

The Effect of Endurance and Resistance Training on Apoptosis Activity and Collagen Deposition in Heart Tissue of Diabetic Rats

Montazery-Taleghani H¹, Shakeri N^{*2}, Ebrahim KH³, Sourì R⁴, Gholami M²

1. Department of Sports Physiology, Cardiovascular and Respiratory, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Department of Sports Physiology, Cardiovascular, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

4. Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Tehran University, Tehran, Iran

* *Corresponding author.* Tel: +982181455551, Fax: +982181455551, E-mail: nsprofsport@gmail.com

Received: Aug 3, 2022

Accepted: Oct 17, 2022

ABSTRACT

Background & objective: Diabetes causes chronic problems in the structure and function of tissues, such as apoptosis and fibrosis in addition to glycemic disorders. In this study the effect of 8 weeks of endurance and resistance training on various signaling pathways of apoptosis and tissue fibrosis of the heart of diabetic rats was investigated.

Methods: Thirty Wistar rats, approximately 8-10 weeks old, weight about 210-250 grams, received intraperitoneal injection of diabetic streptozotocin and were randomly divided into three groups: endurance training, resistance training and control group. The rats of the endurance training group were trained on the treadmill for 8 weeks, 5 days a week with intensity of vo2Max 60-80%. The resistance training group was trained on the ladder with a slope of 85 degrees and with a weight equals to 30-100% of their body weight. Forty eight hours after the last training session, blood samples were collected and ventricular tissues of mice were extracted. Glucose, insulin, serum insulin resistance index and Bcl-2, Bax, caspase 8 gene expression levels and Bax to Bcl-2 ratio were evaluated. Masson's trichrome and hematoxylin-eosin staining methods were used for histological examination of diabetic rat's heart structure to detect fibrosis.

Results: There was a significant decrease in Bax gene expression and the ratio of Bax to Bcl-2, and also there was a significant increase in Bcl-2 and caspase 8 in the endurance and resistance training groups in comparison with the control group. The rate of cardiomyocyte fiber rupture in the endurance and resistance groups was less than the control group, and the presence of lymphocyte cells was observed in some fibers in the control group. ($p \leq 0.05$).

Conclusion: The results showed that high-intensity resistance training and moderate-intensity endurance training can prevent tissue fibrosis caused by collagen deposition in diabetes, and these two types of training can reduce the factors involved in apoptosis both in the internal and external pathways. On the other hand, this training intensity can be used as an effective non-pharmacological method to reduce the problems of apoptosis and fibrosis caused by diabetes in the heart tissue.

Keywords: Endurance Training; Resistance Training; Type 2 Diabetes; Apoptosis; Fibrosis

اثر تمرینات استقامتی و مقاومتی بر میزان آپوپتوز و رسوب کلاژن بافت قلبی موش‌های صحرایی دیابتی

حمیده منتظری طالقانی^۱؛ نادر شاکری^{۲*}؛ خسرو ابراهیم^۳؛ رحمن سوری^۴؛ ماندانا غلامی^۲

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی قلب و عروق و تنفس، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. گروه فیزیولوژی ورزشی قلب و عروق، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۴. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱۸۱۴۵۵۵۵۱ فاکس: ۰۲۱۸۱۴۵۵۵۵۱ پست الکترونیک: nsprofsport@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: بیماری دیابت علاوه بر اختلالات گلیسمی، عوارض مزمنی در ساختار و عملکرد بافت‌ها، مشکلاتی نظیر آپوپتوز و فیبروز نیز ایجاد می‌کند. پژوهش حاضر به بررسی اثر ۸ هفته تمرین استقامتی و مقاومتی بر انواع مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز و فیبروز بافتی قلب موش‌های صحرایی دیابتی پرداخت.

روش کار: ۳۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار با سن تقریبی ۱۰-۸ هفته، محدوده وزنی ۲۵۰-۲۱۰ گرم با روش تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین دیابتی گردیده و به طور تصادفی به سه گروه تمرین استقامتی، تمرین مقاومتی و کنترل تقسیم شدند. موش‌های گروه تمرین استقامتی روی نوار گردان به مدت ۸ هفته، ۵ روز در هفته با شدت ($60\% - 80\% \text{ vo2Max}$) و گروه تمرین مقاومتی روی نردبانی با شیب ۸۵ درجه و با وزنه‌ای برابر ۱۰۰-۳۰ درصد وزن بدن تمرین کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، نمونه خون جمع‌آوری و بافت بطن قلب موش‌ها استخراج شد. مقادیر گلوکز، انسولین و شاخص مقاومت به انسولین سرمی و سطوح بیان ژن Bcl-2, Bax, caspase 8 و نسبت Bax به Bcl2 ارزیابی شد. به منظور بررسی هیستولوژیک ساختار قلب موش‌های صحرایی دیابتی جهت تشخیص فیبروز از روش رنگ‌آمیزی تری کروم-ماسون و هماتوکسیلین-اؤزین استفاده شد.

یافته‌ها: در گروه تمرین استقامتی و مقاومتی کاهش معنی‌داری در بیان ژن Bax و نسب Bax به Bcl-2 و افزایش معنی‌داری در Bcl-2 و کاسپاز ۸ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. میزان پارگی الیاف کاردیومیوسیت در گروه استقامتی و مقاومتی نسبت به گروه کنترل کمتر بود بطوری‌که در برخی از الیاف در گروه کنترل حضور سلول‌های لنفوسیتی مشاهده شد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که تمرینات مقاومتی با شدت بالا و استقامتی با شدت متوسط می‌توانند از ایجاد فیبروز بافتی ناشی از رسوب کلاژن در دیابت جلوگیری نمایند و این نوع تمرینات می‌توانند عوامل درگیر در آپوپتوز را هم در مسیر داخلی و هم در مسیر خارجی فعال نمایند، از سوی دیگر می‌توان از این شدت تمرینی به عنوان یک راه کار غیردارویی مؤثر برای کاهش عوارض آپوپتوز و فیبروز ناشی از دیابت در بافت قلبی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تمرین استقامتی، تمرین مقاومتی، دیابت نوع ۲، آپوپتوز، فیبروز

پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۲۵

دریافت: ۱۴۰۱/۵/۱۲

مقدمه

دیابت ملیتوس از جمله بیماری‌های متابولیکی است که باهایپرگلیسمی ناشی از کمبود انسولین مشخص می‌گردد. بیش از ۱۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان دچار آن هستند و بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، پیش‌بینی می‌شود این تعداد در سال ۲۰۲۵ به ۳۰۰ میلیون نفر برسد [۱]. مطالعات نشان می‌دهد که دیابت اثرات مزمنی بر ساختار و عملکرد بافت‌های مختلف بدن دارد که می‌توان آن‌ها را به دو دسته میکروواسکولار و ماکروواسکولار تقسیم کرد [۲]. مطالعات متعددی اثر منفی دیابت را مستقیماً بر عضله قلب (میوکارد) نشان داده‌اند بطوری‌که این بیماری علاوه بر اختلالات گلیسمی موجب مشکلاتی نظیر آپوپتوز و فیبروز می‌گردد. اخیراً نشان داده شده است که آپوپتوز نقش مهمی در روند بیماری قلبی در بیماران دیابتی دارد [۳]. آپوپتوز سلولی (مرگ برنامه‌ریزی‌شده) یک روش محافظت شده تحت کنترل ژن‌هایی است که برای حذف سلول‌های ناخواسته یا غیرضروری موجودات زنده استفاده می‌شود. دیابت به طور قابل توجهی میزان آپوپتوز را در سلول‌های قلب افزایش می‌دهد [۴]. در واقع، بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ فعال و عوامل آدرنرژیک در تنظیم آپوپتوز در افزایش تنش سلولی عضله قلب نقش دارند [۵]. اعمال آپوپتوز به‌عنوان یکی از آسیب‌های دیابت به میوکارد با فعال‌شدن اجزای مسیر آپوپتوز و فعالیت کاسپازها نشان داده شده است و مرگ سلول‌های میوکارد به عنوان یک رویداد مهم در ایجاد آسیب قلبی ناشی از دیابت شناخته شده است [۶]. در پاسخ به محرک آپوپتوزی تنوعی از سیگنال‌های درونی و بیرونی، بیان ژن‌هایی را تنظیم می‌کند که شروع آپوپتوز را کنترل می‌کنند. میتوکندری جزء جدایی‌ناپذیر مسیر داخلی آپوپتوز و محل استقرار بسیاری از پروتئین‌های درگیر در مراحل اولیه این فرایند می‌باشد [۷].

فرآیند آپوپتوز سلولی توسط برخی پروتئین‌های میتوکندریایی شامل پروتئین‌های خانواده B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) که به دو بخش پروتئین‌های ضد آپوپتوتیک مثل (Mcl-1 و Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1, Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, ...) و پروتئین‌های پیش آپوپتوتیک مانند (Hrk, Bik, Bim) تقسیم می‌شوند، تنظیم می‌گردد که در تسریع شروع یا ممانعت از ایجاد آن نقش اصلی را دارند [۸].

