مجله دیابت و لیپید ایران. بهمن- اسفند ۱۳۹۰؛ دوره ۱۱ (شماره ۳) ۲۳۶-۲۲۳

تاثیر تمرین استقامتی بر بیان ناقل‌های میتوکندریایی و سارکولمایی لاکتات در عضلات اسکلتی و قلبی رت‌های دیابتی نوع ۲

روح‌اله نیکویی[۱]، حیمد رجبی[۲]، رضا قراخانلو[۲]، فرشته عتابی[۳]، کبری امیدفر*[۴]

چکیده

مقدمه: هدف از مطالعه حاضر تعیین تاثیر تمرین استقامتی بر بیان ناقل‌های میتوکندریایی و سارکولمایی لاکتات در عضلات اسکلتی و قلبیرت‌های دیابتی نوع ۲ بود.

روش‌ها: تعداد ۴۰ رت نژاد ویستار نر در سن ۴ هفتگی با میانگین وزن ۹/۸ ± ۹۳/۷ گرم انتخاب و به طور تصادفی به ۳ گروه کنترل سالم (n=۱۰)، کنترل دیابتی (n=۱۵) و تمرینی دیابتی (n=۱۵) تقسیم شدند. دیابت از طریق ترکیب تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین و مصرف غذای پر چرب ایجاد و تمرین استقامتی به مدت ۷ هفته، بر گروه تمرینی دیابتی اعمال شد. جهت تایید وقوع مقاومت انسولین از مقادیر HOMA-IR استفاده گردید. ۲۴ ساعت پس از اتمام پروتکل تمرینی رت‌ها تشریح و عضله نعلی، باز کننده طویل انگشتان (EDL) و قلبی استخراج شدند. اندازه گیری انسولین پلاسما به روش ELISA و میزان بیان MCT1 و MCT4 با تکنیک WesternBlotting انجام گرفت. معنی‌دار بودن تفاوت بین گروه‌ها با آزمون آماری ONE-WAYANOVA مشخص گردید.

یافته‌ها: اعمال دیابت بیان MCT1 و MCT4 در غشای پلاسمایی را به طور معنی‌دار کاهش داد و بر بیانMCT1 میتوکندریایی بدون تاثیر بود. در عضله اسکلتی، تمرین باعث افزایش بیان MCT1 در هر دو غشای عضلات قلبی و اسکلتی شد جایی که تاثیر تمرین بر بیان MCT1 در غشای میتوکندری نسبت به غشای پلاسمایی بیشتر بود. علی‌رغم این تغییرات اختلاف معنی‌داری در غلظت لاکتات پلاسما بین گروه‌های تمرین و کنترل دیابتی یافت نشد در حالی که غلظت لاکتات عضله در گروه تمرین دیابتی نسبت به کنترل دیابتی در هر سه بافت کاهش معنی‌دار داشت.

نتیجه‌گیری: به طور خلاصه نتایج تحقیق نشان داد که بیان MCT1 و MCT4 در شرایط دیابت نوع ۲ نسبت به شرایط طبیعی کاهش قابل ملاحظه دارد و تمرین استقامتی می‌تواند این کاهش بیان را تعدیل و به سطوح طبیعی نزدیک کند و با کاهش غلظت لاکتات استراحتی در عضلات اسکلتی و قلبی به تعدیل مقاومت انسولین کمک نماید.

واژگان کلیدی: ناقل‌های لاکتات، عضله قلبی، دیابت نوع ۲، تمرین استقامتی

۱- دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲- دانشگاه تربیت معلم تهران

۳- واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی

۴- مرکز تحقیقات غدد/پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نشانی: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، تلفن: ۸-۸۸۲۲۰۰۳۷-۰۲۱، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲-۰۲۱، پست الکترونیک: omidfar@tums.ac.ir

تاریخ دریافت:۹۰/۰۱/۲۶ تاریخ درخواست اصلاح: ۹۰/۰۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۰۶/۲۸

مقدمه

تغییر در به کارگیری سوبسترا و رقابت سوبسترایی بین گلوکز، اسید های چرب آزاد و لاکتات [۱،۲] برای اکسیداسیون در شرایط دیابت غیر وابسته به انسولین (NIDDM)[1]، از جمله مهمترین عوامل سهیم در توسعه مقاومت انسولین – عدم توانایی انسولین در تنظیم برداشت گلوکز – است که مهمترین مشخصه در شرایط NIDDM است [۵-۳]. در شرایط NIDDM معمولا افزایش در میزان غلظت لاکتات استراحت خون دیده می شود که دامنه افزایش آن از۰٫۶ mmol/l در افراد لاغر تا ۱٫۱ mmol/l در افراد چاق متغیر است[۲،۵]، ضمن اینکه ارتباط منفی بین غلظت لاکتات استراحت و حساسیت انسولین نیز گزارش گردیده است [۱]. در حقیقت افزایش میزان استراحتی لاکتات، برداشت گلوکز در بافت‌های مصرف کننده این سوبسترا، مانند عضلات اسکلتی، عضله قلبی و ... را از طریق تنظیم منفی بیان GLUT4[2] سارکولماییکاهش می دهد [۶]. به علاوه در مقایسه با گلوکز، لاکتات سوبسترای مفیدتری در تولید انرژی است و می تواند به طور مستقیم بوسیله کمپلکس پیروات دهیدروژناز اکسیداسیون شود [۸] و مصرف گلوکز در چرخه گلیکولیز را کاهش دهد [۷].

طبق نظریه بین سلولی لاکتات[۸،۹][3] انتقال لاکتات بین بافت های مختلف عمدتا از طریق کوترانسپورت با یون هیدروژن از طریق مونوکربوکیسلات ترانسپورترها (MCTs)[4] صورت می گیرد [۱۰] که تاکنون ۱۴ ایزوفرم مختلف از MCT ها در موش و ۹ نوع در انسان شناسایی شده اند که توزیعی وابسته به بافت دارند [۱۱]. در عضلات اسکلتی انسان و حیوان دو ایزوفرمMCT1 و MCT4 و در عضله قلبی دو ایزوفرمMCT1 و MCT2 با خصوصیات کینتیکی و مکان‌های متفاوت بیان می‌شوند [۱۱] که MCT1 بیشتر در تارهای ST[5] و MCT4 بیشتر در تارهای FT[6] بیان می شوند [۱۱]. تنظیم محتوای این انتقال دهنده ها تحت تاثیر مستقیم غلظت لاکتات استراحت می‌باشد، چرا که تحقیقاتی که از افزایش مجازی لاکتات[7] استفاده نموده اند، اذعان داشته اند که در رت‌ها بالا بودن طولانی مدت لاکتات موجب تغییر در انتقال لاکتات و محتوی ناقل های آن در عضلات اسکلتی می شود [۱۲]. عوامل دیگر از قبیل فعالیت بدنی و تحریک الکتریکی نیز بیان MCT ها و انتقال لاکتات را افزایش می دهد [۱۳،۱۴] در حالی که فرایندهای تعلیق عضو و بی تمرینی بیان این انتقال دهنده‌ها را کاهش می‌دهند. در مجموع MCT1 عمدتا در اثر تمرینات استقامتی بیان می شود و با ظرفیت‌های اکسیداتیو عضله در ارتباط است [۱۵،۱۶] در حالی که MCT4 بیشتر متعاقب تمرینات شدید بیان می شود [۱۵،۱۶]. به دلیل بیان شدن MCT ها در مکان‌های مختلف بافت‌ها و تفاوت در کینتیک آنها، به MCT1 نقش برداشت کننده و به MCT4 نقش آزاد کننده لاکتات نسبت داده اند [۱۵،۱۶].

