

تأثیر تمرین مقاومتی بر محتوای پروتئین‌های مرتبط با استرس شبکه آندوپلاسمی و پاسخ پروتئین باز نشده در بطن چپ قلب موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو

فاطمه صلح دوست^۱، محمد شرافتی مقدم^{۱*}، بهاره زارع^۱

چکیده

مقدمه: استرس شبکه آندوپلاسمیک منجر به پاسخ پروتئین باز نشده یا تانخورده می‌شود که پروتئین‌های ATF4 و CHOP نقش‌های بسیار مهمی در این مسیر سیگنالینگ دارند؛ بنابراین هدف از تحقیق حاضر، تأثیر تمرین مقاومتی بر محتوای پروتئین‌های ATF4 و CHOP در بطن چپ قلب موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو است.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۱۲ سررت نر ۲ ماهه از نژاد اسپراگ‌داولی انتخاب و وزن آنها بعد از چهار هفته به میانگین 280 ± 20 گرم رسید. دیابت نوع دو از طریق تزریق محلول‌های نیکوتین‌آمید (110 mg/kg) و استرپتوزوتوسین (60 mg/kg) القاء شد. رت‌ها به روش تصادفی به ۲ گروه، تمرین مقاومتی و کنترل دیابتی تقسیم شدند؛ تمرین مقاومتی شامل ۸ هفته و هفته‌ای ۳ جلسه بالارفتن از یک نردبان عمودی با شیب ۸۵ درجه به طول یک متر با ۲۶ پله و ۲ سانتی‌متر فضای بین هر پله بود. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون t-مستقل در نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۹ و گراف‌پد پریم نسخه ۱۰/۲/۳ استفاده شد. سطح معناداری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها: محتوای پروتئین‌های ATF4 و CHOP به دنبال ۸ هفته تمرین مقاومتی، تغییر معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل در بطن چپ قلب نشان داد ($P = 0/001$).

نتیجه‌گیری: افزایش پروتئین‌های ATF4 و CHOP می‌تواند منجر به افزایش مرگ سلولی کاردومیوست‌ها در بطن چپ قلب آزمودنی‌های دیابتی نوع دو از طریق افزایش استرس شبکه آندوپلاسمی و شروع پاسخ پروتئین باز نشده یا تانخورده شود.

واژگان کلیدی: فاکتور رونویسی فعال ۴، پروتئین همولوگ C/EBP، تمرین مقاومتی، دیابت نوع دو

۱- گروه علوم ورزشی، مؤسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، ایران

***نشان‌ی:** فارس، شیراز، میدان معلم، ایمان شمالی، ساختمان مرکزی مؤسسه آموزش عالی آپادانا، کد پستی: ۷۱۸۷۹۸۵۴۴۳، تلفن: ۰۹۱۶۶۷۲۹۲۷۱، پست الکترونیک: m.sherafati@apadana.ac.ir

مقدمه

دیابت نوع دو یکی از شایع‌ترین اشکال بیماری مزمن در سطح جهان و یک اختلال متابولیک است که با مقاومت به انسولین و اختلال عملکرد سلول‌های بتا با افزایش بروز در سراسر جهان مشخص می‌شود. حدود ۹۵ درصد از موارد دیابت در اکثر جمعیت‌ها را تشکیل می‌دهد [۱]. عوامل خطر متعددی با افزایش خطر ابتلا به دیابت نوع دو مرتبط هستند، از جمله افزایش سن، چاقی، رژیم غذایی بیش از حد، عوامل غذایی مانند افزایش مصرف چربی‌های حیوانی و نوشیدنی‌های شیرین، سبک زندگی بی‌تحرک، سندرم‌ها، وجود فشار خون بالا و هیپرلیپیدمی یا سایر عوامل خطر متابولیک قلبی. در مقایسه، داده‌های اپیدمیولوژیک در دیابت نوع دو با افزایش تقریباً دو برابری مرگ‌ومیر در اکثر جمعیت‌ها همراه است [۲]. شبکه آندوپلاسمیک (ER)^۱ یک اندامک سلولی محصور در غشاء بزرگی است که در همه سلول‌های یوکاریوت‌ها یافت می‌شود که محل تا شدن غشاء و پروتئین‌های ترشحی، ذخیره کلسیم آزاد و سنتز لیپیدها است. تنش‌های فیزیولوژیکی، مانند افزایش بار ترشحی و همچنین تنش‌های پاتولوژیک، از جمله وجود پروتئین‌های جهش‌یافته که نمی‌توانند به درستی در ER تا شوند، ممکن است منجر به عدم تعادل بین تقاضا برای تاخوردگی پروتئین و ظرفیت ER برای تا شدن پروتئین شود [۳]. بنابراین، ایجاد استرس ER این تعادل را بر هم می‌زند و به دلیل شرایط فیزیولوژیکی مختلف، مانند اختلال در هموستاز ER-کلسیم، جهش‌هایی که چین‌خوردگی پروتئین را مختل می‌کند، یا پیری سلولی می‌تواند منجر به تاخوردگی اشتباه پروتئین شود [۴]. استرس ER با تا زدن و تجمع اشتباه پروتئین ایجاد می‌شود و در صورت عدم کاهش می‌تواند پاتولوژیک شود. در واقع، تاخوردگی و تجمع نادرست پروتئین مشخصه بسیاری از اختلالات و بیماری‌ها است [۳].

