



## اثر دو نوع تمرین (تداومی و تناوبی) بر بیان ژن‌های PP2Ac و NF-κB بافت قلب رت‌های مدل دیابتی

مریم ابراهیمی: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، واحد علی‌آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی‌آباد کتول، ایران.

حبیب اصغری‌پور: استادیار، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، واحد علی‌آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی‌آباد کتول، ایران (\* نویسنده مسئول)

Dr.habibasgharpour@aliabadiu.ac.ir

رضا رضایی‌شیرازی: استادیار، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی واحد علی‌آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی‌آباد کتول، ایران

پروین فرزنانگی: دانشیار، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

تمرینات تداومی و تناوبی،

کاردیومیوپاتی دیابت،

سیگنالینگ NF-κB

**زمینه و هدف:** با توجه به افزایش هشداردهنده بیماری‌های متابولیکی در سراسر جهان به‌طور مثال، چاقی و دیابت که عوارض قلبی آن به‌عنوان یک منبع مهم بیماری‌های قلبی در نظر گرفته شده است، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر دو نوع تمرین (تداومی و تناوبی) بر بیان ژن‌های PP2Ac و NF-κB بافت قلب رت‌های مدل دیابتی می‌باشد.

**روش کار:** بدین منظور ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در ۵ گروه بصورت 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 سالمین بود. در ابتدا مدل دیابت القاء، سپس رت‌های گروه‌های تمرینی دو نوع تمرین تداومی و تناوبی را ۵ روز در هفته و به‌مدت ۸ هفته اجرا نمودند. پس از اتمام دوره تمرینی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی با ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین و زایلازین رت‌ها بی‌هوش شدند و نمونه‌گیری بافتی انجام شد. آنالیز آزمایشگاهی سطوح ژن PP2Ac و NF-κB بافت قلب با استفاده از کیت‌های تجاری ویژه و با روش Real-time PCR تعیین شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک راهه انجام شد.

**یافته‌ها:** القای دیابت منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن PP2Ac بافت قلب رت‌ها شد، که انجام تمرین تناوبی و تداومی منجر به افزایش بیان ژن PP2Ac بافت قلب رت‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی گردید، هم‌چنین القای دیابت منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن NF-κB بافت قلب رت‌ها شد، که انجام تمرین تناوبی و تداومی منجر به کاهش بیان ژن NF-κB بافت قلب رت‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی گردید.

**نتیجه‌گیری:** این احتمال وجود دارد که فعالیت ورزشی منظم بتواند از طریق افزایش ژن PP2Ac و مهار سیگنالینگ NF-κB از توسعه کاردیومیوپاتی که در اثر القای دیابت به‌وجود آمد جلوگیری نماید و دارای اثر حفاظتی بر قلب باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این 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 این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.



Original Article

## The Effect of Two Types of Exercise (Continuous and Intermittent) on the Expression of PP2Ac and NF- $\kappa$ B 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@aliabadiu.ac.ir](mailto:Dr.habibasgharpour@aliabadiu.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- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B signaling

Received: 08/04/2023

Published: 10/06/2023

analysis of PP2Ac and NF- $\kappa$ B 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. Shapirovilk 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- $\kappa$ B gene in the heart tissue of rats, which periodic and continuous exercise led to a decrease in the expression of the NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B by increasing the formation of ROS and AGE (18). Also, increased levels of interleukins and cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in response to NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B gene in the heart tissue of diabetic rats may induce apoptosis and the development of cardiomyopathy. Continuous and intermittent exercise reduced NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B in skeletal muscle (19) and lung tissue (20) of diabetic rats. The decrease in NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B signaling and prevents the progression of diabetes-induced cardiomyopathy. Due to the induction of diabetes, the expression of NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B 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.

