



## اثر دو نوع تمرين (تمرين تداومي و تناوبی) بر بيان ژن های PP2Ac و NF-κB بافت قلب رت های مدل ديا بتی

مریم ابراهیمی: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علی آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی آباد کتول، ایران.

حبيب اصغرپور: استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علی آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی آباد کتول، ایران (\* نویسنده مسئول)

Dr.habibasgharpour@aliabadiau.ac.ir

رضاء رضایی شیرازی: استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی واحد علی آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی آباد کتول، ایران

پروین فرزانگی: دانشیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه ها

تمرينات تداومي و تناوبی،

كارديوميوپاتي ديا بتی،

NF-κB سيگنالينگ

**زمينه و هدف:** با توجه به افزایش ه شداردهنده بيماري های متابوليكي در سرا سر جهان به طور مثال، چاقی و ديا بتی که عوارض قلبي آن به عنوان يك منبع مهم بيماري های قلبي در نظر گرفته شده است، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر دو نوع تمرين (تمرين تداومي و تناوبی) بر بيان ژن های PP2Ac و NF-κB بافت قلب رت های مدل ديا بتی می باشد.

**روش کار:** بدین منظور ۴۰ سرموش صحرائي نر نژاد ويستار در ۵ گروه بصورت تصادفي تقسيم بندی شدند که شامل ۱) گروه كنترل سالم، ۲) گروه كنترل ديا بتی، ۳) گروه ديا بتی + تمرين تداومي، ۴) گروه ديا بتی + تمرين تناوبی، و ۵) گروه ساليں بود. در ابتدا مدل ديا بتی القاء، سپس رت های گروه های تمرينی دو نوع تمرين تداومي و تناوبی را ۵ روز در هفته و به مدت ۸ هفته اجرا نمودند. پس از اتمام دوره تمرينی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرينی با ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتايی شبانه با تزريرق درون صفاقی ترکيبی از کتامین و زايلازين رت ها بی هوش شدند و نمونه گيری بافتی انجام شد. آناليز آزمایشگاهی سطوح ژن PP2Ac و NF-κB بافت قلب با استفاده از کيت های تجاري و پژوه و با روش Real-time PCR تعیین شد. تجزيه و تحليل داده ها با استفاده از آزمون آليلز واريанс يك راهه انجام شد.

**يافته ها:** القای ديا بتی منجر به کاهش معنی دار بيان ژن PP2Ac بافت قلب رت ها شد، که انجام تمرين تناوبی و تداومي منجر به افزایش بيان ژن PP2Ac بافت قلب رت های ديا بتی نسبت به گروه كنترل ديا بتی گردید. همچنان القای ديا بتی منجر به افزایش معنی دار بيان ژن NF-κB بافت قلب رت ها شد، که انجام تمرين تناوبی و تداومي منجر به کاهش بيان ژن NF-κB بافت قلب رت های ديا بتی نسبت به گروه كنترل ديا بتی گردید.

**نتيجه گيري:** اين احتمال وجود دارد که فعالیت ورزشی منظم بتواند از طریق افزایش ژن PP2Ac و مهار سیگنالینگ - NF-κB از توسعه کارديوميوپاتي که در اثر القای ديا بت به وجود آمد جلوگيری نماید و داراي اثر حفاظتی بر قلب باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منع حمایت کننده: حامي مالي ندارد.

### شيوه استناد به اين مقاله:

Ebrahimi M, Asgharpour H, Rezaei-Shirazi R, Farzanegi P. The Effect of Two Types of Exercise (Continuous and Intermittent) on the Expression of PP2Ac and NF-κB Genes in the Heart Tissue of Diabetic Rats. Razi J Med Sci. 2023;30(4): 14-23.

\* انتشار اين مقاله به صورت دسترسى آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

## The Effect of Two Types of Exercise (Continuous and Intermittent) on the Expression of PP2Ac and NF-κB Genes in the Heart Tissue of Diabetic Rats

**Maryam Ebrahimi:** PhD Student, Department of physical Education & Sports Sciences, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran

**Habib Asgharpour:** Assistant Professor, Department of Physical Education & Sports Sciences, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran (\* Corresponding author) Dr.habibasgharpour@aliabadiau.ac.ir

**Reza Rezaei-Shirazi:** Assistant Professor, Department of Physical Education & Sports Sciences, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran

**Parvin Farzanegi:** Associated Professor, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** Diabetes as a chronic disease significantly contributes to the spread of physical injuries, mortality and health costs, especially as a cardiovascular risk factor it plays a significant role in mortality (1). Diabetic cardiomyopathy (DCM) is one of the most common complications in diabetic patients and often occurs independently of coronary artery disease, hypertension, or other cardiovascular disease (3). Studies have also shown that inhibition of cardiomyocyte apoptosis improves heart function in diabetic rats (8). Thus, inhibiting apoptosis is a potential therapeutic strategy for DCM. Continuous activation of the NF-κB signaling pathway causes apoptosis in high-glucose cultured cardiomyocytes (7, 9) and inhibition of this pathway improves cardiac dysfunction in diabetic rats (7). Therefore, targeted inhibition of continuous activation of NF-κB signaling may effectively treat DCM.

In recent years, exercise has been used as a non-pharmacological strategy to control diabetes and its complications (11, 12). The aim of this study was to investigate the effect of two types of exercise (continuous and intermittent) on the expression of PP2Ac and NF-κB genes in the heart tissue of diabetic model rats.

**Methods:** In experimental research, 40 male Wistar rats were randomly divided into 5 groups, including 1) healthy control, 2) diabetic control, 3) diabetic + continuous training, 4) diabetic + periodic training, and 5) Saline group.