Bcl-2 آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری را مهار می‌کند و سطوح بالای Bcl-2 نسبت به Bax بقاء سلولی را افزایش می‌دهد، درحالی‌که نسبت معکوس این ۲ نشانگر سبب مرگ سلولی می‌باشد. این ژن‌ها پروتئین‌های ویژه‌شان را در هسته (p53)، میتوکندری (Bcl-2, Bcl-XL) و دیگر ارگانل‌های تحت سلولی بیان می‌کنند [۹]. در مسیر بیرونی (یا رسپتورهای مرگ) که این مسیر بدنال لیگاندپوشی رسپتورهای خانواده TNF آغاز شده و منجر به فعال سازی کاسپاز-۸ و متعاقباً کاسپاز-۳ می‌گردد. کاسپازها پروتئازهایی هستند که بصورت زیموژن‌های غیرفعال سنتز شده و در خلال آپوپتوز متحمل شکست‌های پروتئولیتیک می‌شوند. در نتیجه این شکست‌ها زیرواحدهای کوچک و بزرگی از آنها تولید می‌شوند که باهم هتروداایمرهایی تشکیل داده تا فرم فعال آنزیم بدست آید. این پروتئازهای فعال مسئول تخریب هماهنگ، غیرالتهابی و کارآمد سلول‌ها هستند [۱۰]. اخیراً فیبروز نیز به عنوان یک پاتوژن مهم اختلال در یکپارچگی عملکردی قلب دیابتی مورد توجه می‌باشد [۱۱]. در بیماران دیابتی سازوکارهای بیماریزای مختلفی از جمله تغییر در ترکیب ماتریکس خارج سلولی همراه با افزایش در فیبروز قلبی می‌گردد که افزایش سطوح برخی از سایتوکین‌ها در بروز آن دخالت دارند [۱۲]. فیبروز، رسوب بیش از حد یا نامناسب پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (ECM) اغلب در بافت‌های دیابتی دیده می‌شود و

ممکن است از دلایل اختلال عملکرد اندام باشد. اگرچه در برخی موارد فیبروز مرتبط با دیابت منعکس کننده ترمیم آسیب اولیه است ولی شواهد زیادی بیانگر آن است که اختلالات متابولیکی در افراد دیابتی می تواند مستقیماً یک برنامه فیبروز نیک را فعال کند و موجب آسیب بافتی گردد.

هنگامی که قلب افراد مبتلا به دیابت پس از بیوپسی مورد بررسی قرار گرفت مرگ سلولی ناشی از نکروز و آپوپتوز تشخیص داده شد. بطوری که مشخص شد ایسکمی قلب، به تنهایی نمی تواند منجر به ایست قلبی شود بلکه آپوپتوز و نکروز در تمام بخشهای سلولی درون قلب افزایش می یابد و موجب سکنه های قلبی در افراد دیابتی می شود. عوامل متعددی می توانند شدت آسیب قلبی، بیماری عروق کرونر و سپس آپوپتوز میوکارد را کاهش دهند که مهمترین آنها فعالیت بدنی و دارودرمانی است [۲]. نتایج مطالعات نشان می دهد که به دنبال دیابت، ضایعات قلبی بیشتر در بیماران رخ می دهد که فرآیند آپوپتوز در بروز آن ضایعات نقش دارد. طبق تحقیقات و مطالعات انجام شده، ورزش و فعالیت بدنی می تواند از طریق مسیرهای مختلف سیگنال دهی آپوپتوز، در سیستم متابولیک بیماران دیابتی نقش داشته باشد لذا هدف از این مطالعه، تعیین تأثیر انواع فعالیت بدنی بر نشانگرهای آپوپتوز و نقش ورزش در محافظت از قلب و سلول های میوکارد بود.

روش کار

نمونه حیوانی

مطالعه حاضر از نوع تجربی است که در آن ۳۰ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار ۱۰-۸ هفته با محدوده وزن ۲۵۰-۲۱۰ گرم به عنوان نمونه پژوهش از محل تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه بقیه الله تهیه شدند. حیوانات در دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد، رطوبت بین ۲۵-۳۰

درصد و در چرخه ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. همچنین در مدت پژوهش آب و غذا (پلیت نرمال) به اندازه کافی و آزادانه دریافت کردند. موازین اخلاقی کار با حیوانات مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق با شناسه IR.IAU.SRB.REC.1397.033 رعایت شد.

پس از انتقال موش ها به آزمایشگاه دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران حیوانات به مدت دو هفته برای سازگاری با محیط جدید نگهداری شدند. سپس حیوانات به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. گروه ها با توجه به وزن همسان سازی شدند. بر این اساس، ۱۰ سر موش در گروه دیابتی کنترل، ۱۰ سر موش در گروه دیابتی تمرین استقامتی و ۱۰ سر موش در گروه دیابتی تمرین مقاومتی قرار گرفتند. موش های گروه کنترل در دوره ۸ هفته ای هیچ گونه برنامه تمرینی انجام ندادند در حالی که همه موش های گروه تمرین برنامه تمرینی ۵ روز در هفته اجرا کردند.

برنامه تمرینی

گروه دیابت تمرین استقامتی

برنامه تمرینی شامل ۸ هفته تمرین استقامتی و هر هفته ۵ جلسه تمرینی بود. موش های صحرایی در ۲ هفته اول، هر روز به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه و شیب ۵٪ روی نوار گردان فعالیت داشتند. شدت برنامه تمرینی با توجه به میزان اکسیژن مصرفی طراحی شده بود، بطوری که شدت تمرین با سرعت ۱۰ متر در دقیقه برابر با ۶۰ درصد VO_{2max} می باشد [۱۳]. پس از دو هفته اول مطابق جدول ۱، به تدریج هر ۲ هفته شدت و مدت فعالیت بدون تغییر در شیب، افزایش یافت. در دو هفته آخر زمان فعالیت ۴۰ دقیقه در روز و سرعت ۲۵ متر در دقیقه (معادل شدت VO_{2max} ۸۰٪) رسید. قبل و بعد از هر جلسه تمرینی، به مدت ۵ دقیقه فعالیت های مربوط به گرم کردن و سرد کردن در نظر گرفته شد [۱۳].

جدول ۱. برنامه تمرین استقامتی

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
سرعت (متر در دقیقه)	۱۰	۱۰	۱۵	۱۵	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵
مدت (دقیقه)	۱۵	۱۵	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۴۰	۴۰

گروه دیابت تمرین مقاومتی

طول دوره تمرین مقاومتی ۸ هفته بود که در هر هفته ۵ روز موش‌های صحرایی تمرین کردند. تمرین مقاومتی شامل یک نوبت ۱۰ تکراری با فواصل استراحتی ۹۰ ثانیه ای صعود از نردبان مقاومتی به ارتفاع یک متر و شیب ۸۵ درجه و فاصله ۳ سانتی‌متری بین پله‌های نردبان بود و وزنه به قاعده دم موش‌ها متصل می‌شد. در این پروتکل، پس از

۱ هفته آشنایی با نردبان، موش‌ها با وزنه‌ای که معادل ۳۰ درصد وزن بدن شان بود شروع به تمرین کردند و وزن بار در طول مداخله به ۱۰۰ درصد وزنشان رسید. در کل ۸ هفته تعداد نوبت و تعداد تکرارها تغییر نکرد و ۳ تکرار بدون وزنه برای گرم کردن و ۳ تکرار بدون وزنه برای سرد کردن انجام شد [۱۴].

جدول ۲. نام تمرینی گروه مقاومتی

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
وزن وزنه حمل شده (درصدی از وزن بدن)	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۸۰	۸۰	۱۰۰	۱۰۰
استراحت بین تکرارها (ثانیه)	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰

روش القاء دیابت

القای دیابت با استفاده از داروی نیکوتین آمید (۹۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش صحرایی) که در محلول سالین حل شده بود و پس از ۱۵ دقیقه استرپتوزوتوسین (۵۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن موش) تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich کشور آلمان که در محلول بافر سیترات ۰/۱ مولار با pH برابر ۴/۵ حل شده بود به شکل درون صفاقی تزریق شد [۱۵]. به منظور تشخیص دیابتی بودن موش‌ها، ۵ روز پس از تزریق، با ایجاد جراحی کوچک توسط لانسیت در دم موش‌های صحرایی، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری (ساخت شرکت Medisign کره جنوبی) قرار داده شد و غلظت گلوکز خون اندازه‌گیری گردید. غلظت گلوکز خون ناشتا برابر ۲۵۰-۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند [۱۶].

نمونه برداری

وزن کشی موش‌ها هفتگی انجام شد. پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی هر گروه پس از ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتایی با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین (۵۰ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلوزین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) بیهوش و خون‌گیری شدند [۱۷].

نمونه‌های خون برای اندازه‌گیری سطح انسولین و گلوکز گرفته شد و برای جلوگیری از همولیز شدن بلافاصله در لوله‌های حاوی EDTA ریخته شده و به آرامی مخلوط شدند. غلظت سرمی انسولین با روش الایزا و با استفاده از کیت انسولین مخصوص موش (Zelbio، ساخت آلمان) و میزان سرمی گلوکز به روش آنزیماتیک (کیت پارس آزمون ساخت ایران) توسط دستگاه اتوآنالایزر تکنیکون RA-1000 (نیویورک، آمریکا) سنجیده شد. برای تعیین شاخص مقاومت به انسولین به روش HOMA-IR، با سنجش

انسولین و گلوکز ناشتا طبق فرمول زیر محاسبه شد [۱۸].

$$\text{HOMA-R} = \frac{\text{Fasting Insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Fasting Glucose (mmol/l)}}{22.5}$$

برای سنجش وزن بدن بصورت هفتگی و مقدار غذای مصرفی از ترازوی دیجیتال سارتوریس (ساخت کشور آلمان) با حساسیت ۰/۱ گرم استفاده شد. پس از ایجاد برش در قسمت قدامی قفسه سینه بافت قلب استخراج شده و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و سپس در یخچال در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. بافت بطنی موش‌ها نمونه‌برداری و پس از شستشو در سرم فیزیولوژی، در ۱/۸ میکروتوبول حاوی مایع RNAlater™ به نسبت ۲۰٪ غوطه‌ور شد و برای آزمایش ژنتیکی به آزمایشگاه منتقل شد. برای شناسایی الیاف کلاژن در بافت‌ها از روش رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) استفاده شد. سنجش بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 و caspase8 با زمان واقعی واکنش زنجیره ای پلی مرار (RT-PCR) انجام شد.

