

تأثیر تمرین استقامتی بر بیان ژن‌های مبادله‌گر سدیم هیدروژن ۱ (NHE1) و هم انتقال دهنده سدیم بی‌کربنات ۱ (NBC1) در عضله قلب رت‌های دیابتی نوع ۲

امیرعباس منظمی^{۱*}، حمید رجبی^۲، رضا قراخانو^۳، علی مصطفایی^۱، کبری امیدفر^۴، وحید شهبازی ندر^۵، حمیدرضا محمدی مطلق^۶

چکیده

مقدمه: هدف از مطالعه پیش رو تعیین اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن‌های مبادله‌گر سدیم هیدروژن ۱ (NHE1) و هم انتقال دهنده سدیم بی‌کربنات ۱ (NBC1) در عضله قلب رت‌های دیابتی نوع ۲ بود.

روش‌ها: تعداد ۴۰ رت نژاد ویستار نر در سن ۴ هفتگی با میانگین وزن $93/7 \pm 9/8$ گرم انتخاب و به طور تصادفی به سه گروه کنترل سالم (۷ سر رت) کنترل دیابتی (۹ سر رت) و تمرینی دیابتی (۹ سر رت) تقسیم شدند. دیابت از طریق ترکیب تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین و مصرف غذای پرچرب ایجاد و تمرین استقامتی (دویدن روی نوار گردان جوندگان، شروع با ۲۰ متر بر دقیقه تدریجاً به ۳۰ متر بر دقیقه در هفته آخر) به مدت ۷ هفته، بر گروه تمرینی دیابتی اعمال شد. جهت تأیید مقاومت انسولین از مقادیر HOMA-IR استفاده گردید. ۴۸ ساعت پس از اتمام پروتکل تمرینی، رت‌ها تشریح و عضلات قلب آنها استخراج شد. اندازه‌گیری انسولین پلاسما به روش الایزا، غلظت گلوکز پلاسما با روش آنزیمی گلوکز اکسیداز و میزان بیان ژن mRNA (NHE1 و NBC1) از طریق روش Real time-PCR انجام گرفت. میزان بیان ژن mRNA (NHE1 و NBC1) با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت متغیرها بین گروه‌های تحقیق از آزمون آماری t مستقل و با استفاده از نرم‌افزار REST (permutation test) استفاده گردید. مقدار α در تمامی مراحل برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: یافته‌های تحقیق نشان داد مقادیر HOMA-IR INDEX در دو گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم بیشتر بود ($P < 0/001$)، همچنین اختلاف معنی‌دار بین میزان بیان mRNA (NHE1) بین گروه کنترل دیابتی و کنترل سالم دیده شد ($P < 0/05$). میزان بیان mRNA (NBC1 و NHE1) در گروه تمرینی دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش داشت اما این افزایش معنی‌دار نبود ($P < 0/05$). همچنین اختلاف معنی‌دار در بیان mRNA (NBC1) بین گروه کنترل دیابتی و کنترل سالم یافت نشد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج تحقیق نشان داد که بیان ژن mRNA (NBC1 و NHE1) در گروه کنترل دیابتی کاهش قابل ملاحظه‌ای دارد و تمرین استقامتی می‌تواند این کاهش بیان را در گروه تمرینی دیابتی جبران و به سطوح نرمال نزدیک کند.

واژگان کلیدی: تنظیم pH درون سلولی، تمرین استقامتی، مبادله‌گر سدیم هیدروژن، هم انتقال دهنده سدیم بی‌کربنات

۱- دانشگاه رازی کرمانشاه

۲- دانشگاه تربیت معلم تهران

۳- دانشگاه تربیت مدرس تهران

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

۵- دانشگاه پیام نور

۶- مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*نشانی: کرمانشاه، باغ ابریشم، دانشگاه رازی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، تلفن: ۰۹۱۲۷۲۶۱۰۲۶، نمابر: ۰۸۳۱-۴۲۷۴۵۸۵، پست الکترونیک: monazzami.amirabbas@gmail.com

مقدمه

کنترل و تنظیم pH_i سلول قلب جهت حفظ انقباض‌های مکرر عضلانی و جلوگیری از آسیب درحین فعالیت‌های ورزشی و همچنین در شرایط پاتوفیزیولوژیکی دیابت نوع ۲ از اهمیت خاصی برخوردار است [۱-۳]. بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که تجمع یون هیدروژن و در پی آن اسیدوز طی فعالیت‌های ورزشی در کاهش عملکرد ورزشی از طریق تغییر در ساختار پروتئین‌ها و کانال‌های یونی و اختلال در عملکرد آنها و همچنین اختلال در فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر گلیکولیز و نهایتاً اختلال در سرعت سنتز ATP انجام می‌گیرد [۴]. در عضله قلب تجمع یون هیدروژن و در پی آن اسیدوز با تاثیر بلقوه بر هر مرحله از فرایند زوج تحریک - انقباض و هموستاز کلسیم موجب اختلال در انقباض میوسیت می‌گردد [۵]. هر چند سازوکارهایی که از طریق آن اسیدوز موجب اختلال در عملکرد انقباضی میوسیت می‌گردد به خوبی مشخص نشده، اما نشان داده شده است که اسیدوز علاوه بر اثر بر روی فرایند زوج تحریک - انقباض، همچنین از طریق مهار کانال‌های کلسیمی، کاهش ذخیره کلسیم شبکه سارکوپلاسمی و تغییر جایگاه کلسیم در سیتوپلاسم موجب اختلال در عملکرد کلسیم می‌گردد [۶].

کاهش pH_i میوسیت در شرایط دیگری مانند دیابت نوع ۲ که در آن به علت مقاومت سلول‌ها به انسولین و افزایش مصرف ترکیبات کتوننی ایجاد می‌شود، نیز اتفاق می‌افتد [۷]. در این شرایط، پروتئین‌ها ماهیت خود را از دست می‌دهند و منجر به آسیب به بافت، اختلال در عملکرد و نقص ارگان می‌شوند [۷]. علاوه بر بیماری‌های شریان کرونری و افزایش فشار خون، هایپرتروفی بطن چپ از جمله مهمترین مشکلاتی است که در عضله قلب دیابتی نوع ۲ به وجود می‌آید که با تنظیم pH_i در ارتباط است [۸]. در این شرایط دیابت از طریق اسیدوز موجب اختلال در عملکرد انتقال دهنده‌های غشایی که مسئول تنظیم pH_i هستند، می‌گردد. در نتیجه برای سلول قلبی حیاتی است که کاهش pH_i را در سیتوزول از طریق جلوگیری از تجمع

پروتون در شرایط دیابت نوع ۲ و فعالیت ورزشی به تاخیر بی‌اندازد [۹،۱۰].

