

# تأثیر هشت هفته تمرین استقامتی در دو فاز روشنایی و تاریکی ریتم شبانه‌روزی بر شاخص استرس اکسایشی در بافت پانکراس موش‌های دیابتی

مریم جان‌بزرگی<sup>۱</sup>، عباسعلی گایینی<sup>۲\*</sup>، سیروس چوبینه<sup>۲</sup>، محمدرضا تابنده<sup>۳</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** هایپرگلیسمی با افزایش آسیب‌های سلولی ناشی از فشار اکسایشی در پانکراس همراه است. تأثیر تمرین ورزشی در فازهای مختلف شبانه‌روزی بر محافظت پانکراس از استرس اکسایشی در شرایط دیابت ناشناخته است. هدف از پژوهش حاضر تأثیر هشت هفته تمرین استقامتی در دو فاز روشنایی و تاریکی بر شاخص استرس اکسایشی پانکراس موش‌های دیابتی بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه، تعداد ۱۸ سر موش Naval Medical Research Institute با میانگین وزن  $26 \pm 22/3$  گرم انتخاب و پس از القای دیابت از طریق غذای پرچرب و تزریق استرپتوزوتوسین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، تصادفی در ۶ گروه کنترل سالم فاز روشنایی و تاریکی، کنترل دیابتی فاز روشنایی و تاریکی، تمرین استقامتی دیابتی فاز روشنایی و تاریکی قرار گرفتند. پروتکل تمرین استقامتی ( $50Vmax - 60\%$ )، ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته بود. پس از بی‌هوشی، خون نمونه‌ها جمع‌آوری و بافت پانکراس برداشته شد. مقاومت انسولینی، شاخص استرس اکسایشی و میزان بیان پروتئین Brain and Muscle ARNT-Like1 در پانکراس اندازه‌گیری شد. آنالیز آماری با نرم‌افزار SPSS version 16 در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد.

**نتایج:** ۸ هفته تمرین استقامتی موجب کاهش معنی‌دار مقاومت انسولینی ( $p=0/005$ )، استرس اکسایشی ( $p<0/05$ ) و افزایش معنی‌دار بیان Bmal1 ( $p=0/009$ ) در موش‌های مبتلا به دیابت شد. میانگین متغیرهای مورد بررسی در دو فاز روشنایی و تاریکی با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند ( $p<0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** تمرین استقامتی با افزایش عملکرد آنتی‌اکسیدانی و بیان پروتئین‌های تنظیم شبانه‌روزی سبب بهبود حساسیت انسولینی و آسیب اکسیدان در دیابت می‌شود. فعالیت در فاز تاریکی سبب افزایش بیشتر متابولیسم سلول شده و انجام این نوع تمرین‌ها در فاز تاریکی به‌عنوان یک استراتژی درمانی جدید به این بیماران می‌تواند مورد نظر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** دیابت، تمرین استقامتی، استرس اکسایشی، Bmal1

**ارجاع:** جان‌بزرگی مریم، گایینی عباسعلی، چوبینه سیروس، تابنده محمدرضا. تأثیر هشت هفته تمرین استقامتی در دو فاز روشنایی و تاریکی ریتم شبانه‌روزی بر شاخص استرس اکسایشی در بافت پانکراس موش‌های دیابتی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۱؛ ۳۰ (۶): ۴۹۷۳-۸۶.

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۸۸۲۰، پست الکترونیکی: aagaeeini@ut.ac.ir، صندوق پستی: ۱۴۳۹۸۱۳۱۱۷

## مقدمه

دیابت، مجموعه شرایط متابولیکی است که با قند خون زیاد مشخص می‌شود، دیابت نوع ۲ (type2 Diabetes mellitus)، ۹۰ درصد موارد دیابت را تشکیل می‌دهد و برآورد می‌شود که نزدیک به ۳۴۰ میلیون نفر در جهان مبتلا به دیابت نوع ۲ هستند (۱). نقص عملکرد سلول‌های بتا در شیوع دیابت اهمیت دارد (۲). فشار اکسایشی یکی از مهمترین سازوکارهایی است که باعث ایجاد و پیشرفت دیابت می‌شود (۳). در واقع، دیابت از جمله بیماری‌هایی است که در آن استرس سلولی ناشی از رادیکالی‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن باعث آسیب در بافت‌های بدن می‌شود (۴). گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) در بدن در شرایط فیزیولوژیک تولید می‌شوند و در پیام‌رسانی سلولی نقش دارند (۵). شاخص استرس اکسایشی (oxidative stress index) که نسبت وضعیت اکسیدان تام (Total Oxidant Status) به ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام (total antioxidant capacity) می‌باشد وضعیت فشار اکسایشی سلول را نشان می‌دهد. ROS شامل رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ )، اکسیژن تک‌الکترونی و رادیکال هیدروکسیل است. مازاد ROS منجر به فشار اکسایشی می‌شود. پانکراس درون‌ریز نیز به تغییرات مقادیر داخل سلولی ROS حساس است. آنزیم‌های غیرفعال‌کننده ROS در مقادیر خیلی کم در سلول‌های  $\beta$  پانکراس بیان می‌شوند و آن‌ها را نسبت به فشار اکسایشی بسیار حساس می‌کنند. هیپرگلیسمی مداوم در دیابت باعث افزایش تولید ROS با اکسایش گلوکز، فعال شدن پروتئین کیناز C و افزایش اختلاف الکتریکی بین دو طرف غشا از راه مسیر هگزوزامین می‌شود (۶). باید توجه داشت، برخلاف سایر انواع سلول‌ها، سلول‌های  $\beta$  توانایی آنتی‌اکسیدانی نسبتاً کمی دارد و در نتیجه، بیشتر مستعد فشار اکسایشی و استرس شبکه آندوپلاسمی هستند (۷). از آنجایی‌که، فعالیت بدنی تعادل بین رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها را تغییر می‌دهد، می‌تواند در تغییر فشار اکسایشی بافت‌ها موثر باشد. هنگام فعالیت بدنی با افزایش