هنگامی که مقادیر زیادی از پروتئین‌های تا شده یا تا نشده در ER در پاسخ به استرس انباشته می‌شوند، فرآیندی به نام پاسخ پروتئین باز نشده یا تاخوردگی (UPR)^۲ فعال می‌شود. اختلال در این فرآیند منجر به بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت، بیماری‌های عصبی و بسیاری از سرطان‌ها می‌شود. پاسخ UPR

به دنبال افزایش استرس، بقای سلولی را با مرگ متعادل می‌کند؛ بنابراین در این شرایط سلول‌ها تصمیم می‌گیرند یا زنده بمانند یا مسیر مرگ سلولی مانند آپوپتوز و اتوفازی را پیش رو داشته باشند. اما در برخی موارد این تعادل به هم می‌خورد و مسیر UPR به‌طور مزمن فعال یا غیرفعال می‌شود و شرایط سلولی منجر به ایجاد یا پیشرفت بیماری می‌شود [۵].

تنش‌های سلولی باعث ایجاد آبشارهای سیگنالینگ می‌شوند که می‌توانند اختلال عملکرد تحریک‌کننده را کاهش دهند یا مرگ سلولی را آغاز کنند. در طول استرس ER، فاکتورهای فاکتور رونویسی فعال ۴ (ATF4)^۳ و پروتئین همولوگ C/EBP (CHOP)^۴ به‌طور گسترده برای ترویج مرگ سلولی شناخته شده است. با این حال، مشخص نیست که آیا ATF4 و CHOP در طول سازگاری نیز نقش مفیدی دارند یا خیر [۶].

ATF4 یک پروتئین متصل به DNA در پستانداران متشکل از ۳۴۹ اسید آمینه است و به‌طور گسترده در رده‌های سلولی مختلف بیان می‌شود [۷]. ATF4 یک پروتئین تنظیم‌کننده رونویسی چند منظوره در خانواده زیپ لوسین پایه است. ATF4 را می‌توان در اکثر انواع سلول پستانداران بیان کرد و می‌تواند در انواع پاسخ‌های سلولی به تنش‌های محیطی خاص، اختلالات درون سلولی یا عوامل رشد شرکت کند [۸]. ATF4 در تمایز سلولی، تکثیر، آپوپتوز، تعادل اکسیداسیون/احیاء، جذب اسیدهای آمینه و متابولیسم گلیکولیپید نقش دارد. ATF4 نقش اساسی در حفظ هموستاز ایفا می‌کند. ATF4 در سنتز و جذب ماتریکس، متابولیسم انرژی، آپوپتوز و اتوفازی سلولی شرکت می‌کند [۹، ۱۰]. از آنجاکه ATF4 در طیف وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی درگیر است، نقش آن در سلامت و بیماری انسان هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است. علی‌رغم تأثیرات مفید UPR بر فیزیولوژی سلولی می‌تواند مسیرهای مرگ سلولی را در زمانی که هموستاز بازسازی نمی‌شود آغاز کند. درحالی‌که مسیرهای متعددی که فعال‌سازی UPR را به مرگ سلولی متصل می‌کنند توصیف شده‌اند [۱۱]، اولین موردی که در پستانداران شناسایی شد و مشخص‌تر از همه، توسط پروتئین CHOP تحریک می‌شود [۱۲]. حذف CHOP از بسیاری از آسیب‌شناسی‌های تجربی - البته نه همه

³ Activating Transcription Factor 4

⁴ C/EBP Homologous Protein

¹ Endoplasmic Reticulum

² Unfolded Protein Response

گروه تمرین شنای معمولی نسبت به گروه تمرین شنا با وزنه به دم افزایش یافته بود. این محققان با توجه به نتایج پژوهش خود بیان کردند که در پاسخ به ورزش با شدت بالا، ممکن است باعث میوپاتی در قلب و عضله اسکلتی شود [۱۹]. در تحقیقی دیگر Ruan و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که تمرین ورزشی با شدت متوسط منجر به بهبود توانایی آنتی‌اکسیدانی و مهار آپوپتوز از طریق سازکار مسیرهای سیگنالینگ استرس ER از طریق مسیرهای IRE1/JNK و eIF2 α /CHOP می‌شود [۲۰]. همچنین در تحقیقی دیگر Guarino و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که فعالیت ورزشی ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته و مدت زمان ۶۰ دقیقه برای هر جلسه منجر به افزایش محتوای CHOP می‌شود [۲۱].

تنظیم سلامت عملکردهای قلبی - عروقی بسیار حائز اهمیت است و با وجود بررسی‌های فراوان تمرین‌های ورزشی بر روی این مسیرهای گوناگون سلولی و ملکولی هنوز محققان و فیزیولوژیست‌های ورزشی به درک کاملی از رفتار این مسیرهای مرتبط با تنظیم عملکرد قلبی به دنبال انواع شرایط تمرینی از قبیل مدت‌زمان، شدت، نوع آزمودنی و غیره نرسیده‌اند. سازکارهای دیگر سلولی مانند رتیکولوفازی و آپوپتوز سلول‌های قلبی و تنظیم سلامت عملکرد این سلول‌های نیز بسیار مهم است که پروتئین‌های مختلفی مانند ATF4 و CHOP درگیر در این مسیرها هستند. با توجه به حائز اهمیت بودن مسیرهای سلولی در تنظیم عملکرد قلبی - عروقی و عوامل سلولی برای تنظیم این عملکرد قلبی، هدف محققان تحقیق حاضر بررسی تأثیر تمرین مقاومتی بر محتوای پروتئین‌های مرتبط با استرس شبکه آندوپلاسمی و پاسخ پروتئین بازنشده در بطن چپ قلب موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو است.

