



تأثیر شدت‌های مختلف تمرین هوازی بر بیان ژن مارکرهای Darpp32 در کبد رت‌های نر نژاد ویستار

شهره نعیمی: کارشناسی ارشد، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ - تهران، ایران (* نویسنده مسئول)

shohrenaimi49@gmail.com

سعید نقیبی: استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ تهران، ایران

علی برزگری: استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵ تهران، ایران

سالار مومن مراغه: دپارتمان بیوتکنولوژی (BRC)، انستیتو پاستور ایران؛ گروه بیوتکنولوژی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پویا جعفری دودران: دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

مریم میرجوان: کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

تمرین هوازی با شدت متوسط،

تمرین هوازی تناوبی پر شدت،

تمرین هوازی پر شدت،

Darpp32

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۲

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۰۸/۱۴

زمینه و هدف: مطالعات تمرین‌های پر شدت را عاملی برای افزایش گلیکوژنولیز کبدی دانسته و ذخایر گلیکوژن کبدی کاهش می‌یابد و انرژی‌رسانی به بافت‌های دیگر کم می‌شود و ذخیره گلیکوژن در تمرین‌های با شدت کم و متوسط از حالت بی‌تمرینی بیشتر است. در این مطالعه برای اولین بار اثر ۳ نوع شدت تمرین هوازی را بر روی بافت کبد و بررسی ژن دخیل در سنتز گلیکوژن انجام می‌شود.

روش کار: در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی 33 ± 237 گرم به صورت گروه‌های ۸ سر موش در ۴ گروه کنترل، تمرین هوازی با شدت متوسط، تمرین هوازی پر شدت و تمرین هوازی تناوبی پر شدت تقسیم شدند. پس از اتمام دوره تمرین، رت‌ها بیهوش و خونگیری و جدا سازی بافت صورت گرفت و داده‌های حاصل از دستگاه PCR-Real time اندازه‌گیری و آنالیز شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که سطح بیان ژن DARPP32 در گروه‌های تمرین هوازی با شدت متوسط، تمرین هوازی پر شدت و تمرین هوازی تناوبی پر شدت در مقایسه با کنترل افزایش معناداری داشته است ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که تمرین‌های استقامتی به مدت ۸ هفته می‌تواند باعث افزایش میزان بیان ژن‌های Darpp32 شود. با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که ۸ هفته فعالیت‌های ورزشی هوازی باعث بهبود عملکرد متابولیسم گلیکوژن و مسیر انسولین می‌شود و یک مارکر جدید در شناسایی دیابت باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Naimi S, Naghibi S, Barzegari A, Momen Maragheh S, Jafari Doudaran P, Mirjovan M. The Effect of Different Intensities of Aerobic Exercise on the Expression of Darpp32 Markers in the Liver of Male Wistar Rats. Razi J Med Sci. 2022;29(8):128-136.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.



Original Article

The Effect of Different Intensities of Aerobic Exercise on the Expression of Darpp32 Markers in the Liver of Male Wistar Rat

- Shohre Naimi:** MA, Department of Physical Education, Payame Noor University, PO BOX 19395-3697, Tehran, Iran (* Corresponding author) shohrenaimi49@gmail.com
Saeed Naghibi: Department of Physical Education, Payame Noor University, PO BOX 19395-3697, Tehran, Iran
Ali Barzegari: Department of Physical Education, Payame Noor University, PO BOX 19395-3697, Tehran, Iran
Salar Momen Maragheh: Biotechnology Research Center (BRC), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran; Department of Biotechnology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran
Pooya Jafari Doudaran: Student Research Committee, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran
Maryam Mirjovan: MA, Sports Physiology Department, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

Abstract

Background & Aims: The liver, as the largest gland in the body, can manufacture, store, change and secrete a large number of metabolic substances the body. The liver receives blood rich in nutrients from the digestive and esophageal tracts, then stores them or changes them into chemical substances that are used elsewhere in the body for metabolic needs. This tissue is especially important in regulating glucose and protein metabolism. The liver makes and secretes bile, which plays a major role in the digestion and absorption of fats in the digestive system. On the other hand, the lack of physical activity and the decrease in cardio-respiratory fitness related to it is related to the increase in diseases. Among obese individuals, sedentary individuals have an increased risk of developing fatty liver compared to physically active individuals of similar weight. These data support the hypothesis that increasing physical activity through exercise, which is defined as a planned, structured, and repetitive physical activity with specific intensity and duration, has beneficial effects on liver diseases. On the other hand, in the liver tissue, a large number of targeted proteins are connected to specific enzymes and cell structures and scaffolding proteins, which collect enzyme intermediates. Insulin increases the accumulation of glycogen by phosphorylating these enzymes and as a result, activates glycogen synthase and deactivates glycogen Desynthase. The DARPP-32 gene, which is also known as PPP1R1B regulatory subunit, is a strong inhibitor of protein phosphatase-1 (PP1). It is phosphorylated at Thr34 by cAMP. DARPP-32 shows a significant regional distribution in the brain, which is almost similar to dopamine innervation. Molecular studies of DARPP-32 have shown that its regulation and function are more complex. DARPP-32 protein is phosphorylated by stimulation of D1 and D2 dopamine receptors and is coded by the PPP1R1B gene. DARPP-32 is a small, unstructured protein of about 202 amino acids. Since the mid-1980s, DARPP-32 has been recognized as a critical mediator of dopamine's biochemical, electrophysiological, transcriptional, and behavioral effects. It has been shown that the phosphorylation state of DARPP-32 provides a mechanism to integrate information received by dopamine neurons and in different brain regions through a variety of neurotransmitters, neuromodulators, neuropeptides, and steroid hormones. Most studies have investigated the effect of endurance training on hormones and factors secreted from liver tissue. However, in none of the studies has it been determined which intensity of exercise can have a greater effect on the expression of the DARPP-32 gene. Therefore, in this study, we seek to investigate and answer the question of whether there is a significant difference between different intensities of aerobic exercise on the expression of Darpp32 markers in the liver of male Wistar rats.