به هر حال در شرایط دیابت نوع ۲ و فعالیت ورزشی سازوکارهایی جهت هموستاز pH_i فعال می‌شوند که از مهمترین آنها می‌توان به فعالیت سیستم تامپونی و فعالیت انتقال دهنده‌های غشایی اشاره کرد. تغییر سریع در غلظت سیتوپلاسمی یون هیدروژن به وسیله سازوکارهای تامپونی که از بی‌کربنات، فسفات و پروتئین استفاده می‌کنند خنثی می‌شود اما به دلیل ظرفیت محدود این سازوکارها سلول به وسیله سازوکارهای انتقالی ویژه pH_i را حفظ می‌کند [۱۱]. مهمترین انتقال دهنده‌های غشایی در تنظیم pH_i در حالت استراحت و فعالیت عضلانی مبادله‌گر سدیم- هیدروژن، هم انتقال دهنده سدیم- بی‌کربنات و هم انتقال دهنده لاکتات - پروتون می‌باشند. در این مجموعه MCTها یا انتقال دهنده‌های لاکتات و پروتون به عنوان تنظیم کننده‌های وابسته به لاکتات و NBCها (انتقال دهنده سدیم و بی‌کربنات که دارای ۴ ایزوفرم وابسته به بافت هستند) و NHEها (مبادله‌گر سدیم و هیدروژن که دارای ۱۰ ایزوفرم وابسته به بافت هستند) هر دو به عنوان تنظیم کننده‌های غیر وابسته به لاکتات شناسایی شده‌اند [۹،۱۰]. در حالت استراحت و فعالیت با شدت پایین بخش عمده‌ای از خنثی سازی پروتون با مبادله‌گر سدیم- هیدروژن و هم انتقال دهنده سدیم- بی‌کربنات تعدیل می‌شود اما در شرایط فعالیت با شدت بالا هم انتقال دهنده‌های لاکتات- پروتون که با شیب لاکتات بالا تحریک می‌شوند بخش عمده تعدیل pH_i را به عهده می‌گیرند [۹،۱۰]. با توجه به ویژگی‌های ساختاری و عملکردی عضله قلب، نشان داده شده است که مبادله‌گر و انتقال دهنده NHE1 و NBC1 نقش بسیار مهمی را در تنظیم pH_i در شرایط اسیدوز ناشی از دیابت نوع ۲ و تمرین ایفا می‌کنند و فعالیت و عملکرد آنها از دلایل توجیهی جهت پاسخ‌های تطابقی قلب به این شرایط است [۹،۱۰].

مطالعه تغییرات NHE1 و NBC1 در عضله قلب فقط به تعدادی تحقیق در زمینه فعالیت و بیان پروتئین محدود

2. Monocarboxylate Cotransporter
3. Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporter
4. Na⁺/H⁺ Cotransporter

1. Intracellular pH

می‌شود و در زمینه بیان ژن این انتقال دهنده‌ها در شرایط دیابت نوع ۲ و تمرین تحقیقات محدودی صورت گرفته است. در یک مطالعه Prigent و همکاران نشان دادند که فعالیت مبادله‌گر NHE1 در عضله قلب رت‌های دیابتی ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین^۱ کاهش می‌یابد [۱۲]. هر چند کاهش فعالیت NHE1 ممکن است به علت کاهش بیان ژن آن در شرایط دیابت نوع ۲ باشد اما Pierce و همکاران نشان دادند بیان ژن mRNA (NHE1) عضله قلب گروه دیابتی ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین پس از ۸ هفته تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل ندارد [۱۳]. Prigent و همکاران در تحقیق دیگر نتایج مشابهی در ارتباط با اثر دیابت بر فعالیت NBC1 در گروه دیابتی نسبت به کنترل گزارش کردند [۱۴]. همچنین در تحقیقی که توسط Gan و همکاران بر روی عضله قلب رت‌ها انجام گرفت، نشان داده شد که ایسکمی عضله قلب موجب افزایش بیان ژن mRNA (NHE1) می‌گردد [۱۵]. علاوه بر این Sandman و همکاران در تحقیق دیگر گزارش کردند که در اثر انسداد عروق کرونری قلب بیان ژن و پروتئین هر دو مبادله‌گر و انتقال دهنده NHE1 و NBC1 افزایش پیدا می‌کند [۱۶].

رت‌های دیابتی افزایش می‌یابد [۱۷]. در تحقیق دیگر که توسط Darmellah و همکاران انجام گرفت، نشان داده شد که افزایش فعالیت NHE1 در رت‌های دیابتی با هایپرتروفی قلب مرتبط بوده و این افزایش فعالیت بدون تغییر در محتوی پروتئینی این انتقال دهنده رخ داده است. آنها همچنین گزارش کردند که بین NHE1 و عوامل درگیر در هایپرتروفی قلب ارتباط وجود دارد [۸].

نیکویی و همکاران، در یک مطالعه اثر تمرینات استقامتی بر بیان ژن و محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی و سالم را مورد ارزیابی قرار دادند، نتایج نشان داد که تمرین استقامتی بیان ژن و محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 را در گروه تمرینی دیابتی و سالم افزایش داده است [۱۸]. همچنین در تحقیق دیگر که