روش‌ها

نمونه و نوع تحقیق

تحقیق حاضر از نوع تجربی - بالینی بود که تعداد ۱۲ سر موش صحرایی ۲ ماهه نر از نژاد اسپراگ‌داولی با وزن متوسط 180 ± 20 گرم به صورت تصادفی خریداری شدند. سپس موش‌ها به آزمایشگاه حیوانی انتقال یافتند و در اتاقی مخصوص برای نگهداری موش‌های صحرایی با دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد،

- با یک جزء استرس ER از جمله دیابت، سرطان‌ها، آسیب کبدی و تخریب عصبی محافظت می‌کند، درحالی‌که به‌طور هم‌زمان بیان نشانگرهای مرگ سلولی را کاهش می‌دهد [۱۳]. این یافته‌ها به این ایده کاملاً پذیرفته شده منجر شده است که پیامد سلولی اولیه (یا شاید تنها) فعالیت CHOP، ترویج مرگ سلولی در طول استرس بیش از حد ER است و این مرگ سلولی پیشرفت بیماری‌های تشدید شده توسط استرس ER را تسریع می‌کند [۱۴]. CHOP یک واسطه اصلی برای آپوپتوز ناشی از استرس ER است. حذف CHOP، آپوپتوز ناشی از استرس ER را کاهش می‌دهد درحالی‌که بیان بیش از حد CHOP، سلول‌ها را نسبت به آپوپتوز حساس می‌کند [۱۵].

فعالیت‌های ورزشی یک جزء مهم غیردارویی درمان دیابت است. فعالیت‌های ورزشی با افزایش حساسیت به انسولین، تحریک جذب گلوکز توسط سلول‌های عضلانی اسکلتی و کاهش وزن بدن، کنترل قند خون را در افراد مبتلا به دیابت نوع یک و نوع دو بهبود می‌بخشد. همچنین چربی‌های در گردش، فشار خون و خطر عوارض قلبی - عروقی را کاهش می‌دهد [۱۶]. ترکیبی از ورزش‌های هوازی و مقاومتی برای افراد دیابتی توصیه می‌شود و تمرین‌های هوازی تناوبی ممکن است مؤثرتر از تمرین هوازی مداوم برای بهبود آمادگی قلبی - تنفسی، حساسیت به انسولین و کنترل قند خون در دیابت نوع دو باشد [۱۷]. علاوه بر این، تمرین‌های بدنی ممکن است اثرات مفید مستقیمی روی سلول‌های بتای پانکراس از طریق واسطه‌های در گردش داشته باشد، همان‌طور که مطالعات در مدل‌های حیوانی و جزایر انسانی نشان می‌دهد [۱۶]. نشان داده شده است که تمرین‌های ورزشی مداوم با شدت متوسط به مدت ۸ هفته از سلول‌های بتا در برابر سایتوکین‌های پیش‌التهابی و عامل استرس‌زای ER محافظت می‌کند [۱۸]. در راستای تأثیرگذاری تمرین‌های ورزشی بر استرس ER، در تحقیقی توسط Korkmaz و همکاران (۲۰۲۳) اثرات تمرین‌های شنا با شدت‌های مختلف بر استرس ER آسیب عضلانی بررسی شد. در این تحقیق موش‌های صحرایی به سه گروه کنترل، تمرین شنای معمولی و تمرین شنا با وزنه به دم تقسیم شدند. سطوح ATF4 بطن و عضله اسکلتی دوقلو با استفاده از وسترن‌بلات اندازه‌گیری شد. ATF4 نسبت به سایر گروه‌ها افزایش را نشان داد. سطح ATF4 در عضله قلب در

رطوبت ۴۰ تا ۵۰ درصد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲-۱۲ که به صورت خودکار تنظیم می‌شدند، قرار گرفتند. غذای موش‌ها به صورت آزاد و استاندارد برای حیوانات آزمایشگاهی از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد. همچنین آب مورد نیاز موش‌ها به صورت آزاد در بطری‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری مخصوص حیوانات آزمایشگاهی در دسترس آنها بود.

به وزن رساندن موش‌های صحرایی

موش‌های صحرایی به مدت ۴ هفته تحت غذای کنترل‌شده^۱ پرچرب در قالب پلت، ترکیبی از پودر غذای استاندارد رت (۳۶۵ گرم/کیلوگرم)، چربی گوسفندی (۳۱۰ گرم/کیلوگرم)، مخلوط ویتامین‌ها و مواد معدنی (۶۰ گرم/کیلوگرم)، DL میتونین (سه گرم/کیلوگرم)، پودر مخمر (۱ گرم/کیلوگرم) و کلرید سدیم (یک گرم/کیلوگرم) قرار گرفتند تا به میانگین وزن 280 ± 20 گرم رسیدند [۲۲].

روش القای دیابت نوع دو

برای ایجاد دیابت نوع دو دو مرحله تزریق به موش‌های صحرایی شد. مرحله اول، محلولی از نیکوتین‌آمید با دوز ۱۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن را به صورت داخل صفاقی تزریق شد. مرحله دوم، ۱۵ دقیقه بعد از اولین تزریق، محلولی از استرپتوزوتوسین (STZ) حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با $\text{pH} = 4.5$ بود با دوز ۶۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن را به صورت داخل صفاقی تزریق شد. برای مطمئن شدن از دیابتی شدن موش‌های صحرایی، سه روز بعد از تزریق، قند خون آنها را با دستگاه اندازه‌گیری قند خون اکتیو^۲، ساخته شرکت آکوچک^۲ ساخت آلمان، از نمونه خون گرفته شده از سیاهرگ دم موش‌ها، سنجیده شد. قند خون بین ۱۲۶ تا ۲۶۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر را نشانه‌ای از دیابت نوع دو در نظر گرفته شد [۲۳، ۲۴]. سپس موش‌های صحرایی به ۲ گروه (۱) گروه کنترل و (۲) گروه تمرین تقسیم شدند.