After grouping the mice, streptozotocin (STZ) at a dose of 50 mg / kg body weight was used to make the mice diabetic, which was injected intraperitoneally to ensure that the mice were diabetic from the corner of the eye. Blood samples were taken and the glucose level, which was considered higher than 126 mg / dL, was considered.

The rats of the exercise groups performed two types of continuous and intermittent exercise 5 days a week for 8 weeks. In a continuous exercise program, rats start running on a treadmill for 15 minutes at 15 meters per minute for the first week. Then the running time was increased every week by increasing the speed from 1 to 2 meters per minute for 1 to 2 minutes. In the fourth week, the speed reached 20 meters per minute and the running time reached 13 to 14 minutes, and in the eighth week, the running speed reached 28 to 29 meters per minute and the duration was 21 to 22 minutes. On the other hand, the periodic training program consisted of six sets of 2.5 minutes, with a break of four minutes between each set. It should be noted that periodic exercise was performed for 5 sessions per week. Control mice also spent eight weeks without any training.

At the end of the training period, 48 hours after the last training session, with 10 to 12 hours of night fasting, the rats were anesthetized by intraperitoneal injection of a combination of ketamine and xylazine and tissue sampling was performed. Laboratory

### Keywords

Continuous and  
intermittent exercise,  
Diabetic  
cardiomyopathy,  
NF-κB signaling

Received: 08/04/2023

Published: 10/06/2023

analysis of PP2Ac and NF-κB gene levels of cardiac tissue was determined using special commercial kits by real-time PCR.

Descriptive statistics were used to classify the data obtained from this study. Shapiro-vilk test was used to determine the normality of data distribution. One-way analysis of variance was used to determine the significance of the difference between the variables and the interaction between them, and if the data were significant, the Tukey post hoc test was used to determine the location of the difference. Findings were evaluated at 95% confidence level ( $P \leq 0.05$ )

**Results:** Induction of diabetes significantly reduced the expression of PP2Ac gene in rat heart tissue, which periodic and continuous exercise increased the expression of PP2Ac gene in heart tissue of diabetic rats compared to the diabetic control group. There was a significant increase in the expression of NF-κB gene in the heart tissue of rats, which periodic and continuous exercise led to a decrease in the expression of the NF-κB gene in the heart tissue of diabetic rats compared to the diabetic control group.

**Conclusion:** Hyperglycemia is one of the complications of diabetes that activates NF-κB by increasing the formation of ROS and AGE (18). Also, increased levels of interleukins and cytokines such as TNF-α and IL-1β in response to NF-κB activation exacerbate neuropathy and increase pain sensitivity in diabetic neuropathy (15), so the use of factors that can inhibit their production or activation, They may delay or stop the effects of diabetes. Therefore, in this study, increasing the expression of NF-κB gene in the heart tissue of diabetic rats may induce apoptosis and the development of cardiomyopathy. Continuous and intermittent exercise reduced NF-κB gene expression in diabetic heart tissue that may prevent the progression of cardiomyopathy. In line with this study, Taghiabadi et al. (2019) reported a decrease in NF-κB gene expression in the cardiac tissue of rats with hyperglycemia after 8 weeks of aerobic exercise (10). Also, one round of aerobic exercise reduced the expression and activity of NF-κB in skeletal muscle (19) and lung tissue (20) of diabetic rats. The decrease in NF-κB gene expression appears to be due to a decrease in HMGB1, AGEs, and NADPH oxidase following exercise. It has been shown that under the influence of aerobic exercise, the activity of NADPH oxidase enzyme in the heart tissue of diabetic rats (21) and the amount of AGEs in the bloodstream of elderly mice (22) are reduced. On the other hand, the reduction of HMGB1 protein has been confirmed following exercise (10, 23). Studies show that HMGB1 and AGEs activate NF-κB in different tissues of diabetic patients by binding to their receptors through different pathways (24). Cheng et al. Showed that PP2A activity participated in diabetic cardiomyocytes due to anti-apoptotic and anti-inflammatory activity of regular exercise (26). In the present study, regular intermittent and continuous exercise partially compensated for the decrease in PP2A content due to diabetes induction and brought it closer to the PP2Ac level of healthy mice. It is possible that physical activity in this way inhibits NF-κB signaling and prevents the progression of diabetes-induced cardiomyopathy. Due to the induction of diabetes, the expression of NF-κB gene and the expression of PP2Ac gene in heart tissue increased and decreased significantly, respectively. Therefore, it is possible that regular exercise can prevent the development of cardiomyopathy caused by diabetes induction by increasing the PP2Ac gene and inhibiting NF-κB signaling, and has a protective effect on the heart.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Ebrahimi M, Asgharpour H, Rezaei-Shirazi R, Farzanegi P. The Effect of Two Types of Exercise (Continuous and Intermittent) on the Expression of PP2Ac and NF-κB Genes in the Heart Tissue of Diabetic Rats. Razi J Med Sci. 2023;30(4): 14-23.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

در سال‌های اخیر، از تمرینات ورزشی به عنوان یک استراتژی غیرداروئی برای کنترل دیابت و عوارض ناشی از آن استفاده شده است (۱۰، ۹). تمرینات ورزشی با کاهش ترشح سایتوکاین‌های التهابی و افزایش ترشح سایتوکاین‌های ضدالتهابی در کنترل بیماری‌های مرتبط با التهاب نظیر دیابت، نقش اساسی دارند (۱۱). توانبخشی قلبی ناشی از فعالیت ورزشی برای پیشگیری ثانویه از بیماری عروقی کرونر یک مداخله غیرداروئی مؤثر و شناخته شده می‌باشد. تمرین منظم ورزشی باعث بهبود عملکرد قلب در افراد مسن از طریق افزایش کسر تخلیه، برونده قلبی و شاخص قلبی می‌شود (۱). اثر محافظت قلبی فعالیت ورزشی نه تنها عملکرد قلبی را بهبود می‌بخشد بلکه هم‌چنین به عنوان جایگزینی برای بهبود متابولیسم و عملکرد میتوکندری عمل می‌کند (۱۲).