توسط Baker و همکاران بر روی رت‌ها انجام گرفت نشان داده شد که تمرینات با شدت پایین موجب افزایش بیان mRNA (MCT1) در قلب و تمرینات با شدت بالا فقط در عضلات اسکلتی اکسیداتیو موجب افزایش mRNA (MCT1) می‌شوند [۱۹]. در تحقیق دیگر Juel و همکاران اثر تمرینات قدرتی بر محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی افراد دیابتی نوع ۲ را مورد ارزیابی قرار دادند و نشان دادند که محتوی MCT1 در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم پایین‌تر است و تمرین قدرتی محتوی پروتئینی MCT1 را در گروه تمرینی دیابتی افزایش داده است و آن را به شرایط نرمال رسانده است [۲۰]. همچنین Claire و همکاران اثر تمرینات اینتروال شدید بر محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 و NBC در مورد ارزیابی قرار دادند و افزایش محتوی پروتئینی MCT1 و NBC در تارهای کند نسبت به تند را نشان دادند [۲۱]. در تحقیق دیگر Rasmussen و همکاران نشان دادند که یک جلسه تمرین سرعتی موجب افزایش معنی‌دار در بیان mRNA (NHE1) عضلات اسکلتی رت می‌شود. آنها همچنین گزارش کردند که سه هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنی‌دار بیان mRNA (NHE1) در عضلات اسکلتی کند می‌گردد اما این افزایش در سطح پروتئین NHE1 در عضلات اسکلتی معنی‌دار نبود [۲۲]. Juel و همکاران در یک تحقیق اثر تمرین با شدت زیاد بر محتوی NHE1 عضلات کند و تند رت‌ها را مورد بررسی قرار دادند و نشان داده شد که ایزوفرم NHE1 در عضلات بیان می‌شود و همچنین تمرین با شدت زیاد موجب افزایش محتوی این انتقال دهنده به میزان ۳۶ و ۲۹ درصد به ترتیب در تارهای گلیکولیتیکی و اکسیداتیوی می‌شود [۲۳]. در مجموع به نظر می‌رسد این گونه تحقیقات بیشتر انتقال دهنده‌هایی را که در شرایط تمرینات بیشینه فعال می‌شوند مورد توجه قرار داده‌اند و همچنین تحقیقات محدودی در زمینه اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن این انتقال دهنده‌ها در عضله قلب دیابتی وجود دارد.

در نتیجه با توجه به تحقیقات محدود در زمینه اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن این انتقال دهنده‌ها در عضله قلبی در شرایط سالم و دیابت نوع ۲، در این تحقیق به بررسی این

1. Streptozotocin

عنوان دیابت تعریف و رت‌های واجد شرایط وارد تحقیق شدند [۲۴].

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 طولانی‌تر تمرینی بیشتر از ۳۵ دقیقه امکان‌پذیر نبود و این مدت به عنوان مدت نهایی در اواخر تمرین در نظر گرفته شد. ضمن این که شدت به گونه‌ای انتخاب گردید که سطوح لاکتات را در حین تمرین دست‌خوش تغییر قابل ملاحظه نماید (۷۰-۶۰ درصد VO2MAX). Brooks و همکاران نشان دادند که این شدت تمرینی موجب افزایش قابل توجه سطوح لاکتات می‌شود [۲۵]. تمامی این اطلاعات با انجام مطالعات پایلوت روی ۴ رت به دست آمد. میزان لاکتات در شدت تمرینی ۳۰ متر بر دقیقه (۶۰ تا ۷۰ درصد vo2max) برابر با ۴ میلی‌مولار بود. دو هفته آخر نیز تمامی متغیرهای تمرینی ثابت نگه داشته شدند تا سازگاری‌های انجام شده در زمان تشریح به حالت یکنواخت خود برسند [۲۶، ۲۷].

تست HOMA-IR¹

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، بعد از ۸ ساعت ناشتایی نمونه خونی به میزان ۱ میلی‌لیتر از چشم حیوان جمع‌آوری و جداسازی پلاسما با سانتریفیوژ کردن در ۳۰۰۰g، ۱۰ دقیقه، ۴ C انجام و جهت اندازه‌گیری گلوکز و انسولین ناشتایی جهت تعیین HOMA-IR در ۸۰- نگهداری شد. اندازه‌گیری انسولین به روش الیزا و با کیت ساخت شرکت Millipore با حساسیت اندازه‌گیری یک نانوگرم به ازای هر میلی‌لیتر، # catalog number: EZRMI-13K و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. غلظت گلوکز با روش آنزیمی گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. مقادیر HOMA-IR با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۲۷]:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Insulin} [\mu\text{U/ml}] * \text{Glucose} [\text{mmol/l}]}{22.5}$$

که؛ ۱- آیا تمرین استقامتی بیان ژن این انتقال دهنده‌ها را تغییر می‌دهد و ۲- تعامل پاسخ تمرین و دیابت بر بیان ژن این انتقال دهنده‌ها چگونه است؟، پرداخته می‌شود تا از این طریق برخی از سازوکارهای مسئول تنظیم pH_i در عضله قلب معین گردد.

روش‌ها

تعداد ۴۰ رت نر نژاد ویستار در سن ۴ هفتگی با میانگین وزنی ۹۳/۷±۹/۸ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه و در شرایط دمایی ۲۲±۴ درجه سانتی‌گراد تحت سیکل ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی نگهداری شدند. وزن حیوان به طور روزانه ثبت و رت‌ها با غذای مخصوص رت و آب تغذیه شدند. بعد از گذشت دو هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن مطلوب)، رت‌ها با میانگین وزن ۱۸۳/۴۷±۱۱/۴ گرم به طور تصادفی ضمن همسان‌سازی بر اساس وزن به سه گروه کنترل سالم (۷سر رت)، کنترل دیابتی (۹سر رت) و تمرینی دیابتی (۹سر رت) تقسیم شدند. دیابت در این تحقیق از طریق ترکیب مصرف غذای پر چرب و تزریق استرپتوزوتوسین ایجاد شد. 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 [۲۴]. این ترکیب غذایی به وسیله تیم تحقیق به صورت دست‌ساز و با همکاری شرکت کانی دام و مؤسسه واکسن‌سازی و سرم‌سازی رازی ایران انجام گرفت. رت‌های گروه دیابتی به مدت دو هفته تحت مصرف غذای چرب قرار گرفتند در حالی که گروه کنترل سالم غذای طبیعی مصرف می‌کرد. بعد از آن تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان ۳۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم در بافر سیترات PH=۴/۵۱M بعد از ۶ ساعت ناشتایی در دو گروه دیابتی انجام گرفت. ۴۸ ساعت بعد از تزریق دارو، نمونه خونی از چشم حیوان جمع‌آوری و جداسازی سرم با سانتریفیوژ ۳۰۰۰g، ۱۰min، ۴ C انجام و غلظت گلوکز از روش آنزیمی گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. غلظت گلوکز بالاتر از ۳۰۰ dl/mg به

1. Homeostasis model of insulin resistance

PCR با استفاده غلظت ۱۰۰ نانوگرم از cDNA انجام گرفت (جدول ۴). برنامه مورد استفاده در Real time شامل 94° به مدت ۵ دقیقه - 94° به مدت ۴۵ (باز شدن ۴۵ ثانیه)، 60° به مدت ۴۵ ثانیه (جفت شدن) و 72° به مدت ۴۵ ثانیه (تکثیر) (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های مورد نظر با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ اندازه‌گیری شد [۱۶، ۲۲].