Methods: The present research was experimental, for this purpose, 32 8-week-old male Wistar rats with an average weight of 237 ± 33 grams were purchased from Pasteur Institute. After being transferred to the animal laboratory environment, these animals were kept in groups of 8 mice in transparent polycarbonate cages in an environment with a temperature of 22 ± 1.4 degrees Celsius, a humidity of 45 to 55%, and a light-dark cycle of 12:12. The animals were randomly divided into 4 groups and each group had 8 heads including a control group, moderate-intensity aerobic training (MIT), high-intensity aerobic training (HIT) and high-intensity interval aerobic training (HIIT). Animal care was carried out in accordance with the guidelines of the International Institute of Health

Keywords

Moderate-intensity aerobic training, High-intensity interval aerobic training, High-intensity aerobic training, Darpp32

Received: 03/09/2022

Published: 05/11/2022

and the protocols of this study, following the principles of the Declaration of Helsinki and the rules of medical ethics. Also, this study was approved by the Ethics Committee of Payam Noor University with code IR.PNU.REC.1398.040. During the research period, the food made by Behparvor company was given to the animals in the form of pellets and according to the weekly weighing at the rate of 10 grams per 100 grams of body weight. The water needed by the animal was also freely available. In order to get acquainted with the conditions of the laboratory and the treadmill, the animals ran on the treadmill for 2 weeks, 5 days per week and for 10 to 15 minutes each day at a speed of 5 to 15 m/min. Rats were active for 8 weeks after warming up for 5 minutes (at a speed of 5 m/min). The number of sessions per week was 5 sessions. The MIT exercise protocol consisted of running at 65% of maximum oxygen consumption for a total time of 47 minutes. The exercise consisted of 5 minutes of warm-up and 5 minutes of cool-down and 37 minutes of the main body of the exercise at 65% of maximal oxygen consumption. The HIT exercise protocol included running at a speed of 20 meters per minute for 40 minutes with an increasing incline of the treadmill. The exercise consisted of 5 minutes of warm-up and 5 minutes of cooling down and 30 minutes of the main body of the exercise at 65% of maximal oxygen consumption. The incline of the treadmill was zero in the first week and 2% was added every 2 weeks until it reached 8% in the eighth week. The HIIT training protocol included 4 high-intensity intervals with 4 minutes of running at an intensity of 90 to 100% of maximum oxygen consumption and 4 low-intensity intervals with 3 minutes of running at 50 to 60% of maximum oxygen consumption, which lasted a total of 38 minutes. It consisted of 10 minutes of warm-up and 28 minutes of the main body of the exercise (16). In order to ensure the isolation of exercise in all 4 groups, the exercises were performed according to the method of Rokenmo et al. (2004). Based on this method, the net training time in each group was calculated and equalized based on the time, intensity, and repetition of the work. After finishing the training period, the mice were anesthetized, blood was taken and tissue was separated, and the data obtained by PCR-Real time device were measured and analyzed.

Results: The results obtained from the implementation of this test showed that there is a significant difference between the research groups in the expression values of the Darpp32 protein gene. Comparison between groups showed that there is a significant difference in the expression of the Darpp32 protein gene of Wistar rats between control training groups ($P \geq 0.001$). Comparison between groups was done with Tukey's test and the results showed that there is a significant difference in the expression of the DARPP32 gene in male Wistar rats between the HIIT group compared to the MIT, HIT, and control groups ($P \geq 0.001$). So in the MIT group, they decreased by 0.021 units, in the HIT group by 0.011 units, and in the control group by 0.030 units compared to the HIIT group. On the other hand, a significant difference was also observed between the HIT and control groups compared to the MIT group ($P \geq 0.001$), so that in the HIT group it increased by 0.010 units compared to the MIT group, and in the group, The control also decreased by 0.008 units compared to the MIT group. Also, the follow-up test in the training groups showed that there is a significant difference in the expression of the DARPP32 gene between the HIT and control exercise training groups ($P \geq 0.001$), so in the HIT group it was 0.019 The unit has increased compared to the control group.