## مقدمه

در سال‌های اخیر، از تمرینات ورزشی به‌عنوان یک استراتژی غیردارویی برای کنترل دیابت و عوارض ناشی از آن استفاده شده است (۹، ۱۰). 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 عروق کرونر یک مداخله غیردارویی مؤثر و شناخته‌شده 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 به‌عنوان 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 وانگ (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 بنا دارد به بررسی اثر دو نوع تمرین (تداومی و تناوبی) بر بیان ژن‌های PP2Ac و NF- $\kappa$ B بافت قلب رت‌های مدل دیابتی بپردازد.

## 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 نژاد ویس-تار در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انتخاب و وارد پژوهش شدند. سپس آن‌ها در ۵ گروه بصورت

بیماری‌های قلبی عروقی 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 قلبی عروقی از دست می‌دهند. با توجه به افزایش هشداردهنده بیماری‌های متابولیکی در سراسر جهان به‌طور مثال، چاقی و دیابت که عوارض قلبی آن به‌عنوان یک منبع مهم بیماری‌های قلبی در نظر گرفته شده است (۱).

کاردیومیوپاتی دیابتی (Diabetic cardiomyopathy) (DCM) یکی از شایع‌ترین عوارض در بیماران دیابتی به‌شمار می‌رود و اغلب به‌طور مستقل از بیماری عروق کرونر، فشار خون بالا یا سایر بیماری‌های قلبی عروقی رخ می‌دهد (۲). در دهه‌های اخیر، شیوع دیابت به‌طور 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 قلبی نشان داد آپوپتوز کاردیومیوسیت نقش اساسی در پاتوژنز DCM داشته است (۵). افزایش آپوپتوز کاردیومیوسیت دلیل اصلی از دست دادن بافت انقباضی، بازسازی قلب و در نهایت اختلال عملکرد بود (۶). مطالعات هم‌چنین نشان داد که مهار آپوپتوز کاردیومیوسیت باعث بهبود عملکرد قلب در موش‌های دیابتی شد (۷). بدین ترتیب مهار آپوپتوز یک استراتژی درمانی بالقوه برای DCM است.

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

تعداد جلسات تمرین تناوبی پنج مرتبه در هر هفته انجام شد. از سویی دیگر برنامه تمرین تناوبی شامل شش ست ۲/۵ دقیقه ای بود که بین هر ست مدت زمان چهار دقیقه استراحت در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است تمرین تناوبی برای مدت ۵ جلسه در هفته انجام شد. همچنین 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 ناشتایی شبانه با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین و زایلازین رت‌ها بی‌هوش شدند و نمونه‌گیری بافتی انجام شد. بدین ترتیب بافت قلب آنها جدا و در محیط ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به آزمایشگاه برای اندازه‌گیری متغیرهای PPA2c و NF-κB ارسال شد. بافت با استفاده از یک میلی‌مول محلول تریزول لیز و با دستگاه همگن‌کننده بافت، هموژن شد. در مرحله بعد، جداسازی از فاز آبی به کمک ۰/۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم صورت گرفت. RNA استخراج شده با یک میلی‌لیتر اتانول سرد ۷۰ در صد شستشو و خشک شدند. سپس به آن آب استریل (۱/۵ میکرولیتر بر میلی‌گرم بافت) اضافه شد. برای سنج کمی RNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومر 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 میکرولیتر از آنزیم Dnase I و ۲ میکرولیتر از بافر ۱۰x آن و آب DEPC خورده مخلوط کرده و حجم نمونه به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. محصول ایجاد شده را بدون ورتکس کردن و به آرامی مخلوط کرده و سپس با برنامه‌ریز در دستگاه ترموسایکر انکوبه شد: ۵ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد. پس از اتمام مراحل ترموسایکلر ۲۸۰ میکرولیتر آب تزریقی اضافه شد و برای استفاده در QPCR در دمای ۲۰- درجه

تصادفی تقسیم بندی شدند که شامل (۱) گروه کنترل سالم، (۲) گروه کنترل دیابتی، (۳) گروه دیابتی+ تمرین تناوبی، (۴) گروه دیابتی + تمرین تناوبی، و (۵) گروه سالمین 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 قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات، دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت  $5 \pm 55$  در صد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ به تهبویه مناسب قرار گرفتند. آزمودنی‌ها دارای چیره غذایی پر چرب به روش Zou و همکاران داشتند که امولسیون هر روز صبح به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به ازاء هر کیلو گرم وزن بدن به صورت گاواژ دریافت کرد. در تمام مراحل پژوهش، آب مورد نیاز حیوان به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در دسترس آنها بود.