استخراج RNA و فرآیند RT-PCR

۵۰ میلی گرم از بافت به وسیله اسکالتر خرد و وارد میکروتیوپ شد [۱۹]. سپس RNA با استفاده از کیت میکروتیوپ Rneasy Protect Mini Kit (QIAGEN) مطابق دستورالعمل شرکت از بافت قلب استخراج شد. پس

از استخراج RNA برای اطمینان از کافی بودن غلظت RNA در تهیه cDNA، OD آن توسط دستگاه نانودراپ چک شد. TCF mRNA با روش RT-Real time PCR به وسیله دستگاه روتوژن ۶۰۰۰ و با استفاده از کیت تک مرحله ای One Step SYBR TAKARA ساخت شرکت تاکارا مطابق دستورالعمل شرکت تعیین شد.

تجزیه و تحلیل منحنی ذوب در پایان چرخه PCR به منظور تعیین اعتبار محصول PCR مورد انتظار انجام شد. پروتکل چرخه حرارتی دستگاه روتوژن شامل: ۴۲° به مدت ۲۰ دقیقه، ۹۵° به مدت ۲ دقیقه و ۴۰ سیکل با ۹۴° به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۰° به مدت ۴۰ ثانیه بود. پس از مرحله PCR برای مطالعه ویژگی پرایمرها از دماهای ۵۰ تا ۹۹° برای تهیه منحنی ذوب استفاده گردید. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژنها در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت پیشگامان انجام گرفت. از RNA Polymrasell به عنوان ژن کنترل برای تعیین بیان ژن‌ها استفاده شد. CT های مربوط به واکنش‌ها توسط نرم افزار دستگاه RT-PCR استخراج و ثبت گردید. برای کمی‌سازی بیان، TCFmRNA از روش $\Delta\Delta\text{CT}$ مقایسه‌ای استفاده شد. توالی پرایمرها به صورت جدول ۳ بود.

جدول ۳. الگوی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

Genes	Primer sequence	Scale	purification
<i>Bax</i>	For:ACAGGGTTTCATCCAGGATCGAG Rev:AGCTCCATGTTGTTGCCAGTTC	2	BioRP
<i>caspase8</i>	CAATGATGTCCTGGTGCTATTTCAG GGCTGCTTTTAGGACTCTGCTC	2	BioRP
<i>Bcl-2</i>	GGATTGTGGCCTTCTTTGAGTTC AGAGCGATGTTGTCCACCAG	2	BioRP

آماده سازی بافت‌ها

پس از بیرون آوردن بافت‌ها از فرمالین و به منظور تهیه مقاطع بافتی ابتدا نمونه‌های بافتی در ظرف‌های حاوی الکل ۷۰، ۸۰، ۹۶ و ۱۰۰ درصد به مدت ۵۰

دقیقه قرار داده شد. پس از آگیری بافت، بافت‌ها در دو ظرف محتوی گزیرلول (هر کدام به مدت ۴۰ دقیقه) قرار داده شد. سپس بافت‌های آغشته به گزیرلول طی دو مرحله متوالی و هر بار به مدت ۵۰

یک از آنها یک عدد لام تهیه شده و بر روی آنها رنگ آمیزی معمول هماتوکسیلین و ائوزین صورت گرفت [۲۱].

روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها

از آزمون شاپیرو-ویلک^۲ برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. با توجه به اینکه داده‌های BAX/ BCL-2، کاسپاز ۸ و نسبت BAX/ BCL-2 از توزیع طبیعی برخوردار نبود در نتیجه از آزمون ناپارامتریک کروسکال-والیس و من-ویتنی جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. از آمار توصیفی برای توصیف داده‌ها استفاده شد. سطح معناداری آماری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. در بررسی هیستوشیمیایی ارزیابی میزان کلاژن از آزمون واریانس یک طرفه، برای معنی‌داری گروه‌ها از آزمون ANOVA و برای بررسی رابطه معنی‌داری بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی^۳ استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-22 تحلیل شد.

یافته‌ها

پس از تزریق استرپتوزوتوسین و ایجاد دیابت، یک ماه و تا پایان هفته پنجم مداخله، تفاوت معنی‌داری در میانگین وزنی گروه‌ها مشاهده نشد. هفته‌های ششم، هفتم و هشتم مداخله، کاهش معنی‌داری در میانگین وزن گروه مقاومت نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p = 0.027$). با وجود این تفاوت معناداری بین گروه‌های تمرینی مشاهده نشد. کاهش وزن قابل توجهی یک هفته پس از القای دیابت و افزایش وزن قابل توجهی یک ماه پس از القای دیابت مشاهده شد (جدول ۴ و شکل ۱). همانگونه که در جدول شماره ۵ قابل مشاهده می‌باشد مقادیر گلوکز، انسولین و شاخص مقاومت انسولینی در گروه تمرین استقامتی و گروه تمرین مقاومتی در مقایسه با گروه کنترل به

دقیقه در پارافین مذاب قرار گرفت. جهت آغشته‌سازی نمونه‌ها با پارافین مذاب، به داخل ظروف حاوی پارافین مذاب که درون انکوباتور (با دمای تنظیم شده ۷۰ درجه سانتیگراد) قرار داشت، انتقال یافتند. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها از این ظروف خارج و درون قالب‌های مخصوص حاوی پارافین مذاب قرار گرفتند. قالب‌ها سپس به داخل ظروف حاوی یخ ذوب شده منتقل گردید تا پارافین سریعاً منجمد گردد و از تشکیل حباب در پارافین جلوگیری شود. پس از آن قالب‌ها به درون یخچال منتقل شده و تا مرحله برش گیری در آنجا نگهداری شدند. برای برش گیری از دستگاهی به نام میکروتوم به ضخامت ۵ تا ۱۰ میکرون استفاده شد. برش‌ها بر روی لام‌های حاوی ماده آلبومین چسبانده شدند و به مرحله رنگ آمیزی انتقال یافتند.

رنگ آمیزی بافت‌ها

جهت بررسی فیروز بافتی از روش رنگ آمیزی تری کروم ماسون که یک روش رنگ آمیزی برای تشخیص میزان فیروز بافت عضلانی است استفاده گردید [۱۶]. مراحل آماده‌سازی بافتی برای تهیه لام‌ها انجام و برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون از نمونه‌ها تهیه شد و با استفاده از روش اختصاصی ماسون تری کروم رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری الیمپوس^۱ ساخت ژاپن بررسی شدند. در این نوع رنگ آمیزی کلاژن موجود در بافت به رنگ آبی خود را نشان می‌دهد. درصد کلاژن موجود در هر تصویر به عنوان درصد نواحی آبی رنگ، تقسیم بر کل ناحیه تصویر مورد نظر محاسبه شد. جهت بررسی میزان فیروز در تصاویر عضلات از نرم افزار Image J استفاده شد [۲۰]. جهت رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین- ائوزین پس از جدا کردن قلب موش‌های صحرایی ابتدا در فرمالین ۱۰٪ ثابت شدند و پس از طی مرحله فرآوری، از برش‌های بافتی هر

^۲ Shapiro-Wilk

^۳ Tukey

^۱ Olympus

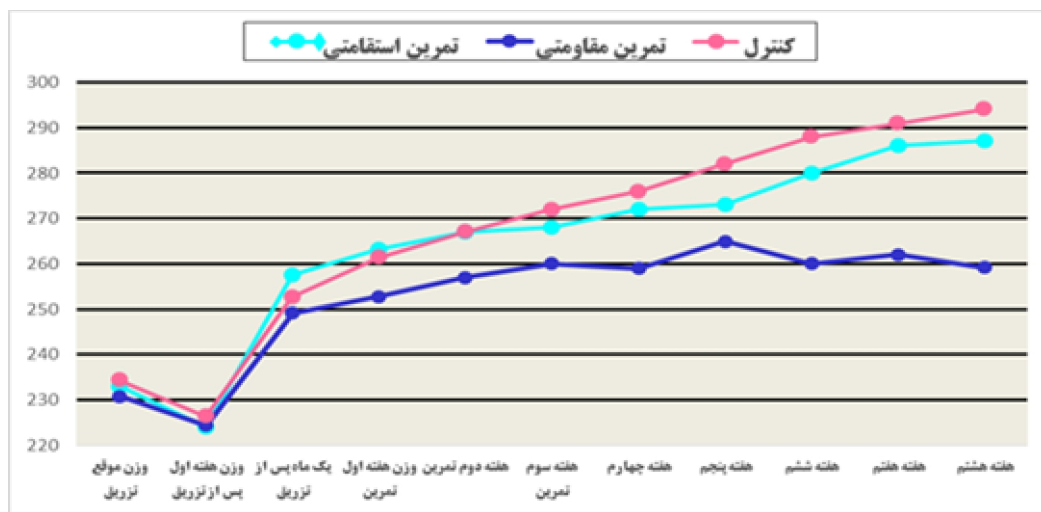
شکل معناداری کاهش یافت ($p < 0.05$). شاخص HbA1C نیز در گروه تمرینی (بیش از ۷٪) کاهش از

خود نشان داد. (جدول ۵).

