مجله دیابت و متابولیسم ایران. آذر- دی ۱۳۹۸؛ دوره ۱۹ (شماره ۲) ۷۰-۶۱

مقاله پژوهشی

تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید همراه با مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن Wnt وβ-catenin در بافت پانکراس رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو

فاطمه سلطان محمدی[۱]، مهسا محسن‌زاده*[۱]، فواد فیض الهی[۱]

چکیده

مقدمه: هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید همراه با مصرف عصاره‌ی انگور سیاه بر میزان بیان ژن Wnt وβ-catenin در بافت پانکراس رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو بود.

روش‌ها: تجربی بود. تعداد ٤٠ سر رت نر ٨ هفته ای با میانگین ۲۰±۲۵۰ گرم، پس از القاء دیابت توسط STZ، به‌صورت تصادفی در ۵ گروه: کنترل-پایه، کنترل- دیابتی، تمرین- دیابتی، عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه- دیابتی و تمرین همراه با مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه-دیابتی تقسیم شدند. آزمودنی‌های گروه‌های تمرینی ۵ جلسه در هفته و به‌مدت ۸ هفته به فعالیت بر روی نوارگردان با شدت۹۰٪ Vo2max پرداختند. در گروه‌های عصاره نیز ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره‌ی دانه‌ی انگور به ازای کیلوگرم وزن بدن یک بار در روز به‌مدت ۸ هفته به داخل معده‌ی رت‌ها گاواژ شد. ٢٤ساعت بعد از آخرین جلسه‌ی تمرینی رت‌ها به‌وسیله گاز Co2 بیهوش شده و بافت پانکراس بلافاصله استخراج و میزان بیان ژن‌ها با تکنیک Real time-PCR و با مقیاس ($2^{-\Delta\Delta Ct} \times 10^3$) سنجیده شد. در کلیه‌ی تحلیل های آماری سطح معنی‌داری آماری برابر۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: اثر تمرین و عصاره هر کدام بر بیان ژن Wntو B-catenin معنادار بود، اما تعامل تمرین و عصاره بر بیان ژن Wnt معنادار نبود ولی اثر تعاملی عصاره و تمرین بر بیان ژن B-catenin معنادار بود.

نتیجه‌گیری: تمرین به‌مدت هشت هفته بر روی بیان ژن‌های مسیر سیگنالینگ β-catenin- Wnt اثر داشته است. بنابراین استفاده از این نوع تمرین همراه با مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه با رعایت احتیاط به بیماران دیابتی نوع دو توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: تمرینات تناوبی شدید(HIIT)، عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه، بیان ژن Wnt، بیان ژن β-catenin، بافت پانکراس، دیابت نوع دو

۱- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحدکرج، البرز، ایران

*نشانی: کرج، انتهای رجایی شهر، تقاطع بلوار موذن و استقلال، مجتمع دانشگاهی امیرالمومنین (ع)، کد پستی :۳۱٤۹۹٦۸۱۱۱، تلفن: ۰۲٦۳٤۲۵۹۵۷۱، نمابر: ۳٤٤۱۸۱۵٦ ، پست الکترونیک: m.mohsenzadeh@kiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۳ **تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۸/۱۰/۱۹** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۸**

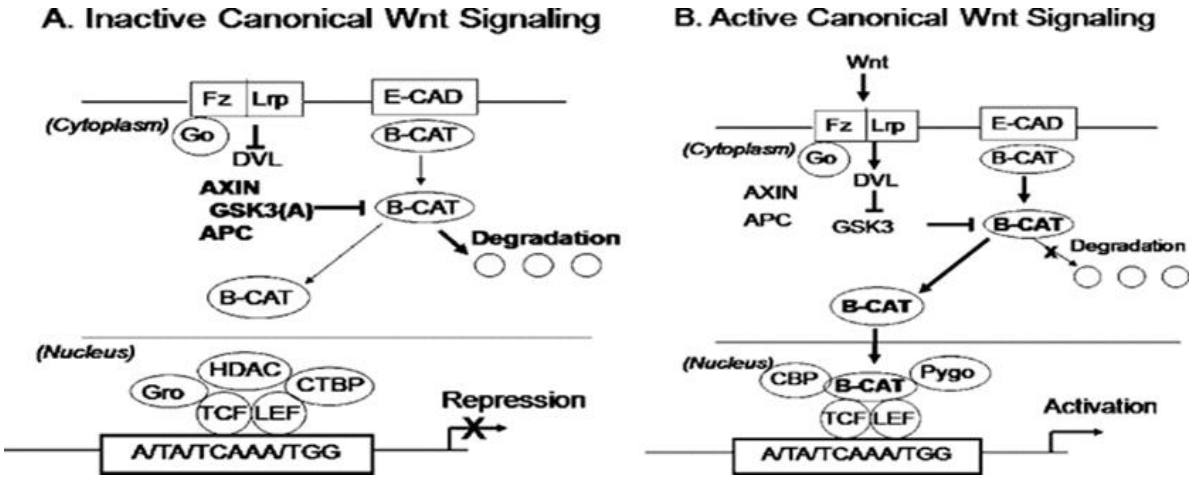
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

مقدمه

دیابت شیرین (Mellitus)، بیماری چندسیستمی از بیماری‌های متابولیک است که مشخصه‌ی آن افزایش مزمن قند خون و اختلالات متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین است که طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت شیوع آن تا ۵۰ سال آینده، ۱۶/۵ درصد افزایش می‌یابد [۱]. علل مولکولی دیابت شامل اختلال در تولید انسولین (دیابت نوع یک) و یا در گیرنده‌های آن در بافت‌های محیطی (دیابت نوع دو) است [۲].