غلظت استراحتی لاکتات در خون و عضله ماحصل فرایندهای تولید و پاکسازی این سوبسترا است. اکسیداسیون لاکتات در میتوکندری مهمترین سرنوشت در پاکسازی این سوبسترا است و نشان داده شده است که ورود لاکتات به داخل میتوکندری بوسیله MCT1 میتوکندریایی صورت می‌گیرد [۱۷]. تسهیل یا تسریع این فرایند نقش بسیار مهمی در تعیین مقادیر استراحتی لاکتات در عضلات اسکلتی و قلبی به همراه دارد. این در حالی است که برداشت لاکتات از گردش خون و ورود آن به داخل عضلات اسکلتی و قلبی نیز به عنوان مرحله محدود کننده در برداشت لاکتات توسط بافت‌های پیرامونی مطرح است، فرایندی که به واسطه وجود MCT1 در غشای پلاسمایی صورت می گیرد [۱۷-۱۵].

هر چند، تاثیرات مفید تمرینات استقامتی در بهبود عملکرد انسولین در شرایط مقاومت انسولین به خوبی مشخص شده است [۴،۵]، لیکن تاثیر اینگونه تمرینات بر بیان MCTها در شرایط هایپرلاکتاتمیا موجود در NIDDM به ندرت مورد مطالعه قرار گرفته و سازوکارهای سلولی که به واسطه آن تمرین می تواند به تعدیل مقاومت انسولین کمک نماید، ناشناخته هستند. معدود تحقیقات انجام شده

1 - non-insulin-dependent diabetes mellitus
2 - glucose transporter 4 down-regulation
3- extracellular lactate shuttle
4- monocarboxylate transporters
5- slow twitch fibers
6 - fast twitch fibers
7 – lactate clamp

در این زمینه [۲،۱۸] بر رت‌های دیابتی نوع ۱ به انجام رسیده که فاقد مقاومت انسولین بوده و در عین حال در این مطالعات تنها بیان سارکولمایی‌MCTs بررسی گردیده و در حال حاضر اطلاعاتی مبنی بر تاثیر تمرین بر بیان ناقل های میتوکندریایی لاکتات در شرایط دیابت نوع ۲ وجود ندارد. لذا تحقیق حاضر در جهت رفع این نقصان و به منظور تعیین تاثیرتمرین استقامتی بر محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 به طور جداگانه در سارکولما به عنوان محل محدود کننده برداشت لاکتات و غشای میتوکندری به عنوان محل اصلی اکسیداسیون این سوبسترا و پیامد های ناشی از این تغییرات بر غلظت های لاکتات استراحت در خون، عضلات اسکلتی و قلبی و تاثیر نهایی آن بر مقاومت انسولین در رت های دیابتی نوع ۲ به اجرا درآمد.

روش‌ها

حیوان و پروتکل تمرینی

تعداد ۴۰ رت نژاد ویستار نر در سن ۴ هفتگی با میانگین وزنی ۹/۸ ± ۹۳/۷ گرم از انستیتوی پاستور ایران تهیه و در شرایط دمایی۴±۲۲ درجه سانتیگراد تحت سیکل ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی – روشنایی نگهداری شدند. وزن بدن به طور روزانه ثبت و رت‌ها با غذای مخصوص رت و آب تغذیه شدند. بعد از گذشت ۲ هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن مطلوب)، رت‌ها (با میانگین وزن ۱۱/۴ ± ۱۸۳/۴۷ به طور تصادفی به ۳ گروه گروه کنترل سالم (n=۱۰)، کنترل دیابتی (n=۱۵) و تمرینی دیابتی (n=۱۵) تقسیم، ضمن اینکه گروه‌ها بر اساس وزن همسان سازی شدند. دیابت در این تحقیق از طریق ترکیب تزریق استرپتوزوتوسین[1] و مصرف غذای پر چرب[2] ایجاد شد [۱۹]. غذای مورد استفاده شامل ۵۸ درصد چربی، ۲۵ درصد پروتئین و ۱۷ درصد کربوهیدرات بود و عناصر تشکیل دهنده آن در جدول ۱ گزارش شده است. این ترکیب غذایی به وسیله محقق به صورت دست ساز و با همکاری شرکت کانی دام و موسسه واکسن سازی و سرم سازی رازی ایران انجام گرفت. رت‌های گروه دیابتی به مدت ۲ هفته تحت مصرف غذای پرچرب قرارگرفتند در حالیکه گروه کنترل سالم غذای طبیعی مصرف می کرد. بعد از آن تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان ۳۵ mg/kg در بافر سیترات 0.1 M (PH 4.5) بعد از ۶ ساعت ناشتایی در دو گروه دیابتی انجام گرفت [۱۹]. ۴۸ ساعت بعد از تزریق دارو، نمونه خونی از چشم حیوان جمع‌آوری و جدا سازی سرم با۴ °C ,۴ min ,۳۰۰۰g انجام و غلظت گلوکز با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. غلظت گلوکز بالاتر از ۳۰۰mg/dl به عنوان دیابت تعریف [۱۹] و رت‌های واجد شرایط وارد تحقیق شدند.

جدول ۱- ترکیب غذای پر چرب و عناصر تشکیل دهنده آن

عناصرتشکیل دهنده	گرم / کیلو گرم
پودر غذای طبیعی رت	۳۶۵
روغن گیاهی	۳۱۰
کازئین	۲۵۰
کلسترول	۱۰
ویتامین و مواد معدنی	۶۰
متیونین	۳
کلراید سدیم	۱
جوش شیرین	۱

پروتکل تمرینی

تمرین استقامتی به مدت ۷ هفته، هر روز بر گروه تمرینی دیابتی اعمال شد (جدول ۲) به دلیل شرایط خاص رت‌های تحقیق (دیابت شدید)، اعمال مدت‌های طولانی تر تمرینی بیشتر از ۳۵ دقیقه امکان پذیر نبود و این مدت به عنوان مدت نهایی در اواخر تمرین درنظر گرفته شد. ضمن اینکه شدت نهایی نیز به گونه ای انتخاب گردید که سطوح لاکتات را در حین تمرین دستخوش تغییر قابل ملاحظه نماید. تمامی این اطلاعات با انجام مطالعه راهنما(pilot study) روی ۴ رت به دست آمد. دو هفته آخر نیز تمامی متغیرهای تمرینی ثابت نگه داشته شدند تا

1- Streptozotocin
2- High fat diet

سازگاری‌های انجام شده در زمان تشریح به حالت یکنواخت خود برسند.

جدول ۲- مشخصات پروتکل تمرینی

زمان	آشناسازی ۵ روز	هفته۱	هفته۲	هفته۳	هفته۴	هفته۵	هفته۶	هفته۷
سرعت (m/min)	۱۵	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۰
مدت (min)	۲۰	۲۰	۲۵	۳۰	۲۵	۳۰	۳۵	۳۵

تست HOMA-IR

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، بعد از ۸ ساعت ناشتایی نمونه خونی به میزان ۱ml از چشم حیوان جمع آوری و جدا سازی پلاسما با سانتریفیوژ کردن در $4^{\circ}C$ ۴ min, ۴ g, ۳۰۰۰ انجام و جهت اندازه گیری گلوکز و انسولین ناشتایی جهت تعیین HOMA-IR در ۸۰- نگهداری شد. اندازه گیری انسولین به روش ELISA و با کیت ساخت شرکت Millipore با حساسیت اندازه‌گیری ۱ng.ml، catalog number: # EZRMI-13K و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. غلظت گلوکز با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه گیری گردید.

مقادیر HOMA-IR با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۲۰]:

HOMA-IR=Insulin [µU/ml]*Glucose [mmol/l] / ۲۲/۵

واجد بودن شرایط مقاومت انسولین منوط به داشتن دو شرط زیر بود :

۱ – مقادیر HOMA-IRبالاتر از ۲,۵ [۲۰]

۲ – مقادیر انسولین ناشتایی بالاتر از [۲۰60 pmol] و تنها رت‌هایی که شرایط فوق را دارا بودند در تجزیه و تحلیل نهایی وارد شدند.

استخراج نمونه

۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی رت‌ها بوسیله تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰mg / kg) و زایلازین (۱۰mg/kg) بی هوش و عضلات نعلی، EDL و عضله قلبی بلافاصله استخراج و در نیتروژن ۸۰- منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد. نمونه خونی نیز مستقیم از قلب حیوان جمع آوری و جداسازی سرم با سانتریفیوژ کردن در $4^{\circ}C$ ۴ min, ۴ g, ۳۰۰۰ انجام شد.