تجزیه و تحلیل آماری

بعد از این که نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون K-S تأیید شد، جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت متغیرها بین گروه‌های تحقیق از آزمون آماری t مستقل و با استفاده از نرم‌افزار REST (permutation test) استفاده گردید. مقدار α در تمامی مراحل برابر با ۰/۰۵ در 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 استرپتوزوتوسین 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.

تأثیر STZ و غذای پر چرب بر متغیرهای متابولیک

جدول ۵ تأثیر استرپتوزوتوسین و غذای پرچرب بر متغیرهای متابولیک را نشان می‌دهد. همچنین نتایج گلوکز خون پلاسما قبل و بعد از اجرای پروتکل تمرینی در شکل ۲ آورده شده است. نتایج تست تأیید دیابت قبل از شروع تحقیق افزایش معنی‌دار سطح گلوکز خون (Pre glucose) در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم را نشان داد ($P < 0.001$). نتایج آزمون HOMA-IR نیز در پایان تحقیق اختلاف معنی‌دار بین سطوح گلوکز خون پلاسما بین

واجد بودن شرایط مقاومت انسولین منوط به داشتن دو شرط بود: ۱- مقادیر HOMA-IR بالاتر از ۲/۵ [۲۷] و ۲- مقادیر انسولین ناشتایی بالاتر از ۱۶۰ پیکومول [۲۷] 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 به وسیله تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش و عضلات نعلی و بازکننده طویل انگشتان پا (EDL) بلافاصله استخراج و در نیتروژن -80° منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد [۱۹].

Real time-PCR

حدود ۵۰ میلی‌گرم عضله با روش هاون کوبی پودر گردید و جهت استخراج RNA تام به نسبت ۱ به ۱۰ در بافر لیز Bisol RNA-Lysis reagent به مدت ۱۵ دقیقه هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول حاصل در $4^{\circ}C$ ، ۱۰ دقیقه، $12000g$ سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت برداشته و با نسبت ۱ به ۲ Isol $0/2$ اولیه با کلروفورم مخلوط و به مدت هر ۱۵ ثانیه یک بار به آرامی تکان داده شد و سپس محصول را به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت. محصول در $4^{\circ}C$ ، ۱۵ دقیقه، $12000g$ سانتریفیوژ و بخش معدنی و آلی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته و هم حجم مایع رویی به آن ایزوپروپانل اضافه نموده و به مدت بیش از ۲۰ دقیقه در یخچال -20° قرار داده تا RNA جداسازی شود. در مرحله بعد محصول را به مدت ۱۰ دقیقه، $4^{\circ}C$ ، $12000g$ سانتریفیوژ نموده تا RNA رسوب کند. رسوب حاوی RNA در اتانول ۷۵ درصد شستشو و در $20\mu l$ آب فاقد RNase-Free حل گردید. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودراپسنجیده و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. cDNA با استفاده از یک میکروگرم از RNA و با استفاده از Reverse primers و آنزیم نسخه‌برداری معکوس انجام گرفت (جدول ۳). Real-Time

در میزان بیان mRNA (NHE1) در گروه تمرینی دیابتی (۱۸ درصد) نسبت به گروه کنترل دیابتی این افزایش معنی‌دار نبود ($P < 0/05$). از طرف دیگر افزایش بیان NBC1 در گروه تمرینی دیابتی (۶ درصد) نسبت به گروه کنترل دیابتی، موجب تغییر معنی‌دار در بین گروه‌ها نشد (شکل ۵) ($P < 0/05$).

جدول ۱- ترکیب غذای پرچرب و عناصر تشکیل دهنده آن

عناصر تشکیل 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

گروه‌های دیابتی و گروه کنترل سالم را نشان داد (شکل ۳) ($P < 0/001$).

همان‌طور که در جدول ۵ نشان داده شده است اختلاف معنی‌دار بین سطوح انسولین پلاسما گروه کنترل دیابتی و دو گروه دیگر ($P < 0/05$) به دست آمد (شکل ۲) ($P < 0/05$). همچنین مقادیر HOMA-IR index در دو گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم افزایش معنی‌دار داشت ($P < 0/001$)، ضمن این که بین دو گروه دیابتی نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P < 0/01$).

بیان ژن NHE1 و NBC1

کل تغییرات بیان ژن mRNA (NBC1 و NHE1) در گروه‌های دیابتی مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل از طریق محاسبه ارزش RQ (Relative quantification) استاندارد شدند. نتایج تحقیق نشان داد که بیان ژن mRNA (NHE1) در گروه کنترل دیابتی ۲۵ درصد کاهش داشت ($P < 0/05$). همچنین کاهش بیان NBC1 در گروه کنترل دیابتی ۱۹ درصد بود (شکل ۴) ($P < 0/05$). علی‌رغم افزایش

جدول ۲- مشخصات پروتکل تمرینی

زمان	آشناسازی ۵ روز	هفته ۱	هفته ۲	هفته ۳	هفته ۴	هفته ۵	هفته ۶	هفته ۷
سرعت (m/min)	۱۵	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۰
مدت (min)	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۵	۳۵

جدول ۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

ژن	Forward primer	Reverse primer	Gene bank
NHE1	CACATCAATGAGCTGCTGC	GCTGGCAAACCTCCTCAAAG	Slc9a1
NBC1	ACTCCCTTCATTGCCTTTG	CATGGTAGGACTTGGCTTTC	Slc4a4
18S	GTC GGC ATC GTT TAT GGT CG	GTTGGTTTTCGGAACTGAGGC	18s