مشکل اصلی این بیماران اختلال در گیرنده‌های انسولین یا گلوکز روی غشاء سلول و یا به عبارتی افزایش مقاومت به انسولین است. چنانچه در این افراد ظرفیت ترشح انسولین برای جبران مقاومت به انسولین مختل نشود، شدت دیابت افزایش پیدا نمی‌کند، در حالی‌که هایپرگلیسمی مزمن به تخریب سلول های بتا پانکراس منجر می‌شود [۳]. در واقع، مرگ سلول‌های بتا ممکن است ویژگی مشترک دیابت نوع اول و دوم باشد، هرچند سازوکار آن متفاوت است. در بیماران دیابت نوع دو، سازگاری سلول‌های بتا با افزایش ترشح انسولین در پاسخ به مقاومت به انسولین نهایتاً منجر به هایپرانسولینمی و افزایش بیش از حد مقاومت به انسولین می‌شود و این روند آسیب بیشتر سلول‌های بتا را به‌دنبال دارد [٤].

مسیرWnt جزء مسیرهای پیام‌رسان سلولی برای کنترل فعالیت ژنتیکی سلول محسوب می‌شود که از طریق اتصال لیگاند به گیرنده آن فعال شده و موجب فعال شدن عامل‌های رونویسی ویژه‌ی خود در سیتوزول می‌گردد (شکل ۱–A). طبق مدل فعلی مسیر Wnt، بازیگر اصلی مسیر تبدیل پیام درون سلولی Wnt در مهره‌داران، β–کاتنین نام دارد. این پروتئین چند عملکردی هم به عنوان عامل رونویسی و هم به‌عنوان پروتئین رابط بین غشاء و اسکلت سلولی عمل می‌نماید [۵]. در غیاب پیام Wnt، β–کاتنین توسط مجموعه‌ای متشکل از این مولکول‌ها فسفریله می‌شود. گلیکوژن سنتاز کیناز–۳[1]، یعنی همان پروتئین کینازی که گلوکز خون را تنظیم می‌نماید، پروتئین پولیپ آدنومایی کولون[2] که یک سرکوبگر مهم تومور در انسان است و آکسین که یک پروتئین داربستی است، سپس β–کاتنین فسفریله، یوبی کوئیتینه شده و در پروتئازوم‌ها تجزیه می‌گردد (شکل ۱–B).



شکل ۱- مسیر سیگنالینگ Wnt فعال و غیرفعال

[1] Glycogen synthase kinase3-beta- GSK3

[2] Tumor suppressor adenomatou polyposis coli -APC

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

ارتباط بین حساسیت گلوکز، تکثیر سلول و سیگنالینگ Wnt/β-catenin در ماکروفاژها، سلول‌های بتا و سلول‌های کولون گزارش شده است. گلوکوکیناز[1] نقش حساس به گلوکز در سلول‌های بتای پانکراس و درد هیپوسیت‌ها و عملکردهای تنظیم کننده‌ی وابسته به گلوکز در ترشح انسولین بازی می‌کند. Leal و همکاران (۲۰۱۱)، گزارش دادند که هشت هفته تمرینات قدرتی توانی موجب افزایش و بیان پروتئین بتاکاتنین در Wnt فعالیت مسیر عضله اسکلتی شد [۶].

مطالعات نشان دادند که در رابطه با مقاومت به انسولین، تمرین ورزشی می‌تواند موجب سازگاری‌های متابولیکی شود که این خود حساسیت به انسولین را بهبود می‌بخشد. با توجه به اثرات جانبی استفاده از انسولین، عوامل هیپوگلیسمیک خوراکی و مشکلات اقتصادی، علاقه رو به افزایشی در میان بیماران دیابتی برای استفاده از گیاهان دارویی با خواص طبیعی ضددیابتی وجود دارد. فلاوونوئیدهای موجود در انگور دارای خواص ضداکسایشی بالا بوده که به کاهش فشار اکسایشی کمک می‌کنند. از طرفی دانه و پوست انگور حاوی غنی‌ترین میزان آنتی‌اکسیدان‌ها هستند. عصاره ی دانه‌ی انگور (GSPE)[2]، بسته به نوع گونه و کشت آن، حاوی ۵ تا ۸٪ پلی‌فنل شامل گالیک اسید، اپی‌گالو کاتچین، فلاوان-۳- اول های مونومر: کاتچین، اپی‌کاتچین، گالوکاتچین و اپی‌کاتچین ۳- اوگالات است [۷]. از میان تمام کشت‌ها، گونه‌های متعلق به Vitus Vinifara بالاترین محتوای کاتچین را دارند. GSPE همچنین به عنوان گونه‌های متساوی اکسیژن و نیتروژن واکنشی، تنظیم کننده‌ی عملکرد ایمنی، عامل آنتی‌ترومبوتیک و مهارکننده‌ی اکسیداسیون LDL عمل می‌کند. علاوه بر این، GSPE اثرات هیپوگلیسیمیک در موش‌های دیابتی شده با STZ را نشان داده است. بنابراین GSPE می‌تواند به‌عنوان مداخله‌گر مؤثر در عوارض دیابت مزمن استفاده شود [۸]. Irina و همکاران (۲۰۰۹) بیان نمودند که مقادیر ۵۰ تا ۱۰۰mg/kg از عصاره‌ی دانه‌ی انگور به‌علت خاصیت آنتی اکسیدانی، در حفاظت سلولی و مهار مرگ سلولی نقش دارد [۹]. از طرفی اجرای دو هفته تمرینات پرشدت می‌تواند عملکرد انسولین را در مردان جوان به‌طور معنادار بهبود بخشد. به‌طور مشابهی در زنان نیز تمرینات پرشدت سه جلسه در هفته به‌مدت پانزده هفته در مقایسه با تمرینات پیوسته‌ی همسان، با کاهش معنادار در کل چربی بدن، چربی زیرپوستی پاها و تنه و مقاومت انسولینی مرتبط بود، لذا پیشنهاد شد که تمرینات پرشدت می‌توانند شیوه‌ی مناسبی برای پیشگیری و بهبود چاقی و عوارض مرتبط با آن باشند [۱۰]. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید همراه با مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر میزان بیان ژن *Wnt* و *β-catenin* در بافت پانکراس رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو بود.