اندازه گیری لاکتات خون

اندازه گیری لاکتات با استفاده از lactic acid assay kit, cat: K607-100, company: biovision طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. اندازه گیری لاکتات استراحت خون با استفاده مستقیم از پلاسما صورت گرفت.

اندازه گیری لاکتات عضله

آماده سازی بافت عضلانی به شکل زیر بود: حدود ۵۰ میلی گرم عضله با روش هاون کوبی پودر گردید و به نسبت ۱ به ۸ در پرکلریک اسید ۷٪ به مدت ۱۰ دقیقه خواباندە، سپس در $4^{\circ}C$ 1500 g, 10 min, سانتریفیوژ و سوپرناتانت به عنوان نمونه جهت اندازه گیری لاکتات عضله مورد استفاده قرار گرفت [۲۱].

تهیه و آماده سازی MI و SL

حدود ۲۰۰ – ۱۵۰ میلی گرم از عضلات جهت استخراج غشای سلولی با روش هاون کوبی پودر گردید. در این مطالعه بافت عضلانی هموژن در سه قسمت مجزا تهیه شد: بافت هموژنیزه کل عضله (MU)[1]، بافت هموژنیزه غنی از میتوکندری(MI)[2]، بافت هموژنیزه غنی از سارکولما (SL)[3]. حدود ۲۰۰ – ۱۵۰ میلی‌گرم از بافت در بافر A متشکل از EGTA۲۱۰mM, sucrose ۲۱۰mM، Nacl۴۰mM، HEPES ۳۰mM، pHv/۴ در دمای ۴ درجه سانتیگراد هموژن و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه

1- Preparations muscle
2- Mitochondria-enriched fraction
3- Sarcolemma-enriched fraction

سانتیگراد در ۶۰۰g سانتریفیوژ شد تا مواد RBC[1] از بافت جدا شوند [۲۲]. سوپرناتانت برداشته شد و با نسبت ۰/۷۵ حجم با بافر B متشکل از Na4P2O7 M ۵۳/۸ ,mM KCL۱/۱۶۷، pH, ۷/۴ رقیق شد. نیمی از این محصول جهت تهیه MU در ۲۳۰۰۰۰g به مدت ۳ ساعت سانتریفیوژ شد تا پروتئین‌های انقباضی جدا شوند. سپس سوپرناتانت دور ریخته شد و Pellet جمع آوری و در۲۰۰ میکرولیتر از بافرC متشکل ۷/۴ Tris,pH ۱۰ mM EDTA , ۱mMو SDS۱۶٪رقیق شد. محصول نهایی جهت برداشت اجزای نامحلول در دمای اتاق و g ۱۱۰۰ سانتریفیوژ، سوپرناتانت برداشته و به عنوانMU در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد [۲۲].

نیم دیگر بافت هموژن شده اولیه در بافر A، ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد و Pellet جمع آوری و در۲۰۰ میکرولیتر از بافرC و SDS۱۶٪ رقیق شد. محصول نهایی جهت برداشت اجزای نامحلول در دمای اتاق و g ۱۱۰۰ سانتریفیوژ، سوپرناتانت برداشته و به عنوانMIدر دمای ۸۰- درجه نگهداری شد [۲۲].

بخش SL ز سوپرناتانت فوق استخراج گردید. سوپرناتانت در g ۲۳۰۰۰۰ به مدت ۳ ساعت سانتریفیوژ شد تا پروتئین‌های انقباضی جدا شوند. سوپرناتانت دور ریخته شد و Pelletجمع آوری و در ۲۰۰ لاندا از بافرC و SDS ۱۶٪ رقیق شد. محصول نهایی جهت برداشت اجزای نامحلول در دمای اتاق و g ۱۱۰۰ سانتریفیوژ، سوپرناتانت برداشته و به عنوان SL در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد. صحت تخلیص دو غشا در مطالعه حاضر به وسیله استفاده از مارکرهای منفی کنترل شد. سیتوکروم اکسیداز به عنوان مارکری که باید در بخش SL وجود نداشته باشد ولی در بخش MI یافت شود و GLUT1 به عنوان مارکری که در بخش SL یافت می‌شود ولی در بخش MI وجود ندارد، جهت اطمینان از صحت تخلیص دو غشاء استفاده شدند [۲۳].

روش تعیین غلظت پروتئینی نمونه‌ها

تعیین غلظت پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش Bradford و با استفاده از Bovin Serum Albumin (BSA) به عنوان استاندارد انجام گرفت.

Western Blotting

میزان 20µg پروتئین در هر چاهک ریخته شد و جدا سازی پروتئین با استفاده از تکنیک SDS-PAGE[2] با ژل ۱۲ درصد انجام شد. پروتئین های جدا شده به غشای PVDF[3] با منافذ۰/۴۵ میکرون انتقال داده شدند. سپس مرحله Blocking غشاء با محلول محتوی Skim milk, ۷/۴ mM Nacl, ٪۰/۱ Tween ۲۰, ۵۰ mM Tris-HCL, ٪۵pH ۱۵۰ به مدت ۱,۵ ساعت خوابانده شد. سپس غشاء در طول شب در محلول محتوی آنتی بادی اولیه با غلظت (1micrograms/ml) که در بافر محتوی BSA و Skim milk رقیق شده بود، قرار گرفت. پس از انجام شستشوی غشاء جهت رفع آنتی بادی های غیر متصل، غشاء در معرض آنتی بادی ثانویه (HRP) قرار گرفته و مجددا بوسیله آب مقطر، Tween ٪۰/۰۵, M Nacl, ۱ شسته شد. بیان پروتئین با استفاده از روش Enhanced [ECL] Chemiluminescence اندازه گیری شد. غشاء در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفت و ظهور باند ها بر روی فیلم در تاریک‌خانه به انجام رسید. از تکنیک Densitometric scanning چگالی باند ها MCT1 و MCT4 تعیین شد و جهت نیمه کمی کردن بیان MCT1 و MCT4 از میزان بیان MCT1 در غشای اریتروسیت استفاده گردید. در این روش میزان باند MCT1 حاصل از µg ۱۰ پروتئین Rat erytrocyte ghoste به عنوان مبنا در نظر گرفته شد و بقیه باندها در مقایسه با آن به مقادیر کمی تبدیل شدند [۲۳].

روش آماده سازی Rat erytrocyte ghoste

مقدار خون تازه مورد نیاز در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شد تا از لخته شدن خون جلوگیری به عمل آید. خون جمع آوری شده به نسبت ۱:۷ با بافر ACDmM

1- Red blood cells 1

2- Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels electrophoresis
3- Polyvinylidene difluoride membrane

mM D-glucose,۳۸ mM soduom sitrate, ۷۵ citric acid, ۱۳۸ مخلوط و در ۱۶۰۰۰gسانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت و buffy coat دور ریخته شد و pellet سه مرتبه در mM Nacl ۱۶۶شستشو داده شد. بعد از شستشو سلول‌ها به نسبت ۱:۷ در بافر لیز کننده ۷,۴ pH mM KH2PO4, ۱,۲۰ mM ۳,۶۱Na2HPO4, mM, ۹,۶۴NaCl, mM EDTA,۱قرار گرفتند که اسمولاریته نهایی آن برابر با ۷۳mosm بود، مدت ۲۰ دقیقه به حال خود رها شدند تا لیز شدن صورت بگیرد. محصول در ۲۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت برداشته و دور ریخته شد. pelletبه نسبت ۱:۱۰ با بافر شستشو pH ۷,۲,۹,۶,Tris-HCLmM۲۰ mM NaCl (۶۰ mosm) مخلوط و شستشو داده شد. شستشو یکبار دیگر با محلول pH ۷,۲ , ۴,۸ ,Tris-HCLmM۱۰ mM NaCl (۳۰ mosm)انجام شد. شستشوی بعدی یکبار با KCL ۱۰۰mMو دوبار با آب انجام شد. محصول نهایی در PBS حل و نگهداری شد. شکل ۲ –۳ روش استخراج را نشان می‌دهد [۲۳].