Conclusion: In general, it can be concluded that sports training produces favorable changes in the metabolic system of the liver - these effects were seen in aerobic exercise with high intensity. Aerobic exercise with high intensity for 8 weeks can increase the expression of the Darpp-32 protein gene. The results of the present study can be concluded that 8 weeks of aerobic exercise improves the function of genes involved in glucose metabolism. Among the limitations of the present study, we can point out the lack of control over the number of calories consumed by rats and the lack of control over physical activity outside of the animal research program. Despite this, the research background on the effect of the exercise protocols of the present research on Darpp-32 in liver tissue is very limited and needs more investigations.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Naimi S, Naghibi S, Barzegari A, Momen Maragheh S, Jafari Doudaran P, Mirjovan M. The Effect of Different Intensities of Aerobic Exercise on the Expression of Darpp32 Markers in the Liver of Male Wistar Rats. *Razi J Med Sci.* 2022;29(8):128-136.

*This work is published under [CC BY-NC-SA 3.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).

مقدمه

کبد به عنوان بزرگترین غده بدن می‌تواند ساخت، ذخیره، تغییر و ترشح مقدار زیادی از مواد متابولیکی بدن را به عهده بگیرد (۱). کبد خون غنی از مواد غذایی را از دستگاه گوارش و مری - روده‌ای دریافت می‌کند سپس آن‌ها را ذخیره می‌کند یا به شکل مواد شیمیایی تغییر می‌دهد که در جای دیگر از بدن جهت نیازهای متابولیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲). این بافت به ویژه در تنظیم گلوکز و متابولیسم پروتئین اهمیت دارد (۳). کبد صفرا را می‌سازد و ترشح می‌کند که نقش عمده‌ای در هضم و جذب چربی‌ها در دستگاه گوارش دارد (۴). از طرفی عدم فعالیت بدنی و کاهش تناسب قلبی - تنفسی مرتبط با آن با افزایش بیماری‌ها مرتبط است. در میان افراد چاق، افراد کم تحرک خطر ابتلا به کبد چرب را در مقایسه با افرادی که دارای فعالیت بدنی مشابه وزن هستند، افزایش می‌دهد (۵). این داده‌ها از این فرضیه حمایت می‌کنند که افزایش فعالیت بدنی از طریق ورزش، که به عنوان یک فعالیت بدنی برنامه‌ریزی شده، ساختاریافته و تکراری با شدت و مدت زمان مشخص تعریف می‌شود، اثرات مفیدی بر بیماری‌های کبدی دارد (۶). از نظر تئوری، همچنین یک مداخله درمانی و پیشگیری محسوب می‌شود. به طور همزمان، ورزش می‌تواند عوامل خطر بیماری‌های کبدی را در بیماران کبدی کاهش دهد. انجمن گوارش آمریکا، انجمن آمریکایی برای مطالعه بیماری‌های کبد و کالج آمریکایی گوارش، همگی ورزش بدنی را به عنوان درمانی توصیه می‌کنند. توصیه‌های فعلی مشخص نمی‌کنند که کدام برنامه ورزشی و با چه شدتی مفیدتر است و مکانیسم‌هایی که ورزش بر روی کبد تأثیر می‌گذارد، حداقل تا حدی ناشناخته باقی ماند (۷). از طرفی در بافت کبد تعداد زیادی از پروتئین‌های هدفمند به آنزیم‌ها و ساختارهای سلولی اختصاصی و پروتئین‌های داربست متصل می‌شوند، که واسطه‌های آنزیمی را جمع آوری می‌کنند. انسولین از طریق فسفریله کردن این آنزیم‌ها تجمع گلیکوژن را افزایش می‌دهد و در نتیجه فعال شدن گلیکوژن سنتاز و غیر فعال شدن گلیکوژن سنتاز را موجب می‌شود (۸). ژن DARPP-32 که به عنوان زیرواحد تنظیم کننده PPP1R1B نیز شناخته می‌شود، یک مهار کننده قوی

