Original Article

The effect of aerobic endurance exercise on changes in heat shock protein 60 and insulin resistance in mice with type 2 diabetes

Shabani M[1,2], Valipour-Dehnou V[1], Tabandeh MR[3], Molanouri-Shamsi M[4]

1- Department of Sport Sciences, Faculty of Literature and Human Sciences, Lorestan University, Khorramabad, I.R. Iran.
2- Department of Sport Physiology, Faculty of Sport Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. Iran.
3- Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. Iran.
4- Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2022/04/9 | Accepted: 2022/06/27

Abstract:

Background: Heat shock protein 60 (HSP_{60}) is considered as an indicator of mitochondrial stress and plays a role in modulating mitochondrial dysfunction. This study aimed to investigate the effect of aerobic endurance exercise on changes in heat shock protein 60 and insulin resistance in mice with type 2 diabetes.
Materials and Methods: Thirty adult mice were randomly and equally divided into three groups: control (C), diabetic (D) and diabetic-exercise (DE). Diabetes was induced by intraperitoneal injection of Streptozotocin. Aerobic endurance training was performed five sessions per week for eight weeks. 48 hours after the last training session, glucose, insulin and HSP_{60} levels and insulin resistance index were measured.
Results: Insulin and blood glucose levels and insulin resistance in group DE decreased significantly compared to group D ($P<0.05$). Also, HSP_{60} protein levels in group DE increased significantly compared to group D ($P<0.05$) and decreased significantly in group D compared to group C ($P<0.05$). Also, the results showed that there was a negative correlation between HSP60 and insulin resistance in all three groups ($P= 0.001$, r= 0.930).
Conclusion: Diabetes lowers HSP_{60} levels and aerobic endurance exercise increases its levels. Also, endurance exercise can enhance mitochondrial function in diabetes by increasing HSP_{60} protein expression. It improves the insulin resistance index, also.

Keywords: Aerobic exercise, Diabetes, Insulin resistance, HSP_{60}, Mice

***Corresponding Author**
Email: valipour.v@lu.ac.ir
Tel: 0098 916 669 1874
Fax: 0098 663 312 086

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2022; Vol. 26, No 3, Pages 273-281

Please cite this article as: Shabani M, Valipour-Dehnou V, Tabandeh MR, Molanouri-Shamsi M. The effect of aerobic endurance exercise on changes in heat shock protein 60 and insulin resistance in mice with type 2 diabetes. ***Feyz*** 2022; 26(3): 273-81.

تأثیر ورزش استقامتی هوازی بر تغییرات پروتئین شوک گرمایی ۶۰ و مقاومت به انسولین در موش‌های دارای دیابت نوع دو

مهرزاد شعبانی [۱]، وحید ولی‌پور ده‌نو [۲*]، محمّدرضا تابنده [۳]، مهدیه ملانوری شمسی [۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: پروتئین شوک گرمایی ۶۰ (HSP_{60}) یک شاخص استرس میتوکندری است و در بهبود عملکرد میتوکندری نقش دارد. هدف این پژوهش، بررسی تأثیر ورزش استقامتی هوازی بر تغییرات پروتئین شوک گرمایی ۶۰ و مقاومت به انسولین در موش‌های دارای دیابت نوع دو بود.

مواد و روش‌ها: ۳۰ سر موش سوری نر بالغ آزمایشگاهی به‌طور تصادفی و یکسان به سه گروه کنترل (C)، دیابتی (D) و دیابتی - ورزش (DE) تقسیم شدند. دیابت به‌وسیله تزریق درون‌صفاقی استرپتوزوتوسین القا شد. تمرین استقامتی هوازی پنج جلسه در هفته برای هشت هفته انجام شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، مقادیر گلوکز، انسولین و HSP_{60} و شاخص مقاومت به انسولین اندازه‌گیری شد.

نتایج: سطوح انسولین و گلوکز خون و مقاومت به انسولین در گروه DE نسبت به گروه D به شکل معناداری کاهش یافت (P=۰/۰۰۱). همچنین، سطوح پروتئین HSP_{60} گروه DE نسبت به گروه D به شکل معناداری افزایش یافت (P<۰/۰۵) و در گروه D نسبت به گروه C به شکل معناداری کاهش یافت (P<۰/۰۵). همچنین نتایج نشان داد که بین HSP_{60} و مقاومت به انسولین در هر سه گروه همبستگی منفی وجود دارد (r= -۰/۹۳۰، P= ۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: دیابت سطوح HSP_{60} را کاهش و ورزش استقامتی هوازی سطوح آن را افزایش می‌دهد. همچنین، ورزش استقامتی با افزایش بیان پروتئین HSP_{60} می‌تواند عملکرد میتوکندری مختل‌شده در دیابت را تقویت کند و باعث بهبود شاخص مقاومت به انسولین شود.

واژگان کلیدی: تمرین استقامتی، HSP_{60}، مقاومت به انسولین، دیابت، موش سوری

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و ششم، شماره ۳، مرداد-شهریور ۱۴۰۱، صفحات ۲۸۱-۲۷۳

مقدمه

دیابت شیرین نوع دو (T2DM) Type 2 diabetes mellitus یک اختلال مزمن است که با اختلال در تنظیم متابولیسم سلولی و اختلال در سیگنال‌دهی انسولین مشخص می‌شود [۱]. دیابت، پویایی میتوکندری را مختل می‌کند که نقش اساسی در تنظیم مسیرهای متابولیک دارد و برای حفظ تعادل مناسب انرژی بسیار مهم است [۲]. اختلال در تنظیم یون‌ها در غشای اندامک‌های خاص، مانند میتوکندری، می‌تواند به استرس اکسیداتیو منجر شود [۳].