**نحوه دیابتی کردن رت‌ها:** پس از گروه بندی موش‌ها برای دیابتی کردن موش‌ها از داروی استرپتوزوتوسین (STZ) با دوز ۵۰ میلی‌گرم 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 گوشه چشم نمونه‌های خونی تهیه شد و میزان گلوکز سنجش، که بالاتر از ۱۲۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر 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 شیب صفر از تردمیل استفاده شد. برنامه تمرینی شامل دو پروتکل تمرین تناوبی و تناوبی بود. برنامه تمرین تناوبی 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 افزوده 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 ۲۱ تا ۲۲ دقیقه رسید.

۵. دماسنج (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 داده‌ها:** جهت طبقه‌بندی داده‌های حاصل از این پژوهش، از آمار توصیفی استفاده شد. جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلیک استفاده گردید. جهت تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیرها و تعامل بین آنها از تحلیل واریانس یک طرفه و در صورت معنی‌دار بودن داده‌ها برای تعیین محل تفاوت از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. یافته‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P \leq 0/05$ ) بررسی شدند و برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نیز از نرم افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۰ استفاده گردید. تمامی داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند.

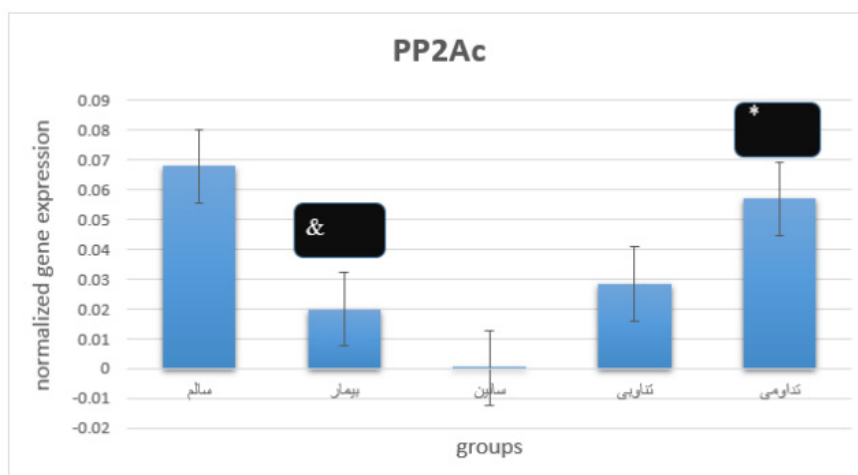
### یافته‌ها

القای دیابت سبب کاهش معنی‌دار ( $P=0/000839$ ) بیان ژن PP2Ac بافت قلب نسبت به گروه کنترل سالم شد ( $P=0/0009$ ) که انجام تمرینات تداومی ( $P=0/0009$ ) و تناوبی ( $P=0/0009$ ) سبب افزایش این ژن در بافت قلب نسبت به رت‌های گروه کنترل دیابت شد که این افزایش در گروه تمرین تداومی معنی‌دار 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. نمونه‌ها به آرامی و بدون ورتکس مخلوط شده و در دستگاه RT-PCR با برنامه ریز PCR قرار گرفتند. ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، واکنش از مرحله دوم به بعد، برای ۴۰ سیکل تکرار شد. Cts مربوط به واکنش‌ها توسط نرم افزار دستگاه RT-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.