جدول ۴- اجزای PCR جهت تکثیر ژن

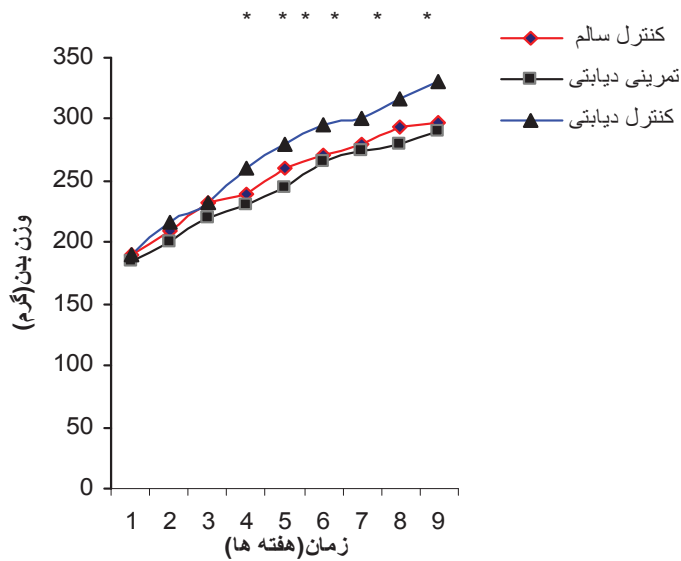
Product	Syber mix (μl)	Primers (μl)	Taq-polymerase (μl)	cDNA (μl)	ddH2O (μl)
NHE1	۱۲/۵	۰/۵	۰/۱۵	۲	۹
NBC1	۱۲/۵	۰/۵	۰/۱۵	۲	۹
18S	۱۲/۵	۰/۵	۰/۱۵	۲	۹

جدول ۵- مشخصات آنترپومتریک و متابولیک گروه‌های 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 ± ۰/۷۸ *, †
شاخص HOMA	۱/۶۲ ± ۰/۲۴ †	۱۰/۴۸ ± ۱/۴۴ *	۶/۶۸ ± ۱/۳۱ *, †

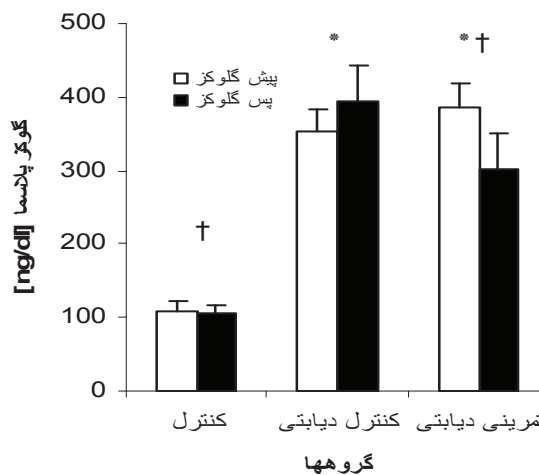
* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم (P</math>۰.۰۵).

† اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دیابتی (P</math>۰.۰۵)، [کنترل سالم (n=۷)]، دیابتی (n=۹)، تمرین دیابتی (n=۹)



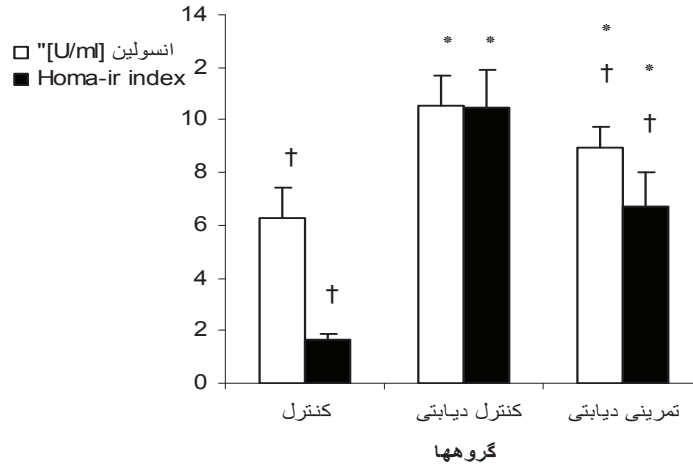
* اختلاف معنی‌دار گروه کنترل دیابتی با سایر گروه‌ها (P</math>۰.۰۵)، [کنترل سالم (n=۷)]، دیابتی (n=۹)، تمرین دیابتی (n=۹)

شکل ۱- تغییرات وزن بدن در گروه‌های مختلف تحقیق

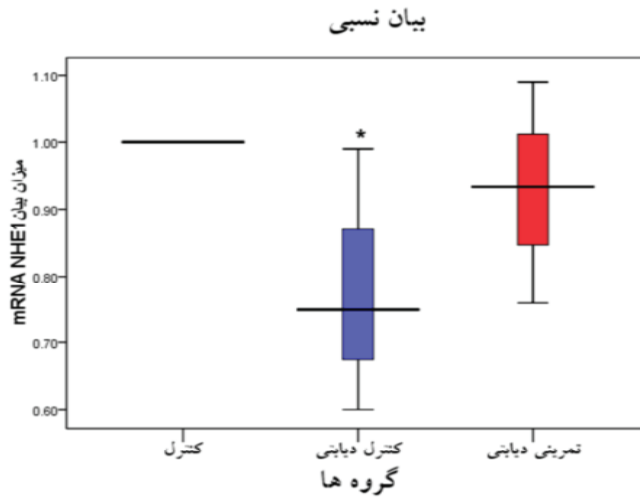


* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم (P</math>۰.۰۵)، † اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دیابتی (P</math>۰.۰۵)

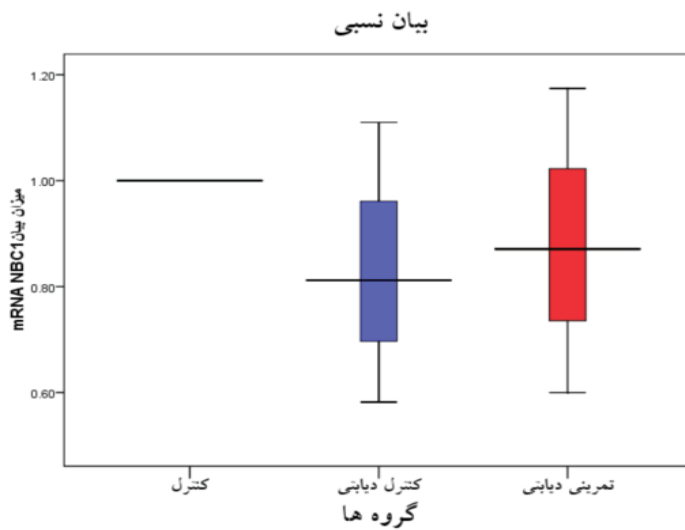
شکل ۲- تغییرات گلوکز پلاسما قبل و بعد از پروتکل تمرینی



*اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم ($P < 0.05$), † اختلاف معنی دار با گروه کنترل دیابتی ($P < 0.05$)
 شکل ۳- نمودار تغییرات انسولین پلاسما و index ir-homa