ون لیو (Hung-Wen Liu) و همکاران (۲۰۱۸) طی پژوهشی نشان دادند که تمرین ورزشی با شدت متوسط با توقف سیگنالینگ NF- $\kappa$ B، آتروفی عضله در موش‌های دیابتی را کاهش می‌دهد (۱۳). هم‌چنین یا نگ شون و نگ (Shawn Yongshun Wang) و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که تمرینات ورزشی از طریق بهبود اختلال عملکرد میتوکندری و حفظ هموستاز انرژی در پیشرفت کاردیومیوپاتی دیابت، عملکرد قلب را بهبود می‌بخشد (۱). با این حال مکانیسم‌های اساسی که فعالیت ورزشی عملکرد قلب را در کاردیومیوپاتی دیابتی بهبود می‌بخشد کاملاً مشخص نیست. لذا این پژوهش بنابراین به بررسی اثر دو نوع تمرین (تداوی و تناوبی) بر بیان ژن‌های PP2Ac و NF- $\kappa$ B بافت قلب رت‌های مدل دیابتی پردازد.

## روش کار

نمونه‌های پژوهش حاضر را موش‌های آزمایشگاهی تشکیل دادند. با توجه به این که آزمودنی‌ها در آزمایشگاه به لحاظ بسیاری از متغیرها تحت کنترل بودند، از این رو پژوهش حاضر از نوع تجربی می‌باشد. در این مطالعه تجربی تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر زیاد ویسی تار در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انتخاب و وارد پژوهش شدند. سپس آن‌ها در ۵ گروه بصورت

## مقدمه

بیماری‌های قلبی‌عروقی رتبه نخست علت مرگ و میر در جهان را به خود اختصاص داده و بیشتر مردم دنیا هر ساله بیشتر از هر علت دیگری جان خود را به علت بیماری‌های قلبی‌عروقی از دست می‌دهند. با توجه به افزایش هشداردهنده بیماری‌های متابولیکی در سراسر جهان به طور مثال، چاقی و دیابت که عوارض قلبی آن به عنوان یک منبع مهم بیماری‌های قلبی در نظر گرفته شده است (۱).

(Diabetic cardiomyopathy) (DCM) یکی از شایع‌ترین عوارض در بیماران دیابتی به شمار می‌رود و اغلب به طور مستقل از از بیماری عروقی کرونر، فشار خون بالا یا سایر بیماری‌های قلبی‌عروقی رخ می‌دهد (۲). در دهه‌های اخیر، شیوع دیابت به طور قابل توجهی افزایش یافته و بیش از نیمی از موارد دیابت با DCM همزمان بوده است (۳). از آنجا که DCM به شیوع بیماری و مرگ‌ومیر کمک می‌کند (۴)، جلوگیری از پیشرفت آن برای درمان آن ضروری است. مطالعات قبلی نشان داد آپوپتوز کاردیومیوسیت نقش اساسی در پاتوزن DCM داشته است (۵). افزایش آپوپتوز کاردیومیوسیت دلیل اصلی از دست دادن بافت انقباضی، بازسازی قلب و در ذهنایت اختلال عملکرد بود (۶). مطالعات هم‌چنین نشان داد که مهار آپوپتوز کاردیومیوسیت باعث بهبود عملکرد قلب ذر موش‌های دیابتی شد (۷). بدین ترتیب مهار آپوپتوز یک استراتژی درمانی بالقوه برای DCM است.

مطالعات اخیر نشان داد که فعال سازی مداوم مسیر سیگنالینگ NF- $\kappa$ B باعث بروز آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌های کشت‌شده در گلوكز بالا می‌شود (۶، ۷) و مهار این مسیر باعث بهبود اختلال عملکرد قلب در رت‌های دیابتی می‌شود (۶). بنابراین، مهار هدفمند فعال سازی مداوم سیگنالینگ NF- $\kappa$ B ممکن است به طور موثر DCM را درمان کند. با این حال سازوکارهای اساسی این فعال سازی مداوم کاملاً شناخته نشده است. در یک مطالعه نشان داده شد سرکوب فعال سازی PP2Ac به فسفوریل‌اسیون  $\alpha$  IKK/I $\kappa$ B $\alpha$  پایدار و متعاقب آن انتقال هسته‌ای NF- $\kappa$ B کمک می‌کند و باعث شروع آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌های تحت درمان با گلوكز بالا می‌شود (۸).

تعداد جلسات تمرین تداومی پنج مرتبه در هر هفته انجام شد. از سویی دیگر برنامه تمرین تناوبی شامل شش سمت ۲/۵ دقیقه ای بود که بین هر سمت مدت زمان چهار دقیقه استراحت در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است تمرین تناوبی برای مدت ۵ جلسه در هفته انجام شد. همچنانی موش‌های گروه کنترل بدون هیچ‌گونه تمرینی هشت هفته را پشت سر گذاشتند.