روش‌ها

روش تحقیق از نوع تجربی با طرح پس آزمون با گروه کنترل بود که بدین منظور تعداد ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با محدوده‌ی وزنی ۲۰±۲۳۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. رت‌های مذکور در آزمایشگاه در درجه حرارت ۲۰- ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعت و در رطوبت نسبی ۵۰ درصد و تعداد هر سه راس رت در یک قفس پرورشی با آب و غذای استاندارد نگه‌داری شدند.

رت‌ها به‌مدت دو هفته با شرایط داخل قفس و نحوه‌ی دویدن روی نوار گردان (۲ روز در هفته با سرعت ۱۵ و ۲۵ متر بر دقیقه)آشنا شدند. دو هفته پس از سازگاری با محیط آزمایشگاه، فرآیند دیابتی شدن آغاز شد که شروع برنامه‌ی تمرینی پس از ۷۲ ساعت از القاء دیابت و اندازه‌گیری توسط دستگاه گلوکومتر که سطوح گلوکز خون بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته شد، بود. جهت دیابتی کردن حیوانات از داروی استروپتوزوتوسین ساخت شرکت سیگما استفاده شد که پس از یک هفته سازگاری رت‌ها با محیط آزمایشگاه، تزریق داخل صفاقی *STZ* که ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن که در محلول نرمال سالین قرار گرفت، انجام شد. سپس رت‌ها به‌طور تصادفی به پنج گروه کنترل-پایه، کنترل- دیابتی، تمرین- دیابتی، عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه- دیابتی و تمرین همراه با مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه-دیابتی تقسیم شدند. همچنین ۵ سر از رت‌ها به‌عنوان گروه آزمایشی برای اندازه‌گیری حداکثر سرعت دویدن روی نوارگردان (که معادل با حداکثر اکسیژن مصرفی *VO2max* حیوان در نظر گرفته شد)، انتخاب شدند. برای برآورد حداکثر سرعت دویدن آزمون عملکرد ورزشی مدرج با شیب صفر درجه اجرا شد، که با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه آغاز و به ازای هر ۱ دقیقه ۱ متر بر سرعت تردمیل افزوده می‌شد تا زمانی که رت‌ها دیگر قادر به دویدن نباشند

[1] GK

[2] Grape seed proanthocyanidin extract

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

(واماندگی) که این سرعت معادل با سرعت رسیدن به *VO2max* در نظر گرفته شد و شدت تمرین براساس آن کنترل گردید.

برنامه‌ی تمرینی: پس از برآورد حداکثر سرعت، گروه تمرین و دیابتی- تمرین ۵ جلسه در هفته و به‌مدت ۸ هفته به فعالیت بر روی نوارگردان با شدت ۹۰٪ Vo2max به‌طول ۱۵ تا ۳۰ دقیقه و سرعت ۲۹ متر بر دقیقه در هفته اول و ۳۶ متر در دقیقه در هفته آخر پرداختند. زمان استراحت بین فواصل یک دقیقه بود. این کار پنج بار در هفته اول و ۱۲ بار در هفته آخر تکرار شد. در این پروتکل رت‌ها ۵ دقیقه در ابتدا گرم کردند و در انتها ۵ دقیقه سرد کردند [۱۱].

نحوه‌ی عصاره دهی

در مورد رت‌های گروه عصاره و تمرین –عصاره، به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم عصاره‌ی پروآنتی سیانیدین به ازای کیلوگرم وزن بدن یک بار در روز به‌مدت ۸ هفته با محتوای بیشتر از ۹۶٪ پروآنتی‌سیانیدین به داخل معده آنها گاواژ شد [۱۲]. ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه ی تمرینی، رت‌ها به‌وسیله گاز CO_2 بیهوش شدند و پس از کالبد شکافی بافت پانکراس برداشته شد.

مراحل آماده سازی بافت پانکراس

در ابتدا ثابت‌سازی بافت به‌منظور نگه‌داری سلول‌ها و بافت‌های بدن در حالتی مشابه و نزدیک به حالت زنده آنها انجام می‌گیرد. پس از جدا کردن نمونه از بدن رت‌ها بلافاصله پانکراس به‌مدت ۷۲ – ۲۴ ساعت در محلول نرمال سالین ۱۰٪ قرار گرفت. به‌دلیل وجود درصد زیادی آب در بافت، پارافین به داخل بافت‌ها نفوذ نمی‌کند، پس در مرحله‌ی دوم آبگیری با الکل اتیلیک انجام شد. از طرفی وجود الکل در پارافین ایجاد اشکال می‌کند پس بهتر است الکل را با ترکیبی از محیط خارج گردد که از یک طرف با الکل و از طرف دیگر با پارافین واکنش دهد و حلال همدیگر باشند. ترکیب به‌کار گرفته شده در این مرحله چون باعث افزایش قدرت انکسار (ضریب شکست) بافت می‌شود به‌عنوان شفاف کننده شناخته شده است. برای این منظور از محلولی بنام زایلول استفاده گردید که مرحله‌ی سوم یا شفاف سازی بود. سپس در مرحله‌ی چهارم یا آغشتگی جایگزینی عامل شفاف کننده با ترکیبی که صلابت و سختی به بافت بدهد تا بتوان از آن قالب تهیه و سپس برش‌گیری کرد، انجام گرفت. در مرحله قالب‌گیری نمونه‌ی آغشته شده با پارافین در قالب پر از پارافین مذاب قرار گرفت و سپس با انجماد پارافین، نمونه نیز در داخل آن سخت شده و آماده مقطع‌گیری شد. در مرحله‌ی برش‌گیری از نمونه‌ها توسط دستگاه میکروتوم به ضخامت ۵ میکرومتر برش تهیه شد، سپس برش‌ها روی لام‌های آغشته شده به چسب آلبومین قرار داده شد و در چند منطقه با لنز ۴۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس مراحل پارافین زدایی و رنگ آمیزی انجام گردید. به کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین هسته‌ها رنگ آبی و سیتوپلاسم رنگ صورتی به خود گرفتند. سپس عمل چسباندن یک لام بر روی نمونه‌ها برای بررسی با میکروسکوپ نوری انجام گرفت.