*اختلاف معنی دار ($P < 0.05$), کنترل سالم ($n=6$), کنترل دیابتی ($n=6$), تمرینی دیابتی ($n=6$)
 شکل ۴- میزان بیان ژن NHE1 در عضله قلبی گروه‌های تحقیق



*اختلاف معنی دار ($P < 0.05$), کنترل سالم ($n=6$), کنترل دیابتی ($n=6$), تمرینی دیابتی ($n=6$)
 شکل ۵- میزان بیان ژن NBC1 در عضله قلبی گروه‌های تحقیق

بحث و نتیجه گیری

کنترل و تنظیم pH_i سلول قلب جهت حفظ انقباض‌های مکرر عضلانی و جلوگیری از آسیب در حین فعالیت‌های ورزشی و همچنین در شرایط پاتوفیزیولوژیکی دیابت نوع ۲ از اهمیت خاصی برخوردار است. در مطالعه حاضر مدل دیابت نوع ۲ و تمرین استقامتی به عنوان شرایط ایجاد کننده اسیدوز مورد استفاده قرار گرفتند تا بیان ژن‌های mRNA (NBC1 و NHE1) را مورد ارزیابی قرار دهند. تحقیق حاضر اولین تحقیقی است که اثرات بلند مدت تمرین استقامتی را بر بیان ژن‌های mRNA (NBC1 و NHE1) در عضله قلب رت‌های دیابتی، مورد بررسی قرار می‌دهد. تغییرات وزن (شکل ۱)، گلوکز خون (شکل ۲)، سطح انسولین و شاخص مقاومت به انسولین HOMA-IR index در گروه‌های دیابتی همگی دلالت بر این داشت که مدل دیابتی نوع ۲ به درستی اعمال گردیده است (شکل ۳). مهمترین یافته‌های تحقیق این است که بیان ژن mRNA (NBC1 و NHE1) در شرایط دیابت نوع ۲ نسبت به شرایط طبیعی کاهش می‌یابد و تمرین استقامتی می‌تواند از کاهش بیان ژن mRNA (NBC1 و NHE1) در عضله قلب جلوگیری نماید. مطالعه تغییرات NHE1 و NBC1 در عضله قلب فقط به تعدادی تحقیق در زمینه فعالیت و بیان پروتئین محدود می‌شود و در زمینه بیان ژن این انتقال دهنده‌ها در شرایط دیابت نوع ۲ و اثر تمرین بر روی آن تحقیقات محدودی صورت گرفته است. مطالعه حاضر نشان داد که کاهش بیان ژن‌های mRNA (NBC1 و NHE1) در گروه کنترل دیابتی دلالت بر این دارد که بیان ژن این انتقال دهنده‌ها نیز تحت تاثیر تغییرات متابولیکی قرار می‌گیرد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که پاسخ انتقال دهنده‌های غشایی به شرایط اسیدوز ناشی از تمرین و دیابت نوع ۲ متفاوت می‌باشد و اطلاعات در این زمینه ضد و نقیض و وابسته به سطح فعالیت، محتوی پروتئین و بیان ژن می‌باشد. در همین راستا Prigent و همکاران نشان دادند فعالیت مبادله‌گر NHE1 در عضله قلب رت‌های دیابتی ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین کاهش می‌یابد. هر چند این کاهش فعالیت NHE1 ممکن است به علت کاهش بیان ژن آن در شرایط دیابت نوع ۲ باشد اما Pierce و همکاران نشان دادند بیان ژن mRNA (NHE1) در عضله قلب گروه دیابتی ناشی از

تزریق استرپتوزوتوسین پس از ۸ هفته تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل ندارد [۱۲، ۱۳]. در تحقیق حاضر کاهش قابل توجه در بیان ژن mRNA (NBC1 و NHE1) در عضلات قلب گروه کنترل دیابتی دیده شد. میزان کاهش بیان mRNA (NBC1) و mRNA (NHE1) به ترتیب ۲۵ و ۱۹ درصد بود (شکل ۴ و ۵). در پاسخ به تمرین استقامتی بیان mRNA (NBC1) و mRNA (NHE1) در گروه تمرینی دیابتی تا حدود سطوح نرمال افزایش پیدا کرد هر چند تمایل به پایین بودن آن در گروه تمرین کرده دیابتی حفظ شد. این نتایج با نتایج تحقیق نیکویی و همکاران که اثر تمرینات استقامتی بر بیان ژن و محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی و سالم مورد ارزیابی قرار دادند، هم راستا می‌باشد که نشان دادند تمرین استقامتی بیان ژن‌ها و محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 را در گروه تمرینی دیابتی و سالم افزایش داده است [۱۸]. در تحقیقی مشابه Darmellah و همکاران نتایج متناقضی به دست آوردند. آنها نشان دادند که فعالیت NHE1 در عضله قلب رت‌های (GK)^۱ مدل دیابتی نوع ۲ افزایش یافته است و این افزایش فعالیت بدون تغییر در محتوی پروتئینی این مبادله‌گر رخ داده است [۸]. افزایش بیان ژن mRNA (NHE1) نیز در عروق رت‌های دیابتی توسط Jandeleit و همکاران تایید شد، که با یافته‌های تحقیق حاضر همسو نمی‌باشد [۱۷]. در تحقیق دیگر Sandmann و همکاران گزارش کردند که در اثر انسداد عروق کرونری قلب (اسیدوز) بیان ژن و پروتئین هر دو مبادله‌گر و انتقال دهنده NHE1 و NBC1 افزایش پیدا می‌کند. دلایل این اختلاف را می‌توان در روش ایجاد مدل دیابتی و مدت اعمال پروتکل و روش تمرینی استفاده شده در تحقیق حاضر جستجو کرد [۱۶].