برنامه تمرینی

برنامه تمرین مقاومتی موش‌های صحرایی شامل صعود از نردبان مخصوص جوندگان بود و مرحله آشناسازی به مدت یک هفته

بالارفتن از نردبان بدون بستن وزنه به دُم موش‌های صحرایی انجام شد. برنامه تمرینی اصلی تمرین مقاومتی شامل ۸ هفته و هفته‌ای ۳ جلسه بالارفتن از یک نردبان عمودی با شیب ۸۵ درجه به طول یک متر با ۲۶ پله و ۲ سانتی‌متر فضای بین هر پله بود. هر جلسه تمرین مقاومتی شامل ۳ نوبت با ۵ تکرار انجام می‌شود که در فاصله هر تکرار یک دقیقه استراحت و در فاصله بین هر ست ۲ دقیقه استراحت در نظر گرفته شد. اصل اضافه بار برای موش‌های صحرایی به این صورت بود که در هفته اول، دوم و سوم میزان وزنه‌های بسته‌شده به دُم موش‌های صحرایی شامل ۵۰ درصد وزن بدن آنها بود و در هفته‌های چهارم و پنجم و ششم به ۷۵ درصد وزن بدن آنها رسید و در نهایت در هفته‌های هفتم و هشتم به ۱۰۰ درصد وزن بدن آنها رسید. به منظور گرم کردن و سرد کردن، قبل از انجام تمرین اصلی بین ۳ تا ۴ مرتبه بالا رفتن از نردبان بدون وزنه، قبل و بعد از هر جلسه تمرین در نظر گرفته شد [۲۵].

روش بافت‌برداری

در مدت اجرای پروتکل، گروه کنترل هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند. همچنین موش‌های صحرایی دیابتی هیچ‌گونه درمانی با انسولین را در طول دوره پژوهش نداشتند. برای از بین بردن آثار حاد تمرین مقاومتی متغیرهای غیرقابل کنترل مانند استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه تمرینی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کنامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۳ تا ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، بی‌هوش شدند. سپس بافت بطن چپ قلب از بدن حیوان برداشته شد و در سرم فیزیولوژیک شستشو داده و سپس بلافاصله برای سنجش‌های بعدی با دمای ۸۰- فریز شد. با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن-بلات محتوای پروتئین‌های ATF4 و CHOP اندازه‌گیری شد.

روش آزمایشگاهی وسترن‌بلات

با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن-بلات متغیرهای پژوهش اندازه‌گیری شد. برای استخراج پروتئین‌های بافت بطن چپ قلب از بافر RIPA حاوی ۰/۰۵ میلی مولار بافر تریس (pH برابر ۸)، ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد EGTA، یک درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) به اضافه ۰/۱ درصد آنتی‌پروتئاز

¹ Active

² Accu-Chek

تجزیه و تحلیل آماری

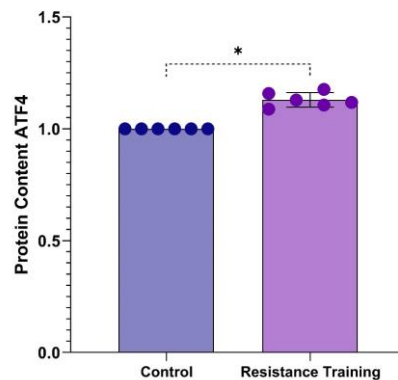
نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون آماری شاپیرو-ویلک بررسی شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، داده‌های متغیرهای تحقیق حاضر از طریق آزمون آماری t-مستقل تجزیه و تحلیل شدند. بررسی داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۹ و گراف‌پد پریم نسخه ۱۰/۲/۳ انجام گرفت. اندازه اثر از طریق آزمون Choen'd بررسی شد. سطح معناداری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

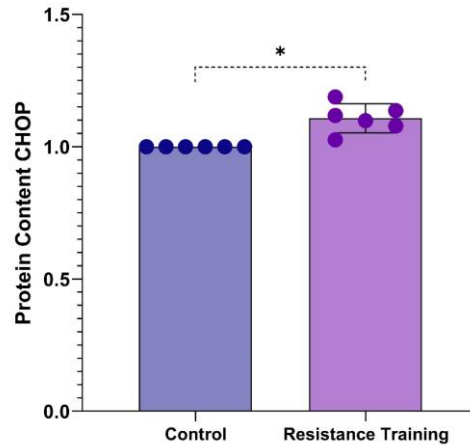
تجزیه و تحلیل محتوای پروتئین ATF4 به دنبال ۸ هفته مقاومتی، با مقدار t-مستقل (۹/۶۷) تغییر معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل در بطن چپ قلب نشان داد ($P = 0/001$) (شکل ۱). اندازه اثر Choen'd، اثر قدرتمندی را به دنبال افزایش محتوای پروتئین ATF4 به دنبال انجام تمرین مقاومتی نشان داد ($EF = 0/58$).

همچنین محتوای پروتئین CHOP به دنبال ۸ هفته مقاومتی، با مقدار آزمون t-مستقل (۴/۸۱) تغییر معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل در بطن چپ قلب نشان داد ($P = 0/001$) (شکل ۲). اندازه اثر Choen'd، اثر قدرتمندی را به دنبال افزایش محتوای پروتئین CHOP به دنبال انجام تمرین مقاومتی نشان داد ($EF = 2/78$).

کوکتیل (sigma) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌گرم بافت در ۵۰۰ میکرولیتر بافر حاوی آنتی‌پروتئاز توسط یک هموژنایزر دستی هموژن شدند و نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد و سپس در یک سانتریفوژ یخچال‌دار (bo, swl4rfroil) در دور ۱۲۰۰۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد؛ سپس مایع رویی جمع‌آوری شده و غلظت پروتئین آن با کیت تعیین کننده پروتئین (Bio-Rad) اندازه‌گیری گردید (در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد). در نهایت در ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری شد، سپس هموژن به دست آمده به نسبت ۱:۱ با نمونه لودینگ بافر (mM50) تریس-کلرید هیدروژن، ۲ درصد سدیم دو سیل سولفات، ۱۰ درصد گلیسرول، ۵ درصد بتا-مرکاپتواتانول و ۰/۰۰۵ درصد برموفنول آبی) مخلوط شد. در ادامه، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه جوشانده شدند تا تمام پروتئین‌ها کاملاً دناتوره شوند. پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل SDS-Polyacrylamide جدا شده و به غشای نیترو سلولز منتقل شدند. غشاء به مدت ۱ ساعت در ۵ درصد BSA در Tris-Buffered Saline و ۰/۱ درصد Tween 20 TBST) مسدود و در آنتی‌بادی اولیه (۱:۵۰۰) انکوبه شد. انکوباسیون در آنتی‌بادی ثانویه روز بعد به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق در ۴ درصد TBST انجام شد. پروتئین‌ها با یک واکنش شیمیایی لومینسانس (ECL) و با تجزیه و تحلیل densitometry با نرم‌افزار Image J (نسخه ۱/۸/۰/۱۱۲) اندازه‌گیری شد.