پروتئین فسفاتاز-1 (PP1) است. در Thr34 توسط cAMP فسفریله می‌شود. DARPP-32 توزیع منطقه‌ای قابل توجهی را در مغز نشان می‌دهد که تقریباً شبیه به عصب‌دهی دوپامین است (۹). مطالعات مولکولی DARPP-32 نشان داده است که تنظیم و عملکرد آن پیچیده‌تر از حد انتظار است. در چندین مکان توسط چندین پروتئین کیناز فسفریله می‌شود که خواص DARPP-32 را تعدیل می‌کند. در درجه اول، هنگامی که در Thr34 فسفریله می‌شود، DARPP-32 یک مهار کننده قوی PP1 است، در حالی که وقتی در Thr75 توسط Cdk5 فسفریله شود، PKA را مهار می‌کند (۱۰). فسفوریلاسیون در باقی مانده‌های سرین توسط CK1 و CK2 باعث تعدیل درون سلولی و حساسیت آن به کینازها یا فسفاتازها می‌شود (۱۱). مطالعات مدل‌سازی شواهدی را ارائه می‌دهند که مسیرهای سیگنالینگ از جمله DARPP-32 دارای استحکام قوی و ویژگی‌های پایداری هستند که پاسخ‌های سوئیچ مانند را ترجیح می‌دهند (۱۲). پروتئین DARPP-32 با تحریک گیرنده دوپامین D1 و D2 فسفریله می‌شود و توسط ژن PPP1R1B کدگذاری می‌شود. DARPP-32 یک پروتئین کوچک و بدون ساختار از حدود ۲۰۲ اسید آمینه است. از اواسط دهه ۱۹۸۰، DARPP-32 به عنوان یک واسطه حیاتی برای اثرات بیوشیمیایی، الکتروفیزیولوژیکی، رونویسی و رفتاری دوپامین شناخته شده است. نشان داده شده است که حالت فسفوریلاسیون DARPP-32 مکانیسمی برای یکپارچه‌سازی اطلاعات دریافتی به نورون‌های دوپامین و در مناطق مختلف مغز از طریق انواع انتقال دهنده‌های عصبی، تعدیل کننده‌های عصبی، نوروپپتیدها و هورمون‌های استروئیدی فراهم می‌کند (۱۰). فعال‌سازی PKA فسفوریلاسیون DARPP-32 را در Thr34 تحریک می‌کند و در نتیجه DARPP-32 را به یک مهار کننده قوی پروتئین فسفاتاز-1 (PP1) تبدیل می‌کند. این ژن به عنوان تقویت کننده سیگنالینگ با واسطه PKA و PKG هنگامی که روی Thr34 فسفریله می‌شود، عمل می‌کند که آن را به یک مهار کننده PP1 تبدیل می‌کند (۱۳). نقش DARPP-32 در سیگنال‌دهی بسیار پیچیده است. در شرایط پایه، DARPP-32 در Thr75 فسفریله می‌شود و PKA

رت صحرائی نر نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی 237 ± 23 گرم از انستیتو پاستور خریداری شدند. این حیوانات پس از انتقال به محیط آزمایشگاه جانوری، به صورت گروه‌های ۸ سر موش در قفس‌های پلی کربنات شفاف در محیطی با دمای $22 \pm 1/4$ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند. حیوانات به‌طور تصادفی در ۴ گروه و هر گروه ۸ سر شامل: گروه کنترل، تمرین هوازی با شدت متوسط (Moderate-Intensity Training: MIT)، تمرین هوازی پرشدت (High-Intensity Training: HIT) و تمرین هوازی تناوبی پرشدت (High-Intensity Interval Training: HIIT) تقسیم شدند. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی بین‌المللی سلامت و پروتکل‌های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد. همچنین این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه پیام نور با کد IR.PNU.REC.1398.040 تأیید گردید. طی دوره تحقیق، غذای ساخت شرکت به‌پرور به‌صورت پلت و با توجه به وزن کشتی هفتگی به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در اختیار حیوان قرار داده شد. آب موردنیاز حیوان نیز به‌صورت آزاد در دسترس قرار داده شد.

به‌منظور آشناسازی با شرایط آزمایشگاه و نوار گردان، حیوانات به مدت ۲ هفته، ۵ روز در هر هفته و در هر روز به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۵ تا ۱۵ متر بر دقیقه بر روی نوار گردان دویدند. رت‌ها به مدت ۸ هفته پس از ۵ دقیقه گرم کردن (با سرعت ۵ متر بر دقیقه) به فعالیت پرداختند. تعداد جلسات در هر هفته ۵ جلسه بود. پروتکل تمرین MIT شامل دویدن در ۶۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی در زمان کل ۴۷ دقیقه بود. تمرین شامل ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن و ۳۷ دقیقه بدنه اصلی تمرین در ۶۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه بود (۱۶).

پروتکل تمرین HIT شامل دویدن در سرعت ۲۰ متر بر دقیقه در زمان ۴۰ دقیقه و با شیب فزاینده نوارگردان بود. تمرین شامل ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن و ۳۰ دقیقه بدنه اصلی تمرین در ۶۵ درصد