جدول ۴. میانگین و انحراف معیار وزن گروه‌ها (گرم)

گروه	وزن موقع تزریق	وزن هفته اول پس از تزریق	وزن یکماه پس از تزریق	وزن هفته اول تمرین	وزن نهایی
تمرین استقامتی	۲۳۳±۱۳/۱	۲۲۴/۱±۱۲/۸	۲۵۷/۶±۱۴/۲	۲۶۳/۳±۱۵/۲	۲۸۷/۲±۹/۶
تمرین مقاومتی	۲۳۰/۸±۱۳/۱	۲۲۴/۴±۱۶/۶	۲۴۹/۱±۲۰/۸	۲۵۲/۸±۲۲/۷	۲۵۹/۲±۱۷/۷
کنترل	۲۳۴/۳±۱۳/۸	۲۳۶/۴±۱۳/۶	۲۵۲/۷±۱۱/۷	۲۶۱/۴±۱۱/۵	۲۹۴/۱±۱۹/۴

* داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.



شکل ۱. تغییرات وزن بدن در گروه کنترل و گروه‌های تمرینی (گرم)

جدول ۵. شاخص‌های توصیفی متغیرهای پژوهش (میانگین و انحراف معیار)

متغیر/گروه	تمرین استقامتی	تمرین مقاومتی	کنترل
گلوکز (Mg/dl)	۲۷۶/۸±۲۷/۵	۲۳۴/۸±۴۸/۹	۳۲۴±۱۶
انسولین μ U/ml	۵/۹±۰/۸۳	۵/۵±۱/۰۶	۶/۷±۰/۶۶
HOMA-IR Index	۵/۲۵±۰/۷	۴/۶۹±۱/۰۳	۶/۸±۰/۷۵
درصد HbA1C	۸/۳±۱/۱	۷/۸±۱/۱	۹/۶±۱/۱
بیان ژن Bax بافت قلبی	۰/۷۰۰±۰/۱۴۹	۰/۵۹۹±۰/۲۸۲	۱/۰۰۰±۰/۰۰۰
بیان ژن BCL2 بافت قلبی	۳/۹۷۷±۲/۱۴۰	۲/۹۶۷±۱/۳۲۳	۱/۰۰±۰/۰۰۰
بیان ژن caspase8 بافت قلبی	۱/۶۷۲±۰/۷۸۸	۲/۸۶۶±۱/۹۵۹	۱/۰۰۰±۰/۰۰۰
نسبت Bax /BCL2	۰/۲۰۸±۰/۱۰۵۷۹	۰/۲۵۷±۰/۱۰۵۷۳	۱/۰۰۰±۰/۰۰۰
درصد کلژن بافت	۲۲/۹۳±۲/۶۱	۲۸/۷۵±۳/۸۸	۴۲/۶۷±۲/۵۱

* داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.

بر اساس نتایج حاصل از آزمون کروسکال والیس در خصوص سطح پروتئین‌های BCL-2 ($p = 0.000$) و کاسپاز ۸ ($p = 0.000$) بافت قلب بین گروه‌های مورد مطالعه پس از ۸ هفته مداخله (تمرین استقامتی و تمرین مقاومتی) افزایش معنی‌داری مشاهده شد. با

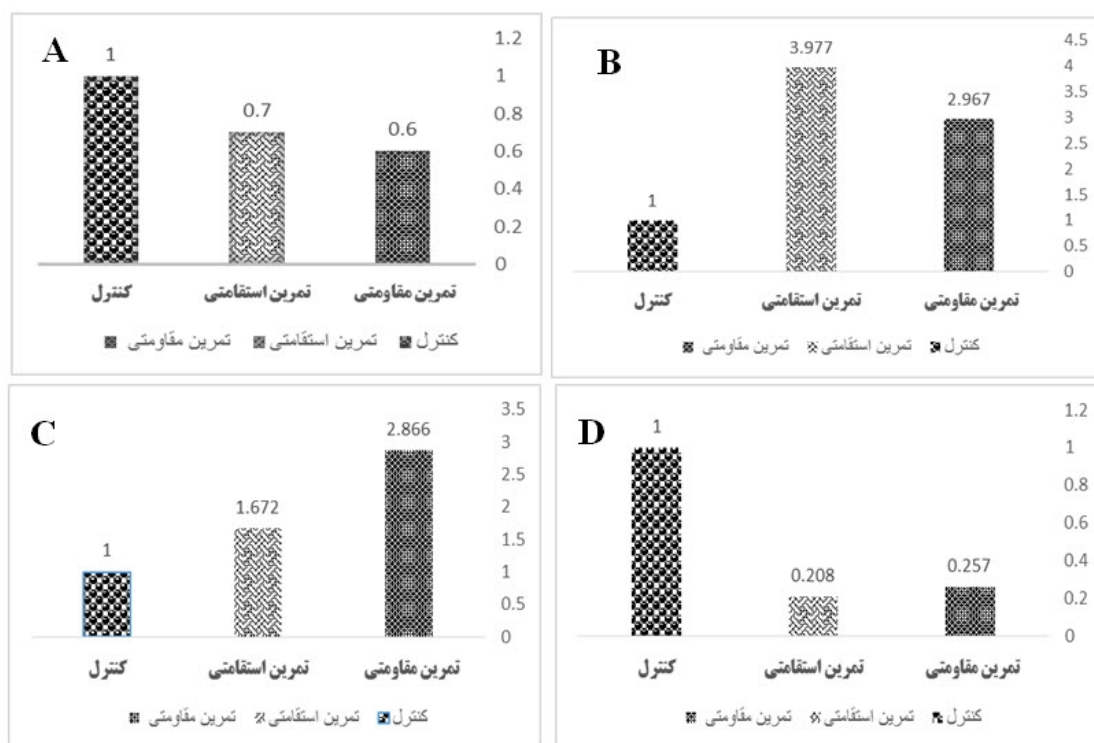
توجه به نتایج آزمون من-ویتنی BCL-2 گروه کنترل با دو گروه استقامتی و مقاومتی به ترتیب ($p = 0.000$) و ($p = 0.001$) اختلاف نشان داد ولی بین دو گروه استقامتی و مقاومتی ($p = 0.31$) اختلاف معنی‌داری دیده نشد، همچنین نتایج آزمون من-ویتنی کاسپاز ۸،

دیگر نتایج مطالعه حاضر وجود کاهش معنادار در نسبت Bax/Bcl-2 بافت قلب بین گروه‌های مورد مطالعه پس از ۸ هفته مداخلات تمرینی بود ($p=0/000$).

در این نسبت گروه کنترل در مقایسه با دو گروه استقامتی و مقاومتی اختلاف معناداری وجود دارد ($p=0/000$) در حالی که بین دو گروه تمرینی این صفت معنادار نشد ($p=0/85$).

در شکل ۲ تغییرات فاکتورهای ارزیابی شده قابل مشاهده می‌باشد.

گروه کنترل با دو گروه استقامتی و مقاومتی به ترتیب ($p=0/000$ و $p=0/005$) اختلاف معناداری مشاهده شد ولی بین دو گروه استقامتی و مقاومتی این اختلاف معنی‌دار نشد ($p=0/380$). از طرفی سطح پروتئین Bax بعد از ۸ هفته مداخله تمرین استقامتی و مقاومتی به‌طور معناداری کمتر بود ($p=0/000$) در بررسی آزمون تعقیبی نشان داده شد گروه کنترل در مقایسه با دو گروه استقامتی و مقاومتی اختلاف معناداری وجود دارد ($p=0/000$) در حالی که بین دو گروه تمرینی این صفت معنادار نشد ($p=0/79$) از



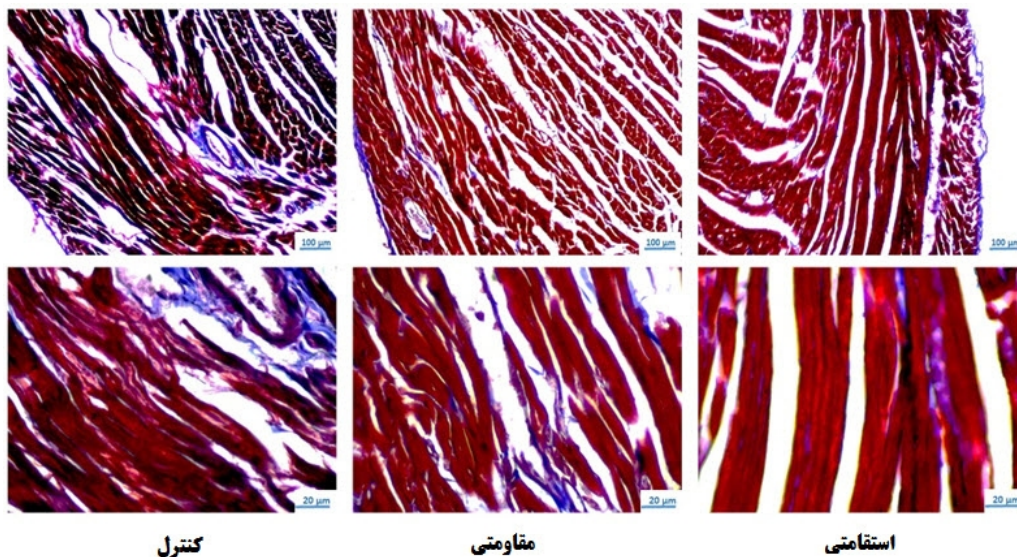
شکل ۲. A: تغییرات بیان ژن Bax در بافت قلب دیابتی در گروه کنترل و گروه‌های تمرین استقامتی و مقاومتی، B: تغییرات بیان ژن BCL-2 در بافت قلب دیابتی در گروه کنترل و گروه‌های تمرین استقامتی و مقاومتی، C: تغییرات بیان ژن caspase8 در بافت قلب دیابتی در گروه کنترل و گروه‌های تمرین استقامتی و مقاومتی، D: نسبت بیان Bax / BCL-2 در بافت قلب دیابتی در گروه کنترل و گروه‌های تمرین استقامتی و مقاومتی

هیستولوژیک ساختار قلب موش‌های صحرایی دیابتی با استفاده از دو روش رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون و هماتوکسیلین-ائوزین پرداخت. نتایج آزمون تحلیل واریانس یکطرفه نشانگر اثر معنی‌دار تمرین بر کاهش کلانژن بافت قلبی را نشان داد ($p=0/000$).