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲. دانشیار، گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴. دانشیار، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*نشانی نویسنده مسؤول:

لرستان، دانشگاه لرستان، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، گروه علوم ورزشی

تلفن: ۰۹۱۶۶۶۹۱۸۷۴ دورنویس: ۰۶۶۳۳۱۲۰۸۶

پست الکترونیک: valipour.v@lu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۲۰ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۴/۶

مقاومت به انسولین نه‌تنها قوی‌ترین پیش‌بینی‌کننده ابتلا به T2DM است، بلکه پس از وجود هایپرگلیسمی، یک هدف درمانی نیز محسوب می‌شود [۴]. در T2DM استرس اکسیداتیو سیستمیک افزایش می‌یابد و اختلال در زنجیره تنفسی میتوکندری با افزایش تولید Reactive Oxygen Species (ROS) و استرس اکسیداتیو همراه است که به‌نوبه خود یکپارچگی و چین‌خوردگی پروتئین‌های زنجیره تنفسی میتوکندری را به خطر می‌اندازد و در نتیجه باعث ایجاد یک چرخه معیوب می‌شود که به‌تدریج آسیب میتوکندری را بدتر می‌کند و اختلال عملکرد عضله را باعث می‌شود [۵،۲]. ممکن است کاهش عملکرد میتوکندری با مقاومت به انسولین و T2DM مرتبط باشد؛ زیرا تجمع چربی در عضلات و بافت‌های چربی را تسهیل می‌کند. کاهش فعالیت اکسیداتیو میتوکندری و کاهش سنتز ATP هر دو نشانگر کاهش عملکرد میتوکندری هستند [۶]. ورزش یکی از درمان‌های T2DM است. انقباض عضلات در حین انجام تمرینات ورزشی به تولید ROS و متعاقب آن افزایش در بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان منجر می‌شود. در نتیجه تولید آنتی‌اکسیدان‌های سلولی برای محافظت در برابر آسیب سلولی افزایش می‌یابد [۷]. توانایی همه موجودات زنده برای پاسخگویی به تغییرات یک ویژگی ضروری برای بقا است.

بیان پروتئین‌های شوک گرمایی (Heat shock protein (HSP، حفاظت‌شده‌ترین سیستم ژنتیکی در برابر استرس سلولی است [۱]. پروتئین شوک گرمایی ۶۰ (HSP_{60}) Heat shock protein 60 از گروه یک چاپرونین‌هاست (Chaperonins) و به‌عنوان یک پروتئین داخل میتوکندریایی تعریف می‌شود و یک شاخص استرس میتوکندری در نظر گرفته می‌شود که برای زنده‌ماندن سلول ضروری است [۸]. HSP_{60} برای حفظ و تصحیح تاخوردگی پروتئین‌های میتوکندری عمل می‌کند که نمایانگر نقش اساسی آن در بهبود عملکرد پروتئین‌های میتوکندری است [۹]. اگر کمبودی در HSP_{60} رخ دهد، همان‌طور که در عضله اسکلتی بیماران T2DM مشاهده می‌شود، استرس سلولی افزایش می‌یابد [۱۰]. کاهش سطح HSP_{60} داخل سلولی با تشکیل ROS و مقاومت به انسولین ارتباط دارد که معمولاً در افراد دیابتی مشاهده می‌شود [۱۱]. *HSP60* به‌عنوان نشانگر مولکولی سازگاری فیزیولوژیک با ورزش‌های هوازی است [۲۸]. از آن‌جایی که عضله EDL یک عضله تندانقباض است که عمدتاً حاوی فیبرهای نوع IIb است و امکان خم‌شدن پشتی پا را فراهم می‌کند و مطالعات جدید نشان داده‌اند که *HSP60* در عضلات اسکلتی غنی از فیبرهای تند اکسیداتیو که تحت تمرین هوازی (تمرین استقامتی) بودند، تنظیم می‌شود [۱۲]؛ در این مطالعه از عضله EDL به‌عنوان بافت نمونه استفاده شد. در مطالعه حاضر، نقش ورزش استقامتی هوازی بر مقاومت به انسولین و سطح پروتئین HSP_{60} در T2DM بررسی خواهد شد. به هر حال، فرضیه این است که ورزش استقامتی هوازی، مقاومت به انسولین را کاهش و سطوح پروتئین HSP_{60} را در T2DM افزایش می‌دهد.

مواد و روش‌ها

روش مطالعه حاضر از نوع تجربی و به شیوه آزمایشگاهی و با طرح پس‌آزمون است. اصول اخلاقی (کد اخلاقی EE/1400.2.24.32890/SCU.AC.IR) مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه شهید چمران اهواز مورد توجه قرار گرفت. در پژوهش حاضر سی سر موش آزمایشگاهی نر بالغ با میانگین وزنی ۳±۳۵ گرم، از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز خریداری شدند و در شرایط محیطی کنترل‌شده با میانگین دمای ۴±۲۲ درجه سانتی‌گراد، میزان رطوبت ۵۰-۴۰ درصد و چرخه تاریکی روشنایی ۱۲-۱۲ و با دسترسی به آب و غذای مخصوص موش نگهداری شدند. نمونه‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه ده‌تایی تقسیم شدند: ۱) گروه کنترل (Control: C): این گروه شامل ده سر موش بود که در هیچ فعالیتی شرکت نکردند و همزمان با بقیه گروه‌ها مراحل آزمایشگاهی و تشریح روی آن‌ها انجام گرفت. ۲) گروه دیابتی (Diabetes: D): این گروه شامل ده سر موش بود که به‌وسیله تزریق درون‌صفاقی استرپتوزوتوسین (۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) طی سه روز متوالی دیابتی شدند و در هیچ فعالیت بدنی شرکت نکردند و همزمان با بقیه گروه‌ها مراحل آزمایشگاهی و تشریح روی آن‌ها انجام گرفت. ۳) گروه دیابتی - ورزش (Diabetes + Exercise: DE): این گروه شامل ده سر موش بود که به‌وسیله تزریق درون‌صفاقی استرپتوزوتوسین (۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دیابتی شدند و پس از یک هفته دوره سازگاری با تمرین، به‌مدت ۸ هفته و هر هفته ۵ جلسه تمرین استقامتی هوازی شامل دویدن روی تردمیل را انجام دادند و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین تشریح شدند [۱۳].