**نحوه جداسازی نمونه‌های بافتی:** پس از اتمام دوره تمرینی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی با ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتاپی شبانه با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتابتین و زایلازین رت‌ها بی هوش شدند و نمونه‌گیری بافتی انجام شد. بدین ترتیب بافت قلب آنها جدا و در محیط ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به آزمایشگاه برای اندازه گیری متغیرهای PPA2c و NF-κB ارسال شد. بافت با استفاده از یک میلی مول محلول تریزول لیز و با دستگاه همگن کننده بافت، هموزن شد. در مرحله بعد، جداسازی از فاز آبی به کمک ۰/۲۵ میلی لیتر کلروفرم صورت گرفت. RNA استخراج شده با یک میلی لیتر اتانول سرد ۷۰ درصد شستشو و خشک شدند. سپس به آن آب استریل (۱/۵ میکرولیتر بر میلی گرم بافت) اضافه شد. برای سنج کمی RNA استخراج شده از دستگاه بایوفتومر با طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده شد. میانگین OD خوانده شده ۱/۷۷ بود که نشانگر کارایی مناسب RNA استخراج شده است. استخراج cDNA برای هر نمونه سه مرحله ساخت cDNA انجام گرفت. بدین ترتیب که در ابتدا ۸ میکروگرم از RNA استخراج شده را با ۰/۸ آن و آب DEPC خورده مخلوط کرده و حجم نمونه به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. محصول ایجاد شده را بدون ورتكس کردن و به آرامی مخلوط کرده و سپس با برنامه‌ریز در دستگاه ترموسایکر انکوبه شد: ۵ دقیقه در ۵۵ درجه سانتیگراد، ۱۵ دقیقه در مای ۲۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ دقیقه در مای ۴۲ درجه سانتیگراد، ۵ دقیقه در مای ۹۵ درجه سانتیگراد. پس از اتحام مراحل ترموسایکلر ۲۸۰ میکرولیتر آب تزریقی اضافه شد و برای استفاده در QPCR در مای ۲۰- درجه

تصادفی تقسیم بندی شدند که شامل ۱) گروه کنترل سالم، ۲) گروه کنترل دیابتی، ۳) گروه دیابتی + تمرین تداومی، ۴) گروه دیابتی + تمرین تناوبی، و ۵) گروه سالین بود. این مطالعه توسط کمیته اخلاق کار با حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تأیید شد.

**محیط پژوهش و تغذیه آزمودنی‌ها:** پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه در قفس هایی از جنس پلی کربنات، دمای ۲  $\pm$  ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵  $\pm$  ۵۵ درصد و چرخه رو شنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ با تهويه مناسب قرار گرفتند. آزمودنی‌ها دارای چیره غذایی پر چرب به روش Zou و همکاران داشتند که امولسیون هر روز صبح به میزان ۱۰ میلی لیتر به ازاء هر کیلو گرم وزن بدن به صورت گاواظ دریافت کرد. در تمام مراحل پژوهش، آب مورد نیاز حیوان به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در دسترس آنها بود.

**نحوه دیابتی کردن رت‌ها:** پس از گروه بندی موش‌ها برای دیابتی کردن موش‌ها از داروی استرپیوزوتوسین (STZ) با دوز ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد که به صورت درون صفاقی به آن‌ها تزریق شد و برای اطمینان از دیابتی بودن موش‌ها از گوش چشم نمونه‌های خونی تهیه شد و میزان گلوكز سنجش، که بالاتر از ۱۲۶ میلی گرم بر دسی لیتر در نظر گرفته شد.

**پروتکل تمرین ورزشی:** قبل از شروع پروتکل اصلی، برای آشنایی از فعالیت، موش‌ها به مدت یک هفته با تواتر پنج جلسه و به مدت پنج دقیقه با سرعت ۸ تا ۱۰ متر بر دقیقه با شبیه صفر از تردمیل استفاده شد. برنامه تمرینی شامل دو پروتکل تمرین تداومی و تناوبی بود. برنامه تمرین تداومی هفته اول با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه برای مدت زمان پنج دقیقه شروع به دویدن روی تردمیل کرد. سپس هر هفته با افزایش سرعت ۱ تا ۲ متر بر دقیقه به مدت ۱ تا ۲ دقیقه بر زمان دویدن افزده شد. به طوری که در هفته چهارم سرعت به ۲۰ متر بر دقیقه و زمان دویدن به ۱۳ تا ۱۴ دقیقه رسید و در هفته هشتم سرعت دویدن به ۲۸ تا ۲۹ متر بر دقیقه و مدت زمان ۲۲ تا ۲۱ دقیقه رسید.

۵. دماستنج (جهت تنظیم دمای محیط آزمایشگاه).  
 ۶. لوله آزمایشگاهی، ارلن، استن، الکل، دستکش جراحی (لاتکس)، سرنگ دو و نیم و پنج سی سی، سینی تشریح، پنبه و ...

**روش تجزیه و تحلیل داده ها:** جهت طبقه بندی داده های حاصل از این پژوهش، از آمار توصیفی استفاده شد. جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرورویلک استفاده گردید. جهت تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیرها و تعامل بین آنها از تحلیل واریانس یک طرفه و در صورت معنی دار بودن داده ها برای تعیین محل تفاوت از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. یافته ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P \leq 0.05$ ) بررسی شدند و برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها نیز از نرم افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۰ استفاده گردید. تمامی داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند.