با توجه به آنکه نتایج بیان ژن در فاکتورهایی که در مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز دخیل بودند پس از ۸ هفته مداخلات تمرینات استقامتی و مقاومتی، الگوی مشابهی در افزایش و کاهش از خود نشان دادند لذا مطالعه حاضر به بررسی بافت شناسی جهت شناسایی تغییر بافت، فیبروز کاردیومیوسیت‌ها و تغییرات

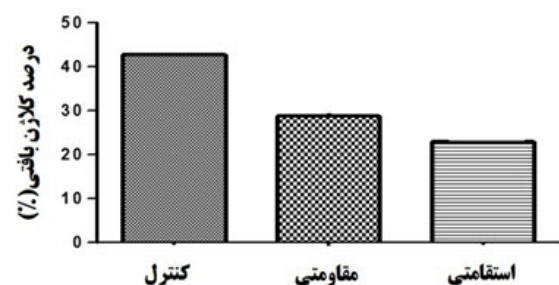
میانگین درصد کلژن بافت قلب در گروه استقامتی ($22/93 \pm 2/61$) و مقاومتی ($28/75 \pm 3/88$) در مقایسه با گروه کنترل ($42/67 \pm 2/51$) کاهش معنی‌داری در سطح $p < 0/05$ پیدا کرده است. نتایج حاصل از آزمون توکی در بررسی رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون نشان داد میزان کلژن در بافت قلب موش‌های بین گروه‌های تمرینی ارتباط معنی‌داری وجود ندارد. اما بین گروه تمرین استقامتی

با گروه کنترل و تمرین مقاومتی و گروه کنترل رابطه معنی‌داری مشاهده گردید. تصاویر رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون در گروه‌های مختلف پژوهش در شکل ۳ نشان داده شده است. در این نوع رنگ‌آمیزی کلژن موجود (فیبروز) به رنگ آبی خود را نشان می‌دهد.



شکل ۳. رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون در سه گروه استقامتی، مقاومتی و کنترلی

نتایج رنگ‌آمیزی نشان داد که تغییرات درصد کلژن بافتی در گروه‌های استقامتی و مقاومتی به طور معناداری کاهش یافته است (نمودار ۱).



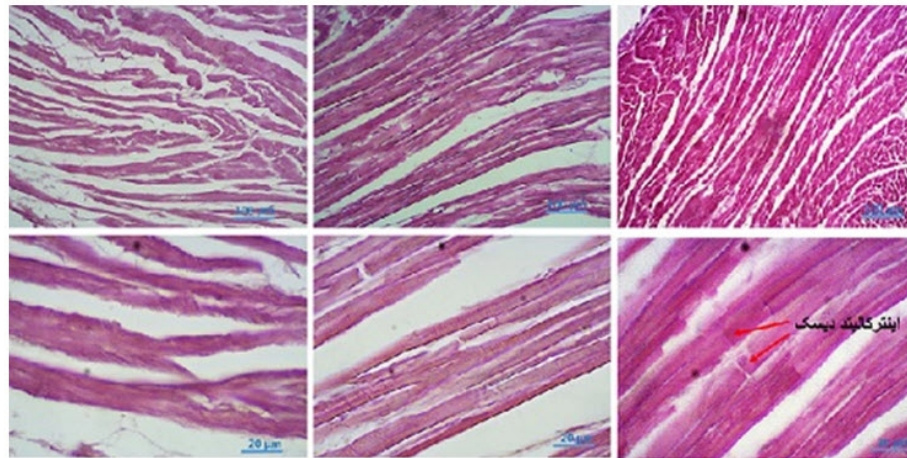
نمودار ۱. تغییرات میزان درصد کلژن بافتی بین گروه تمرین و کنترل

حضور سلول‌های لنفوسیتی مشاهده شد در حالی که در گروه استقامتی دیابتی الیاف کاردیومیوسیت به صورت نرمال مشاهده شد، سلول‌های خونی و لنفوسیتی به میزان بسیار کمی در بین الیاف عضلانی مشاهده شدند. از طرف دیگر در گروه مقاومتی دیابتی تعداد کمی از الیاف کاردیومیوسیت، دچار پارگی شده و در برخی از الیاف حضور سلول‌های لنفوسیتی مشاهده شد که نسبت به گروه کنترل دیابتی کمتر بود. همچنین همانطور که در شکل ۴ قابل مشاهده است در گروه کنترل دیابتی رشته‌های عضلانی به صورت انشعاب نامنظم و در برخی از رشته‌ها با ساختار مشخصی از طریق صفحات اینترکاله به هم متصل شده بودند، قطر فیبرهای عضلانی در این گروه به صورت محسوسی نسبت به گروه‌های

بر اساس نتایج به دست آمده از تصاویر مشاهده شده (شکل ۴) در گروه کنترل دیابتی میزان پارگی الیاف کاردیومیوسیت بیشتر بوده و در برخی از الیاف

تمرینی کمتر بود. در گروه استقامتی دیابتی رشته‌های عضلانی به صورت انشعاب منظم و با ساختار مشخصی از طریق صفحات اینترکاله به هم متصل هستند و قطر فیبرهای عضلانی در این گروه به صورت محسوسی نسبت به گروه کنترل و تمرین مقاومتی بیشتر بود. در گروه تمرین مقاومتی رشته‌های عضلانی به صورت

انشعاب منظم و با ساختار مشخصی از طریق صفحات اینترکاله به هم متصل شده بودند. قطر فیبرهای عضلانی در این گروه نسبت به گروه کنترل دیابتی کمتر بود.



کنترل

مقاومتی

استقامتی

شکل ۴: تصویر رنگ‌آمیزی شده باهماتوکسیلین-ائوزین از مقاطع بافت قلب دیابتی در گروه‌های استقامتی، مقاومتی و کنترل

بحث

هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر تمرینات استقامتی و مقاومتی بر سطح پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز، Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۸ و رسوب کلاژن در فیبروز بافت قلب موش‌های صحرایی بود. نتایج این مطالعه در خصوص تغییرات سطوح Bcl-2 و کاسپاز-۸ بافت قلب نشان داد سطوح این پروتئین‌ها پس از ۸ هفته تمرین استقامتی و تمرین مقاومتی در گروه تمرینی دیابتی افزایش یافته است. از طرفی پروتئین Bax و نسبت Bax / Bcl-2 پس از ۸ هفته مداخله تمرین استقامتی و تمرین مقاومتی در موش‌های صحرایی دیابتی شده کاهش معنی‌داری یافت. به عبارت دیگر تمرینات استقامتی و مقاومتی نتایج مشابهی در افزایش و کاهش در بیان ژن Bcl-2، Bax و کاسپاز-۸ از خود نشان داده‌اند. بنظر می‌رسد تمرینات ورزشی هم بصورت استقامتی و هم بصورت

مقاومتی می‌تواند بافت قلبی را از آپوپتوز شدن دور نگه دارد و مقادیر پروتئین‌های ضد آپوپتوزی را برای مقابله با پروتئین‌های آپوپتوزی افزایش دهد. نتایج این مطالعه با نتایج تحقیقات ماری کیو و همکاران [۲۲] همسو بود. در تحقیقات انجام‌شده این محققین به بررسی اثر تمرین هوازی بر نشانگرهای آپوپتوز در سلول‌های عضلانی قلب موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین پرداختند که علت وقوع آپوپتوز سلول‌های قلبی در اثر دیابت علاوه بر افزایش استرس‌های اکسیداتیو وقوع فرآیندهای التهابی را موجب وقوع مرگ سلولی به روش آپوپتوز در سلول‌های قلبی نشان دادند. نتایج پژوهش حاضر با نتایج پژوهش هم و همکاران نیز همسو بود بطوری که تمرین هوازی سبب افزایش BCL-2 و کاهش معنادار Bax شد [۲۳]. همچنین با نتایج پژوهش قجری و همکاران همسو بود بطوریکه در پژوهش

آنها هشت هفته تمرین استقامتی سبب افزایش معنادار Bcl-2 و کاهش Bax بر عضله قلبی شد [۲۴]. ابوطالب و همکاران نیز نشان دادند تمرینات ورزشی روی تردمیل به مدت ۴ هفته موجب کاهش نسبت پروتئین‌های پیش آپوپتوز و پروتئین‌های ضد آپوپتوز مانند Bcl-2 و کاهش سیگنالینگ فعالسازی کاسپاز نهایی مسیر آپوپتوز می‌شود [۲۵]. طبق تحقیقات قبلی سطح بیان Bcl-2 همواره در اثر تمرینات نتایج یکسانی از خود نشان نداده است. در مطالعه‌ای، تمرین شنا با شدت بالا، سطح Bcl-2 را تغییر نداد، در حالی که تمرین ورزشی روی تردمیل، با همان شدت سطوح Bcl-2 را افزایش داد [۲۶]. در مطالعه‌ای دیگر تاثیرات تمرینات ورزشی روی آپوپتوز قلبی در موش‌های چاق مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۱۶ موش چاق، ۱۶ موش لاغر ۵ تا ۶ ماهه و ۱۶ موش چاق دیگر نژاد ویستار ورزش دویدن روی تردمیل را یک ساعت در روز و به مدت ۳ ماه انجام دادند. نتایج نشان داد سطح پروتئین $TNF-\alpha$ گیرنده‌های FAS, BAD, Bax, Caspase 8, 9, 3 فعال در موش‌های چاق نسبت به لاغر بالاتر بوده است و نسبت Bcl-2/Bax در موش‌های چاق نسبت به لاغر پایین تر بود. در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد فعالیت بدنی با تغییر در ژن‌های آپوپتوز، ضد آپوپتوز و مداخله در هر دو مسیر بیرونی و درونی موجب کاهش آپوپتوز کاردیومیوسیتی می‌شود [۱۸]. محققان اعلام کردند که سازوکارهای آپوپتوز که گلوکز به واسطه آنها موجب القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌شود بسته به نوع سلول و بافت مورد مطالعه متفاوت است [۲۷]. طبق تحقیقات، فعالیت ورزشی منظم باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو و در نتیجه کاهش آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود [۲۸]. بنظر می‌رسد در این پژوهش با افزایش عملکرد میتو‌کندری‌های ناشی از تمرینات ورزشی طولانی‌مدت، هم بصورت تمرین استقامتی و هم