پروتکل تمرین: قبل از اجرای پروتکل تمرین، موش‌های گروه (DE) به‌مدت یک هفته دوره سازگاری با تمرین را شامل ۳۰ دقیقه تمرین با سرعت پنج متر در دقیقه در روز اوّل انجام دادند و در ادامه با افزودن سرعت به‌میزان یک متر در دقیقه و روزانه به‌مدت ۱۰ دقیقه به تمرین افزوده شد. پس از یک هفته دوره سازگاری، برنامه هشت‌هفته‌ای تمرین هوازی شروع شد که شامل دویدن روی تردمیل بود که ساعت ۹ صبح با سرعت ۱۰ متر در دقیقه به‌مدت یک ساعت در هر جلسه و به‌مدت هشت هفته و پنج جلسه در هر هفته اجرا می‌شد. شیب تردمیل صفر درجه بود و در طول هشت هفته تمرین بدون تغییر ماند [۱۳]. وزن‌کشی موش‌ها به‌صورت هفتگی انجام شد و برای اندازه‌گیری وزن بدن از ترازوی دیجیتال سارتوریس (ساخت کشور آلمان) استفاده شد. غلظت سرمی انسولین نیز با روش الایزا و با استفاده از کیت انسولین ویژه موش (Mercodia، ساخت کشور سوییس) و سطح سرمی گلوکز به‌روش آنزیماتیک توسط دستگاه اتوآنالایزر (SELECTRA PROM، ساخت کشور هلند) اندازه‌گیری شد. مقاومت به انسولین به‌روش HOMA-IR با اندازه‌گیری گلوکز ناشتا و انسولین طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

(HOMA-IR) index = (fasting insulin (μU/ml) × fasting glucose (mmol/l))/ 22.5

در پژوهش حاضر به‌منظور القای دیابت از استرپتوزوتوسین Streptozotocin (STZ) با دوز کم استفاده شد. براساس این روش، STZ (۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) طی سه روز متوالی به‌روش تزریق درون‌صفاقی انجام شد [۱۴]. STZ به‌صورت روزانه تهیه و طی ۳۰ دقیقه تزریق شد. پس از تزریق STZ به‌مدت ۲۴ ساعت، موش‌ها به جای آب به محلول گلوکز در سالین دسترسی داشتند تا از اُفت قند خون کُشنده جلوگیری شود. جهت

اطمینان از ایجاد دیابت، یک هفته پس از دریافت اوّلین دوز STZ، میزان گلوکز موش‌ها اندازه‌گیری و گلوکز ناشتایی نمونه‌ها بررسی شد. با ایجاد یک جراحت کوچک به‌وسیله لانست روی دُم موش‌ها، یک قطره خون روی نوار گلوکومتر قرار داده شد و قند خون با استفاده از دستگاه گلوکومتر (Roche Diagnotics, japan, Tokyo, k.k.) ثبت گردید. قند خون بالای ۱۲۶ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی در نظر گرفته شد [۱۵]. موش‌هایی که کمتر از ۱۲۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بودند، از تحقیق حذف شدند. پس از اتمام دوره هشت هفته‌ای تمرین، نمونه‌ها پس از ۴۸ ساعت (برای ازبین‌رفتن تأثیر کوتاه‌مدت فعالیت) به سالن نمونه‌برداری برده شدند و پس از بیهوشی ابتدا بافت عضله Extensor digitorum longus (EDL) و سپس نمونه‌های خونی مستقیم از قلب برداشت شد. بافت عضله بلافاصله به فریزر ۷۰- (88fd-2-93-A) ساخت ایران منتقل شد. سپس نمونه‌ها و بافت‌ها برای انجام آزمایش‌ها به آزمایشگاه ارسال شدند. ارزیابی بیان پروتئین HSP_{60} با استفاده از روش وسترن‌بلات صورت گرفت. به این‌صورت که نمونه‌های بافت عضله EDL ابتدا در بافر لیزکننده هموژن شدند (لایزیس بافر شامل تریس پایه ۵۰ میلی‌مولار (۰/۳ گرم)، کلرید سدیم ۱۵۰ میلی‌مولار (۰/۴۳ گرم)، تریتون x100 ۰/۱ درصد (۰/۰۲ میلی‌لیتر)، سدیم داوکسی کولات ۰/۲۵ درصد (۰/۰۵ گرم)، SDS ۰/۱ درصد (۰/۰۲ گرم) و Ethylenediaminetetraacetic acid EDTA (۵/۸۴ گرم) در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و pH آن بر روی ۷/۴ تنظیم شد) و هموژن شدند (۱۴۰۰۰ rpm و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد). به‌ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر از محلول، یک قرص مهارکننده پروتئاز استفاده شد. محلول به‌دست‌آمده به‌وسیله کیت بردفورت موردبررسی قرار گرفت. پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل SDS-PAGE (۱۰ درصد) بارگذاری شدند (ابتدا در ولتاژ ۶۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه و سپس در ولتاژ ۱۰۰ به‌مدت ۶۰ دقیقه نگهداری شد). سپس پروتئین‌ها طی فرآیند انتقال روی کاغذ نیتروسلولز به‌مدت ۱۰۵ دقیقه انتقال داده شدند و سپس کاغذ یک شب با آنتی‌بادی‌های اوّلیه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سه مرتبه و هر بار پنج دقیقه با محلول PBS شستشو داده شد و کاغذ به‌مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ثانویه انکوبه شد. باندهای پروتئین در دستگاه پردازشگر X-RAY (LD-14، چین) با استفاده از کیت ECL ظاهر شدند. سپس با استفاده از دستگاه اسکنر JS 2000 دانسیته باندها محاسبه گردید.