را مهار می‌کند. بنابراین، DARPP-32 دارای خاصیت منحصر به فردی است که یا به عنوان بازدارنده PP1 یا مهارکننده PKA عمل می‌کند (۱۱). با این حال، در شرایط هیپر دوپامینرژیک، حالت فسفریله Thr75 کاهش می‌یابد و امکان افزایش فسفوریلاسیون در Thr34 را فراهم می‌کند (۹). در مطالعه ماناب (Manabe) و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که افزایش تمرینات ورزشی در بازه زمانی ۴-۷ هفته باعث افزایش مصرف محتوای گلیکوژن عضلانی می‌شود که می‌تواند از طریق مکانیزم‌های متعددی از قبیل افزایش حساسیت به انسولین و افزایش بیان ژن‌های دخیل در مهار DARPP-32 شود عمل کند (۱۴). هینگست (Hingst) و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای نشان دادند که ورزش باعث کاهش بیان ژن پروتئین DARPP-32 می‌شود (۱۵). یافته‌های بیان بیش از حد این پروتئین در بافت‌های سرطانی فرضیه نقش آن در بیماری‌های التهابی را مطرح کرد. تحقیقات پایه نشان می‌دهد که DARPP-32 ممکن است با پیش‌آگهی بدتر در برخی از بیماری‌ها همراه باشد از قبیل بیماری‌های کبدی که امروزه شیوع فراوانی داشته است (۱۶). در تحقیقی دیگر باکورا (Bacurau) و همکاران (۲۰۱۶) اظهار داشتند که پس از یک دوره تمرین، افزایش معنی‌داری را در محتوای این پروتئین مشاهده کردند (۱۷). مطالعه ما (Ma) و همکاران نشان داد که تمرین هوازی با شدت بالا باعث افزایش بیان پروتئین‌های DARPP-32 می‌شود (۱۸). همانطور که گفته شد بیشتر مطالعات به بررسی اثر تمرینات استقامتی بر هورمون‌ها و فاکتورهای مترشح شده از بافت کبد پرداخته‌اند. اما در هیچ کدام از مطالعات مشخص نشده که چه شدت از تمرین می‌تواند بر بیان ژن DARPP-32 تأثیر بیشتری دارد. لذا در این مطالعه به دنبال بررسی و پاسخ به این سؤال می‌باشیم که آیا بین شدت‌های مختلف تمرین هوازی بر بیان ژن مارکرهای Darpp32 در کبد رت‌های نر نژاد ویستار تفاوت معناداری وجود دارد؟

روش کار

تحقیق حاضر از نوع تجربی بود، بدین منظور ۳۲ سر

کشور آمریکا انجام شد. درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای، مخلوطی به حجم ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی سایبرگرین مسترمیکس (SYBR green master mix)، ۲ میکرولیتر از پرایمرهای اختصاصی هر ژن، ۴ میکرولیتر از DNA ژنومی و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. برنامه زمانی و دمایی واکنش انجام شده در دستگاه real-time PCR مدل ABI در سه مرحله عبارت بود از: مرحله اول در یک چرخه به منظور فعال‌سازی آنزیم پلیمرز و دناتوره اولیه DNA الگو با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه؛ مرحله دوم به صورت متناوب در طول ۴۰ چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام شد. در مرحله سوم به منظور رسم منحنی تفکیک، برنامه دمایی مورد استفاده شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه بود. در این مرحله، کاهش دما از ۹۵ درجه سانتی‌گراد به ۶۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۰/۳ درجه سانتی‌گراد بر ثانیه انجام شد و حدوداً ۲۰ دقیقه طول کشید. پس از اتمام مرحله سوم، منحنی‌های تکثیر و تفکیک با استفاده از نرم‌افزار SDS ABI تحلیل شد. تفاوت Ct ژن هدف به ژن رفرنس به صورت ΔCt برای هر نمونه محاسبه شد. سپس برای هر مورد، $2^{-\Delta Ct}$ به دست آمد. علاوه بر این، در این آزمایش تجزیه و تحلیل منحنی ذوب جهت اطمینان از ویژگی محصول PCR انجام شد. در ابتدا توالی mRNA مربوط به ژن Darpp32 از سایت NCBI استخراج شد.

پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار AllelID و توسط شرکت CinnaGen ساخته شده و پس از آن هر پرایمر توسط نرم‌افزار BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت تا از قرارگیری جفتی پرایمرها اطمینان حاصل شود. در این تحقیق، ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. برای هر دور PCR، ۴۰ چرخه منظور گردید، به طوری که دمای هر چرخه برای ۱۵ ثانیه تا ۹۴ درجه سانتی‌گراد و برای ۳۰ ثانیه تا ۶۰

اکسیژن مصرفی بیشینه بود. شیب تردمیل در هفته اول صفر بوده و هر ۲ هفته ۲ درصد بر شیب افزوده شد تا در هفته هشتم به ۸ درصد رسید (۱۶).

پروتکل تمرین HIIT شامل ۴ وهله تناوب شدید با زمان ۴ دقیقه دویدن با شدت ۹۰ تا ۱۰۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و ۴ وهله تناوب کم شدت با زمان ۳ دقیقه دویدن در ۵۰ تا ۶۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی بود که در مجموع ۳۸ دقیقه بطول انجامید و شامل ۱۰ دقیقه گرم کردن و ۲۸ دقیقه بدنه اصلی تمرین بود (۱۶). برای اطمینان از ایزولود بودن تمرین در هر ۴ گروه تمرینات ورزشی بر اساس روش روکنمو و همکاران (۲۰۰۴) عمل شد. بر اساس این روش زمان خالص تمرین در هر گروه بر اساس زمان، شدت و تکرار وهله‌های کار محاسبه و یکسان گردید (۱۶). بنابراین با این روش مجموع ۲۸ دقیقه تمرین تناوبی در شدت‌های میانگین ۹۵ و ۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی معادل ۳۸ دقیقه تداومی در شدت ۶۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی محاسبه گردید. بر همین منوال شدت تمرینات تداومی پرشدت نیز معادل سازی گردید.