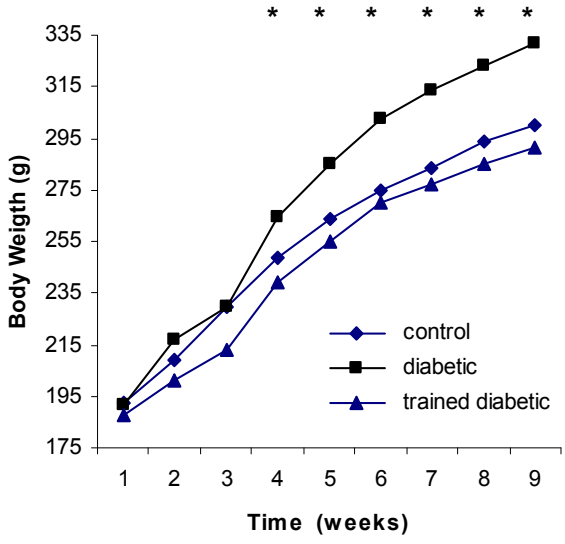
تجزیه و تحلیل آماری

بعد از اینکه طبیعی بودن داده ها با استفاده از آزمون K – S تایید شد، جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت متغیرها بین گروههای تحقیق از آزمون آماری ONE WAY ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت در مقایسه دو گانه از آزمون آماریt استیودنت استفاده شد. مقدار α درتمامی مراحل برابر با ۰/۰۵در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

وزن بدن

تغییرات وزن بدن در شکل ۱ گزارش شده است. کاهش اندک در وزن بدن در هفته بعد از تزریق STZ در گروه‌های دیابتی مشاهده و بعد از آن روند افزایش وزن در تمامی گروه‌ها به صورت طبیعی ادامه یافت. بعد از گذشت ۴ هفته از زمان شروع مصرف غذای پرچرب توسط گروه‌های دیابتی، اختلاف وزن بین گروه کنترل دیابتی و سایر گروه‌ها معنی‌دار شد و این اختلاف تا پایان تحقیق ادامه داشت.



* اختلاف معنی دار گروه کنترل دیابتی با سایر گروه‌ها (p <۰/۰۵)، [کنترل سالم (n =۹)، دیابتی (n =۱۲)، تمرین دیابتی(n =۱۱)]

شکل ۱- تغییرات وزن بدن در گروه های مختلف تحقیق

تاثیر STZ و غذای پرچرب بر متغیرهای متابولیک

جدول ۳ تاثیر STZ و غذای پر چرب بر متغیر های متابولیک را نشان می‌دهد. نتایج تست تایید دیابت قبل از شروع تحقیق افزایش معنی دار سطح گلوکز خون (Pre glucose) در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم را نشان داد (p <۰/۰۱). نتایج آزمون HOMA-IR در پایان تحقیق نیز اختلاف معنی دار بین سطوح گلوکز خون پلاسما بین گروه‌های دیابتی و گروه کنترل سالم را نشان داد (p <۰/۰۱).

جدول ۳- مشخصات آنتروپومتریک و متابولیکی گروهها در انتهای تحقیق

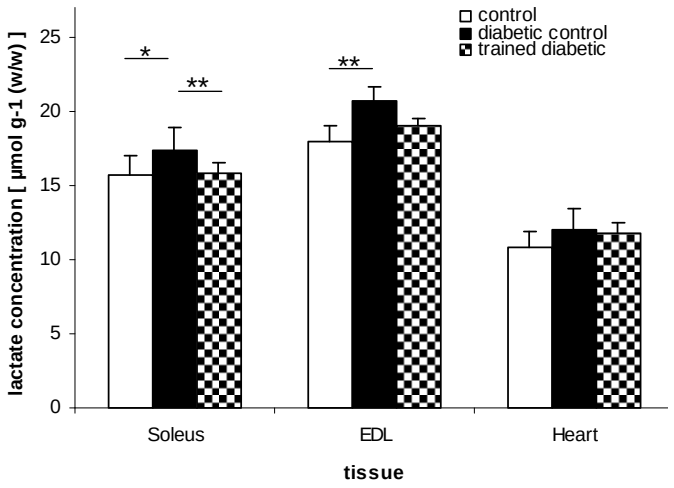
گروهها	کنترل سالم	کنترل دیابتی	تمرین دیابتی
وزن [g]	۲۹۹/۷±۳۰/۸۱**	۳۳۱/۷±۱۸/۱۴*	۲۹۱/۱۷±۲۵/۲۱**
گلوکز[ng/dl]	۱۰۶/۴±۹/۲۶**	۳۹۴/۴۴±۴۸/۷۴*	۳۰۱/۷±۴۷/۹۵*,**
انسولین [µU/ml]	۶/۲۵±۱/۱۵**	۱۰/۵۵±۱/۱۲*	۸,۹۵ ±.۷۸ *,**
شاخص HOMA-IR	۱/۶۲±۰/۲۴**	۱۰/۴۸±۱/۴۴*	۶/۶۸±۱/۳۱*,**
غلظت لاکتات پلاسما	۱/۹۱±۰/۳۱	۳/۸۴±۰/۵۶ *	۳/۵۴±۰/۴۷*

*اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم(p <۰/۰۵)، ** اختلاف معنی دار با گروه کنترل دیابتی(p <۰/۰۵)
(کنترل سالم (n =۷) ، دیابتی (n =۹) ، (تمرین دیابتی (n =۹)

اختلاف معنی دار بین سطوح انسولین پلاسما گروه کنترل دیابتی و دو گروه دیگر(p <۰/۰۱)و گروه تمرین کرده دیابتی به دست آمد(p <۰/۰۵). (مقادیر HOMA-IR index در دو گروه دیابتی نسبت گروه کنترل سالم افزایش معنی دار داشت(p <۰/۰۱)، ضمن اینکه بین دوگروه دیابتی نیز اختلاف معنی دار مشاهده شد(p <۰/۰۱).(جدول ۳).

میزان لاکتات پلاسما و عضله

قبل از اعمال پروتکل تمرینی اختلاف معنی دار مقادیر لاکتات پلاسما فقط بین گروه تمرین دیابتی و کنترل سالم وجود داشت[F(۲ ،۲۹) = ۴/۵۶ p <,۰/۰۱] بعد از اعمال پروتکل تمرینی اختلاف معنی دار بین گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی[F(۲ ،۲۹) = ۴۹/۲p <,۰/۰۰۱]، کنترل سالم و تمرین دیابتی[F(۲ ،۲۹) = ۴/۵۶ p <,۰/۰۱] وجود داشت (جدول ۳). در عضله نعلی، اختلاف معنی دار بین گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی[F(۲ ،۲۲) = ۸/۶۲p <,۰/۰۱]، کنترل دیابتی و تمرین دیابتی[F(۲ ،۲۲) = ۷/۵۶ p <,۰/۰۱] وجود داشت (شکل ۳). در عضله EDL، اختلاف معنی دار بین گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی[F(۲ ،۲۲) = ۱۷/۰۱p <,۰/۰۱] (شکل ۲).



کنترل سالم (n=۷)، دیابتی (n=۹)، تمرین دیابتی (n=۹)

شکل ۲- تغییرات لاکتات عضلات اسکلتی و قلبی بعد از اجرای پروتکل تمرینی

بیان MCT1

بخش SL

اختلاف معنی‌دار بین گروه تمرینی دیابتی و کنترل دیابتی (به نفع تمرین دیابتی) [F(۲، ۱۵) = ۴/۵۶ p <،۰/۰۱] و گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی (به نفع کنترل سالم) [F(۲، ۱۵) = ۳۱/۰۲p <،۰/۰۱] در عضله EDL وجود داشت (شکل ۳).

اختلاف معنی دار بین گروه تمرینی دیابتی و کنترل دیابتی (به نفع تمرین دیابتی)[F(۲، ۱۵) = ۱۰/۹۳p <،۰/۰۵] و گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی (به نفع کنترل سالم) [F(۲، ۱۵) = ۱۲/۷p <،۰/۰۱] در عضله نعلی وجود داشت (شکل ۳).