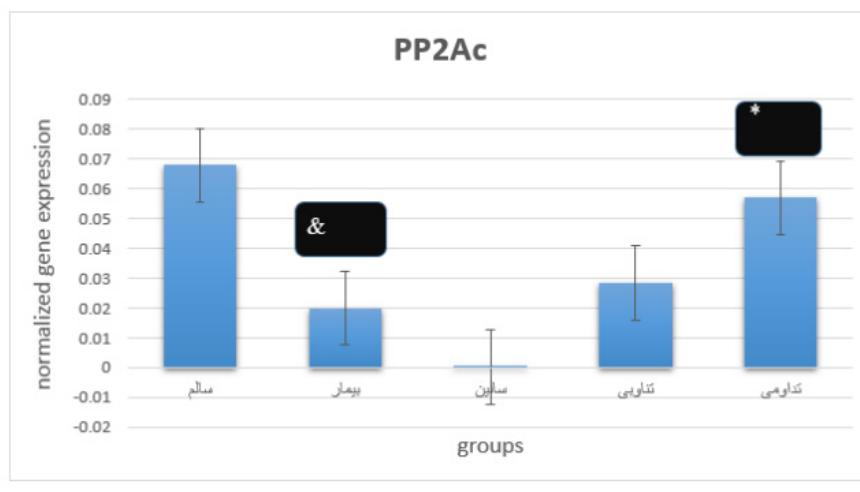
### یافته ها

القای دیابت سبب کاهش معنی دار (۷۰/۸۳۹٪) بیان ژن PP2Ac بافت قلب نسبت به گروه کنترل سالم شد ( $P=0.000$ ) که انجام تمرینات تداومی ( $P=0.009$ ) و تناوبی ( $P=0.984$ ) سبب افزایش این ژن در بافت قلب نسبت به رت های گروه کنترل دیابت شد که این افزایش در گروه تمرین تداومی معنی دار بود، انجام تمرینات

سانتیگراد نگهداری شدند. برای هر نمونه cDNA نیز، یک نمونه کنترل مثبت با پرایمر b2m به عنوان کنترل داخلی، برای آزمون حضور cDNA تهیه شد. نمونه ها به آرامی و بدون ورتكس مخلوط شده و در دستگاه RT-PCR با برنامه ریز PCR قرار گرفتند. ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد، واکنش از مرحله دوم به بعد، برای ۴۰ سیکل تکرار شد. مربوط به واکنش ها توسط نرم افزار دستگاه Cts PCR استخراج و در نهایت CT Mean سه مرتبه ثبت شد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول آورده شده است. کمی سازی مقادیر بیان ژن هدف مورد نظر از فرمول ۲ به توان منفی  $\Delta\Delta CT$  استفاده شد.

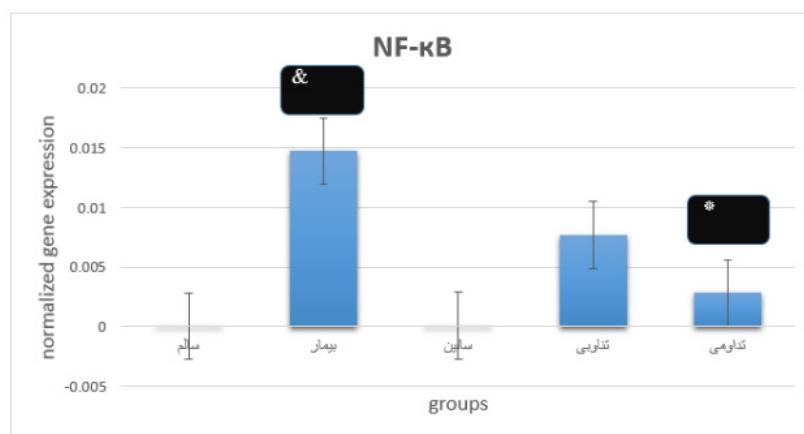
### ابزار اندازه گیری

۱. ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی جهت وزن نمودن آزمودنی ها با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم.
۲. ترمیل مخصوص حیوانات آزمایشگاهی (موش صحرای) ساخت ایران
۳. وسایل جراحی (تیغ کارپل، قیچی، پنس و ...).
۴. تایمر (جهت تنظیم تاریکی و روشنایی محیط آزمایشگاه).



\*تغییرات معنی دار نسبت به گروه بیمار & تغییرات معنی دار نسبت به گروه سالم

**نمودار ۱** - مقایسه میانگین سطوح PP2AC در گروههای مختلف پژوهش



\*تغییرات معنی دار نسبت به گروه سالم & تغییرات معنی دار نسبت به گروه سالم

#### نمودار ۲ - مقایسه میانگین سطوح NF-κB در گروههای مختلف پژوهش

این کاهش در گروه تمرین تداومی معنی دار بود و به مقادیر گروه کنترل سالم نزدیکتر بود. NF-κB جزو فاکتور رونویسی هسته‌ای است که کدگذاری ژن‌های مختلف از جمله فاکتورهای التهابی را کنترل می‌کند (۱۴). فعال شدن NF-κB نقش مهمی را در فرایندهای التهابی، پاسخ‌های ایمنی و مرگ سلولی به واسطه اتصال به پرومотор ژن‌های مختلف مانند TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$  و سیکلواکسیژنаз ۲ بازی می‌کند (۱۵). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که در پی نوروپاتی دیابتی در مدل‌های آزمایشی سطح فاکتورهای آپوپتوزی از جمله NF-κB در بافت عصبی افزایش می‌یابد (۱۶). در رت‌های دیابتی شده بیان NF-κB در گانگلیون ریشه پشتی افزایش می‌یابد که همراه با نوروپاتی محیطی است (۱۷). هایپرگلایسمی یکی از عوارض دیابت است که با افزایش تشکیل ROS و AGE (Advanced glycation end-products) سبب فعال‌سازی NF-κB می‌شود (۱۸). همچنین افزایش سطح اینترلوکین‌ها و سایتوکاین‌هایی مانند TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$  در پاسخ به فعال‌سازی NF-κB سبب تشدید نوروپاتی و افزایش حساسیت به درد در نوروپاتی دیابتی می‌شود (۱۵)، بنابراین بکارگیری عواملی که می‌تواند تولید یا فعال‌سازی آن‌ها را مهار کند، ممکن است سبب تأخیر یا توقف عوارض ناشی از دیابت شوند. لذا در این پژوهش افزایش بیان ژن NF-κB بافت قلب رت‌های دیابتی

تمداومی اثر بهتری نسبت به تمرینات تناوبی در افزایش این ژن داشت و مقادیر بیان ژن در گروه تداومی به مقادیر گروه کنترل سالم نزدیکتر بود (نمودار ۱). همچنین در مورد بیان ژن NF-κB بافت قلب رت‌ها، با القای دیابت بیان این ژن نسبت به گروه کنترل سالم افزایش (۹۹/۷۹٪) معنی داری داشت ( $P=0/000$ ). گروه تمرینات تداومی ( $P=0/046$ ) و تمرینات تناوبی ( $P=0/087$ ) باعث کاهش این ژن نسبت به گروه کنترل دیابتی شدند. که این کاهش فقط در گروه تمرین تداومی معنی دار بود. در مورد این ژن نیز اثر تمرین تداومی بهتر از تمرین تناوبی بود (نمودار ۲).