روش آزمایشگاهی

استخراج RNA

جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت‌ها در همه گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن، آلمان) انجام گرفت. ابتدا به نمونه‌ها ۳۰۰–۲۰۰ لاندا کیازول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آن را در دمای ۸۰- قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت پلاک موجود در کرایوتیوب را در حالت نیمه انجماد توسط سر سمپلر خرد کرده، سپس کمی از آن پیپتاژ گردید. سپس به نمونه حدود ۱۰۰ لاندا کلروفرم اضافه شد تا سلول-ها لیز شود. این محلول حدود ۱ دقیقه باید با سلول‌ها در تماس بود. پس از ۱ دقیقه محلول را با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ محلول به سه فاز تقسیم شد. قسمت بالایی لوله که شفاف و حاوی RNA بود. قسمت وسطی لوله که سفید رنگ و محتوی بافت لیز شده بود. قسمت پایینی لوله صورتی و حاوی کیازول بود. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. پس ۱ سی سی ایزوپروپانول را بر روی RNA شفاف ریخته شد و به‌مدت ۱ دقیقه با دست به‌هم زده شد. ایزوپروپرانول شفاف بوده و RNA نیز شفاف است، اما وقتی این دو با هم مخلوط شوند مایع کدری را به وجود می‌آورند. بهتر است این محلول به‌دست آمده یک شب در دمای ۸۰- قرار گیرد. پس از افزودن ایزوپروپرانول نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ سی سی الکل ۷۰ اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه گردید و سپس پلاک

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

در داخل میکروتیوب خشک شد. به‌منظور حل کردن RNA به میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ٦٠ درجه بر روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرسمپلر پیپتاژ و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه ی ٦٠ درجه قرار داده شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۸۰- قرار گرفت.

ساخت cDNA

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کلیه ی پرایمرهای طراحی شده مربوط به تمامی ژن‌ها، مورد بررسی قرار گرفت و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کیازول، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سیناژن استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase I Fermentas قرار گرفت. سپس کیفیت RNAهای استخراج شده با دستگاه اسپکترفتومتری (DPI-1, Kiagen) ارزیابی شد. جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از پرایمر Oligo dt MWG-Biotech, Germany و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Fermentas) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. هر واکنش PCR با استفاده از master mix Applied Biosystems و SYBER Green در دستگاه ABI Step One Applied Biosystems, Sequences Detection Systems. Focter City, CA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ٤٠ سیکل برای هر چرخه‌ی Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ٦٠-۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نمودار Melting جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده و به‌صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه‌ی آستانه (Thereshold Cycle: CT) ارزیابی شدند. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول زیر منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن با استفاده از حداقل ۵ غلظت لگاریتمی به‌ترتیب رقیق شونده از کنترل مثبت هر ژن رسم گردید.

$$R = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$$
$$\Delta\Delta CT = (CT_{target} - CT_{refence})_{Time\ X} - (CT_{target} - CT_{refence})_{Time\ 0}$$

میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به‌عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن هدف مورد نظر، از فرمول 2^{-} ΔΔCT استفاده شد. برای تحلیل داده‌های بیان ژن Wnt و catenin β- از پروتکل استاندارد لیواک و با مقیاس ($Ct\times 103\Delta\Delta-2$) استفاده شد. داده‌های بیان ژن براساس ژن خانه‌دار (کنترل داخلی) نرمالایز داخلی شدند و سپس با استفاده از آزمون‌های پارامتریک داده‌های بیان ژن پرت (دورافتاده) تعدیل و نرمال سازی صورت گرفت شد. جهت نشان دادن شاخص‌های گرایش مرکزی و شاخص‌های پراکندگی از آمار توصیفی استفاده شد. بررسی فرض نرمالیتی داده‌های بیان ژن‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف اسمیرنف، انجام شد. همچنین برای بررسی اثر دیابتی شدن بر فاکتورهای مورد مطالعه و مقایسه جفتی برخی از گروه‌ها از آزمون t مستقل استفاده گردید. به‌منظور بررسی میزان اثر تمرین تناوبی شدید و عصاره‌ی دانه‌ی انگور بر روی ژن‌ها از تحلیل واریانس دو عاملی(۲×۲) استفاده شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲٤ در سطح معنی‌داری آلفای ۰/۰۵ انجام گرفت.