بصورت تمرین مقاومتی، میزان BCL-2 افزایش یافته، مهمترین عامل مهارکننده آپوپتوز است. عمده‌ترین نقش میتو‌کندری‌ها در آپوپتوز، مهار رهاسازی سیتوکروم C به درون سیتوزول است که در نهایت سبب افزایش پتانسیل غشای میتو‌کندری و حفظ هومئوستاز سلولی شود [۲۹]. از طرف دیگر افزایش BCL-2 بعنوان مکانیسم سرکوب‌کننده Bax در کاهش این پروتئین و در نهایت کاهش نسبت Bax به BCL-2 می‌تواند اثر گذار باشد [۳۰]. در همین راستا در مطالعاتی یو و همکاران تنظیم سیستم‌های مختلف سلولی را در آپوپتوز بیان کردند و نشان دادند تمرینات مداوم تا رسیدن به سطوح خستگی تعادل Bax و BCL2 را در راستای بقا و یا مرگ سلولی بهم می‌ریزد. آنها اظهار داشتند تمرینات مداوم خسته‌کننده منجر به تولید ROS می‌شود که غوطه‌ور شدن سلول در ROS می‌تواند به سلول‌ها آسیب بزند و مسیر سیگنالینگ آپوپتوز اولیه از طریق $MAPK$ (SAPK/JNK, ERK1/2, P38) فعال نمایند [۳۱]. تجمع ROS بیان Bax را افزایش می‌دهد در نتیجه به واسطه اتصال به کانال‌های آنیونی وابسته به ولتاژ میتو‌کندری منافذ انتقال میتو‌کندریایی باز و انتشار سیتوکروم C افزایش می‌یابد و در نهایت سلول به سمت آپوپتوزی شدن پیش می‌رود [۳۲]. فعالیت بدنی موجب بهبود بیوژنز میتو‌کندری در مراحل آخر کاردیومیوپاتی دیابتی می‌گردد و مسیر سیگنالینگ که از طریق فعالیت هوازی موجب اهداف درمانی مرتبط با کاردیومیوپاتی معرفی کردند مسیر سیگنالینگ $PGC1-\alpha / AKT$ بود. فسفوریلاسیون AKT پس از انجام فعالیت ورزشی با شدت متوسط در تنظیم مجدد انتقال‌دهنده گلوکز در کاردیومیوسیت‌ها متابولیسم گلوکز را در قلب دیابتی بهبود می‌بخشد [۳۳]. در مطالعه‌ای توسط لو و همکاران، مشخص شد که در میوکارد موش‌های مبتلا به انفارکتوس قلبی، تمرینات تناوبی با شدت بالا و تمرینات مداوم با شدت متوسط به طور مساوی باعث افزایش سطح Bcl-2

شد [۳۴]. مطالعه دیگری نشان داد که هشت هفته تمرین مقاومتی با شدت ۶۰ درصد یک تکرار بیشینه، Bcl-2، Bcl-xl و کاسپاز-۳ را افزایش داد و همچنین نسبت Bad به Bcl-2 را در سلول‌های تک‌هسته‌ای عروق محیطی کاهش داد. این نوع ورزش می‌تواند روند آپوپتوز را در سالمندان به تأخیر بیندازد. بنابراین به نظر می‌رسد ورزش با اثرات متفاوت در افزایش یا کاهش عوامل آپوپتوز در روند القا یا پیشگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده موثر باشد. یافته‌های این مطالعه با نتایج برخی از مطالعات در تضاد بود. دیمارو و همکاران نشان دادند که ۱۲ هفته تمرین مقاومتی در مردان و زنان مسن، علیرغم افزایش طول تلومر، تأثیری بر کاسپاز ۳، Bcl-2، Bax ندارد. دلایل مغایرت نتایج مطالعه حاضر با مطالعه دیمارو و همکاران، می‌تواند زمینه مطالعه، بافت مورد بررسی، نوع آزمودنی‌ها و تعداد جلسات فعالیت مقاومتی باشد. علاوه بر این آنها تعادل بین استرس اکسیداتیو و راندمان آنتی‌اکسیدانی را مانند (MnSoD، TrxR1) که با فعالیت ورزشی ایجاد می‌شود در نتایج مطالعات خود مؤثر دانستند. همچنین بیان کردند تمرینات مقاومتی در کاهش متیلاسیون DNA می‌تواند اثرات مثبتی داشته باشد [۳۵، ۳۶]. در پژوهشی دیگر ۴ هفته تمرین هوازی میان مدت تغییری در مقدار پروتئین Bcl-2 ایجاد نکرد [۳۷]. همچنین صراف و همکاران نشان دادند تمرین مقاومتی با شدت ۸۰ درصد یک تکرار بیشینه سبب افزایش Bax و کاهش Bcl-2 بصورت غیرمعنادار شد که با پژوهش حاضر ناهمسو می‌باشد. علت تفاوت پژوهش حاضر با این مطالعه نوع تمرین مقاومتی می‌باشد که در مطالعه صراف و همکاران یک جلسه تمرین حاد مقاومتی انجام شد و استفاده از مصرف مکمل کراتین را یک اثر محافظتی جهت آپوپتوز ایجاد شده ناشی از فعالیت حاد ورزشی بیان داشتند [۳۸]. در تمرین هوازی زمانی که ATP مصرف می‌شود، به AMP تبدیل می‌شود و در این

مسیر AMPK می‌تواند روی PGC1- α اثر بگذارد و سبب مهار آپوپتوز گردد. همچنین در تمرین مقاومتی با ترشح IGF-1، PI3K فعال شده و سپس موجب فعال شدن AKt می‌شود و می‌تواند از این طریق آپوپتوز را مهار کند [۳۹]. کاسپازهای پروآپتوزی ۸، ۹ و ۱۲ به ترتیب از طریق گیرنده‌های مرگ، رهایی سیتوکروم C و رهاسازی بدون کنترل کلسیم از شبکه سارکوپلاسمیک/ رتیکولو کوم اندوپلاسمیک فعال می‌شوند و در نهایت باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها می‌گردند [۴۰]. در مطالعه‌ای نشان داده شد کاسپاز-۸ می‌تواند در فعالیت‌های غیرآپوپتوتیک نیز شرکت کند بطوری‌که تحت کنترل NFkB در تنظیم دقیق ژن‌های التهابی نقش مهمی ایفا می‌کند [۴۱].

با توجه به مطالعات انجام شده و با توجه به نوع آزمودنی، نوع تمرین، شدت و مدت ورزش می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت بدنی خطر آپوپتوز را کاهش می‌دهد، مکانیسم این اثرات حمایتی هنوز نامشخص است. عوامل سلولی و مولکولی از طریق سیگنالینگ آبخاری با هم در ارتباط هستند طوری که در پاسخ به محرک و استرس بیرونی سیگنالینگ آبخاری بین سلولی رخ می‌دهد.

یکی دیگر از یافته‌های مهم مطالعه حاضر افزایش کاسپاز-۸ پس از هشت هفته تمرین استقامتی و مقاومتی در موش‌های صحرایی دیابتی بود. کاسپاز-۸ یک کاسپاز آغازگر در مسیر خارجی آپوپتوز معرفی شده است که می‌تواند موجب فعال شدن کاسپاز-۳ یعنی کاسپاز اجرایی پایین دست شود [۴۲]. بنابراین کاهش میزان پروکاسپازها می‌تواند نشان‌دهنده فعال شدن کاسپازها باشد. مسیر اصلی برای فعال شدن کاسپاز-۸ از طریق گیرنده‌های مرگ و با دخالت مولکول FADD می‌باشد [۴۳]. اما شواهد مطالعات دیگر نشان داده‌اند که فعال شدن کاسپاز-۸ می‌تواند بصورت مستقل توسط میانجی‌های درون سلولی مانند رادیکال آزاد صورت گیرد [۴۴]. فعال شدن