شکل ۱- میانگین و انحراف استاندارد محتوای تام پروتئین ATF4



شکل ۲- میانگین و انحراف استاندارد محتوای پروتئین CHOP

بحث

این تحقیق با هدف بررسی تأثیر تمرین مقاومتی بر محتوای پروتئین‌های مرتبط با استرس شبکه آندوپلاسمی و پاسخ پروتئین بازنشده در بطن چپ قلب موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو انجام شد. نتایج افزایش معناداری را به دنبال ۸ هفته مقاومتی در محتوای پروتئین ATF4 و CHOP نسبت به گروه کنترل در بطن چپ قلب نشان دادند.

شبکه آندوپلاسمی یک اندامک اصلی است که در تا کردن پروتئین و سنتز اصلاح نقش دارد و استرس شبکه آندوپلاسمی زمانی اتفاق می‌افتد که چندین عامل فیزیولوژیکی و پاتولوژیک اجازه می‌دهند مقادیر بیش از حد پروتئین‌های تاشده یا تاننشده انباشته شوند. استرس شبکه آندوپلاسمی اغلب منجر به شروع پاسخ پروتئین بازنشده یا تاننشده در تلاش برای برقراری مجدد هموستاز بافتی می‌شود. با این حال، پاسخ پروتئین بازنشده یا تاننشده برای القای بازسازی عروقی و آسیب قلبی تحت شرایط پاتولوژیک مختلف، که منجر به یا تسریع توسعه بیماری‌های قلبی-عروقی مانند فشار خون بالا، آترواسکلروز و نارسایی قلبی می‌شود، مستند شده است [۲۶]. در این راستا فعالیت‌ها و تمرین‌های ورزشی با شرایط متفاوت مانند مدت زمان، نوع و شدت‌های تمرینی، تعداد تکرارها و ست‌ها می‌تواند تأثیرگذاری متغیری را اعمال کند.

در این راستا در تحقیقی Chen و همکاران (۲۰۲۳) تأثیر تمرین ورزشی بر تنظیم استرس شبکه آندوپلاسمی و میتوفاژی قلبی در موش‌های صحرایی آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد میوکارد

(I/R)^۱ را بررسی کردند. تمرین ورزشی باعث افزایش عملکرد عصب پاراسمپاتیک و افزایش بیان پروتئین M2AChR میوکارد در موش‌های I/R شد. همچنین از بیان مسیرهای سیگنالینگ CHOP و PERK/eIF2 α /ATF4 جلوگیری کرد و به طور مؤثر میتوفاژی، استرس شبکه آندوپلاسمی و آپوپتوز را کاهش داد. این محققان بیان کردند که مداخله ورزشی حالت پاراسمپاتیک را در موش‌ها فعال کرد. این میتوفاژی میوکارد و سطوح استرس شبکه آندوپلاسمی را مهار و آپوپتوز میوکارد کاهش داد، در نتیجه در برابر آسیب میوکارد ناشی از I/R مقاومت کرد و عملکرد قلب را بهبود بخشید [۲۷]. نتایج تحقیق Chen و همکاران با نتایج تحقیق حاضر در یک راستا نیست، زیرا ما شاهد افزایش محتوای پروتئین‌های ATF4 و CHOP هستیم و این در حالی است که در تحقیق Chen و همکاران محتوا و مسیر مرتبط با این عوامل مهار شده بود و این مهار مرگ سلولی را در آزمودنی‌های مبتلا به نقص قلبی کاهش داد. آزمودنی‌های تحقیق حاضر از نوع دیابتی بودند و یکی از عوارض مهم دیابت نوع دو، کاردیومیوپاتی دیابتی است که قلب عملکرد مؤثر خود را از دست می‌دهد و این می‌تواند یکی از عوامل مهم افزایش محتوای پروتئین‌های ATF4 و CHOP در تحقیق حاضر باشد. کاردیومیوپاتی دیابتی عمدتاً به اختلال عملکرد متابولیک میوکارد ناشی از گلوکز بالا اشاره دارد و هیپرگلیسمی یک عامل خطر مستقل برای عملکرد قلب در غیاب آترواسکلروز عروق کرونر و فشار خون بالا است. کاردیومیوپاتی دیابتی که یکی از عوارض شدید دیابت است، به علت اصلی

^۱ Ischemia-Reperfusion Injury

نهایی گلیکولاسیون پیشرفته (AGES)، استرس شبکه آندوپلاسمی (ERS)، استرس اکسیداتیو، التهاب، اختلال در جابجایی کلسیم، اتوفازی، میتوفاژی، فعال‌سازی سیستم رنین-آنژیوتانسین-آلدوسترون (RAAS)^۱، عدم تعادل بین متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMPs)^۲ و مهارکننده بافتی متالوپروتئینازها (TIMPs)^۳ و مسیرهای سیگنالینگ با واسطه فاکتور تبدیل‌کننده رشد بتا (TGFβ)^۴ همگی در پیشرفت نواقص قلبی نقش دارند [۳۱-۳۳].