کاهش بیان ژن مبادله‌گر و انتقال دهنده NHE1 و NBC1 در گروه کنترل دیابتی و افزایش بیان آنها در گروه تمرین کرده دیابتی در تحقیق حاضر حاکی از غلبه کردن اثرات تمرین استقامتی بر دیگر متغیرهای درگیر در شرایط دیابت است. بیان mRNA (NHE1) در پاسخ به تمرین استقامتی (۷ درصد کاهش) بیشتر از بیان mRNA (NBC1) (۱۳ درصد کاهش) در عضله قلبی گروه تمرین کرده دیابتی بود

1. Goto-Kakizaki

همکاران، Darmellah و همکاران و دیگر محققین موید این موضوع می‌باشد [۸،۱۲]. از طرف دیگر تغییرات متابولیکی نیز می‌توانند به عنوان عوامل موثر پس ترجمه‌ای در کاهش بیان این انتقال دهنده‌ها باشد. Lagadic-Gossmann و همکاران گزارش کردند که افزایش شیب سدیم Na^+ درون سلولی در رت‌های دیابتی، از جمله عواملی است که به کاهش فعالیت مبادله‌گر NHE1 در عضله قلب منجر می‌شود [۲۸]. به علاوه نتایج تحقیق Grinstein و همکاران نشان داد که افزایش سدیم درون سلولی می‌تواند یک نقش مهمی از طریق رقابت با پروتون در اتصال به جایگاه درون سلولی مبادله‌گر NHE1 داشته باشد [۲۹]. همچنین در تحقیق دیگر Pierce و همکاران گزارش کردند میل ترکیبی مبادله‌گر NHE1 به پروتون در شرایط دیابت نوع ۲ کاهش می‌یابد [۳۰]. تغییر در کنترل کلسیم درون سلولی از جمله سازوکارهای دیگر مسئول کاهش فعالیت مبادله‌گر NHE1 در عضله قلبی دیابتی است. در تحقیق دیگر Bertrand و همکاران دو مسیر درون سلولی را برای کنترل فعالیت NHE1 از طریق کلسیم پیشنهاد دادند. مسیر اول از طریق پیوند مستقیم کلسیم/کالمودلین (CAM)^۱ به مبادله‌گر و مسیر دوم فسفوریلاسیون مبادله‌گر بوسیله کلسیم/کالمودلین وابسته به پروتئین کیناز^۲ می‌باشد [۳۱]. Lagadic-Gossmann و همکاران نشان دادند که کاهش کلسیم درون سلولی ناشی از دیابت نوع ۲ موجب کاهش فعالیت مبادله‌گر NHE1 می‌شود [۳۲]. علاوه بر این همچنین Juel و همکاران نشان دادند که فعالیت NBC1 در شرایط دیابت نوع ۲ با شرایط کنترل سالم تفاوتی ندارد [۱۰].

سازوکارهایی که از طریق آن تمرین استقامتی موجب افزایش بیان ژن مبادله‌گر و انتقال دهنده NHE1 و NBC1 غشای سلول قلبی می‌گردد تا کنون به خوبی مشخص نشده است اما چندین عامل جهت ایجاد این تغییرات توسط محققین پیشنهاد شده است که شامل کلسیم، MAPK^۳، AMPK^۴ و PKC^۵ می‌باشد [۱۰]. تمرین استقامتی موجب آزادسازی کلسیم درون سلولی می‌گردد و

(شکل ۴ و ۵). دلایل این افزایش را می‌توان به خصوصیات اکسیداتیوی عضله قلبی از یک طرف و همچنین شدت و نوع تمرین (استقامتی) از طرف دیگر نسبت داد. در تایید این فرضیه Rasmussen و همکاران نشان دادند که یک جلسه تمرین سرعتی موجب افزایش معنی‌دار در بیان mRNA NHE1 (NHE1) عضلات اسکلتی رت می‌شود. آنها همچنین گزارش کردند که سه هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنی‌داری در بیان mRNA NHE1 (NHE1) در عضلات اسکلتی کند می‌گردد اما این افزایش در سطح پروتئین NHE1 در عضلات اسکلتی معنی‌دار نبود [۲۲]. همچنین Claire و همکاران اثر تمرینات اینتروال شدید بر محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 و NBC را مورد ارزیابی قرار دادند و افزایش محتوی پروتئینی MCT1 و NBC در تارهای کند نسبت به تند را نشان دادند. از طرف دیگر افزایش میزان بیان mRNA NHE1 (NHE1) نسبت به توزیع و کتیبک فعالیت این انتقال دهنده‌ها در بافت‌های مختلف نسبت داد [۲۱]. Prigent و همکاران نشان دادند که مشارکت مبادله‌گر و انتقال دهنده NHE1 و NBC1 در خارج ساختن پروتون H^+ از سلول قلب در $\text{pH}=6/90$ به ترتیب ۶۹ و ۳۱ درصد است [۱۴]. در همین راستا Juel و همکاران در یک تحقیق اثر تمرین با شدت زیاد بر محتوی NHE1 عضلات کند و تند رت‌ها را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که ایزوفرم NHE1 در عضلات بیان می‌شود و همچنین تمرین با شدت زیاد موجب افزایش محتوی این انتقال دهنده به میزان ۳۶ و ۲۹ درصد به ترتیب در تارهای گلیکولیتیکی و اکسیداتیوی می‌شود [۲۳]. در نتیجه افزایش بیان mRNA NHE1 (NHE1) نسبت به mRNA NBC1 (NBC1) در عضله قلب با توجه به خصوصیات اکسیداتیوی این عضله و از طرف دیگر شدت تمرین استقامتی به کار رفته در این تحقیق منطقی به نظر می‌رسد. سازوکارهای که از طریق آن دیابت موجب کاهش بیان ژن مبادله‌گر و هم انتقال دهنده NHE1 و NBC1 می‌شود به خوبی مشخص نشده است اما اختلاف بین بیان ژن و پروتئین نشان دهنده تاثیر متغیرهای مداخله‌گر پس ترجمه‌ای بر کنترل سنتز پروتئین می‌باشد. نتایج تحقیق Prigent و

1. Ca⁺/calmodulin
2. Mitogen- activated protein kinases
3. Mitogen- activated protein kinases
4. Gosmanow, A and et al
5. Protein kinase C

سپاسگزاری

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور (ریاست جمهوری) به جهت حمایت مالی از تحقیق حاضر، شرکت دام و طیور کانی دام و مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رازی کرمانشاه به جهت همکاری در اجرای تحقیق ابراز می‌دارند.

کلسیم از طریق فعال کردن چندین سازوکار به تغییرات در سطح mRNA و پروتئین ترانسپورترهای غشایی کمک می‌کند [۱۰]. در مجموع نتایج تحقیق نشان داد که بیان ژن در گروه کنترل دیابتی کاهش قابل ملاحظه‌ای دارد و تمرین استقامتی می‌تواند این کاهش بیان را جبران و به سطوح نرمال نزدیک کند. همچنین الگوی بیان، مختص هر ژن و نقش متابولیکی آن در بافت مورد نظر دارد.