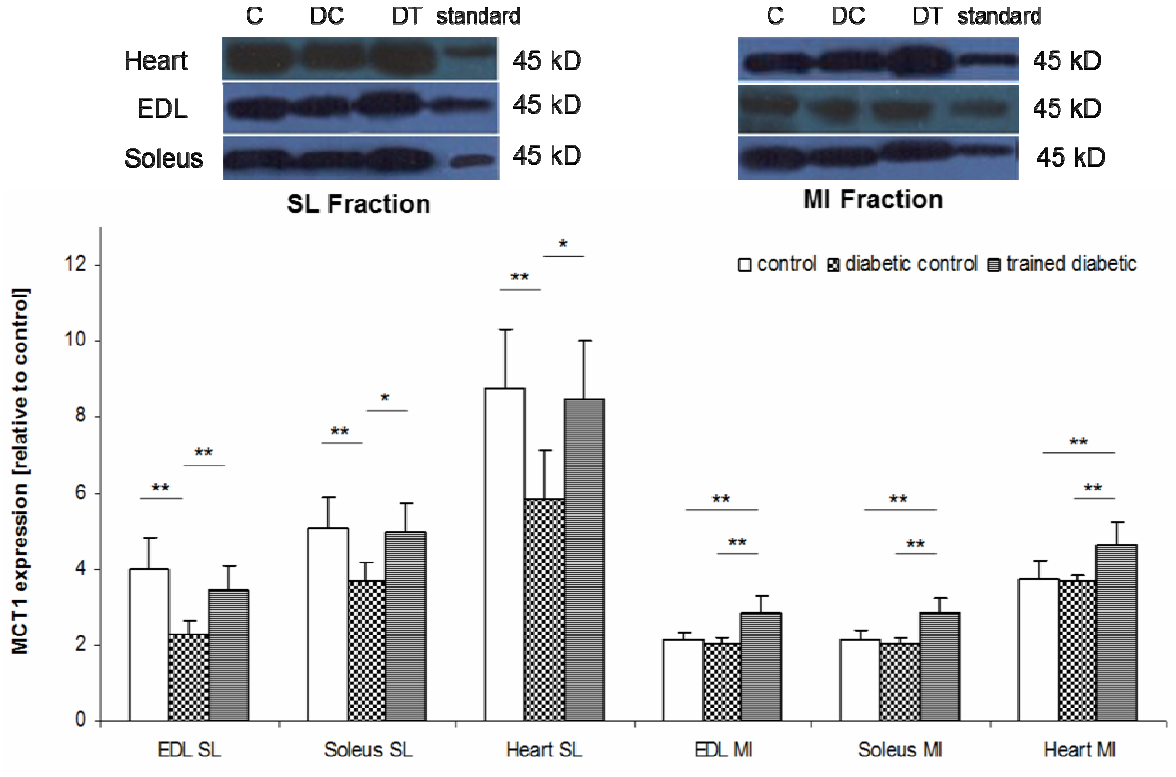
اختلاف معنی دار بین گروه تمرینی دیابتی و کنترل دیابتی (به نفع تمرین دیابتی)[F(۲، ۱۵) = ۱۷/۴۳p <،۰/۰۵] وگروه کنترل سالم و کنترل دیابتی(به نفع کنترل سالم) [F(۲، ۱۵) = ۲۱/۴۵p <،۰/۰۱] در عضله قلبی وجود داشت (شکل ۳).

بخش MI

اختلاف معنی دار بین گروه تمرینی دیابتی و کنترل سالم(به نفع تمرین دیابتی) [F(۲، ۱۵) = ۱۵/۷۷p <،۰/۰۱]، تمرین دیابتی و کنترل دیابتی (به نفع تمرین دیابتی) [F(۲، ۲۹) = ۱۶/۱۷p <،۰/۰۱] در عضله نعلی وجود داشت (شکل ۳).

اختلاف معنی دار بین گروه تمرینی دیابتی و کنترل دیابتی (به نفع تمرین دیابتی)[F(۲، ۱۵) = ۱۴/۹۹p <،۰/۰۱] وگروه کنترل سالم و تمرین دیابتی (به نفع تمرین دیابتی)[F(۲، ۱۵) = ۱۳/۷۱p <،۰/۰۱] F[F (2,15) =درعضله EDLوجود داشت (شکل ۳).

اختلاف معنی دار بین گروه تمرینی دیابتی و کنترل دیابتی (به نفع تمرین دیابتی) [F(۲، ۱۵) = ۹/۴۶p <،۰/۰۱] و گروه کنترل سالم و تمرینی دیابتی (به نفع تمرین دیابتی) [F,(۲، ۱۵) = ۱۰/۷۵p <،۰/۰۱]در عضله قلبی وجود داشت (شکل ۳).



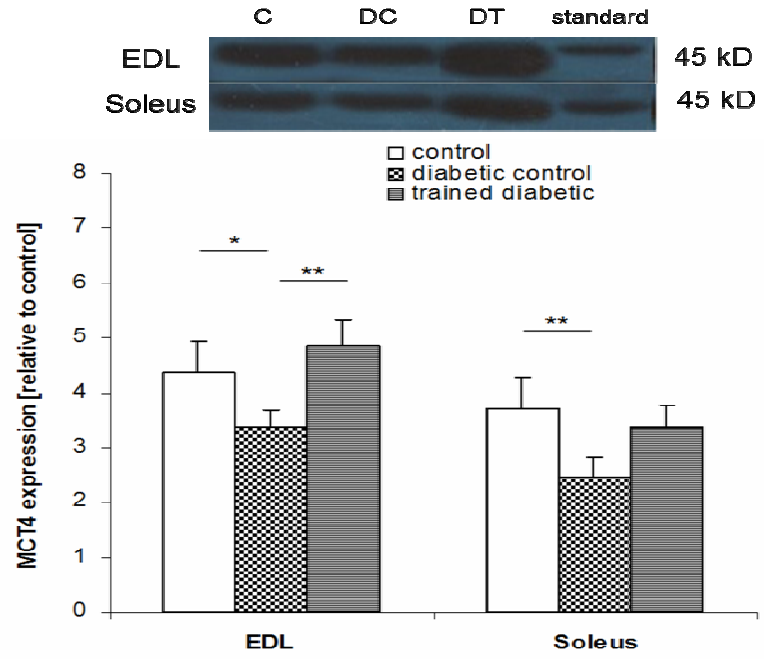
[کنترل سالم (n=۶)، دیابتی (n=۶)، (تمرین دیابتی (n=۶)]

شکل ۳- تغییرات MCT1 در بخش MI و SL عضلات اسکلتی و قلبی بعد از اجرای پروتکل تمرینی

بیان MCT4

اختلاف معنی دار بین گروه کنترل دیابتی و کنترل سالم (به نفع کنترل سالم)[F(۲ ،۱۵) = ۱۰/۴۲p <،۰/۰۱] در عضله نعلی وجود داشت (شکل ۴).

اختلاف معنی‌دار بین گروه تمرینی دیابتی و کنترل دیابتی (به نفع تمرین دیابتی) [F(۲ ،۱۵) = ۱۱/۹۶p <،۰/۰۱] وگروه کنترل سالم و کنترل دیابتی(به نفع کنترل سالم)[F(۲ ،۱۵) = ۷/۱۶p <،۰/۰۵] درعضله EDL وجود داشت (شکل ۴).