در مقابل با نتایج تحقیق حاضر Ruan و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که تمرین ورزشی با شدت متوسط منجر به بهبود توانایی آنتی‌اکسیدانی و مهار آپوپتوز از طریق سازکار مسیرهای سیگنالینگ استرس شبکه آندوپلاسمی از طریق مسیرهای IRE1/JNK و eIF2α/CHOP می‌شود [۲۰]. نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق Ruan و همکاران هم‌راستا نمی‌باشد؛ در تحقیق حاضر تمرین مقاومتی به مدت ۸ هفته منجر به افزایش ATF4/CHOP شد و این درحالی است که در تحقیق Ruan و همکاران به دنبال انجام تمرین ورزشی با شدت متوسط مسیرهای IRE1/JNK و eIF2α/CHOP مهار شده و در نهایت منجر به کاهش مرگ سلولی از طریق آپوپتوز شده است. مطالعات متعدد تأیید کرده‌اند که آسیب ساختاری سلولی مزمن و اختلال عملکرد با واسطه استرس شبکه آندوپلاسمی در پاتوفیزیولوژی بیماری قلبی-عروقی نقش اساسی دارند. فعالیت‌های و تمرین‌های ورزشی متفاوت در افزایش یا کاهش استرس شبکه آندوپلاسمی نقش به‌سزایی دارد. بنابراین با توجه به اینکه استرس شبکه آندوپلاسمی در مسیرهای سیگنالینگ متعددی مانند تاخوردگی پروتئین، استرس اکسیداتیو، مسیرهای کلسیم و پاسخ التهابی نقش دارد، سازکارهای مولکولی دقیق هر مسیر در تنظیم عملکرد اندوتلیال عروقی و کاردیومیوسیت و برهمکنش‌های بین این مسیرها نقش دارد و به این معنی است که برای آشکارسازی نقش فعالیت‌ها و تمرین‌های ورزشی بر استرس شبکه آندوپلاسمی و مسیرهای مرتبط نیاز به بررسی بیشتر در آینده دارد [۳۴-۳۸].

نارسایی قلبی در بیماران دیابتی تبدیل شده است. علائم اولیه نامشخص هستند و بیماران به تدریج اختلال عملکرد بطن چپ را نشان می‌دهند و در نهایت به نارسایی کامل قلب مبتلا می‌شوند که چالش بزرگی را برای تشخیص زودهنگام کاردیومیوپاتی دیابتی ایجاد می‌کند [۲۸]. مداخلات سبک زندگی ضروری است و به خوبی شناخته شده است که یک رژیم غذایی سالم و انجام فعالیت‌های ورزشی مناسب برای بهبود کنترل قند خون و کنترل وزن و ارتقای حساسیت به انسولین برای کاهش بار بر روی قلب در کاردیومیوپاتی دیابتی مفید است [۲۹، ۳۰].

در راستای تأثیرگذاری تمرین‌های ورزشی بر استرس شبکه آندوپلاسمی، در تحقیقی توسط Korkmaz و همکاران (۲۰۲۳) اثرات تمرین‌های شنا با شدت‌های مختلف بر استرس شبکه آندوپلاسمی آسیب عضلانی بررسی شد. ATF4 نسبت به سایر گروه‌ها افزایش را نشان داد. سطح ATF4 در عضله قلب در گروه تمرین شنای معمولی نسبت به گروه تمرین شنا با وزنه به دم افزایش یافته بود. این محققان با توجه به نتایج پژوهش خود بیان کردند که در پاسخ به ورزش با شدت بالا، ممکن است باعث میوپاتی در قلب و عضله اسکلتی شود [۱۹]. نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق Korkmaz و همکاران هم‌راستا است، زیرا در هر دو تحقیق ما شاهد افزایش محتوای ATF4 هستیم و این افزایش می‌تواند مرتبط با شرایط تمرینی مانند مدت زمان، نوع و شدت‌های تمرینی، تعداد تکرارها و ست‌ها و غیره باشد که با افزایش محتوای ATF4 اتوفازی یا میتوفاژی را در بافت‌های متفاوت افزایش می‌دهند. در تحقیق Korkmaz و همکاران مشاهده می‌شود محتوای ATF4 در هر دو بافت عضله اسکلتی و قلب افزایش می‌یابد و این هم‌راستا با نتایج تحقیق حاضر است که محتوای ATF4 در بطن چپ افزایش یافته بود. همچنین هر دو تحقیق محتوای ATF4 را از طریق روش آزمایشگاهی وسترن‌بلات اندازه‌گیری شده است. در راستای افزایش مسیر مرتبط با ATF4/CHOP در تحقیق Guarino و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که فعالیت ورزشی ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته و مدت زمان ۶۰ دقیقه برای هر جلسه منجر به افزایش محتوای CHOP می‌شود [۲۱]. هیپرگلیسمی مداوم باعث ایجاد هیپرانسولینمی و مقاومت به انسولین می‌شود و سپس باعث متابولیسم غیر طبیعی گلوکز، آپوپتوز کاردیومیوسیت و فیبروز میوکارد می‌شود. لیپیدها و متابولیت‌های میانی لیپیدی، محصولات

¹ Renin-Angiotensin System

² Matrix Metalloproteinases

³ Tissue Inhibitor of Metalloproteinases

⁴ Transforming Growth Factor Beta

نتیجه‌گیری

در نهایت نتایج تحقیق حاضر افزایش معناداری را به‌دنبال ۸ هفته تمرین مقاومتی در محتوای پروتئین ATF4 و CHOP نسبت به گروه کنترل در بطن چپ قلب در آزمودنی‌های دیابتی نوع دو نشان داد. این افزایش می‌تواند به معنای افزایش مرگ سلولی کاردیومیوست‌ها در بطن چپ قلب آزمودنی‌های دیابتی نوع دو از طریق افزایش استرس شبکه آندوپلاسمی و شروع پاسخ پروتئین بازنده یا تانخورده باشد که پروتئین‌های ATF4 و CHOP از عوامل مهم این مسیر سلولی هستند. برای روشن شدن تأثیر

تمرین‌های ورزشی بر مسیرهای سلولی مرتبط با مرگ کاردیومیوست‌ها باید مطالعات بیشتری انجام شود.