تجزیه‌وتحلیل آماری

جهت بررسی نرمال‌بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو - ویلک استفاده شد و با توجه به طبیعی‌بودن توزیع داده‌ها، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه به‌منظور بررسی تفاوت بین گروه‌های موردنظر استفاده شد. با توجه به معنی‌داری تفاوت بین‌گروهی و یکسان‌بودن تعداد آزمودنی‌ها در گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین از ضریب همبستگی پیرسون برای تعیین میزان همبستگی متغیرها استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ در سطح معناداری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

پژوهش حاضر نشان داد که القای دیابت، افزایش معنی‌داری را در وزن موش‌های گروه D و DE نسبت به گروه C ایجاد کرد، همچنین افزایش میانگین وزن در گروه D به شکل معنی‌داری بیشتر از گروه DE بود ($P=۰/۰۰۱$). تفاوت متغیر بین گروه‌ها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱- نتایج تحلیل واریانس یک‌راهه متغیرهای تحقیق در ۳ گروه

متغیرها	گروه کنترل سالم	گروه کنترل دیابت	گروه تمرین دیابت
وزن بعد از مداخله (گرم)	۳۳/۰۰±۳/۶۰	#۴۱/۳۳±۱/۵۲	*۱/۳۶±۵۲/۳۳
گلوکز (میلی‌گرم / دسی‌لیتر)	۱۰۱/۱۸±۴/۱۰	#۱۵۷/۳۳±۵/۰۹	*۱۲۷/۴۰±۳/۳۶
انسولین (میکروگرم / لیتر)	۴۰/۰۸±۳/۶۱	#۸۸/۰۴±۵/۳۶	*۷۱/۳۲±۷/۱۲
شاخص مقاومت به انسولین	۹/۹۹±۰/۸۵	#۳۱/۱۷±۰/۷۹	*۲۵/۲۷±۳/۳۸

*تفاوت معنی‌دار با گروه (D) ($P<۰/۰۵$) و # تفاوت معنی‌دار با گروه (C) ($P<۰/۰۵$).

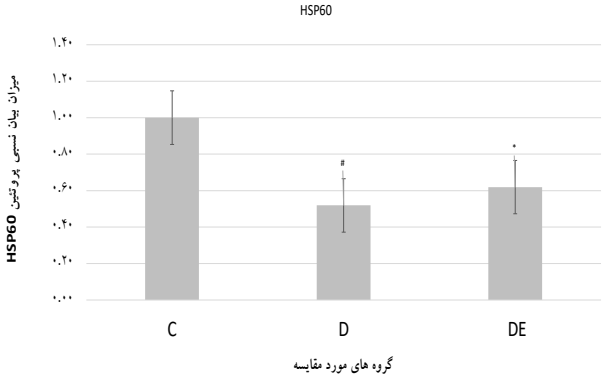
نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای دیابت، افزایش معنی‌داری را در سطح گلوکز خون، انسولین و مقاومت به انسولین موش‌های گروه‌های D و DE نسبت به گروه C ایجاد کرد و پس از ۸ هفته تمرین استقامتی، گروه DE همچنان در مقایسه با گروه C از تفاوت معنی‌داری برخوردار بود ($P=۰/۰۰۱$). همچنین سطح گلوکز خون گروه D و DE نسبت به گروه C در پایان برنامه تمرینی به‌صورت معنی‌داری بالاتر بود ($P=۰/۰۰۱$) و پس از هشت هفته تمرین استقامتی سطح گلوکز خون گروه DE نسبت به گروه D به‌صورت معنی‌داری پایین‌تر بود ($P=۰/۰۰۱$). همچنین مقادیر انسولین و مقاومت به انسولین گروه D و DE نسبت به گروه C در پایان برنامه تمرینی به‌صورت معنی‌داری بالاتر بود ($P=۰/۰۰۱$) و پس از ۸ هفته تمرین مقادیر انسولین و مقاومت به

انسولین در گروه DE به شکل معنی‌داری کمتر از گروه D بود (P=۰/۰۰۱). شکل شماره ۲ تغییرات سطح پروتئین HSP_{60} را در عضله EDL در سه گروه C، D و DE نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که بیماری دیابت باعث کاهش معنی‌دار سطوح بیان پروتئین HSP_{60} در موش‌های گروه D در مقایسه با موش‌های گروه C شد (P<۰/۰۵). نتایج بیانگر این نکته است که یک دوره تمرین استقامتی باعث افزایش معنی‌دار بیان سطوح این پروتئین در موش‌های گروه DE در مقایسه با گروه D شد (P=۰/۰۱). همچنین سطح بیان این پروتئین در گروه DE به شکل معنی‌داری کمتر از گروه C می‌باشد (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد (جدول شماره ۲) که همبستگی معکوس بالایی بین بیان پروتئین HSP_{60} و شاخص مقاومت به انسولین در بین سه گروه مورد مطالعه وجود دارد (P=۰/۰۰۱، r= -۰/۹۳۰).