#### بحث

القای دیابت منجر به کاهش معنی دار بیان ژن PP2Ac بافت قلب رت‌ها نسبت به گروه کنترل سالم شد، که انجام تمرین تناوبی و تداومی منجر به افزایش بیان ژن PP2Ac بافت قلب رت‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی گردید، که این افزایش در گروه تمرین تداومی معنی دار بود. همچنین القای دیابت منجر به سالم نزدیکتر بود. همچنین افزایش سطح NF-κB بافت قلب رت‌ها نسبت به گروه کنترل سالم شد، که انجام تمرین تناوبی و تداومی منجر به کاهش بیان ژن NF-κB بافت قلب رت‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی گردید، که

سیگنالینگ NF-κB شده و از پیشرفت کاردیومیوپاتی ناشی از دیابت جلوگیری نماید. PP2A یک پروتئین ضدالتهابی و ضدسرطان قوی در سلول‌های پستانداران است (۲۷). گزارش شده است که PP2A باعث مهارشدن فعالیت مسیر سیگنالینگ NF-κB با کاتالیز کردن دفسفوریلاسیون IjBa، IKK و P56، در نتیجه کاهش در ورود هسته‌ای زیرواحد های NF-κB و فعالیت رونویسی آن‌ها می‌شود (۲۸). فعالسازی NF-κB، آسیب بافت و عملکرد بد با تقویت التهاب را کامل می‌کند، و مهار این مسیر سیگنالینگ پیش‌التهابی باعث بهبود کاردیومیوپاتی دیابتی می‌شود (۳۲-۳۹). فعالیت PP2A در سلول‌ها توسط تغییرات پس از ترجمه و تعامل با دیگر مولکول‌های پروتئین تنظیم می‌شود. فسفوریلاسیون Tyr307 روی PP2Ac مرتبط با کینازهای تیروزین منجر به کاهش در فعالیت PP2A می‌شود (۳۳)، که همچنین توسط تعامل PP2A با MID1 و a4 هدایت می‌شود (۳۴). در تحقیقی، تحریک گلوکز بالا به طور معنی‌داری فسفوریلاسیون PP2A را در کاردیومیو سیت‌های اولیه رت در شرایط آزمایشگاهی افزایش داد که مشابه بود با آن‌چه رن (Ren) و همکاران گزارش کرده بودند (۳۱). ما همچنین دریافتیم که فعالیت‌بدنی باعث مهار افزایش PP2A ناشی از هایپرگلایسمی شد. به عنوان نتایج تنظیم PP2A، فعالیت‌بدنی به طور معنی‌داری افزایش فعالسازی NF-κB ایجاد شده در اثر هایپرگلایسمی را در کاردیومیوسیت‌های رت کاهش داد. فعالسازی مسیر سیگنالینگ NF-κB در کاردیومیوسیت‌های دیابتی همچنین در پژوهش‌های قبلی گزارش شده است (۲۶، ۳۱، ۳۶، ۳۷). چنگ (Cheng) و همکاران کاهش تولید ROS میتوکندریایی در کاردیومیوسیت‌های تحریک‌شده با گلوکز بالا را در یک رفتار وابسته به فعالیت PP2A را نشان دادند. هم ابتدا اکسیداتیو و هم فعالسازی NF-κB ناشی از ROS در مرگ سلول میوکاردیل ناشی از هایپرگلایسمی نقش دارند (۲۶، ۳۶).

### نتیجه‌گیری

در اثر القا دیابت بیان ژن NF-κB و بیان ژن

ممکن است سبب القای آپوپتوز و توسعه کاردیومیوپاتی گردد. انجام تمرینات تناوبی و تداوبی بیان ژن NF-κB بافت قلب رت‌های دیابتی را کاهش داد که ممکن است از این طریق از پیشرفت کاردیومیوپاتی جلوگیری نماید. هم‌راستا با این مطالعه تقی‌آبادی و همکاران (۲۰۱۹) کاهش میزان بیان ژن NF-κB در بافت قلبی رت‌های دارای هایپرگلایسمی در پی ۸ هفته تمرین هوایی را گزارش کردند (۱۰). هم‌چنان، یک دوره تمرین هوایی باعث کاهش بیان و میزان فعالیت NF-κB در عضلات اسکلتی (۱۹) و بافت ریهی (۲۰) موش‌های صحرایی دیابتی گردید. به‌نظر می‌رسد کاهش مشاهده شده در بیان ژن NF-κB مربوط به کاهش HMGB1، AGEها و آنزیم NADPH اکسیداز به دنبال تمرینات ورزشی باشد. مشخص شده است که تحت تأثیر فعالیت‌های ورزشی هوایی میزان فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز در بافت قلبی رت‌های دیابتی (۲۱) و میزان AGEها نیز در گردهش خون موش‌های مسن (۲۲) کاهش می‌یابد. از طرفی کاهش پروتئین HMGB1 نیز به‌دبال تمرینات ورزشی مورد تأیید قرار گرفته است (۱۰، ۲۳). بررسی‌ها نشان می‌دهد که AGE و HMGB1 با اتصال به گیرنده‌های خود از طریق مسیرهای مختلف بیماران دیابتی فعالسازی NF-κB در بافت‌های مختلف بیماران دیابتی می‌شوند (۲۴). همین‌طور، نقش NADPH اکسیداز از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال در ترشح و انتقال هسته‌ای NF-κB مشخص شده است (۲۵). از این‌رو، به‌نظر می‌رسد کاهش موارد مذکور به‌دبال تمرینات ورزشی، در کاهش میزان بیان ژن NF-κB تأثیرگذار باشند.