سپاسگزاری

نتایج گزارش شده حاصل تلاش رساله کارشناسی ارشد نویسندگان این مقاله است که در مؤسسه آموزش عالی آپادانا شیراز انجام شده است. از همه افرادی که در انجام و جمع‌آوری این پژوهش ما را یاری کردند، کمال تشکر را داریم.

تضاد منافع

این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منافی برای نویسندگان نداشته است.

مآخذ

- Sajadimajd S, Deravi N, Forouhar K, Rahimi R, Kheirandish A, Bahramsoltani R. Endoplasmic reticulum as a therapeutic target in type 2 diabetes: Role of phytochemicals. *International Immunopharmacology*. 2023; 114:109508.
- Ma RCW, Tong PCY. Epidemiology of Type 2 Diabetes. *Textbook of Diabetes*. 2024; 55-74.
- Ahlstedt BA, Ganji R, Mukkavalli S, Paulo JA, Gygi SP, Raman M. UBXN1 maintains ER proteostasis and represses UPR activation by modulating translation. *EMBO Reports*. 2024; 1-32.
- Lu H-j, Koju N, Sheng R. Mammalian integrated stress responses in stressed organelles and their functions. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2024; 1-20.
- Beilankouhi EAV, Sajadi MA, Alipourfard I, Hassani P, Valilo M, Safaralizadeh R. Role of the ER-induced UPR pathway, apoptosis, and autophagy in colorectal cancer. *Pathology Research and Practice*. 2023; 248:154706.
- Liu K, Zhao C, Adajar RC, DeZwaan-McCabe D, Thomas Rutkowski D. A beneficial adaptive role for CHOP in driving cell fate selection during ER stress. *EMBO Reports*. 2024; 1-26.
- Xiao Y, Xie X, Chen Z, Yin G, Kong W, Zhou J. Advances in the roles of ATF4 in osteoporosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023; 169:115864.
- Ebert SM, Rasmussen BB, Judge AR, Judge SM, Larsson L, Wek RC, et al. Biology of activating transcription factor 4 (ATF4) and its role in skeletal muscle atrophy. *The Journal of Nutrition*. 2022; 152(4):926-38.
- Khotib J, Marhaeny HD, Miatmoko A, Budiati AS, Ardianto C, Rahmadi M, et al. Differentiation of osteoblasts: the links between essential transcription factors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2023; 41(19):10257-76.
- Kim J-M, Yang Y-S, Park KH, Oh H, Greenblatt MB, Shim J-H. The ERK MAPK pathway is essential for skeletal development and homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(8):1803.
- Hetz C, Papa FR. The unfolded protein response and cell fate control. *Molecular Cell*. 2018; 69(2):169-81.
- Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Frontiers in Immunology*. 2019; 9:3083.
- Yang Y, Liu L, Naik I, Braunstein Z, Zhong J, Ren B. Transcription factor C/EBP homologous protein in health and diseases. *Frontiers in Immunology* 2017; 8:1612.
- Liu K, Zhao C, Adajar RC, DeZwaan-McCabe D, Thomas Rutkowski D. A beneficial adaptive role for CHOP in driving cell fate selection during ER stress. *EMBO Reports*. 2024; 25(1):228-53-53.
- Sun Z, Brodsky JL. Protein quality control in the secretory pathway. *Journal of Cell Biology*. 2019; 218(10):3171-87.
- Coomans de Brachène A, Scoubeau C, Musuaya AE, Costa-Junior JM, Castela A, Carpentier J, et al. Exercise as a non-pharmacological intervention to protect pancreatic beta cells in individuals with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2023; 66(3):450-60.
- Association AD. 3. Prevention or delay of type 2 diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care*. 2021; 44(Supplement_1):S34-S9.
- Paula FM, Leite NC, Borck PC, Freitas-Dias R, Cnop M, Chacon-Mikahil MP, et al. Exercise training protects human and rodent β cells against endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *The FASEB Journal*. 2018; 32(3):1524-36.