جدول شماره ۲- ارتباط بین متغیرها

	گلوکز (mg/dL)	انسولین (µmol/L)	*HSP60* (دانسیته نسبی)
مقاومت به انسولین (HOMA-IR)	❋۰/۹۵۴	❋۰/۹۲۲	❋-۰/۹۳۰
HSP60 (دانسیته نسبی)	❋-۰/۹۵۴	❋-۰/۹۲۴	
انسولین (µmol/L)	❋۰/۹۱۸		

❋سطح معنی‌داری ۰/۰۰۱



شکل شماره ۲- مقادیر بیان پروتئین HSP60 نسبت به β -actin در بافت عضله EDL در گروه‌های مختلف.

❋تفاوت معنی‌دار با گروه (D) P=۰/۰۱ و # تفاوت معنی‌دار با گروه (C) P=۰/۰۱.

شکل شماره ۳- میزان بیان HSP_{60} در گروه‌های مختلف

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که دیابت باعث کاهش معنی‌دار سطوح بیان HSP_{60} در میتوکندری عضله EDL موش‌های دیابتی می‌شود. همچنین فعالیت استقامتی هوازی باعث تعدیل HSP_{60} و افزایش آن نسبت به قبل از تمرین می‌شود که نشان از تأثیر مثبت فعالیت استقامتی هوازی بر آن است. اطلاعات کافی برای ادبیات فعلی در زمینه تأثیر HSP_{60} در بایوژنز و بازسازی فیبر عضله اسکلتی در حین ورزش و در شرایط دیابت، وجود ندارد. ارتباط بین HSP_{60} و دیابت پیچیده است. در حال حاضر، شواهد HSP_{60} را با دیابت و عوارض دیابت مرتبط می‌دانند، اگرچه مکانیسم‌های مولکولی آن به‌خوبی شناخته نشده است [۱۷،۱۶]. افراد دارای دیابت نوع دو کاهش بیان HSP_{60} داخل سلولی را در برخی از بافت‌ها مانند عضلات اسکلتی [۱۶]، مغز، قلب و بافت چربی زیرجلدی نشان می‌دهند [۱۹،۱۸]. فیزیوپاتولوژی دیابت باعث تغییراتی در سلول و عملکرد میتوکندری می‌شود. یکی از این تغییرات تولید مزمن ROS است که به استرس اکسیداتیو و اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها منجر می‌شود [۲۰]. تولید ROS میتوکندری در زنجیره انتقال الکترون