[کنترل سالم (n=۶)، دیابتی (n=۶)، (تمرین دیابتی (n=۶)]

شکل ۴- تغییرات MCT4 در عضلات EDL و نعلی بعد از اجرای پروتکل تمرینی

بحث

مطالعه حاضر با ایجاد شرایط دیابت نوع ۲ در رت‌های آزمایشگاهی شروع و با پیاده کردن یک دوره تمرین استقامتی به منظور تعیین تغییرات در بیان MCT1 و MCT4 به صورت جداگانه در غشای میتوکندری به عنوان محل اصلی اکسیداسیون این سوبسترا و غشای پلاسماییی به عنوان محل محدود کننده برداشت آن و پیامد های ناشی از این تغییرات بر غلظت های لاکتات استراحت در خون، عضلات اسکلتی و قلبی و تاثیر نهایی آن بر مقاومت انسولین پایان رسید. اهم نتایج تحقیق به شرح زیر بود: ۱ – تاثیر دیابت بر بیان MCT1 در غشای میتوکندری و پلاسماییی متفاوت است و بیانMCT1 در غشای میتوکندری نسبت به سارکولما کمتر تحت تاثیر دیابت قرار می گیرد ۲ – تاثیر تمرین استقامتی بر بیان MCT1 در غشای میتوکندری و پلاسمایی متفاوت است و تغییرات ناشی از تمرین استقامتی بر بیانMCT1 در غشای میتوکندری نسبت به سارکولما بارزتراست ۳ – افزایش بیان MCT1 در غشای میتوکندری منجر به کاهش غلظت لاکتات استراحت در عضله اسکلتی و قلبی می شود و نتیجه این تغییرات کاهش مقاومت انسولین در شرایط دیابت نوع ۲ است.

بعد از اعمال پروتکل تمرینی تغییر معنی‌داری در میزان لاکتات استراحتی پلاسما در گروه تمرین دیابتی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی مشاهده نشد هرچند که تمایل به کاهش در گروه تمرین دیابتی مشاهده گردید. علی‌رغم افزایش معنی‌دار در محتوی MCT1 در غشای سارکولمائی عضلات اسکلتی و قلبی، هنوز غلظت لاکتات در خون بالا بود که نشان از تاثیر فاکتورهای دیگری در تعیین غلظت

استراحتی لاکتات پلاسما در شرایط دیابت نوع ۲ است. در تایید این موضوع، نشان داده شده است که بافت‌های چربی در افراد چاق، مقادیر غیرطبیعی لاکتات را به درون خون آزاد می‌کنند [۲۴]. بر این اساس می‌توان این فرضیه را توسعه داد که به دلیل اینکه در مقایسه با عضلات اسکلتی، بافت چربی در حین تمرین غیرفعال است، تمرین نمی‌تواند به اندازه عضله اسکلتی بر این بافت‌ها تأثیرگذار باشد و بافت‌های چربی می‌توانند تا حدودی پایدار ماندن شرایط هایپرلاکتاتمیا را در این تحقیق تفسیر نمایند. به منظور تعیین نقش بافت های چربی زیر پوستی و احشایی بیان ژن MCT1 که مهمترین ایزوفرم مونوکربوکسیلات ترانسپورتر در بافتهای چربی است [۲۵] در این بافت‌ها اندازه گیری شد و افزایش بیان ژن MCT1در بافت‌های چربی احشائی و زیرپوستی در مطالعه حاضر در گروه کنترل دیابتی نسبت به سایر گروه‌های تمرینی دیده شد (داده‌ها گزارش نشده‌اند). این افزایش در چربی احشائی نسبت به چربی زیرپوستی بیشتر بود که نشان‌دهنده این است که بافت‌های چربی احشائی در مقایسه با چربی زیرپوستی نقش مهمتری در تولید لاکتات و مقاومت انسولین متعاقب آن دارند. در عین حال، آن بافتی که مسؤول افزایش غلظت لاکتات پلاسما می باشد، عمدتاً بافت چربی زیرپوستی است، چرا که لاکتات آزاده شده از بافت‌های چربی احشائی به درون گردش خون پورتال کبدی وارد می‌شود و به درون گردش خون سیستمیک وارد نمی‌شود. در شرایط دیابت نوع ۲، دو عامل باعث افزایش آزاد شدن بیشتر لاکتات از بافت های چربی می‌شوند. نخست اینکه پرز و همکاران اخیرا نشان دادند که ازدیاد بافت‌های چربی در شرایط دیابت نوع ۲ عمدتا از طریق افزایش حجم صورت می گیرد که این عامل باعث افزایش مسافت آدیپوسیت‌ها از بستر عروقی می شود و به دلیل کمبود اکسیژن این بافت‌ها جهت تامین انرژی به میسر بی هوازی متکی می شوند که در نهایت با افزایش تولید لاکتات و آزاد شدن بیشتر این سوبسترا به درون گردش خون همراه است [۲۶،۲۷]. عامل دیگر تغییر نقش MCT1 در شرایط هایپوکسی از برداشت کننده به آزاد کننده لاکتات است که اخیرا به آن اشاره شده است [۲۶،۲۷].

افزایش بیان ژن MCT1 در بافت‌های چربی احشائی و زیرپوستی در مطالعه حاضر در گروه کنترل دیابتی نسبت به سایر گروه‌های تمرینی دیده شد و با توجه به مطالب فوق می توان بخشی از بالا ماندن غلظت لاکتات استراحت در گروه های دیابتی تحقیق حاضر را تفسیر کرد. بالا ماندن غلظت لاکتات استراحت در گروه‌های دیابتی اهمیت بسیار زیادی در شرایط دیابت نوع ۲ دارد چرا که افزایش در میزان غلظت لاکتات پلاسما می‌تواند باعث ایجاد رقابت سوبسترائی بین لاکتات و گلوکز و اسیدچرب شود و از طریق کاهش برداشت گلوکز، میزان مصرف آن را کاهش و به توسعه شرایط هایپرگلیسیمیا و در نهایت مقاومت انسولین کمک نماید [۲۸]. جهت تعیین نقش غلظت لاکتات پلاسما در ایجاد رقابت سوبسترایی، متغیرهای FFA، TG، گلوکز پلاسما، لاکتات پلاسما و عضله وارد آنالیز رگرسیون شدند تا سهم هر یک در واریانس شاخص HOMA-IR تعیین گردد. نتایج آنالیز رگرسیون نشان داد که FFA وTG بر روی هم ۴۱,۴ درصد و لاکتات پلاسما و عضله بر روی هم ۲۷,۱ درصد واریانس را شامل شدند. سهم گلوکز در معادله رگرسیون ۲۱,۶ درصد بود.

به دلیل اینکه در مطالعه حاضر، افزایش وزن در گروه کنترل دیابتی نسبت به سایر گروه اتفاق افتاد، عاقلانه است که در هنگام تفسیر نقش عضلات اسکلتی و بافت‌های چربی، اثر توده نیز در نظر قرار بگیرد. این احتمال وجود دارد که در اثر افزایش بیشتر توده چربی در مقایسه با توده عضلانی، نقش بافت‌های چربی در تعیین سطوح استراحتی لاکتات پرنگ‌تر شود، هرچند در این مطالعه، ترکیب بدن مورد مطالعه قرار نگرفت، لیکن تمایل به کاهش در غلظت استراحتی لاکتات پلاسما در گروه تمرین دیابتی که با عدم تفاوت معنی دار در متغیر وزن همراه بود می‌تواند درستی این فرضیه را تأیید نماید.

عامل دیگر در افزایش سطوح استراحتی غلظت لاکتات پلاسما، شرایط هایپرانسولینمیا است. نشان داده شده است که انسولین آزادسازی خالص لاکتات در بافت‌های چربی و عضلات اسکلتی را تحریک می‌کند [۲۸]. مطالعاتی که از افزایش مجازی انسولین استفاده کرده‌اند [۹۷]، نشان داده‌اند که در شرایط هایپرانسولینمیا، بافت‌های چربی سهم

بیشتری در آزادسازی لاکتات به درون پلاسما را به خود اختصاص می‌دهند. به عبارت دیگر در شرایط هایپرانسولینما سطوح لاکتات پلاسما، عمدتاً به واسطه نرخ پاکسازی گلوکز در بافت‌های غیر عضلات اسکلتی از قبیل بافت‌های چربی مشخص می‌شود.