جهت حذف اثر حاد تمرین، نمونه‌برداری از حیوانات ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی انجام شد. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۳۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۳-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شده و بعد از عمل جراحی قفسه سینه، بافت کبد جدا شده و در میکروتیوب‌های مخصوص در مایع نیتروژن قرار داده شد. سپس برای نگهداری به فریزر دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. کیت سنتز cDNA توسط Thermo Scientific که با شماره کاتالوگ K1622 تولید شده است، در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. برای استخراج RNA و cDNA، حدود ۵۰ میلی‌گرم میلی‌گرم از بافت کبد رت‌ها به صورت جداگانه جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۲ در QIAzol Reagent Lysis هموزن گردید.

برای تعیین بیان ژن‌های پروتئین Darpp32 به روش real-time PCR انجام شد. بدین منظور واکنش Real-Time PCR در دستگاه ای.بی.آی (ABA) ساخت

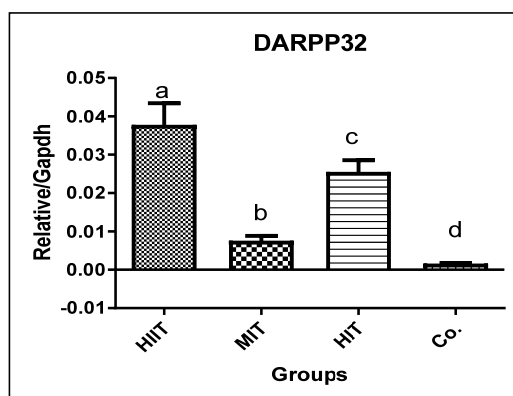
جدول ۱- توالی پرایمرها و اندازه محصولات ژن هدف

Genes	Primer sequence
Darpp32	For: 5'- CCTGTTCTACTACTCCCCATCAC -3' Rev: 5'- TCTTCGTCTCCTCTTCATCCTC -3'
GAPDH	For: 5'- GACATGCCGCTGGAGAAAC -3' Rev: 5'- AGCCAGGATGCCCTTTAGT -3'

شد ($P \leq 0/001$)، به طوری که در گروه HIT به میزان $0/010$ واحد نسبت به گروه MIT افزایش داشته و در گروه کنترل نیز به میزان $0/008$ واحد نسبت به گروه MIT کاهش داشته است. همچنین بررسی آزمون تعقیبی در گروه‌های تمرینی نشان داد که اختلاف معنی‌داری در بیان ژن DARPP32 میان گروه‌های تمرین ورزشی HIT و کنترل وجود دارد ($P \leq 0/001$)، به طوری که در گروه HIT به میزان $0/019$ واحد نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که تمرین هوازی با شدت متوسط به مدت ۸ هفته می‌تواند باعث افزایش بیان ژن پروتئین DARPP32 شود. هینگست (Hingst) و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که ورزش باعث شکسته شدن گلیکوژن و کاهش بیان ژن پروتئین DARPP-32 می‌شود (۱۵). کمی (Kemi) و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه خود اظهار داشتند که فعالیت ورزشی منجر به افزایش ژن پروتئین DARPP-32 می‌شود (۱۶).



شکل ۱- تغییرات بیان ژن DARPP32 در رت‌های نور و بیستار در گروه‌های پژوهش

درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. پرایمرهای مربوط به رت‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. بعد از تحلیل آزمایشگاهی نمونه‌ها، برای توصیف کمی داده‌ها از شاخص‌های آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف استاندارد و آمار استنباطی استفاده شد. ابتدا جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و برای تعیین تجانس واریانس از آزمون لون استفاده شد. با توجه به طبیعی بودن نحوه توزیع داده‌ها، از آزمون‌های پارامتریک شامل آزمون تی مستقل در سطح معنی‌داری $p \leq 0/05$ استفاده شد. انجام کلیه امور آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و EXCEL انجام شد.

یافته‌ها

نتایج بدست آمده از اجرای این آزمون نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های پژوهش در مقادیر بیان ژن پروتئین Darpp32 وجود دارد. به منظور تبیین بیشتر و درک بهتر این تغییرات در شکل ۱ نمایش داده شده است. مقایسه بین گروهی نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن پروتئین Darpp32 رت‌های بیستار میان گروه‌های تمرین کنترل وجود دارد ($P \leq 0/001$).