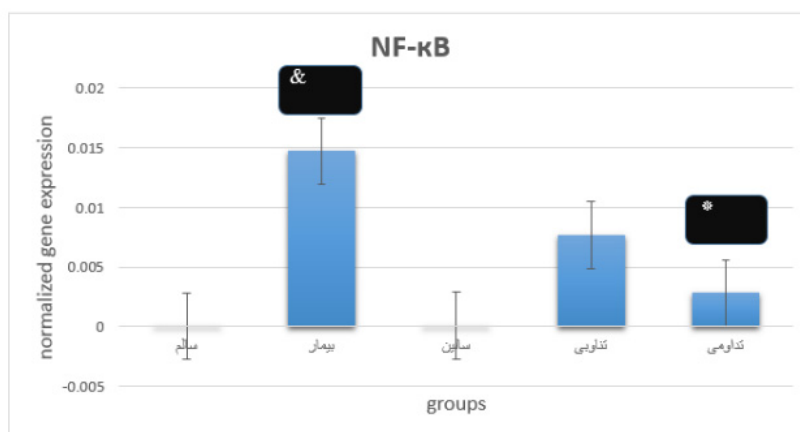
### ابزار اندازه‌گیری

- ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی جهت وزن نمودن آزمودنی‌ها با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم.
- تردمیل مخصوص حیوانات آزمایشگاهی (موش صحرایی) ساخت ایران
- وسایل جراحی (تیغ کارپل، قیچی، پنس و ...).
- تایمر (جهت تنظیم تاریکی و روشنایی محیط آزمایشگاه).



\*تغییرات معنی‌دار نسبت به گروه بیمار & تغییرات معنی‌دار نسبت به گروه سالم

نمودار ۱- مقایسه میانگین سطوح PP2Ac در گروه‌های مختلف پژوهش



\*تغییرات معنی‌دار نسبت به گروه بیمار & تغییرات معنی‌دار نسبت به گروه سالم

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

این کاهش در گروه تمرین مداومی معنی‌دار 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 پروموتور ژن‌های مختلف مانند TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$  و سیکلواکسیژناز 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). هایپرگلیسمی 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

تناوبی اثر بهتری نسبت به تمرینات تناوبی در افزایش این ژن داشت و مقادیر بیان ژن در گروه تناوبی 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٪) معنی‌داری داشت ( $P=0/000$ ). گروه تمرینات مداومی ( $P=0/046$ ) و تمرینات تناوبی ( $P=0/087$ ) باعث کاهش این ژن نسبت به گروه کنترل دیابتی شدند. که این کاهش فقط در گروه تمرین مداومی معنی‌دار بود. در مورد این ژن نیز اثر تمرین مداومی بهتر از تمرین تناوبی بود (نمودار ۲).

## بحث

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

سیگنالینگ NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B با کاتالیز کردن فسفوریلاسیون IKK، IjBa و P56، در نتیجه کاهش در ورود هسته‌ای زیرواحد های NF- $\kappa$ B و فعالیت رونویسی آنها می‌شود (۲۸). فعال‌سازی NF- $\kappa$ B، آسیب بافت و عملکرد بد با تقویت التهاب را کامل می‌کند، و مهار این مسیر سیگنالینگ پیش‌التهابی باعث بهبود کاردیومیوپاتی دیابتی می‌شود (۲۹-۳۲). فعالیت PP2A در سلول‌ها توسط تغییرات پس از ترجمه و تعامل با دیگر مولکول‌های پروتئین تنظیم می‌شود. فسفوریلاسیون Tyr307 روی PP2Ac توسط گیرنده مرتبط با کینازهای تیروزین منجر به کاهش در فعالیت PP2A می‌شود (۳۳)، که هم‌چنین توسط تعامل PP2Ac با MID1 و a4 هدایت می‌شود (۳۴، ۳۵). در تحقیقی، تحریک گلوکز بالا به‌طور معنی‌داری فسفوریلاسیون PP2A را در کاردیومیوسیت‌های 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 هایپرگلیسمی شد. به‌عنوان نتایج تنظیم PP2A، فعالیت‌بدنی به‌طور معنی‌داری افزایش فعال‌سازی NF- $\kappa$ B ایجاد شده در اثر هایپرگلیسمی را در کاردیومیوسیت‌های رت کاهش داد. فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ NF- $\kappa$ B در کاردیومیوسیت‌های دیابتی هم‌چنین در پژوهش‌های قبلی گزارش شده است (۲۶، ۳۱، ۳۶). 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. هم‌استرس اکسیداتیو و هم‌فعال‌سازی NF- $\kappa$ B ناشی از ROS در مرگ سلول میوکاردیل ناشی از هایپرگلیسمی نقش دارند (۲۶، ۳۶، ۳۷).