برخلاف غلظت استراحتی لاکتات پلاسما، غلظت استراحتی لاکتات در عضلات اسکلتی در گروه تمرینی نسبت به گروه همتای خود کاهش یافت. این در صورتی اتفاق افتاد که غلظت استراحتی لاکتات عضلات در گروه تمرین دیابتی به سطح طبیعی رسید، چرا که اختلاف معنی دار بین گروه کنترل سالم و تمرین دیابتی دیده نشد. رقابت سوبسترایی لاکتات در عضله اسکلتی از طریق رقابت این سوبسترا با پیروات – محصول نهایی گلیکولیز هوازی – جهت اکسیداسیون در سیکل کربس به انجام می رسد. در حقیقت، لاکتات که در شرایط چاقی و NIDDM افزایش می‌یابد در جریان خون، بوسیله بافت‌های محیطی برداشت می‌شود. جایی که می‌تواند به پیروات تبدیل شود، مورد اخیر به پیروات ناشی از تجزیه گلوکز اضافه می‌شود و هر دو در نهایت در چرخه تری کربوکسیلیک اسید متابولیزه می‌شوند. افزایش سطوح لاکتات در عضلات اسکلتی می‌تواند نرخ ناپدید شدن گلوکز را کاهش دهد، این در حالی است که این کاهش در میزان برداشت گلوکز وابسته به انسولین عمدتاً در عضلات اسکلتی اتفاق می‌افتد و از این فرضیه حمایت می‌کند که لاکتات عضله می‌تواند نقش مهمی در توسعه مقاومت انسولین داشته باشد [۷]. تداخل اعمال شده توسط لاکتات در توسعه مقاومت انسولین می‌تواند در مراحل مختلف اتفاق بیفتد. این مراحل شامل کاهش فسفریلاسیون گلوکز [۲۹] و کاهش در mRNAGLUT4 (۲۹) می باشد. عمل دیگر لاکتات با افزایش محتوی زیر واحد کاتالیکی پیروات دهیدروژناز PDH (ELα) mRNA صورت می‌گیرد. در مطالعاتی که از افزایش مجازی لاکتات استفاده کرده‌اند، میزان بیان ژن این آنزیم افزایش یافته است که احتمالاً به واسطه سطوح افزایش یافته سوسبترایش یعنی پیروات اتفاق می‌افتد [۷].

لاکتات می‌تواند نرخ برداشت گلوکز را از طریق تنظیم منفی GLUT4 کاهش دهد که منجر به کاهش گلیکولیز و نهایتاً تولید پیروات ناشی از روند گلیکولیز شود و از طرفی با افزایش موجودیت این سوبسترا تبدیل آن به پیروات فزونی می‌گیرد. افزایش این آنزیم در شرایط هایپر لاکتاتمیا نه تنها نیاز به متابولیزه کردن سوبسترای زیادی را تفسیر می‌کند، بلکه یک بار دیگر رقابت سوبسترایی بین لاکتات و گلوکز را تأیید می‌کند. جهت روشن شدن نقش لاکتات عضله بر مقاومت انسولین مشاهده شده در گروه‌های دیابتی تحقیق از همبستگی استفاده شد (داده‌های گزارش نشده) و ارتباط مثبت و متوسط بین میزان سطوح استراحتی لاکتات عضله نعلی و مقاومت انسولین به دست آمد (r=۴۷) که بر نقش لاکتات که توسعه مقاومت انسولین از طریق رقابت با پیروات تأکید می‌کند. این ارتباط در مورد عضله EDL معنی دار نبود.

در تحقیق حاضر غلظت لاکتات عضله به دنبال اعمال پروتکل تمرینی در گروه تمرین دیابتی کاهش معنی‌دار داشت. در مقایسه با غلظت لاکتات پلاسما، غلظت لاکتات در عضلات اسکلتی کاهش معنی‌دار داشت. این کاهش هم در گروه تمرینی سالم و هم گروه تمرینی دیابتی مشاهده شد. این مسئله، بازگوکننده افزایش در فعالیت اکسیداتیو عضله است که با افزایش در محتوی سیتوکروم اکسیداز (داده های گزارش نشده) در تحقیق حاضر تأیید می‌شود. به دنبال افزایش توان اکسیداتیو عضله، میزان پاکسازی لاکتات در عضله فزونی و میزان غلظت آن در این بافت‌ها کاهش می‌یابد. این کاهش اهمیت بسیار زیادی در توسعه مقاومت انسولین دارد چرا که تزریق درون عضلانی لاکتات باعث ایجاد و توسعه مقاومت انسولین و کاهش جذب گلوکز توسط عضلات اسکلتی می‌شود [۹]. افزایش غلظت استراحتی لاکتات عضله می تواند مسیر سیگنالینگ انسولین در برداشت گلوکز را مختل می کند. افزایش لاکتات می‌تواند فعالیت مسیر گلیکولیز را کاهش دهد. هم چنین کاهش در برداشت گلوکز وابسته به انسولین در شرایط هایپر لاکتاتمیا دیده می شود. اختلال در مسیر سیگنالینگ انسولین، با کاهش تحریک IRS-1 و IRS-2 توسط انسولین در مسیر سیگنالینگ IP3 صورت می گیرد [۹].

عامل تعیین کننده دیگر، افزایش میزان MCT1 در غشای میتوکندری عضله اسکلتی است که در تحقیق حاضر در هر

دو عضله اسکلتی در گروه‌های تمرینی نسبت به گروه‌های همتا افزایش بیشتری داشت. نشان داده شده است که تمرین استقامتی باعث افزایش فرایندهای نسخه برداری MCT1 می‌شود که می تواند بخشی از این افزایش ناشی از تمرین در بیان MCT1 را تفسیر نماید [۳۰]. با افزایش میزان MCT1 در غشای میتوکندری نرخ ورود لاکتات به درون میتوکندری به صورت مستقیم افزایش می‌یابد که به کاهش غلظت لاکتات استراحت عضله کمک می‌کند.

برای اولین بار در مطالعه حاضر تأثیر بلندمدت تمرینات استقامتی بر محتوی MCTs را به صورت جداگانه در سارکولما و غشای میتوکندری در شرایط سالم و دیابتی نوع ۲ در عضلات اسکلتی گزارش شد. حضور MCT1 در هر دو بخش SI و MI عضلات اسکلتی و هم چنین افزایش معنی‌دار آن به دنبال اعمال پروتکل تمرینی، نقش این ایزوفرم در نظریه درون و بین سلولی لاکتات را مورد تأیید قرار می دهد. درحالیکه وجود MCT4 فقط در سطح سارکولما بیانگر نقش این ترانسپورتر در شاتل بین سلولی لاکتات است. در مطالعات قبلی بیان MCT1 در عضلات اسکلتی فقط در سطح سارکولما و آنهم در نمونه عضله MU اندازه‌گیری شده است که در آنها آلودگی RBCها برداشته نشده است و بین پاسخ میتوکندری و سارکولما افتراق ایجاد نکرده‌اند. در مطالعه ما با انجام سانتریفوژهای مختلف هم غشای اریتروسیت‌ها حذف شدند و هم بخش MI وSL از هم جدا شدند. صحت تخلیص دو غشا در مطالعه حاضر به وسیله استفاده از مارکرهای منفی کنترل شد. سیتوکروم اکسیداز به عنوان مارکری که باید در بخش SL وجود نداشته باشد ولی در بخش MI یافت شود و GLUT1 به عنوان مارکری که دو بخش SL یافت می‌شود ولی در بخش MI وجود ندارد، جهت اطمینان از صحت تخلیص غشاء استفاده شدند. میزان آلودگی بخش SL به میتوکندری در تحقیق حاضر بسیار ناچیز بود چرا که چگالی باند Cox در بخش SL نسبت به MI حدود ۰/۱ بود که قابل چشم‌پوشی بود. افزایش در میزان MCT1 در بخش SL می‌تواند کاهش اندک غلظت لاکتات پلاسما در گروه دیابتی تمرین را تفسیر کند. دو نکته مهم در پاسخ میزان MCT1 در بخش MI در تحقیق حاضر بدست آمد: نخست اینکه علیرغم کاهش معنی دار میزان MCT1 در سارکولما در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم، این کاهش در غشای میتوکندری دیده نشد که نشان دهنده این است که بیان MCT1 در سارکولما تحت تاثیر تغییرات متابولیکی گردش خون نیز واقع می شود. مورد اخیر در تحقیق Bonen و همکاران [۳۱] نیز تایید شد که طی آن تجویز یک هفته‌ای تستسترون بیان MCT1 و MCT4 را در عضله پلانتاریس و محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 را در ۵ عضله متفاوت افزایش داد. دوم اینکه در پاسخ به تمرین میزان بیان MCT1 در غشای میتوکندری نسبت به سارکولما در هر دو عضله اسکلتی افزایش بیشتری داشت. این نتیجه یک بار دیگر تایید می کند که ورود و اکسیداسیون مستقیم لاکتات در میتوکندری صورت می‌پذیرد و نقش این انتقال دهنده در شاتل درون سلولی لاکتات را تایید می‌کند.