19. Korkmaz K, Düzova H, Çetin Taşlıdere A, Koç A, Karaca ZM, Durmuş K. Effect of high-intensity exercise on endoplasmic reticulum stress and proinflammatory cytokine levels. *Science & Sports*. 2023; 38(4):428. 1-10.
20. Ruan L, Li F, Li S, Zhang M, Wang F, Lv X, et al. Effect of different exercise intensities on hepatocyte apoptosis in HFD-induced NAFLD in rats: the possible role of endoplasmic reticulum stress through the regulation of the IRE1/JNK and eIF2 α /CHOP signal pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021; 2021.
21. Guarino M, Kumar P, Felser A, Terracciano LM, Guixé-Muntet S, Humar B, et al. Exercise attenuates the transition from fatty liver to steatohepatitis and reduces tumor formation in mice. *Cancers*. 2020; 12(6):1407.
22. Seidi A N, Aghaei Bahmanbeglou N, Asgharpour H, Ahmadi M. The Effect of Long-Term High-Intensity Interval Training on the Intracellular Content of Mafbx and Murf1 Proteins in the Left Ventricular of the Heart of Rats With Type 2 Diabetes. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*. 2022; 22(3):175-184
23. Aghaei Bahmanbeglou N, Salboukhi R, Sherafati Moghadam M. The Effect of Protein Kinase-B on FOXO Autophagy Family Proteins (FOXO1 and FOXO3a) Following High Intensity Interval Training in the Left Ventricle of the Heart of Diabetic Rats by Streptozotocin and Nicotinamide. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*. 2021; 21(2):119-128
24. Aghaei Bahmanbeglou N, Sherafati Moghadam M, Amirahmadi M. The Effect of Ampk and P53 Proteins On Tor Pathway Following Endurance Training In The Left Ventricle Of The Heart Of Diabetic Rats By Streptozotocin And Nicotinamide. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*. 2021; 21(1):13-23
25. Thirupathi A, da Silva Pieri BL, Queiroz JAMP, Rodrigues MS, de Bem Silveira G, de Souza DR, et al. Strength training and aerobic exercise alter mitochondrial parameters in brown adipose tissue and equally reduce body adiposity in aged rats. *Journal of physiology and biochemistry*. 2019; 75:101-8.
26. Chen Z, Zhang S-L. Endoplasmic Reticulum Stress: A Key Regulator of Cardiovascular Disease. *DNA and cell biology*. 2023; 42(6):322-35.
27. Chen W, Ma M, Song Y, Hua Y, Jia H, Liu J, et al. Exercise attenuates myocardial I/R injury by regulating endoplasmic reticulum stress and mitophagy through M2AChR. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2023; 1-10.
28. Huo J-L, Feng Q, Pan S, Fu W-J, Liu Z, Liu Z. Diabetic cardiomyopathy: Early diagnostic biomarkers, pathogenetic mechanisms, and therapeutic interventions. *Cell Death Discovery*. 2023; 9(1):256.
29. Sun Y, Ding S. NLRP3 inflammasome in diabetic cardiomyopathy and exercise intervention. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(24):13228.
30. Verboven M, Deluyker D, Ferferieva V, Lambrichts I, Hansen D, Eijnde BO, Bito V. Western diet given to healthy rats mimics the human phenotype of diabetic cardiomyopathy. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2018; 61:140-6.
31. Wu MX, Wang SH, Xie Y, Chen ZT, Guo Q, Yuan WL, et al. Interleukin-33 alleviates diabetic cardiomyopathy through regulation of endoplasmic reticulum stress and autophagy via insulin-like growth factor-binding protein 3. *Journal of Cellular Physiology*. 2021; 236(6):4403-19.
32. Tian J-h, Wu Q, He Y-x, Shen Q-y, Rekep M, Zhang G-p, et al. Zonisamide, an antiepileptic drug, alleviates diabetic cardiomyopathy by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2021; 42(3):393-403.
33. Zhao H, Liu H, Yang Y, Lan T, Wang H, Wu D. Hydrogen sulfide plays an important role by regulating endoplasmic reticulum stress in diabetes-related diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(13):7170.
34. Liu Y, Huo J-L, Ren K, Pan S, Liu H, Zheng Y, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM): a dark horse for diabetic cardiomyopathy treatment. *Cell Death Discovery*. 2024; 10(1):148.
35. Keyhani K, Arbab Mojeni F, Khalaji A, Rasouli A, Aminzade D, Karimi MA, et al. Endoplasmic reticulum as a target in cardiovascular diseases: Is there a role for flavonoids? *Frontiers in Pharmacology*. 2023; 13:1027633.
36. Yang M, Liu C, Jiang N, Liu Y, Luo S, Li C, et al. Endoplasmic reticulum homeostasis: a potential target for diabetic nephropathy. *Frontiers in Endocrinology*. 2023; 14:1182848.
37. Chen X, Shi C, He M, Xiong S, Xia X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023; 8(1):352.
38. De Sousa Fernandes MS, Badicu G, Santos GCJ, Filgueira TO, Henrique RdS, de Souza RF, et al. Physical Exercise Decreases Endoplasmic Reticulum Stress in Central and Peripheral Tissues of Rodents: A Systematic Review. *European journal of investigation in health, psychology and education*. 2023; 13(6):1082-96.

The Effect of Resistance Training on the Content of Endoplasmic Reticulum Stress-Related Proteins and Unfolded Protein Response in the Left Ventricle of the Heart of Type 2 Diabetic Rats

Fatemeh Solhdoust¹, Mohammad Sherafati Moghadam*¹, Bahare Zare¹

1. Department of Sport Sciences, Apadana Institute of Higher Education, Shiraz, Iran

ABSTRACT

Background: Endoplasmic reticulum stress leads to unfolded or folded protein response, and ATF4 and CHOP proteins play very important roles in this signalling pathway; Therefore, the aim of this research is the effect of resistance training on the content of ATF4 and CHOP proteins in the left ventricle of the heart of type 2 diabetic rats.

Methods: In this experimental study, 12 two-month-old male Sprague Dawley rats were selected and their weight reached an average of 280±20 gr after four weeks. Type 2 diabetes was induced by injecting nicotinamide solutions (110 mg/kg) and streptozotocin (60 mg/kg). The rats were randomly divided into 2 groups, resistance training and diabetic control; Resistance training consisted of 8 weeks and 3 sessions per week of climbing a vertical ladder with an 85-degree slope, one meter long with 26 steps and 2 cm space between each step. To analyze data, independent t-test was used in SPSS version 29 and Graphpad Prism version 10.2.3. A significance level of $P \leq 0.05$ is considered.

Results: The content of ATF4 and CHOP proteins after 8 weeks of resistance training showed a significant change compared to the control group in the left ventricle of the heart ($P=0.001$).

Conclusion: The increase of ATF4 and CHOP proteins can lead to increased cell death of cardiomyocytes in the left ventricle of the heart of type 2 diabetic subjects through increasing the endoplasmic reticulum stress and initiating the unfolded or folded protein response.

Keywords: Activating Transcription Factor 4, C/EBP Homologous Protein, Resistance Training, Type 2 Diabetes

* Fars, Shiraz, Moallem Square, North Iman, Apadana Higher Education Institute Central Building, Postal Code: 7187985443. Tel: +989166729271, Email: m.sherafati@apadana.ac.ir