واقع در غشای داخلی میتوکندری طی فرآیند فسفوریلاسیون اکسیداتیو صورت می‌گیرد. مجتمع‌های زنجیره‌ای تنفسی I و III تولیدکنندگان اصلی ROS هستند [۲۱]. افزایش سطح ROS میتوکندری در دیابت شیرین باعث کاهش سیگنالینگ PGC-1α/AMPK ناشی از استرس اکسیداتیو در عضلات اسکلتی می‌شود و این باعث آسیب به DNA هسته‌ای و میتوکندری می‌گردد، در نتیجه کاهش بایوژنز میتوکندری اتفاق می‌افتد [۹]؛ ممکن است بایوژنز کمتر میتوکندری منعکس‌کننده کاهش سطح HSP_{60} در بیماران دیابتی باشد [۲۲]. نکته مهم این است که کاهش سطح HSP_{60} داخل سلولی ارتباط نزدیکی با التهاب، اختلال عملکرد میتوکندری، استرس سلولی، تشکیل ROS و مقاومت به انسولین دارد که معمولاً در افراد دیابتی مشاهده می‌شود [۲۳،۱۹]. اثرات محافظتی HSP_{60} ثابت شده است، جایی که بیان بیش از حدّ HSP_{60} کاهش فعالیت سیتوکروم C اکسیداز را در میتوکندری مهار می‌کند و متعاقباً آپوپتوز را کاهش می‌دهد [۱]. همچنین، شواهد نشان می‌دهد که HSP_{60} سایتوکین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی را القا می‌کند و به‌شدت با دیابت مرتبط است؛ بنابراین نقش تنظیمی HSP_{60} در تعدیل فرآیندهای التهابی در دیابت و ارتباط استرس میتوکندری با التهاب برجسته می‌شود [۱۹]. Marino و همکاران گزارش دادند که فعالیت جسمانی بیان HSP_{60} را افزایش و التهاب را در سلول کاهش می‌دهد [۹]. عضله اسکلتی، برای کنترل اجزای داخل سلولی و ارتباطات به سیستم حمایتی HSP نیاز دارد [۲۴]. به‌نظر می‌رسد که تغییرات ناشی از ورزش در HSPها دارای اثرات محافظت چندگانه از سلول شامل میتوکندری، شبکه سارکوپلاسمی و اجزای اسکلت سلولی [۲۵]، اثرات مهاری بر آپوپتوز و همچنین دارای نقشی در حفظ فعالیت آنزیمی، حساسیت به انسولین و انتقال گلوکز باشد [۲۶]. در میان HSPها، HSP_{60} نقش مهمّی در فیزیوپاتولوژی عضله اسکلتی دارد [۲۷] و بر هموستاز عضلات تأثیر می‌گذارد [۱۲]. به‌نظر می‌رسد همبستگی HSP_{60} و ورزش منطقی است، اما داده‌ها محدود و گاهی بحث‌برانگیز هستند. Morton و همکاران نشان دادند که گروه تمرین هوازی در مقایسه با گروه غیرتمرینی، میزان HSP_{60} استراحتی بیشتری در عضله پهن جانبی (Vastus Lateralis muscle) دارند که در آن درصد زیادی از الیاف I و IIa وجود دارد که نشان‌دهنده این است که HSP_{60} به‌عنوان یک نشانگر مولکولی دارای سازگاری فیزیولوژیک با ورزش‌های هوازی است. با این‌حال، گزارش شده است که در عضله پهن جانبی انسان که بیشترین میزان میتوکندری را در الیاف نوع I دارد، در یک دوره حادّ تمرین استقامتی که به‌عنوان یک تمرین هوازی در نظر گرفته می‌شود، سطح پروتئین پایه HSP_{60} را در همان عضله افزایش نمی‌دهد [۲۸]. بنابراین، تمرین مزمن توانایی افزایش بیان HSP_{60} را دارد، درحالی‌که یک جلسه تمرین هوازی این افزایش را موجب نمی‌شود. Ogata و همکاران [۲۹] و Moura و همکاران [۳۰] نشان دادند که میزان بیان سطح $HSP60$ در عضله کف پایی و عضله دوقلو و هر دو عضله غنی از فیبر IIx، در موش‌های صحرایی نر بعد از تمرین استقامتی تقریباً به یک میزان افزایش می‌یابد. از طرف دیگر، ماتسون و همکاران نشان دادند که موش‌های ماده‌ای که به‌مدت ۸ هفته ورزش استقامتی هوازی را انجام داده‌اند، سطح HSP_{60} قابل‌توجهی را در عضلات کف پا که دارای درصد بالایی از تار نوع IIb است، نشان می‌دهند [۳۱]. Talmadge و همکاران افزایش سطح HSP_{60} را در عضله EDL موش‌ها پس از یک دوره تمرین استقامتی مشاهده کردند [۳۲]. مطالعات متعددی نشان دادند که HSP_{60} در عضلات اسکلتی غنی از فیبرهای کندانقباض که تحت تمرین هوازی بودند، بهبود می‌یابد [۳۴،۳۳،۱۲]. افراد تمرین‌کرده از طریق تعدیل آنتی‌اکسیدان‌ها و پروتئین‌های ناشی از استرس، مانند HSP_{60}، یک واکنش انطباقی در سطح سیستمیک و سلولی را نشان می‌دهند [۱۲]. فعالیت هوازی باعث افزایش بیان پروتئین HSP_{60} در سلول‌های عضلانی و در نتیجه بهبود بایوژنز میتوکندری می‌شود و این ظرفیت برای ترویج تاخوردگی صحیح سایر پروتئین‌های میتوکندری برای حفظ عملکرد سلولی آن بسیار مهم و ضروری است [۳۵]. نتایج حاصل از اندازه‌گیری منظم مقادیر انسولین و گلوکز خون در طی این تحقیق نشان داد که یک دوره فعالیت استقامتی هوازی کاهش پایداری را در سطح انسولین، مقاومت به انسولین و گلوکز خون در موش‌های دیابتی به‌وجود می‌آورد. به‌طور فزاینده‌ای روشن شده است که دیابت نوع دو با تخریب تدریجی سلول‌های پانکراس به‌وسیله فرآیندهای خودایمنی همراه است که به اختلال در مکانیسم سیگنال‌دهی انسولین و عدم حساسیت به انسولین در بافت‌های محیطی منجر می‌شود؛ در نتیجه باعث هایپرگلیسمی و هایپرانسولینمی گردش خون می‌گردد [۳۶]. مقاومت به انسولین زمانی شروع می‌شود که بافت‌های هدف حساس به انسولین (مانند عضلات اسکلتی) شروع به کاهش پاسخ به قدرت تنظیمی هورمون در گردش خون می‌کنند که نشان می‌دهد عضله، محلّ غالب جذب گلوکز تحریک‌شده توسط انسولین در بدن است. در مرحله اوّلیه پیشرفت بیماری، مداخله ورزشی نقش پیشگیرانه مهمّی دارد. با این‌حال، اگر به آن توجه نشود، اضافه‌بار مزمن باعث ناکارآمدی سلول‌های β می‌شود و ترشح انسولین تحریک‌شده با گلوکز در نهایت کاهش می‌یابد

[۳۷]. با گذشت زمان، عملکرد سلول β با افزایش مقاومت به انسولین به کاهش ادامه می‌دهد و باعث ایجاد یک آبشار از رویدادها می‌شود که در نهایت به دیابت نوع دو منجر می‌شود [۳۸]. میتوکندری‌های عضله اسکلتی به‌عنوان اندامک‌های مسؤول اکسیداسیون لیپید، عامل بالقوه درگیر در دیابت نوع دو هستند. به‌طور خاص، ظرفیت کاهش‌یافته برای اکسیداسیون لیپید می‌تواند ناشی از «اختلال عملکرد میتوکندری» باشد. به‌عنوان مثال، کاهش بایوژنز میتوکندری، کاهش محتوای میتوکندری و یا کاهش محتوای پروتئین و فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو در واحد میتوکندری [۳۹]. همچنین ارتباط تولید بیش از حدّ ROS به‌وسیله میتوکندری با بروز مقاومت سلولی در برابر انسولین به خوبی ثابت شده است. این دیدگاه در مطالعه Fujimaki و همکاران که پنج مکانیسم مولکولی اصلی را که از طریق آن‌ها استرس اکسیداتیو باعث ایجاد مقاومت به انسولین می‌شود، مشخص می‌گردد: اختلال عملکرد سلول β، کاهش بیان ناقل گلوکز Glucose (GLUT4) transporter type 4، سرکوب مسیرهای پیام‌رسانی انسولین، افزایش پاسخ‌های التهابی و اختلال عملکرد میتوکندری. نتایج نشان داده است که افزایش سطح ROS می‌تواند سنتز ATP را در میتوکندری سرکوب کند. ROS می‌تواند با اسیدهای چرب اشباع‌نشده لیپیدهای غشای میتوکندری واکنش نشان دهد و باعث پراکسیداسیون لیپید شود. ممکن است تخریب اکسیداتیو فسفولیپیدهای غشایی باعث نفوذپذیری غیراختصاصی غشای میتوکندری، افزایش نشت پروتون و مهار فعالیت زنجیره تنفسی شود [۲]. وزارت بهداشت و خدمات انسانی ایالات متحده در سال ۲۰۱۷ عدم فعالیت بدنی را به‌عنوان یکی از شش عامل خطر برای عوارض دیابت نوع دو در بزرگسالان معرفی کرده است [۴۰]. مطالعات زیادی گزارش کرده‌اند که فعالیت بدنی منظم در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو و پیش‌دیابت در بهبود تحمل گلوکز و حساسیت به انسولین، حداکثر جذب اکسیژن و محتوای میتوکندری مؤثر است [۴۱،۴۲]. چندین مطالعه بهبود حساسیت به انسولین را با بهبود عملکرد میتوکندری تأیید کردند [۴۵-۴۳].