کاسپاز-۸ در سلول‌های مختلف در پاسخ به انواع مختلف استرس اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفته و مکانیسم‌های مختلفی برای آن پیشنهاد شده است. به عنوان مثال، استرس اکسیداتیو نفوذپذیری غشای لیزوزوم را افزایش می‌دهد و کاسپاز-۸ را فعال می‌کند [۴۵]. مسیرهای سیگنال وابسته به پروتئین کینازهای خانواده MAPK مانند JNK، P38 و ERK نیز به دلیل استرس اکسیداتیو در فعال شدن کاسپاز-۸ نقش دارند. در یک تحقیق، ۱۰ هفته تمرین مقاومتی با شدت متوسط باعث کاهش سطح سرمی TNF- α در زنان مسن شد. بنابراین به نظر می‌رسد مکانیسم دیگری در کاهش بیان کاسپاز-۳ و افزایش محتوای تلومراز در بافت قلب موثر بوده است [۴۶، ۴۷]. در نهایت بیان کردند که تمرینات مقاومتی مسیر خارج سلولی آپوپتوز را سرکوب می‌کند و از اختلالات قلبی در زنان مسن جلوگیری می‌کند. در مطالعه‌ای که تمرین مقاومتی موجب افزایش کاسپاز-۸ متناسب با کاسپاز-۳ در کلیه موش‌های دیابتی شده بود مشاهده شد TNF- α مستقیماً کاسپاز-۸ را فعال می‌کند [۴۸]. فعالیت بدنی با شدت متوسط به مدت ۷ هفته، فعالیت کاسپاز-۸ و به دنبال آن کاسپاز-۳ را کاهش می‌دهد. لازم به ذکر است نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعه حاضر متناقض بود چرا که پروتکل تمرینی و شدت فعالیت بدنی تفاوت چشمگیری داشتند. علاوه بر این بهبود کاسپاز-۸ ناشی از بهبود بیان SOD (سوپر اکسید دسموتاز) بیان شده است و چنین نتیجه‌گیری شد که اگرچه تولید سوپراکسیدها با ورزش در موش‌ها بیشتر می‌شود اما تقویت استرس اکسیداتیو منجر به افزایش SOD می‌شود که می‌تواند ظرفیت بیشتری برای کاهش چالش‌های اکسیداتیو ناشی از هرگونه تغییر رادیکال‌های آزاد خارج یا درون سلولی ایجاد کند و در نهایت بیان شد ورزش کم شدت مستقل از تغییر در هاپیر گلیسمی باعث افزایش وضعیت آنتی اکسیدانی می‌شود [۱۰]. نتایج حاصل از تصویربرداری تری کروم

ماسون نشان داد میزان کلاژن موجود در بافت قلبی در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه تمرین دیابتی بیشتر است. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه عبدی و همکاران همسو بود که نشان از کاهش کلاژن در گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه کنترل بود. در این مطالعه نیز میزان کلاژن و میانگین عرض عضلات قلب در گروه دیابتی بطور معناداری بالاتر از دیگر گروه‌ها گزارش شد. همچنین با مطالعات کوزینس^۱ و همکاران [۴۹] و تنت^۲ و همکاران [۵۰] نیز هم راستا بود که نشان دادند سازمان ساختاری بافت قلبی در موش‌های صحرایی دیابتی شده مختل می‌گردد و تغییرات بافت شناسی التهابی در بافت‌های قلبی، آسیب دیدگی میکروکارد را نشان داده است و در روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین نیز تغییر شکل هسته‌های کاردیومیوسیت‌ها و جداسدن با ایجاد میوفیبریل‌های قلبی مختل شده مشاهده شد که تجمع کلاژن در میکروکارد دیابتی ممکن است تا حدی به دلیل اختلال در تخریب کلاژن ناشی از گلیکوزیلاسیون باقی مانده‌های لیزین بر روی کلاژن باشد. هاپیر گلیسمی همچنین منجر به تولید اکسیژن واکنش‌پذیر و گونه‌های نیتروژن می‌شود که استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد و باعث بیان ژن بطور غیرطبیعی و تغییر انتقال سیگنال می‌گردد و مسیرهای منتهی به مرگ سلولی میکروکارد برنامه‌ریزی شده را فعال می‌کند [۵۱]. بنابراین طبق پژوهش حاضر تمرینات استقامتی و مقاومتی بصورت طولانی مدت می‌تواند با ایجاد تغییرات ساختاری در تارهای عضلانی کاردیومیوسیت‌های قلب دیابتی و افزایش قطر فیبرهای عضلانی منجر به کاهش رسوب کلاژن و کاهش فیبروز قلب دیابتیک گردد.

همچنین یافته‌های این پژوهش نشان داد تمرینات استقامتی و مقاومتی باعث کاهش مقادیر پلاسمایی گلوکز و انسولین در مقایسه با گروه کنترل شد.

^۱ Cosyns

^۲ Thent

همچنین تمرینات استقامتی و مقاومتی شاخص مقاومت انسولینی (HOMA-IR) را در حد معناداری کاهش داد با این وجود بین گروه‌های تجربی تفاوت معناداری مشاهده نشد. پژوهش‌های گوناگونی گزارش کرده‌اند انجام فعالیت بدنی منظم در افراد دیابتی تحمل گلوکز را بالا می‌برد و قند خون بیماران دیابتی را کاهش می‌دهد [۵۲، ۵۳] برخی مطالعات کاهش معنادار گلوکز [۵۴] و برخی کاهش غیرمعنادار [۵۵] آن را متعاقب تمرینات استقامتی و مقاومتی گزارش کرده‌اند. برخی مطالعات مزایای بیش‌تر تمرینات استقامتی [۵۶] را نشان دادند و برخی دیگر مزایای بیشتر تمرین مقاومتی را گزارش کردند [۵۷]. در خصوص کاهش انسولین و شاخص مقاومت به انسولین نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های ماربا و همکاران [۵۸] همسو می‌باشد و با یافته‌های پیترو و همکاران [۵۹] ناهمسو است. این مطالعات سازوکارهای مثبت فعالیت بدنی منظم برای تنظیم متابولیسم گلوکز و بهبود عمل انسولین را به افزایش تخلیه اسید چرب آزاد، افزایش پیام‌های پس سیناپسی انسولین و فعالیت واسطه‌های پیام‌رسانی مثل AMP فعال شده، افزایش فعالیت مسیر PI3 و MAPK [۵۶] مهار آنزیم کلیدی گلوکوئوژنز، تغییر ساختار عضله و... نسبت داده‌اند. طبق مطالعه حاضر کاهش معنادار مقاومت انسولینی در هر دو نوع تمرین که ناشی از کاهش هر دوی گلوکز و انسولین جبرانی می‌باشد، نشان می‌دهد هر دو نوع تمرین مفید می‌باشند اما طبق نتایج تمرینات مقاومتی، نسبت به تمرینات استقامتی تاثیر گذارتر بود. به نظر می‌رسد کنترل گلیسمیک از راه فعالیت‌های ورزشی وابسته به شدت تمرین می‌باشد و تمرینات ورزشی با شدت مناسب و بالا که از کربوهیدرات بعنوان منبع سوختی استفاده

می‌کنند تاثیر بیشتری بر کنترل گلیسمیک دارد. در تمرینات مقاومتی با وزنه‌های سنگین در زمان کوتاه و با شدت بالا نه تنها از گلیکوژن به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند و باعث تخلیه منابع ذخایر گلیکوژن می‌شوند [۵۷]؛ بلکه با تحریک هورمون رشد لیپولیز را افزایش می‌دهد.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم اندازه‌گیری عوامل مؤثر بر تغییرات آنتی اکسیدانی به دلیل هزینه‌های مالی بالا می‌باشد شاید اندازه‌گیری این عوامل درک بهتری از مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوتیک دهد. همچنین ارزیابی بیان سایر پروتئین‌های درگیر در مسیر خارجی و داخلی آپوپتوز عضله قلبی از محدودیت‌های دیگر پژوهش حاضر می‌باشد که منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد هر دو نوع تمرین مقاومتی با شدت بالا و تمرین استقامتی با شدت متوسط می‌تواند بر مرگ آپوپتوتیک کاردیومیست‌های ناشی از دیابت تاثیر مثبتی داشته باشد و با ایجاد مقاومت در پروتئین‌های شبکه اندوپلاسمیک از مرگ سلول‌های قلبی بصورت آپوپتوز و فیبروز جلوگیری نماید. تمرینات ورزشی طولانی‌مدت و منظم می‌تواند به عنوان یک راهکار حفاظتی و غیردارویی جهت کاهش آسیب‌های ناشی از دیابت مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین توصیه می‌شود که بیماران دیابتی از هر دو نوع ورزش برای به تاخیر انداختن یا جلوگیری از آپوپتوز قلبی بهره‌مند شوند.

References

- 1- Lane JT, Ford TC, Larson LR, Chambers WA, Lane PH. Acute effects of different intensities of exercise in normoalbuminuric/normotensive patients with type 1 diabetes. Diabetes Care. 2004 Jan; 27(1):28-32.