یافته‌ها

میانگین و انحراف استاندارد مقادیر بیان ژن (نرمالایز شده) β– catenin و Wnt در بافت پانکرانس رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو را در پنج گروه تمرین، عصاره، تمرین و عصاره، کنترل دیابتی و کنترل پایه در جدول ۱ نشان داده شده است.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

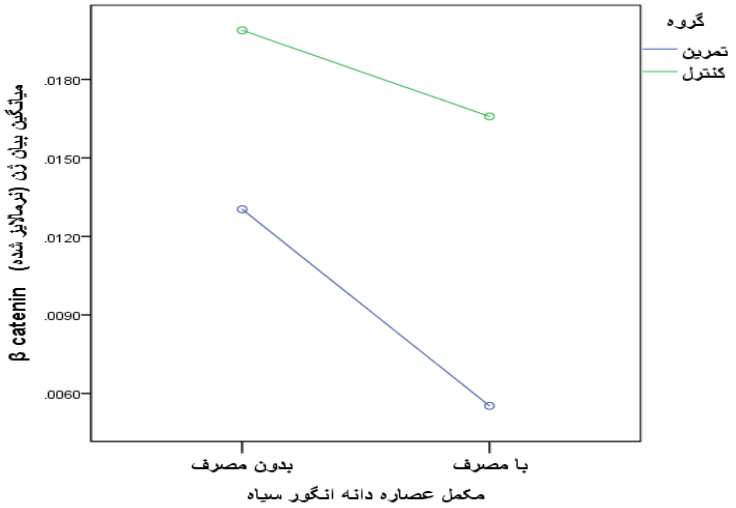
جدول ۱- توصیف متغیرهای تحقیق

	M	SD	M	SD
کنترل پایه	۰/۰۰۳۲	۰/۰۰۱	۰/۰۷٤۱	۰/۰۳۵
دیابتی -کنترل	۰/۰۱۹۸	۰/۰۰۳	۰/۲۵۳۱	۰/۰۸٦
عصاره	۰/۰۱٦۵	۰/۰۰۵	۰/۱۱۵۵	۰/۰۷۳
تمرین	۰/۰۱۳۰	۰/۰۰۳	۰/۰٦۷٤	۰/۰۲۱
عصاره و تمرین	۰/۰۰۵۵	۰/۰۰۰۳	۰/۰٤۳۰	۰/۰۲٤

نتایج آزمون کالموگراف اسمیرنف نشان داد که توزیع داده‌های بیان ژن (نرمالایز شده) β-catenin و WNT در گروه رت‌های پایه، دیابتی-کنترل، دیابتی-تمرین، دیابتی-عصاره، دیابتی-عصاره-تمرین طبیعی بود.

نتایج تحلیل t- مستقل نشان داد که بین میانگین بیان ژن (نرمالایز شده) رت‌های سالم و دیابتی تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P=۰/۰۱۵، $t_{(۸)}$=۳/۱۰). به‌عبارت دیگر، میانگین بیان ژن (نرمالایز شده) β-catenin رت‌های دیابتی به‌طور معنی‌داری از رت‌های سالم بیشتر بود. همچنین، بین میانگین بیان ژن (نرمالایز شده) Wnt رت‌های سالم و دیابتی تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P=۰/۰۰۳، $t_{(۸)}$=٤/۲۷). به‌عبارت دیگر، میانگین بیان ژن (نرمالایز شده) Wnt رت‌های دیابتی به‌طور معنی‌داری از رت های سالم بیشتر است.

نتایج تحلیل واریانس دو عاملی (تمرین×عصاره) نشان داد که اثر اصلی تمرین و عصاره بر بیان ژنβ-catenin رت‌های دیابتی معنی‌دار است. اثر تعاملی تمرین و مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن β-catenin رت‌های دیابتی معنی‌دار نیست.

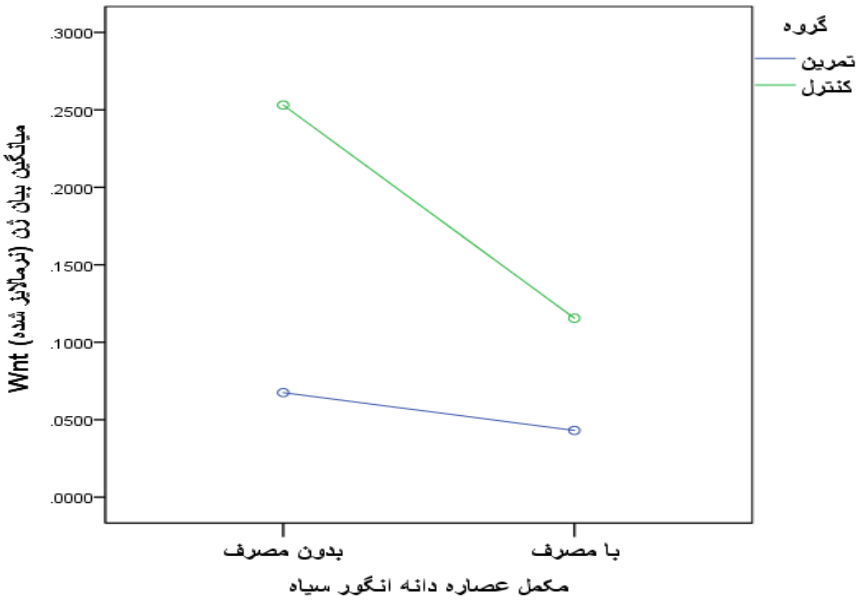


شکل ۱-نمودار میانگین اثرات تعاملی تمرین و مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن β-catenin در رت‌های دیابتی

همانگونه که در نمودار مشاهده می‌شود، بیان ژن β-catenin گروه تمرین (خط آبی) بالاتر از گروه کنترل (خط سبز) است. همچنین، میانگین بیان ژن β-catenin گروه تمرین (خط آبی) پایین‌تر از گروه کنترل (خط سبز) است. همچنین، تغییرات میانگین بیان ژن β-catenin گروه تمرین (خط آبی) از بدون مصرف تا مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه مشابه تغییرات بیان ژن β-catenin گروه کنترل (خط سبز) است. هرچند، مقدار کاهش بیان ژن β-catenin در گروه تمرین بیشتر از گروه کنترل (خط سبز) است، اما این تفاوت‌ها معنی‌دار نیست.