چنگ (Cheng) و همکاران نشان دادند که فعالیت PP2A در اثر ضدآپوپتوز و ضدالتهاب فعالیت ورزشی منظم روی کاردیومیوسیت‌های دیابت شرکت کرد (۲۶). در پژوهش حاضر نیز تمرینات تناوبی و تداومی منظم کاهش به وجود آمده در محتوای PP2A در اثر القا دیابت را تا حدودی جیران و به سطح PP2Ac موش‌های سالم نزدیک کرد، البته تمرین تداومی دارای نتیجه بهتری نسبت به تمرینات تناوبی بود. این احتمال وجود دارد که فعالیت بدنی از این طریق منجر به مهار

development of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 2014; 63(10): 3497±3511.

7. Chen SL, Hu ZY, Zuo GF, Li MH, Li B. I(f) current channel inhibitor (ivabradine) deserves cardioprotective effect via down-regulating the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and attenuating apoptosis in diabetic mice. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014; 14:150.

8. Nizamutdinova IT, Guleria RS, Singh AB, Kendall JA Jr., Baker KM, Pan J. Retinoic acid protects cardiomyocytes from high glucose-induced apoptosis through inhibition of NF-kappaB signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2013; 228(2):380±392.

9. Sharma A, Tate M, Mathew G, Vince JE, Ritchie RH and de Haan JB. Oxidative Stress and NLRP3-Inflammasome Activity as Significant Drivers of Diabetic Cardiovascular Complications: Therapeutic Implications. *Front. Physiol*. (2018). 9:114.

10. Taghibeigi Hoseinabadi H, Esfarjani F, Marandi SM, Karami H. Effects of Eight Weeks of Aerobic Training on Expression Levels of the HMGB1-RAGE/TLR4-NF- $\kappa$ B Proinflammatory Pathway in Cardiac Tissue of Male Rats with Hyperglycemia. *291/Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. Vol 20 No.5 December-January 2019.

11. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 607-15.

12. Seo DY, Lee SR, Kim N, Ko KS, Rhee BD, Han J. Aged garlic extract enhances exercise-mediated improvement of metabolic parameters in high fat diet-induced obese rats. *Nutr Res Pract*. (2012). 6(6):513-519.

13. Hung-Wen Liu, Sue-Joan Chang. Moderate Exercise Suppresses NF- $\kappa$ B Signaling and Activates the SIRT1-AMPK-PGC1a Axis to Attenuate Muscle Loss in Diabetic db/db Mice. *Frontiers in Physiology*. May 2018, Volume 9, Article 636.

14. Amirpour-najafabadi B, Gholami M, Zarie P, Sirvan Hossieni, Mehdi Sadegh. Effect of sodium valproate on adjusting increased hippocampal levels of NF-KB, S100B and GFAP following alloxan induced diabetes. *SJKU*.2018;23(4):78-87.

15. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, et al. Neuroinflammation induces neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine* 2016; 1: 1003.

16. Jia D, Heng LJ, Yang RH, Gao GD. Fish oil improves learning impairments of diabetic rats by blocking PI3K/AKT/nuclear factor-kappaB-mediated inflammatory pathways. *Neuroscience* 2014; 258: 228-37.

PP2Ac بافت قلب به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری یافته‌ند، که انجام تمرینات تداومی و تناوبی این روند را بر عکس و به سطح بیان ژن گروه کنترل سالم نزدیک کرد. لذا این احتمال وجود دارد که فعالیت ورزشی منظم بتواند از طریق افزایش ژن Ac و مهار سیگنالینگ NF- $\kappa$ B از توسعه کار迪ومیوپاتی که در اثر الای ۱ دیابت به وجود آمد جلوگیری نماید و دارای اثر حفاظتی بر قلب باشد.

## تقدیر و تشکر

این تحقیق در قالب رساله دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری با کد اخلاقی IR.IAU.SARI.REC.1402.040 نویسنده‌گان تشکر و قدردانی خود را از این واحد دانشگاهی اعلام می‌دارند.

## References

1. Shawn Yongshun Wang, Siyu Zhu4 & Jian Wu, Maomao Zhang, Yousheng Xu, Wei Xu, Jinjin Cui, Bo Yu, Wei Cao, Jingjin Liu, Exercise enhances cardiac function by improving mitochondrial dysfunction and maintaining energy homoeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy. *Journal of Molecular Medicine*. 2020/10.1007/s00109-019-01861-2.
2. Ouyang C, You J, Xie Z. The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2014; 71:71±80.
3. Somaratne JB, Whalley GA, Poppe KK, ter Bals MM, Wadams G, Pearl A, et al. Screening for left ventricular hypertrophy in patients with type 2 diabetes mellitus in the community. *Cardiovasc Diabetol*. 2011; 10:29.
4. Bertoni AG, Tsai A, Kasper EK, Brancati FL. Diabetes and idiopathic cardiomyopathy: a nationwide case-control study. *Diabetes Care*. 2003; 26(10):2791±2795.
5. Cai L, Kang YJ. Cell death and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol*. 2003; 3(3):219±228.
6. Pan Y, Wang Y, Zhao Y, Peng K, Li W, Wang Y, et al. Inhibition of JNK phosphorylation by a novel curcumin analog prevents high glucose-induced inflammation and apoptosis in cardiomyocytes and the