مأخذ

- Fligel L. molecular biology of the myocardial Na/H exchanger. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2008; 44: 228-237.
 - Danielle F. The regulation of intracellular pH in the diabetic myocardium. *Cardiovascular Research* 1997; 34: 48-54.
 - Claire T and David B. Effect of High- Intensity Training on MCT1, MCT4 and NBC Expressions in Rat Skeletal Muscles: Influence of Chronic Metabolic Alkalosis. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 2007; 293: E916-E922.
 - Juel C. Muscle pH regulation: role of training. *Acta Physiol Scand* 1998; 162: 359-366
 - Vennetia R. Danes. Effect of exercise training on myocyte pH_i regulation. National library of Canada. simon fraser university 1996.
 - Orchard CH, Kentish JC. Effects of changes in pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol* 1990; 258: C967-C981.
 - Van ZD. Diagnosis and Treatment of Diabetic Ketoacidosis. *SA FAMPRAC* 2008; 50: 35-40.
 - Darmellah D. Enhanced activity of myocardial na/h exchanger contribute to left ventricular hypertrophy in GOTO-KAKIZAKI rat model of type 2 diabetes: *critical role of Akt diabetologia* 2007; 50: 1335-1344.
 - Juel C. Regulation of PH in Human Skeletal Muscle: Adaptation to Physical Activity. *Acta Physiol* 2008; 193: 17-24
 - Juel C. Training-induced changes in membrane transport proteins of human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2006; 96: 627-635.
 - Charles TP, Norman L, George N, Heigenhauser JF. Effects of short-term training on plasma acid-base balance during incremental exercise in man. *Physiol* 2003; 55: 585-603.
 - Le Prigent K, Lagadic-Gossmann D, Feuvray D. Modulation by extracellular pH and intracellular calcium of Na/H exchange in diabetic rat isolated ventricular myocytes. *Circ Res* 1997; 80: 253-260.
 - Pierce GN, Slotin T, Fliegel L, Gilchrist JSC, Maddaford TG. Expression and activity of the sodium-hydrogen exchanger in cardiac sarcolemma in health and disease. In: Fliegel L, ed. *The Na/H Exchanger*. Heidelberg: Springer-Verlag 1996; 217-228.
 - Le Prigent K, Lagadic-Gossmann D, Feuvray D. Na-HCO₃ symport activity in diabetic ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: A67.
 - Gan XT, Chakrabarti S, Karmazyn M. Modulation of Na⁺/H⁺ exchange isoform 1 mRNA expression in isolated rat hearts. *Am J Physiol* 1999; 277: H993-8.
 - Sandmann S, Yu M, Kaschina E, Blume A, Bouzinova E, Aalkjaer C, et al. Differential effects of angiotensin AT1 and AT2 receptors on the expression, translation and function of the Na⁺-H⁺ exchanger and Na⁺-HCO₃⁻ symporter in the rat heart after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 2154-65.
 - Jandeleit-Dahm K, Hannan KM, Farrelly CA, Allen TJ, Rumble JR, Gilbert RE, et al. Diabetes-induced vascular hypertrophy is accompanied by activation of Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange and prevented by Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange inhibition. *Circ Res* 2000; 87: 1133-40.
۱۸. نیکویی، روح الله؛ رجبی، حمید؛ قراخانلو، رضا؛ منظمی، امیرعباس؛ امیدفر، کبری؛ لاریجانی، باقر و همکاران. تعدیل کاهش بیان ژن MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی نوع ۲ متعاقب تمرین استقامتی، *مجله دیابت و لیپید ایران* ۱۳۸۹، ۳(۳): ۲۴۱-۲۵۱.
- Baker S, KARL J A. MCCULLAGH, AND BONEN A. Training intensity-dependent and tissue-specific increases in lactate uptake and MCT-1 in heart and muscle. *J Appl Physiol* 1998; 84: 987-994.
 - Juel C, Mads KH and Dela F. Effect of Strength Training on Muscle Lactate Release and MCT1 and MCT4 Content in Healthy and Type 2 Diabetic Humans. *J Physiol* 2004; 55: 297-304.
 - Claire T and David B. Effect of High- Intensity Training on MCT1, MCT4 and NBC Expressions in Rat Skeletal Muscles: Influence of Chronic Metabolic Alkalosis. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 2007; 293: E916-E922.
 - Rasmussen M, Juel C and Nordborg B. Exercise-induced regulation of muscular Na⁺-K⁺ pump, FXD1, and NHE1 mRNA and protein expression: importance of training status,

- intensity, and muscle type. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300:R1209-R1220.
23. Juel C. Expression of the Na/H Exchanger Isoform NHE1 in Skeletal Muscle and Effect of Training. *Acta Physiol Scand* 2000; 170:59-63.
 24. Viswanad KB, Lydia A, Ramarao P. Combination of High-Fat-Diet-Fed and Low-Dose Streptocin-Treated Rat: A Model for Type 2 Diabetes and Pharmacological Screening Srinivasan. *Pharmacological Research* 2005; 52: 313-32.
 25. Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rat responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol* 1978; 45: 1009-1015.
 26. Norton A. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *EUR SOCIETY OF CARDIOLOGY* 2007; 14: 753-760.
 27. Sharma AK, Srinivasan BP. Triple versus 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.
 28. Lagadic-Gossman D, Feuvray D. Intracellular sodium activity in papillary muscle from diabetic rat hearts. *Exp Physiol* 1991; 76: 147-149.
 29. Grinstein S, Goetz JD, Rosthstein A. 23Na fluxes in thymic lymphocytes. II. Amiloride sensitive Na/H exchange pathway: reversibility of transport and asymmetry of the modifier site. *J Gen Physiol* 1984; 84:585-600.
 30. Pierce GN, Ramjiawan B, Dhalla NS, Ferrari R. Na/H exchange in cardiac sarcolemmal vesicles isolated from diabetic rats. *Am J Physiol* 1990; 258: H255-H261.
 31. Bertrand B, Wakabayashi S, Ikeda T, Pouyssegur J, Shigekawa M. The Na/H exchanger isoform NHE 1 is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J Biol Chem* 1994; 269: 13703-13709.
 32. Lagadic-Gossman D, Buckler KJ, Le Prigent K, Feuvray D. Altered Ca²⁺ handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *Am J Physiol* 1996; 270: H1529-H1537.