نتایج تحلیل واریانس دو عاملی (تمرین× عصاره) نشان داد که اثر اصلی تمرین و عصاره و اثر تعاملی تمرین و عصاره بر بیان ژن Wnt رت‌های دیابتی معنی‌دار است.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]



شکل ۲- نمودار میانگین اثرات تعاملی تمرین و مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن Wnt در رت‌های دیابتی

همانگونه که در نمودار مشاهده می‌شود، بیان ژن Wnt گروه تمرین (خط آبی) پایین‌تر از گروه کنترل (خط سبز) است. همچنین، الگوی تغییرات میانگین بیان ژن Wnt گروه تمرین (خط آبی) از بدون تا مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه متفاوت از تغییرات گروه کنترل (خط سبز) است. در گروه کنترل (خط سبز) میانگین بیان ژن Wnt از بدون مصرف تا مصرف عصاره کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته است، در حالی که در گروه تمرین (خط آبی) میانگین بیان ژن Wnt از بدون مصرف تا مصرف عصاره تغییرات اندکی داشته است.

همچنین تغییرات بافت پانکراس در گروه دیابتی، کاهش میزان تراکم سلولی را نشان داد، سلول‌های تخریب شده که دچار انقباض و پیکنوز هسته‌ای شده‌اند، بیشتر در مرکز جزایر هستند. میزان تخریب سلول‌های بتا و نیز اپیتوز سلولی براساس درجه‌بندی حدوداً ۶۰٪ بود. در گروه های کنترل سالم میزان تخریب سلول‌های بتا و نیز اپوپتوز سلولی براساس درجه‌بندی ۱۰٪ بود. در گروه تمرین و گروه عصاره، سلول های تخریب شده به تعداد بیشتری نسبت به گروه کنترل سالم مشاهده شد. میزان تخریب سلول‌های بتا و نیز اپیتوز سلولی براساس درجه‌بندی حدوداً ۳۰-۴۰ درصد بود.

بحث و نتیجه گیری

در پژوهش حاضر تمرین تناوبی شدید تغییرات معنی‌داری از لحاظ آماری بر میانگین بیان ژن Wnt و B-catenin رت‌های دیابتی نسبت به رت‌های سالم نشان داد. یافته‌های پژوهش‌های قبلی نشان دادند که بیان ژن بتا کاتنین عضله‌ی نعلی در گروه تمرین به‌طور غیرمعنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود [۵]. همچنین تمرینات HIIT بر کاهش مقاومت به انسولین تأثیر مثبت و معنی‌داری را نشان داده و سبب کاهش مقاومت به انسولین گردید [۱۰]. همسو با نتایج تحقیق اخیر Leal و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که هشت هفته تمرینات قدرتی توانی موجب افزایش بیان پروتئین بتاکاتنین در فعالیت مسیر Wnt عضله‌ی اسکلتی شد [۶]. از طرفی Fujimaki و همکاران (۲۰۱۴) اشاره داشتند که چهار هفته دویدن اختیاری و با شدت آرام روی چرخ گردان موجب بیش‌تنظیمی مسیر Wnt و افزایش بتاکاتنین در گروه تمرین شد [۱۳]. برخی نتایج تحقیقات قبلی نشان داد که میزان بیان بتاکاتنین در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک بالاتر است. از آنجایی که GSK-3beta در تخریب بتاکاتنین نقش دارد، کاهش بیان آن موجب کاهش تخریب بتاکاتنین می‌شود. این یافته‌ها نشان دهنده‌ی آن است که واسطه ی مسیر پیام‌رسانی Wnt به‌دنبال بیان بیشتر و تخریب کمتر، تجمع بیشتری در سیتوپلاسم خواهد یافت که جریان بیشتر به سمت هسته‌ی سلول و فعال کردن نسخه برداری از ژن‌های هدف را به‌دنبال دارد [۱۴]. تجمع هسته‌ای بتاکاتنین منتج به افزایش شکل‌گیری کمپلکس‌هایی با خانواده

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

فاکتورهای نسخه‌برداری (LEF)[1] و (TCF)[2] می‌شود. این فرآیند با فعال‌سازی نسخه‌برداری ژن‌های هدف برای تحریک سنتز، ترمیم و باززایی سلول‌های عضلانی همراه است. با این حال، پروتئین گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ –بتا، علاوه بر کاهش تجمع هسته‌ای بتاکاتنین نقش پیچیده‌ای از طریق پروتئین‌های مختلف پیامرسان در سلول بازی می‌کند. برخی از مطالعات نشان دادند که افزایش تام بیان پروتئین گلیکوژن سنتازکیناز۳–بتا و یا فسفریله شدن آن موجب مهار سنتز پروتئین و هایپرتروفی سلول‌های عضلانی از طریق کاهش بیان پروتئین‌های نسخه‌برداری ویژه می‌شود. همچنین، گلیکوژن سنتازکیناز ۳–بتا به‌واسطه‌ی توقف بیان پروتئین‌های myc و سایکلین‌ها می‌تواند باعث کاهش تکثیر و تمایز سلول‌های عضلانی شود. پژوهش حاضر این احتمال وجود دارد که تمرینات استقامتی شدید و طولانی مدت با افزایش قابل توجه در بیان گلیکوژن سنتازکیناز ۳ بتا و کاهش بتا–کاتنین مانع هایپرتروفی سلول های عضلانی شوند. این احتمال وجود دارد که تمرینات هوازی شدید و طولانی‌مدت، با توجه به استرس بالای مکانیکی – متابولیکی میزان بیان و فعالیت گلیکوژن سنتاز کیناز ۳–بتا را افزایش دهد و از این طریق مانع تجمع هسته‌ای بتا کاتنین شود [۵].

مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه منجر به کاهش معنی‌دار میانگین بیان ژن Wnt و B-catenin در بافت پانکراس رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو شد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش در مورد Wnt با نتایج پژوهش‌های ملکانه و همکاران (۲۰۱۸)، اله گاهی و همکاران (۱۳۹۵)، Zhang و همکاران (۲۰۱۸) و Gao و همکاران (۲۰۱٤) و در زمینه‌ی B-catenin با نتایج پژوهش های قاری و همکاران (۱۳۹۷)، داده‌خواه تهرانی و همکاران (۱۳۹٤) هم‌راستا است [۱۹–۱۵، ۸]. بررسی هم‌زمان تمرین و مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن Wnt تغییرات معنی‌داری را نشان نداد، اما انجام تمرین و مصرف عصاره‌ی دانه ی انگور به‌طور هم‌زمان تغییرات معناداری را در بیان B-catenin نشان داد.

براساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر نمایان شده است که یک دوره‌ی فعالیت ورزشی با مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه سبب کاهش میانگین بیان ژن B-catenin وwnt در بافت پانکراس در رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو شده است. در حالی که تمرین به تنهایی هم سبب کاهش بیان ژن B-catenin و Wnt در بافت پانکراس در رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو شده است. این در صورتی است که اثر تعاملی تمرین و مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور بر بیان ژن Wnt رت‌های دیابتی معنی‌دار نیست و به زبان ساده‌تر، مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه همراه تمرین بر بیان ژن Wnt رت‌ها، تفاوت معنی‌داری با مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بدون تمرین ندارد. در حقیقت نتایج پژوهش نشان داد که عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر کاهش میانگین بیان ژن B-catenin و wnt اثرگذار است. ممکن است پروآنتوسیانیدین موجود در عصاره‌ی هسته‌ی انگور که به صورت عاملی در به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند، به‌عنوان احیاء کننده‌ی سایر مواد ضداکسایشی عمل کنند و غلظت سایر مواد اکساینده‌ی آنزیمی را بالا نگه دارند و بتوانند بر تشکیل رادیکال‌های آزاد اثر مهاری داشته باشند و بدین ترتیب از بروز پراکسایشی جلوگیری کنند [۲۰].

در نهایت می‌توان با احتیاط توصیه کرد که تمرین هوازی همراه با مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه سبب کاهش بیان ژن-B catenin و Wnt می‌گردد؛ درنتیجه شاید بتواند در کنترل قند خون افراد مبتلا به دیابت نوع دو مؤثر واقع شود. روشن است که انجام تحقیقات بیشتری در این زمینه توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

از تمام افرادی که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، تشکر می‌گردد. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد و پژوهش حاضر با هزینه نویسندگان صورت گرفته است.

[1] Lymphoid enhancer factors

[2] T Cell Factor

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

مآخذ

1. Shahrjerdi Sh, Shavandi N, Sheikh Hoseini. The effect of aerobic exercise on metabolic factors, quality of life (QOL) and mental health (MH) in women with type II diabetes. *Arak Medical University Journal (AMUJ) Original Article* 2010; 12(4): 25-35.
2. Heine RJ, Diamant M, Mbanya JC, Nathan DM. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: the end of recurrent failure? *BMJ*. 2006; 333(7580): 1200-4.

۳. عزیزی. فریدون. اپیدمیولوژی دیابت در ایران. چکیده نامه سمینار افق‌های جدید در آموزش و درمان دیابت، تهران، ایران، بنیاد امور بیماری‌های خاص، ۱۳۸۰.

4. Pinent M, Castell A, Baiges I, Montagut G, ArolaL, Ardevol A. Bioactivity of flavonoids oninsulinsecreting cells. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2008; 7: 299-308.

۵. حبیبی. جعفر، بشیری. جبار، نورآذر. علیرضا، رضی. حسن. تأثیر سه ماه تمرین هوازی بر مسیر پیام‌رسانی Wnt عضله اسکلتی موش‌های صحرایی نر. مجله علوم پزشکی رازی، ۱۳۹۶؛ دوره ۲۶، شماره ۱۶۰، ص ۱۶-۷.

6. Leal ML, Lamas L, Aoki MS, Ugrinowitsch C, Ramos MSC, Tricoli V, et al. Effect of different resistance-training regimens on the WNT-signaling pathway. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111:2535-45.
7. Arora P, Ansari S. Bio-functional aspects of grape seeds-a review. *Int J Phytomed* 2010; 2: 177-85.

۸. الله‌گاهی. فریده، شیروی. عبدالحسین، حجتی. ویدا. مطالعه هیستومورفومتریک اثر عصاره الکلی دانه انگور (Vitis vinifera) بر روی ترمیم زخم‌های دیابتی موش صحرایی نر نژاد ویستار، *مجله علمی پژوهشی سلول و بافت* ۱۳۹۵؛ جلد ۷، شماره ۳، ص ۲۹۳-۳۰۱.

9. Irina CC, Marius IU, Adriana M, et al. Antioxidant effects of grape seed extractin a rat model of diabetes mellitus. *Diabetes and vascular research* 2009; 6(3): 200-204.

۱۰.مرادی ترابی. ناهید، بهپور. ناصر، تأدیبی. وحید. مقایسه آثار حاد تمرین HIIT و تمرین هوازی بر پاسخ مقاومت انسولینی در دختران جوان دارای اضافه وزن. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده دانشگاه رازی، گروه فیزیولوژی ورزشی، ۱۳۹۵.