نتیجه‌گیری

این پژوهش، کاهش اثرات هایپرگلیسمی ناشی از فعالیت استقامتی هوازی و متعاقباً اثر آن بر افزایش بیان HSP_{60} را تأیید کرد. افزایش بیان پروتئین HSP_{60} می‌تواند عملکرد میتوکندری مختل‌شده را تقویت کند و باعث بهبود شاخص مقاومت انسولین شود. ورزش نشان‌دهنده یک درمان غیردارویی قابل اجرا می‌باشد که می‌تواند عملکرد میتوکندری مختل‌شده را تقویت کند. در این‌راستا، لازم است با دقت به موضوع تنظیم اختلال عملکرد میتوکندری در دیابت شیرین نزدیک شده، کلیه مطالعات مؤثر بر عملکرد میتوکندری به‌طور جامع انجام شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش، حاصل رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه لرستان می‌باشد. از تمامی افرادی که در این امر مهم، یاری‌رسان بودند، تشکر می‌شود.

References:

[1] Rowles JE, Keane KN, Gomes Heck T, Cruzat V, Verdile G, Newsholme P. Are heat shock proteins an important link between type 2 diabetes and Alzheimer disease? ***Int J Mol Med Sci*** 2020; 21(21): 8204.

[2] Fujimaki S, Kuwabara T. Diabetes-induced dysfunction of mitochondria and stem cells in skeletal muscle and the nervous system. ***Int J Mol Med Sci*** 2017; 18(10): 2147.

[3] Peng TI, Jou MJ. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. ***Ann N Y Acad Sci*** 2010; 1201(1): 183-8.

[4] Taylor R. Insulin resistance and type 2 diabetes. ***Diabetes*** 2012; 61(4): 778-9.

[5] Voos W, Jaworek W, Wilkening A, Bruderek M. Protein quality control at the mitochondrion. ***Essays Biochem*** 2016; 60(2): 213-25.

[6] Wondmkun YT. Obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes: associations and therapeutic implications. ***Diabetes Metab Syndr Obes***. 2020; 13: 3611.

[7] Kim K, Kim YH, Lee SH, Jeon MJ, Park SY, Doh KO. Effect of exercise intensity on unfolded protein response in skeletal muscle of rat. ***Korean J Physiol Pharmacol*** 2014; 18(3): 211-6.

[8] Cappello F, Gammazza AM, Vilasi S, Ortore MG, San Biagio PL, Campanella C, et al. *Chaperonotherapy for Alzheimer's disease: focusing on HSP60*. ***Heat Shock Protein-Based Therapies*** 2015: 51-76.

[9] Marino Gammazza A, Macaluso F, Di Felice V, Cappello F, Barone R. Hsp60 in skeletal muscle fiber biogenesis and homeostasis: From physical exercise to skeletal muscle pathology. ***Cells*** 2018; 7(12): 224.

[10] Muchowski PJ, Wacker JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. ***Nat Rev Neurosci*** 2005; 6(1): 11-22.

[11] Zhang D, Liu H, Zhang Y, Li J, Fu Y, Zheng Y, et al. Heat shock protein 60 (HSP60) modulates adiponectin signaling by stabilizing adiponectin receptor. ***Cell Communic Signal*** 2020; 18(1): 1-9.