### نتیجه‌گیری

در اثر القای دیابت بیان ژن NF- $\kappa$ B و بیان ژن

ممکن است سبب القای آپوپتوز و توسعه کاردیومیوپاتی گردد. انجام تمرینات تناوبی و مداومی بیان ژن NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B در بافت قلبی رت‌های دارای هایپرگلیسمی در پی ۸ هفته تمرین هوازی را گزارش کردند (۱۰). هم‌چنین، یک‌دوره تمرین هوازی باعث کاهش بیان و میزان فعالیت NF- $\kappa$ B در عضلات اسکلتی (۱۹) و بافت ریه‌ی (۲۰) موش‌های صحرایی دیابتی گردید. به‌نظر می‌رسد کاهش مشاهده شده در بیان ژن NF- $\kappa$ B مربوط به کاهش AGE، HMGB1 و آنزیم NADPH اکسیداز به دنبال تمرینات ورزشی باشد. مشخص شده است که تحت تأثیر فعالیت‌های ورزشی هوازی میزان فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز در بافت قلبی رت‌های دیابتی (۲۱) و میزان AGE‌ها نیز در گردش خون موش‌های مسن (۲۲) کاهش می‌یابد. از طرفی کاهش پروتئین HMGB1 نیز به دنبال تمرینات ورزشی مورد تأیید قرار گرفته است (۱۰، ۲۳). بررسی‌ها نشان می‌دهد که HMGB1 و AGE‌ها با اتصال به گیرنده‌های خود از طریق مسیرهای مختلف باعث فعال‌سازی NF- $\kappa$ B در بافت‌های مختلف بیماران دیابتی می‌شوند (۲۴). همین‌طور، نقش NADPH اکسیداز از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال در ترشح و انتقال هسته‌ای NF- $\kappa$ B مشخص شده است (۲۵). از این‌رو، به‌نظر می‌رسد کاهش موارد مذکور به دنبال تمرینات ورزشی، در کاهش میزان بیان ژن NF- $\kappa$ B 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 مداومی منظم کاهش به‌وجود آمده در محتوای PP2A در اثر القای دیابت را تا حدودی جبران و به سطح PP2Ac موش‌های سالم نزدیک کرد، البته تمرین مداومی دارای نتیجه بهتری نسبت به تمرینات تناوبی بود. این احتمال وجود دارد که فعالیت‌بدنی 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-kB 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-kB 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 یافتند، که انجام تمرینات تناوبی و تناوبی این روند رو برعکس و به سطح بیان ژن گروه کنترل سالم نزدیک کرد. لذا این احتمال وجود دارد که فعالیت ورزشی منظم بتواند از طریق افزایش ژن PP2Ac و مهار سیگنالینگ NF-κB از توسعه کاردیومیوپاتی که در اثر القای 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 اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1402.040 انجام شد. بدین وسیله، نویسندگان 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 homeostasis 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. Oyenihni 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- $\kappa$ B signaling and activates the SIRT1-AMPK-PGC1 $\alpha$  axis to attenuate muscle loss in diabetic db/db mice. *Front 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- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  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 I $\kappa$ B/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-3 $\beta$ -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, Didoronkute 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.