11. Alizadeh .M, Asad. M, Faramarzi. M, Afroundeh. R. Effect of Eight-Week High Intensity Interval Training on Omentin-1 Gene Expression and Insulin-Resistance in Diabetic Male Rats. Annals of Applied Sport Science, 2017; 5(2): 29 – 36.
12. Bing Z, ZHaocun ZH, Hong J, Hui SH, SHouzhen CH, Donglian Y, Xuewen J and Benkang SH. Grape seed proanthocyanidin extract alleviates urethral dysfunction in diabetic rats through modulating the NO- cGMP pathway. *Experimental and therapeutic medicine* 2018; 15: 1053-1061.
13. Fujimaki Sh, Hidaka R, Asashima M, Takemasa T, Kuwabara T. Wnt Protein-mediated satellite cell conversion in adult and aged mice following voluntary wheel running. *J of Bio Chem* 2014; 289(11): 7399–7412.

۱۴.حسین‌نژاد، آرش؛ بهزادی، حدیث؛ ثقفی، حوریه؛ رحمانی. مظاهر؛ لاریجانی باقر؛ شیرزاد، محمود . بررسی نقش دفاع بیولوژیک در مقابل استرس اکسیداتیو در سندرم متابولیک و بیماری عروق کرونری.مجله دیابت ولیپید ایران. ۱۳۸۸، دوره ۸، شماره ٤ ، ص ۳۱۷-۳۳۰.

۱۵.ملکانه، محمد؛ هراتی‌زاده، بهاره؛ میری، محمدرضا. بررسی اثرات عصاره انگور سیاه بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون در موش‌های هیپرلیپیدمیک دیابتی شده با آلوکسان. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند*، ۱۳۹۲؛ دوره ۲۰، شماره ٤، ص ۳٦٦-۳۷۳.

16. Zhang H, Xuqiang X, Jiufeng Zhao Ch, Yu Y, Chengxin S and Jianwen Yang. Regulatory Mechanisms of the Wnt/β-catenin Pathway in Diabetic Cutaneous Ulcers, a section of the journal Frontiers in Pharmacology, Front. *Pharmacol* 2018; 9:1114.
17. Gao L Z, Guangyi L, Hui Z, Xing L, Yangi X, Jiangy B and Xianhua L. Grape seed proanthocyanidin extract protects from cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, Molecular Medicine Reports 2014; 9: 801-807.

۱۸.قاری، مائده؛ فتحی، عزت اله؛ فرحزادی، راحله. نقش مسیر سیگنالینگ Wnt/β-catenin در لوسمی‌های خونی. *فصلنامه پژوهشی خون* ۱۳۹۷؛ دوره ۱۵. شماره ۲. ص ۱۴۹-۱٦٤.

۱۹.دادخواه تهرانی، ابوالفضل؛ محمدی‌ملایری، محمدرضا؛ فاطمی، فائزه؛ جهانبانی، علیرضا، ترابی؛ فاطمه، جمالی، محمدحسین. تأثیر سیاه دانه در فعالیت آنزیم‌های متابولیزه کننده سموم و سطح پروتئین بتاکاتنین در رت‌های تحت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

هسته انگور بر ظرفیت ضد اکسایشی تام و مالون دی آلدهید مردان جوان. *مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز*،۱۳۹۷؛ دوره ٤٠(۳)،ص ۸۱-۸۷.

تیمار با دی‌متیل هیدرازین، *دوماهنامه علمی پژوهشی دانشگاه شاهد*، ۱۳۹٤؛ دوره ۲۲، شماره ۱۱۷، ص ۲۲-۹.

۲۰.نیک بخت، حجت ا..؛ مرادی، حمزه؛ ابراهیم، خسرو؛ عابد نطنزی، حسین. تاثیر همزمان تمرینات هوازی و عصاره

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]

THE EFFECT OF 8 WEEKS OF HIIT TRAINING AND SUPPLEMENTATION OF BLACK GRAPE SEED EXTRACT ON WNT AND *B*-CATENIN GENE EXPRESSION IN PANCREATIC TISSUE IN MALE RATS WITH TYPE 2 DIABETES.

Fatemeh Soltan Mohammadi[1], Mahsa Mohsenzadeh*[1], Foad Feizollahi[1]

1. Department of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Branch Karaj, Alborz, Iran

ABSTRACT

Background: The aim of the present study was to investigate the effect of 8 weeks of HIIT training and supplementation of black grape seed extract on Wnt and *B*-catenin gene expression in pancreatic tissue in male rats with type 2 diabetes.
Methods: In this experimental study, 40 male Wistar rats, with average weight of 250 ± 20 gr, after induction of diabetes by STZ, were randomly divided into 5 groups: training- supplement, training-placebo, supplement and diabetic-control and base control. After becoming diabetic, rats were familiarized with protocol for one week and then trained for eight weeks, five days a week. They ran on treadmill with 90% of VO2 max. Intragastric injection of GSPE extracted from black grape seed (Cabernet sauvignon) once a day for 8 weeks (250 mg/kg, proanthocyanidin content >96%). 24 hours after the last session of training, pancreas tissue was extracted, and the level of gene expression was measured by Real Time-PCR. In all statistical analyzes, the statistical significance level was considered to be 0.05.
Results: Eight weeks and supplement significantly increased the mean expression of Wnt and B-catenin genes in pancreatic tissue of type 2 diabetic rats but the effect of exercise with black grape seed extract on the expression of Wnt genes in the pancreas of diabetic rats was not significant.
Conclusion: It seems that regulating the expression of Wnt and B-catenin genes through exercise and consumption of black grape seed extract is likely to improve and maintain the function of pancreatic beta cells, especially in diabetic samples.

Keywords: High Intense Training, Black Grape Seed Extract, Wnt, β-catenin, T2D

*Imam Ali Complex, Moazen Blvd, Karaj,Alborz, Department of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Branch Karaj, Alborz, Iran. Postal Code: 3149968111, Phone Number: 026-34259571-9, Fax: 34418156, Email: m.mohsenzadeh@kiau.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-20]