به طور خلاصه نتایج تحقیق حاضر نشان داد که محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 در شرایط دیابت نوع ۲ در غشای پلاسمایی کاهش قابل ملاحظه دارد در حالیکه بیان MCT1 در غشای میتوکندری تحت تاثیر دیابت واقع نمی‌شود. تمرین استقامتی می‌تواند این کاهش بیان را تعدیل و به سطوح طبیعی نزدیک کند. چنین تعدیل کاهش در بیان MCT1 و MCT4 سارکولمایی و افزایش در بیان MCT1 میتوکندریایی در شرایط دیابت نوع ۲ به عنوان بخشی از سازوکارهای سلولی مطرح می‌شوند که به ترتیب در کاهش غلظت لاکتات استراحت پلاسما و عضله ایفای نقش کرده و بخشی از اثرات مفید فعالیت بدنی بر کنترل مقاومت انسولین را توجیه می کنند.

سپاسگزاری

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه تهران به جهت حمایت مالی از تحقیق حاضر، شرکت دام و طیور کانی دام و موسسه واکسن سازی و سرم سازی رازی کرج به جهت همکاری در تهیه غذای پر چرب ابراز می دارند.

مأخذ

1. Susan LM, Bonen A, Vusse GL. Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: Role of sarcolemmal substrate transporters. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2007; 299: 5–18.
2. Guillaume P, Karen L, Antonia PM, Raynaud E, Pre faut C, Mercier J. Impaired sarcolemmal vesicle lactate uptake and skeletal muscle MCT1 and MCT4 expression in obese Zucke rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E1308–E1315.
3. Bouche C, Serdy S, Kahn C R, Goldfine AB. The Cellular Fate of Glucose and Its Relevance in Type 2 Diabetes.*Endocrine Reviews*2004; 25(5):807–830.
4. Metza TL, Sirventa P, Pya G, Brunb JF, Fedoub C, Raynaudb E, Merciera J. Relationship between blood lactate concentration and substrate utilization during exercise in type 2 diabetic postmenopausal women. *Metabolism Clinical and Experimental*2005; 54: 1102– 1107.
5. Ghanassia E, Brun JF, Fedou C, Raynaud E, Mercier J. Substrate oxidation during exercise: type 2 diabetes is associated with a decrease in lipid oxidationand an earlier shift towards carbohydrate utilization. *Diabetes Metab* 2006; 32: 604-610.
6. Pendergrass M, Bertoldo A, Bonadonna RG, Nucci L, Mandarino C, Cobelli RA. Muscle glucose transport and phosphorylation in type 2 diabetic, obese nondiabetic, and genetically predisposed individuals. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E92–E100.
7. Lombardi A, Fabris MR, Bassetto F, Serra R, Leturque A, Federspil G et al. Hyperlactatemia reduces muscle glucose uptake and GLUT-4 mRNA while increasing (E1a) PDH gene expression in rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*1999; 39: E922–E929.
8. Brooks GA. Lactate shuttles in Nature. *Biochemical Society Transactions* 2002;Vol 30, part 2.
9. Brooks GA. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Med. Sci. Sports Exerc*2000; Vol. 32, No. 4, pp. 790–799.
10. Carsten J, Halestrap AP. Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *Journal of Physiology*1999; 517.3, pp. 633-642.
11. Andrew PH, Nigel TP. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family : structure, function and regulation. *Biochem.J* 1999; 343: 281-299.
12. Kelley KM, Jason JH, Navarre C, Gladden LB. Lactate metabolism in resting and contracting canine skeletal muscle with elevated lactate concentrationn. *J Appl Physiol*2002; 93: 865–872.
13. Thomas C, Perrey S, Lambert K, Hugon G, Mornet D, Mercier J. Monocarboxylate transporters, blood lactate removal after supramaximal exercise, and fatigue indexes in humans. *J Appl Physiol* 2005; 98: 804–809.
14. BonenA, MioT, DraganaM, CatherineH, JohnJ.H, AndrewP. Isoform-specific regulation of the lactate transporters MCT1 and MCT4 by contractile activity.*Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E1131–E1138.
15. Bonen A, Miskovic D, Tonouchi M, Lemieux K, Wilson MC, Marette A et al. Abundance and subcellular distribution of MCT1 and MCT4 in heart and fasttwitch skeletal muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab*2000; 278: E1067–E1077.
16. Bonen A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle.*Eur J Appl Physiol*2001; 86: 6-11.
17. Brooks GA, Marcia A, Brown CE, Sicurello JP, Herve D. Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1. *J Appl Physiol*1999; 87(5): 1713–1718.
18. Taisuke E, YoshidaY, Hatta H, Bonen A. Exercise training alleviates MCT1 andMCT4 reductions in heart and skeletal muscles of STZinduced diabetic rats. *J Appl Physiol* 2003; 94: 2433–2438.
19. Viswanad KB, Lydia A, Kaul CL, RamaraoP. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening Srinivasan. *Pharmacological Research 2005;* 52 313–320.
20. Sharma AK, Srinivasan BP. Triple verses glimepiride plus metformin therapy on cardiovascular risk biomarkers and diabetic cardiomyopathy in insulin resistance type 2 diabetes mellitus rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*2009; 38 433–444.
21. Lore M, ermaelen MV. endurance training increases lactate transporter in male Zucker falfa rats. *Biochemical and Biophysical Research Communication*2005; 331: 1338-1345.
22. Butz CE, McClellandGB and Brooks GA. MCT1 confirmed in rat striated muscle mitochondria.*J Appl Physiol* 2004; 97: 1059–1066.
23. SchwochC and Pasoow H. prepration and properties of human rat erytrocyte ghosts.*molecullar and celluar biochemistry*1984; vol 2, num 2.
24. Heredia FP, Wood IS and Trayhurn P. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. *Pflugers Arch - Eur J Physio.*2010; 459:509–518.
25. Regazzetti C, Peraldi P, Gremeaux T, Najem-Lendom R. Hypoxia decreases insulin signaling

pathways in adipocytes.*Diabetes*2009; 58:95–103.
26. Trayhurn P, Wang B and WoodIS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr*2008; 00:227–235.
27. Metz L, Mercier J, Tremblay A, Alméras N, Denis R. Effect of weight loss on lactate transporter expression in skeletal muscle of obese subjects. *J Appl Physiol*2008; 104: 633-638.
28. Coletta DK, Balas B, Alberto OC, Muhammad B, Muhammad AG, Sangeeta RK et al. Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle in vivo.*Am J Physiol Endocrinol Metab*2008;294: E910–E917.
29. Becker ZK, Berger M, Berchtold P, Gries FA, Herberg L, Schewenen M. Treadmill training improves intravenous glucose tolerance and insulin sensitivity in fatty Zucker rats. *Diabetologia*1982; 22:468–474.
۳۰. حمید، رجبی.، روح‌اله، نیکویی، رضا، قراخانلو.، کبری، امیدفر.، امیرعباس، منظمی.، فرشته، عتابی.، آرش، حسین‌نژاد.، باقر، لاریجانی.، تعدیل کاهش بیان ژن‌های MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی نوع ۲ متعاقبتمرین استقامتی.، *مجله دیابت و لیپید ایران* ۱۳۸۹.، (۳) ۱۰، ۲۵۰-۲۴۱.
31. Enoki T, Yuko Y, Lally J, Hideo H, Bonen A. Testosterone increases lactate transport, monocarboxylate transporter MCT1 and MCT4 in rat skeletal muscle. *J Physiol* 2006; 577.1 pp: 433–443.