مقایسه بین گروهی با آزمون توکی انجام شد و نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن DARPP32 در رت‌های نور و بیستار میان گروه HIIT نسبت به گروه‌های MIT، HIT و کنترل وجود دارد ($P \leq 0/001$)، به طوری که در گروه MIT به میزان $0/021$ واحد، در گروه HIT به میزان $0/011$ واحد و در گروه کنترل نیز به میزان $0/030$ واحد نسبت به گروه HIIT کاهش داشته‌اند. از سویی دیگر اختلاف معنی‌داری نیز میان گروه‌های HIT و کنترل نسبت به گروه MIT مشاهده

فعال‌سازی تونیک گیرنده‌های دو پامین D1 و D2 و گیرنده آدنوزین A2A تنظیم می‌شود (۶). DARPP-32 ممکن است در Thr-34 توسط PKA در زیرجمعیت‌های متمایز نورون‌های خاردار متوسط که گیرنده‌های D1 را بیان می‌کنند، فسفریله شود. مانند دوپامین، آدنوزین روی گیرنده A2A عمل می‌کند و از cAMP به عنوان یک واسطه در فرآیند استفاده می‌کند، PKA را فعال می‌کند و فسفوریلاسیون DARPP-32 را در Thr-34 افزایش می‌دهد. گیرنده D2 به عنوان دو ایزوform مختلف تولید شده توسط اتصال جایگزین وجود دارد: بلند (D2L) و کوتاه (D2S) (۱۵). گیرنده D2S به طور خاص وضعیت فسفوریلاسیون و فعالیت تیروزین هیدروکسیلاز را در پایانه‌های پیش سیناپسی تنظیم می‌کند، در حالی که گیرنده D2L عمدتاً در تنظیم فسفوریلاسیون DARPP-32 در نورون‌های محیط مخطط پس سیناپسی نقش دارد. فعال شدن گیرنده D2 فسفوریلاسیون DARPP-32 را با دو مکانیسم مختلف کاهش می‌دهد. اول، در نورون متوسط که کلاس‌های D1 و D2 گیرنده‌های دو پامین را بیان می‌کنند، فعال شدن گیرنده‌های D2 باعث کاهش سطح cAMP می‌شود (۱۶). هنگامی که گیرنده‌های D2 با گیرنده آدنوزین A2A بیان می‌شوند، می‌تواند منجر به کاهش سطح cAMP، کاهش فعالیت PKA و فسفوریلاسیون DARPP-32 در Thr-34 شود. دوم، فعال شدن گیرنده D2 منجر به افزایش سطوح Ca²⁺ و فعالیت پروتئین فسفاتاز B (PP-2B) می‌شود که منجر به افزایش فسفوریلاسیون DARPP-32 در Thr-34 می‌شود. فعال شدن گیرنده تونیک دوپامین D2 فسفوریلاسیون DARPP-32 را در Thr-34 افزایش می‌دهد و می‌تواند با مسدود کردن گیرنده‌های آدنوزین A2A یا دوپامین D1 خنثی شود (۱۴).

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم کنترل میزان کالری مصرفی موش‌های صحرایی و عدم کنترل فعالیت بدنی خارج از برنامه تحقیق حیوانات اشاره نمود. با وجود این، پیشینه تحقیقاتی در زمینه تاثیر پروتکل‌های تمرینی تحقیق حاضر بر Darpp-32 در بافت کبد بسیار محدود بوده و نیاز

ورزش‌های هوازی باعث افزایش AMPK، AKT می‌شود و تولید گلوکز را بالا می‌برد. در واقع با شکستن گلیکوژن تولید گلوکز بالا می‌رود و با افزایش AKT میزان مهارکننده‌های پروتئین DARPP-32 بالا رفته و سنتز گلیکوژن کاهش می‌یابد و گلوکز آزاد می‌شود (۱۷). تحقیقات موجود در مورد AMPK، یک سنسور اصلی انرژی ناشی از ورزش، نشان می‌دهد که این بیماری در بهبود اختلال در متابولیسم گلوکز در دیابت نقش دارد (۱۸). فعالیت بدنی یک استراتژی رفتاری پذیرفته شده برای افزایش سلامت کلی از جمله عملکرد بافت کبد و مغز است. فعال‌سازی DARPP-32 توسط مجموعه‌ای از انتقال‌دهنده‌های عصبی، مانند دوپامین، گلو تامات، سروتونین و آدنوزین تنظیم می‌شود، اما همچنین نشان داده شده است که واسطه اعمال چندین داروی سوء مصرف، از جمله کوکائین، آمفتامین، نیکوتین و کافئین است (۱۱). DARPP-32 در تعدادی از اختلالات روانپزشکی و عصبی مانند اسکیزوفرنی نقش دارد. علاوه بر سیستم عصبی مرکزی، DARPP-32 در طیف وسیعی از سلول‌های اپیتلیال بیان می‌شود (۴). در سرطان معده، DARPP-32 می‌تواند مهاجم سلولی را از طریق فعال‌سازی مسیر MT1-MMP/MMP-2 با واسطه CXCR4 ترویج کند. یک رونوشت فیوژن PPP1R1B-STARD3 نیز در سرطان معده شناسایی شده است که تکثیر سلولی در شرایط آزمایشگاهی را از طریق مسیر فسفاتیدیل نوزیتول-۳-کیناز افزایش می‌دهد (۵). نشان داده شده است که DARPP-32 بر مهاجرت سلول‌های اپیتلیال پستان تأثیر می‌گذارد. از زمان کشف آن در سه دهه پیش، DARPP-32 به عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده مرکزی فعال شده توسط تعدادی از انتقال‌دهنده‌های عصبی مانند دوپامین، گلو تامات، سروتونین، آدنوزین، و اسید گاما آمینوبوتیریک نشان داده شده است (۷). در پاسخ به داروهای سوء مصرف و روان‌گردان‌ها و نیز فعالیت ورزشی این انتقال‌دهنده‌های عصبی حالت فسفوریلاسیون DARPP-32 را تنظیم می‌کنند که آن را به یک مهارکننده پروتئین فسفاتاز یا پروتئین کیناز تبدیل می‌کند. وضعیت فسفوریلاسیون DARPP-32