[12] D'Amico D, Fiore R, Caporossi D, Di Felice VD, Cappello F, Dimauro I, et al. Function and Fiber-Type Specific Distribution of Hsp60 and αB-Crystallin in Skeletal Muscles: Role of Physical Exercise. ***Biology*** 2021; 10(2): 77.
[13] Wang J, Polaki V, Chen S, Bihl JC. Exercise improves endothelial function associated with alleviated inflammation and oxidative stress of perivascular adipose tissue in type 2 diabetic mice. ***Oxid Med Cell Longev***. 2020; 2020.
[14] Ranjbar Kohan N, Tabandeh MR, Nazifi S, Soleimani Z. L-carnitine improves metabolic disorders and regulates apelin and apelin receptor genes expression in adipose tissue in diabetic rats. ***Physiologi Rep*** 2020; 8(23): e14641.
[15] Akram S, Tabssum M, Rao M, Qureshi HJ. Effect of endurance exercise on oxidative stress marker malondialdehyde in type 2 diabetic mice. ***TPMJ*** 2020; 27(07): 1493-8.
[16] Juwono J, Martinus RD. *Does Hsp60 provide a link between mitochondrial stress and inflammation in diabetes mellitus?* ***J Diabetes Res*** 2016; 2016.
[17] Bellini S, Barutta F, Mastrocola R, Imperatore L, Bruno G, Gruden G. *Heat shock proteins in vascular diabetic complications: review and future perspective*. ***Int J Mol Sci*** 2017;18(12): 2709.
[18] Kleinridders A, Lauritzen HP, Ussar S, Christensen JH, Mori MA, Bross P, et al. *Leptin regulation of Hsp60 impacts hypothalamic insulin signaling*. ***JCI*** 2013; 123(11): 4667-80.
[19] Khadir A, Kavalakatt S, Cherian P, Warsame S, Abubaker JA, Dehbi M, et al. *Physical exercise enhanced heat shock protein 60 expression and attenuated inflammation in the adipose tissue of human diabetic obese*. ***Front Endocrinol*** 2018; 9: 16.
[20] Lumini JA, Magalhaes J, Oliveira PJ, Ascensao A. Beneficial effects of exercise on muscle mitochondrial function in diabetes mellitus. ***Sports Med*** 2008; 38(9): 735-50.
[21] Rochette L, Meloux A, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Role of humanin, a mitochondrial-derived peptide, in cardiovascular disorders. ***Arch Cardiovasc Dis*** 2020.
[22] Rong JX, Qiu Y, Hansen MK, Zhu L, Zhang V, Xie M, et al. Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet–fed mice and improved by rosiglitazone. ***Diabetes*** 2007; 56(7): 1751-60.
[23] Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. ***Int J Mol Sci*** 2017; 18(6): 1321.
[24] Noble EG, Milne KJ, Melling CJ. Heat shock proteins and exercise: a primer. ***Appl Physiol Nutr Metab*** 2008; 33(5): 1050-75.
[25] Sammut IA, Harrison JC. Cardiac mitochondrial complex activity is enhanced by heat shock proteins. ***Clin Exp Pharmacol Physiol*** 2003; 30(1-2): 110-5.
[26] Chung J, Nguyen AK, Henstridge DC, Holmes AG, Chan MS, Mesa JL, et al. HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. ***PNAS*** 2008; 105(5): 1739-44.
[27] Dimauro I, Antonioni A, Mercatelli N, Grazioli E, Fantini C, Barone R, et al. The early response of αB-crystallin to a single bout of aerobic exercise in mouse skeletal muscles depends upon fiber oxidative features. ***Redox Biol*** 2019; 24: 101183.
[28] Morton JP, Maclaren D, Cable NT, Campbell IT, Evans L, Kayani AC, et al. Trained men display increased basal heat shock protein content of skeletal muscle. ***MSSE*** 2008; 40(7): 1255-62.
[29] Ogata T, Oishi Y, Higashida K, Higuchi M, Muraoka I. Prolonged exercise training induces long-term enhancement of HSP70 expression in rat plantaris muscle. ***Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*** 2009; 296(5): R1557-R63.
[30] Moura CS, Lollo PCB, Morato PN, Nisishima LH, Carneiro EM, Amaya-Farfan J. Whey protein hydrolysate enhances HSP90 but does not alter HSP60 and HSP25 in skeletal muscle of rats**.** ***Plos One*** 2014; 9(1): e83437.
[31] Mattson JP, Ross CR, Kilgore J, Musch TI. Induction of mitochondrial stress proteins following treadmill running. ***MSSE*** 2000; 32(2): 365-9.
[32] Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Muscle fiber types and function. ***Curr Opin Rheumatol*** 1993; 5(6): 695-705.
[33] Mattson JP, Ross CR, Kilgore JL, Musch TI, Induction of mitochondrial stress proteins following treadmill running. Med.Sci. ***Sports Exerc*** 2000, 32, 365–9.
[34] Barone R, Macaluso F, Sangiorgi C, Campanella C, Marino Gammazza A, Moresi V, et al. Skeletal muscle Heat shock protein 60 increases after endurance training and induces peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha1 expression. ***Sci Rep*** 2016; 6(1): 1-8.
[35] Voos W, Röttgers K. Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. ***BBA*** 2002; 1592(1): 51-62.
[36] Itariu BK, Stulnig TM. Autoimmune aspects of type 2 diabetes mellitus-a mini-review. ***Gerontology*** 2014 ;60(3): 189-96.
[37] Cerf ME. Beta cell dysfunction and insulin resistance. ***Front. Endocrinol*** 2013; 4: 37.
[38] Gandhi SM, Nylen ES, Sen S. The Role of Physical Activity on Insulin Resistance-Associated Endothelial Dysfunction. ***IntechOpen*** 2019.
[39] Montgomery MK, Turner N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. ***Endocrine Connections*** 2015; 4(1): R1-R15.
[40] CfDCaP C. National diabetes statistics report, 2017. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services. 2017.
[41] Olver TD, Laughlin MH, Padilla J. Exercise and vascular insulin sensitivity in skeletal muscle and brain. ***Exerc Sport Sci Rev*** 2019; 47(2): 66.

[42] Nylén ES, Kokkinos P. Physical activity, cardiorespiratory fitness, and the diabetes spectrum. Cardiorespiratory Fitness in Cardiometabolic Diseases: Springer; 2019. p. 191-206.
[43] Meex RC, Schrauwen-Hinderling VB, Moonen-Kornips E, Schaart G, Mensink M, Phielix E, et al. Restoration of muscle mitochondrial function and metabolic flexibility in type 2 diabetes by exercise training is paralleled by increased myocellular fat storage and improved insulin sensitivity. ***Diabetes*** 2010; 59(3): 572-9.
[44] McConell GK, Ng GPY, Phillips M, Ruan Z, Macaulay SL, Wadley GD. Central role of nitric oxide synthase in AICAR and caffeine-induced mitochondrial biogenesis in L6 myocytes. ***J Appl Physioly*** 2010; 108(3): 589-95.
[45] Hey-Mogensen M, Højlund K, Vind B, Wang L, Dela F, Beck-Nielsen H, et al. Effect of physical training on mitochondrial respiration and reactive oxygen species release in skeletal muscle in patients with obesity and type 2 diabetes. ***Diabetologia*** 2010; 53(9): 1976-85.