17. Zhang HH, Hu J, Zhou YL, Qin X, Song ZY, Yang PP, et al. Promoted interaction of nuclear factor- $\kappa$ B with demethylated purinergic P2X3 receptor gene contributes to neuropathic pain in rats with diabetes. *Diabetes* 2015; 64: 4272-84.
18. Oyenihu AB, Ayeleso AO, Mukwevho E, Masola B. Antioxidant strategies in the management of diabetic neuropathy. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 515042.
19. Liu HW, Chang S-J. Moderate exercise suppresses NF-WB signaling and activates the SIRT1-AMPK-PGC1a axis to attenuate muscle loss in diabetic db/db mice. *Fron Physiol* 2018; 9: 636.
20. Fashi M, Agha-Alinejad H, Mahabadi HA, Rezaei B, Pakrad BB, Rezaei S. The effects of aerobic exercise on NF-WB and TNF-- in lung tissue of male rat. *Novelty in Biomedicine* 2015; 3: 131-4.
21. Sharma NM, Rabeler B, Zheng H, Raichlin E, Patel KP. Exercise Training Attenuates Upregulation of p47phox and p67phox in Hearts of Diabetic Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 5868913.
22. Gu Q, Wang B, Zhang XF, Ma YP, Liu JD, Wang XZ. Contribution of receptor for advanced glycation end products to vasculature-protecting effects of exercise training in aged rats. *Eur J Pharmacol* 2014; 741: 186- 94.
23. Giallauria F, Cirillo P, D'Agostino M, Petrillo G, Vitelli A, Pacileo M, et al. Effects of exercise training on highmobility group box-1 levels after acute myocardial infarction. *J Card Fail* 2011; 17: 108-14.
24. Wu H, Sheng ZQ, Xie J, Li R, Chen L, Li GN, et al. Reduced HMGB 1-Mediated Pathway and Oxidative Stress in Resveratrol-Treated Diabetic Mice: A Possible Mechanism of Cardioprotection of Resveratrol in Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 9836860.
25. Clark RA, Valente AJ. Nuclear factor kappa B activation by NADPH oxidases. *Mech Ageing Dev* 2004; 125: 799-810.
26. Cheng G, Li L. High-glucose-induced apoptosis, ROS production and pro-inflammatory response in cardiomyocytes is attenuated by metformin treatment via PP2A activation. *J Biosci* (2020) 45:126.
27. Enjoji S and Ohama T 2017 [The role of protein phosphatase 2A in inflammation and cancer]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 149 208–212
28. Nakajima S and Kitamura M 2013 Bidirectional regulation of NF- $\kappa$ B by reactive oxygen species: a role of unfolded protein response. *Free Radic. Biol. Med.* 65 162–174.
29. Guo X, Xue M, Li CJ, Yang W, Wang SS, Ma ZJ, Zhang XN, Wang XY, Zhao R, Chang BC and Chen LM. Protective effects of triptolide on TLR4 mediated autoimmune and inflammatory response induced myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *J. Ethnopharmacol.* 2016. 193 333–344.
30. Liao HH, Zhu JX, Feng H, Ni J, Zhang N, Chen S, Liu HJ, Yang Z, Deng Wand Tang QZ 2017 Myricetin Possesses Potential Protective Effects on Diabetic Cardiomyopathy through Inhibiting IjBa/NF $\kappa$ B and Enhancing Nrf2/HO-1. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017 8370593.
31. Ren XM, Zuo GF, Wu W, Luo J, Ye P, Chen SL and Hu ZY. Atorvastatin alleviates experimental diabetic cardiomyopathy by regulating the GSK-3b-PP2Ac-NF- $\kappa$ B signaling axis. *PLoS One.* 2016. 11 e0166740.
32. Thomas CM, Yong QC, Rosa RM, Seqqat R, Gopal S, Casarini DE, Jones WK, Gupta S, Baker KM and Kumar R. Cardiac-specific suppression of NF- $\kappa$ B signaling prevents diabetic cardiomyopathy via inhibition of the renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2014. 307 H1036–H1045.
33. Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K and Batra SK. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett.* 2013. 335 9–18.
34. Du H, Huang Y, Zaghlula M, Walters E, Cox TC and Massiah MA. The MID1 E3 ligase catalyzes the polyubiquitination of Alpha4 (a4), a regulatory subunit of protein phosphatase 2A (PP2A): novel insights into MID1-mediated regulation of PP2A. *J. Biol. Chem.* 2013, 288 21341–21350
35. Du H, Wu K, Didorokute A, Levy MV, Todi N, Shchelokova A and Massiah MA. MID1 catalyzes the ubiquitination of protein phosphatase 2A and mutations within its Bbox1 domain disrupt polyubiquitination of alpha4 but not of PP2Ac. *PLoS One.* 2014. 9 e107428.
36. Zhong P, Wu L, Qian Y, Fang Q, Liang D, Wang J, Zeng C, Wang Y and Liang G. Blockage of ROS and NF- $\kappa$ B-mediated inflammation by a new chalcone L6H9 protects cardiomyocytes from hyperglycemia-induced injuries. *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. 1852 1230–1241.
37. Guo Y, Zhuang X, Huang Z, Zou J, Yang D, Hu X, Du Z, Wang L and Liao X. Klotho protects the heart from hyperglycemia-induced injury by inactivating ROS and NF- $\kappa$ B-mediated inflammation both in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2018. 1864 238–251.