20213.

10. Morganstern I, Gulati G, Leibowitz SF. Role of melanin-concentrating hormone in drug use disorders. *Brain Res.* 2020;1741:146872.

11. Heckman PRA, Blokland A, Bollen EPP, Prickaerts J. Phosphodiesterase inhibition and modulation of corticostriatal and hippocampal circuits: Clinical overview and translational considerations. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018;87:233-254.

12. Kelly MP. Cyclic nucleotide signaling changes associated with normal aging and age-related diseases of the brain. *Cell Signal.* 2018;42:281-291.

13. Padovan-Neto FE, West AR. Regulation of Striatal Neuron Activity by Cyclic Nucleotide Signaling and Phosphodiesterase Inhibition: Implications for the Treatment of Parkinson's Disease. *Adv Neurobiol.* 2017;17:257-283.

14. Manabe Y, Gollisch KS, Holton L, Kim YB, Brandauer J, Fujii NL, et al. Exercise training-induced adaptations associated with increases in skeletal muscle glycogen content. *FEBS J.* 2013;280(3):916-26.

15. Hingst JR, Bruhn L, Hansen MB, Rosschou MF, Birk JB, Fentz J, et al. Exercise-induced molecular mechanisms promoting glycogen supercompensation in human skeletal muscle. *Mol Metab.* 2018;16:24-34.

16. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol.* 2008;214(2):316-21.

به بررسی‌های بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

تمرینات ورزشی تغییرات مطلوبی در سیستم متابولیسمی کبد ایجاد می‌کند این تأثیرات در ورزش هوازی با شدت زیاد دیده شد. تمرین هوازی با شدت زیاد به مدت ۸ هفته می‌تواند باعث افزایش بیان ژن پروتئین Darpp-32 شود. نتایج پژوهش حاضر می‌تواند نتیجه گرفت که ۸ هفته فعالیت‌های ورزشی هوازی باعث بهبود عملکرد ژن‌های درگیر در مسیر متابولیسم گلوکز می‌باشد.

References

- Girault JA, Nairn AC. DARPP-32 40 years later. *Adv Pharmacol.* 2021;90:67-87.
- Scheggi S, De Montis MG, Gambarana C. DARPP-32 in the orchestration of responses to positive natural stimuli. *J Neurochem.* 2018;147(4):439-453.
- Avanes A, Lenz G, Momand J. Darpp-32 and t-Darpp protein products of PPP1R1B: Old dogs with new tricks. *Biochem Pharmacol.* 2019;160:71-79.
- Lee AM, Picciotto MR. Effects of nicotine on DARPP-32 and CaMKII signaling relevant to addiction. *Adv Pharmacol.* 2021;90:89-115.
- Christensen KR, Nairn AC. cAMP-regulated phosphoproteins DARPP-32, ARPP16/19, and RCS modulate striatal signal transduction through protein kinases and phosphatases. *Adv Pharmacol.* 2021;90:39-65.
- Seeley C, Kegel-Gleason KB. Taming the Huntington's Disease Proteome: What Have We Learned? *J Huntingtons Dis.* 2021;10(2):239-257.
- Leslie SN, Nairn AC. cAMP regulation of protein phosphatases PP1 and PP2A in brain. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019;1866(1):64-73.
- Mauna JC, Miyamae T, Pulli B, Thiels E. Protein phosphatases 1 and 2A are both required for long-term depression and associated dephosphorylation of cAMP response element binding protein in hippocampal area CA1 in vivo. *Hippocampus.* 2011;21(10):1093-104.
- Ricarte FR, Le Henaff C, Kolupaeva VG, Gardella TJ, Partridge NC. Parathyroid hormone(1-34) and its analogs differentially modulate osteoblastic Rankl expression via PKA/SIK2/SIK3 and PP1/PP2A-CRTC3 signaling. *J Biol Chem.* 2018;293(52):20200-