- 2- Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res*. 2000 Dec; 87(12):1123-32.
- 3- Shao CH, Wehrens XH, Wyatt TA, Parbhu S, Rozanski GJ, Patel KP, et al. Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. *J Appl Physiol*. 2009 Apr;106(4):1280-92
- 4- Guleria RS, Choudhary R, Tanaka T, Baker KM, Pan J. Retinoic acid receptor-mediated signaling protects cardiomyocytes from hyperglycemia induced apoptosis: Role of the renin-angiotensin system. *J Cell Physiol*. 2011 May; 226(5):1292-307.
- 5- Cai M. Land for welfare in China. *Land Use Policy*. 2016; 55:1-12.
- 6- Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantzios S, Factor SM, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest*. 2003 May; 111(10):1497-504.
- 7- Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J Exerc Rehabil*. 2013 Apr; 9(2):212-219.
- 8- Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. *Scientific World Journal*. 2010 Feb; 10:340-9.
- 9- Mooren F, Völker K. *Molecular and cellular exercise physiology*, 1st ed. Canada: Human Kinetics Publishers IL, 2004: 71-94.
- 10- Lin CL, Wang FS, Kuo YR, Huang YT, Huang HC, Sun YC, et al. Ras modulation of superoxide activates ERK-dependent fibronectin expression in diabetes-induced renal injuries. *Kidney Int*. 2006 May; 69(9):1593-600.
- 11- Mohamad HE, Askar ME, Hafez MM. Management of cardiac fibrosis in diabetic rats; the role of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gamma) and calcium channel blockers (CCBs). *Diabetol Metab Syndr*. 2011 Mar; 3:4.
- 12- Westermann D, Rutschow S, Jager S, Linderer A, Anker S, Riad A, et al. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes*. 2007 Mar; 56(3):641-6.
- 13- Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007 Dec; 6:38.
- 14- Hosseini S, Nik bakht H, Azarbayjani M. The effect of aqua extract of saffron with resistance training on glycemic indexes of streptozotocin induced diabetic rats. *Armaghane danesh*. 2013 Summer; 18(4):284-294. [Full text in Persian]
- 15- Pierre W, Gildas AJ, Ulrich MC, Modeste WN, Benoît NT, Albert K. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Bersama engleriana* leaves in nicotinamide/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *BMC Complement Altern Med*. 2012 Dec; 12:264.
- 16- Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012 Sep; Chapter 5: Unit 5.61.
- 17- Janke J, Engeli S, Boschmann M, Adams F, Bohnke J, Luft FC, et al. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes*. 2006 Oct; 55(10):2805-10.
- 18- Cheng SM, Ho TJ, Yang AL, Chen IJ, Kao CL, Wu FN, et al. Exercise training enhances cardiac IGFI-R/PI3K/Akt and Bcl-2 family associated pro-survival pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Cardiol*. 2013 Jul; 167(2):478-85.
- 19- Kazeminasab F, Marandi M, Ghaedi K, Esfarjani F, Moshtaghian J. The effect of endurance training on lipid profile and expression level of liver X receptor α gene in male Wistar rats. *Genet millenn*. 2012; 10(2):2715. [Full text in Persian]
- 20- Amani M, Rahmati M, Fathi M, Ahmadvand H. The effect of 6 weeks moderate intensity endurance training on skeletal muscle fibrosis in diabetic rats. *Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services*. 2020 Jun-Jul; 42(2): 126-134. [Full text in Persian]
- 21- Afshar bakeshlou H, Abdi A, Azarbayjani M A, Barari A. Effect Of Aerobic Exercise Combined With Berberine Chloride Hydrate On Cardiac Tissue Of Streptozotocin-Diabetic Rats. *IJDLD 2020 Autumn*; 19 (2) :81-92. [Full text in Persian]

- 22- Cao JY, Wang H. Role of Fas-FasL in insulinitis in nonobese diabetic mouse. *Chin Med J (Engl)*. 2004 Apr;117(4):615-17.
- 23- Ham O, Lee SY, Lee CY, Park JH, Lee J, Seo HH, et al. let-7b suppresses apoptosis and autophagy of human mesenchymal stem cells transplanted into ischemia/reperfusion injured heart 7by targeting caspase-3. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Aug; 6(1):147.
- 24- Ghajari H, Hosseini SA, Farsi S. The effect of endurance training along with cadmium consumption on Bcl-2 and bax gene expressions in heart tissue of rats. *AMHSR*. 2019 Jan; 17(1):e86795.
- 25- Aboutaleb N, Shamsaei N, Khaksari M, Erfani S, Rajabi H, Nikbakht F. Pre-ischemic exercise reduces apoptosis in hippocampal CA3 cells after cerebral ischemia by modulation of the Bax/Bcl-2 proteins ratio and prevention of caspase-3 activation. *J Physiol Sci*. 2015 Sep; 65(5):435-43.
- 26- Kim DY, Jung SY, Kim CJ, Sung YH, Kim JD. Treadmill exercise ameliorates apoptotic cell death in the retinas of diabetic rats. *Mol Med Rep*. 2013 Jun ;7(6):1745-50
- 27- Allen DA, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr Biochem* 2005 Dec; 16(12): 705-713
- 28- Mazzola PN, Terra M, Rosa AP, Mescka CP, Moraes TB, Piccoli B, et al. Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. *Metab Brain Dis*. 2011 Dec; 26(4): 291-7.
- 29- Oh YS, Kwon HY, Jeong SJ, Park KY, Kim SY, Lee HJ, et al. Sojucktang induces apoptosis via loss of mitochondrial membrane potential and caspase-3 activation in KLE human endometrial cancer cells. *Chin. Sci. Bull*. 2009 Dec;54, 4387–4392.
- 30- Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2008 Dec;105(6):1934-43.
- 31- Yu W, Wu J, Cai F, Xiang J, Zha W, Fan D, et al. Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats. *PloS One*. 2012; 7(12): e52013.
- 32- Kamata H, Honda SI, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005 Mar;120(5):649-61
- 33- Pulakat L, Aroor AR, Gul R, Sowers JR. Cardiac insulin resistance and microRNA modulators. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:654904.
- 34- Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Mol Med Rep*. 2015 Aug; 12(2):2374-82.
- 35- Dimauro I, Scalabrin M, Fantini C, Grazioli E, Beltran Valls MR, Mercatelli N, et al. Resistance training and redox homeostasis: correlation with age-associated genomic changes. *Redox biol*. 2016 Dec; 10:34-44.
- 36- Doustar Y, Ghadiri Soufi F, Ghiassie R, Safarmashaei S. Effect of resistance exercise on cardiac apoptosis following of ischemic/reperfusion. *J Anim Vet Adv*. 2011; 10(19):2561-6.
- 37- Tanoorsaz S, Behpour N, Tadibi V. Investigating the Effect of mid-term of aerobic exercise on apoptosis biomarkers in the cardiomyocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. *JABS*. 2017 Winter; 7(4):488-97. [Full text in Persian]
- 38- Sari-Sarraf V, Amirsasan R, Sheikholeslami-Vatani D, Faraji H. Effect of creatine supplementation on the factors involved in apoptosis-related process (Bax, Bcl-2) and their ratio (Bcl-2/Bax) during acute resistance exercise in middle-aged men. *SJKU*. 2016 Autumn; 21(4):17-28. [Full text in Persian]
- 39- Petriz BA, Gomes CP, Almeida JA, de Oliveira GP Jr, Ribeiro FM, Pereira RW, et al. The effects of acute and chronic exercise on skeletal muscle proteome. *J Cell Physiol*. 2017 Feb;232(2):257-269.
- 40- Faraji H, Mehrani E. The effect of omega-3 supplementation on caspase-3 levels after acute resistance exercise in nonathletic men. *JAHSSP*. 2019 Aug; 6(2):40-46.[Full text in Persian]

- 41- Philip NH, DeLaney A, Peterson LW, Santos-Marrero M, Grier JT, Sun Y, et al. Activity of uncleaved caspase-8 controls anti-bacterial immune defense and TLR-induced cytokine production independent of cell death. *PLoS pathogens*. 2016 Oct;12(10):e1005910
- 42- Creagh EM, Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans*. 2001 Nov; 29(6): 696-702.
- 43- Barnhart BC, Lee JC, Alappat EC, Peter ME. The death effector domain protein family. *Oncogene*. 2003 Nov; 22(53):8634-8644.
- 44- von Haefen C, Wieder T, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Daniel PT. Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop. *Oncogene*. 2003 Apr; 22(15):2236-47.
- 45- Baumgartner HK, Gerasimenko JV, Thorne C, Ashurst LH, Barrow SL, Chvanov MA, et al. Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007 Jul; 293(1): 296-307.
- 46- Sumbayev VV, Yasinska IM. Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch Biochem Biophys*. 2005 Apr; 436(2):406-12.
- 47- Phillips MD, Flynn MG, McFarlin BK, Stewart LK, Timmerman KL. Resistance training at eight-repetition maximum reduces the inflammatory milieu in elderly women. *Med Sci Sports Exerc*. 2010 Feb; 42(2):314-25.
- 48- Wang L, Du F, Wang X. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*. 2008 May; 133(4):693-703.
- 49- Cosyns B, Droogmans S, Weytjens C, Lahoutte T, Van Camp G, Schoors D, et al. Effect of streptozotocin-induced diabetes on left ventricular function in adult rats: an in vivo Pinhole Gated SPECT study. *Cardiovasc Diabetol*. 2007 Oct; 6:30.
- 50- Thent ZC, Lin TS, Das S, Zakaria Z. Histological changes in the heart and the proximal aorta in streptozotocin-induced diabetic rats following piper sarmentsoum administration. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2012 Apr; 9(3), 396-404.
- 51- Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev*. 2004 Aug; 25(4):543-67.
- 52- Castaneda C. Type 2 diabetes mellitus and exercise. *Nutr Clin Care*. 2000 Nov-Dec; 3(6):349-358.
- 53- Castaneda C, Layne JE, Munoz-Orians L, Gordon PL, Walsmith J, Foldvari M, et al. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2002 Dec; 25(12):2335-41.
- 54- Kinmonth AL, Wareham NJ, Hardeman W, Sutton S, Prevost AT, Fanshawe T, et al. Efficacy of a theory-based behavioural intervention to increase physical activity in an at-risk group in primary care (ProActive UK): a randomised trial. *Lancet*. 2008 Jan;371(9606):41-8.
- 55- Lucotti P, Monti LD, Setola E, Galluccio E, Gatti R, Bosi E, et al. Aerobic and resistance training effects compared to aerobic training alone in obese type 2 diabetic patients on diet treatment. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Dec; 94(3):395-403.
- 56- Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*. 2008 Jan;7(1):34-42.
- 57- Ogasawara R, Sato K, Matsutani K, Nakazato K, Fujita S. The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 May; 306(10): E1155-62.
- 58- Jorge ML, de Oliveira VN, Resende NM, Paraiso LF, Calixto A, Diniz AL, et al. The effects of aerobic, resistance, and combined exercise on metabolic control, inflammatory markers, adipocytokines, and muscle insulin signaling in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2011 Sep; 60(9):1244-52.
- 59- Peter D, Igreja C, Weber R, Wohlbold L, Weiler C, Ebertsch L, et al. Molecular architecture of 4E-BP translational inhibitors bound to eIF4E. *Mol Cell*. 2015 Mar;57(6):1074-1087.