سوخت‌وساز، مصرف اکسیژن به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد (۸،۹)، و متعاقب آن ظرفیت تولید رادیکال آزاد توسط میتوکندری‌ها موقتا افزایش می‌یابد. علی‌رغم اینکه ROS سبب تغییرات مسیرهای پیام‌رسان سلولی می‌شود اما مقادیر زیاد ROS در زمان تمرین بدنی ارتباطی منفی با هموستاز سلولی دارد و عملکرد سلولی را به خطر می‌اندازد (۹). برای حفظ وضعیت ردواکس سلول، یک ساز و کار درون‌زاد پیچیده به نام سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. فعالیت ورزشی کوتاه مدت با تشدید تولید رادیکال‌های آزاد باعث فشار اکسایشی در بدن می‌شود و فعالیت ورزشی با شدت متوسط با تقویت دستگاه آنتی‌اکسیدانی سبب مقاومت در برابر فشار اکسایشی می‌شود (۸،۴). تحقیقات نشان داده است که بیماری‌های متابولیک و دیابت نوع ۲ با اختلال در ریتم شبانه‌روزی همراه است (۱۰). از آنجایی‌که، دستگاه ساعت شبانه‌روزی در پستانداران نقش اساسی در حفظ هموستاز دارد (۱۱) به‌نظر می‌رسد فعالیت ورزشی بتواند اختلالات متابولیک وابسته به ریتم شبانه‌روزی را بهبود ببخشد (۱۰). ریتم شبانه‌روزی برای تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بدن ضروری است. هسته سوپرا کیاسماتیک (Suprachiasmatic nucleus) هیپوتالاموسی مغز، در کنترل ریتم شبانه‌روزی در حیوانات نقش اساسی دارد (۱۲). سیگنال‌های نوری از طریق اعصاب بینایی، تنظیم ساعت و همگام‌سازی رفتارهای گوناگون را به‌عهده دارند. به‌طور متناوب، هر دو سیستم عصبی مرکزی و تقریباً تمام بافت‌ها و سلول‌های محیطی بیانگر عوامل رونویسی نوسانگر شبانه‌روزی *Bmal1* (brain-muscle arntlike 1) و *CLOCK* (circadian locomotor output control kaput) هستند که عملکردهای سلولی را تنظیم می‌کنند (۱۲). در سطح مولکولی، ریتم‌های شبانه‌روزی خودگردان سلولی توسط حلقه‌های بازخورد رونویسی و ترجمه‌ای به‌هم پیوسته تنظیم می‌شوند. بازوی مثبت این بازخورد پروتئین‌های *Bmal1* و *CLOCK* است. این سیستم ساعت داخلی تنظیم عملکردهای موردنیاز برای حفظ هموستاز گلوکز را تنظیم می‌کند (۱۰). ساعت‌های تنظیم ریتم شبانه‌روزی در بافت‌های محیطی - مثل

جندی شاپور اهواز خریداری شد. به منظور القای دیابت، ترکیبی از رژیم غذایی پرچرب (High Fat Diet) و داروی استرپتوزتوسین (STZ) با دوز کم استفاده شد. بر اساس این روش، موش‌های گروه‌های دیابتی به مدت ۵ هفته HFD (۶۰٪ کالری چیره از چربی) دریافت کردند. در پایان این دوره STZ (۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) (۱۷) برای یک‌بار به روش تزریق درون صفاقی دریافت کردند. STZ به صورت روزانه در بافر سیترات  $\text{pH} = 5$  تهیه و طی ۳۰ دقیقه تزریق شد. ۵ روز پس از تزریق STZ، موش‌هایی که گلوکز ناشتای آن‌ها بیشتر از  $\text{mg/dl}$  ۱۲۶ بود نمونه دیابتی در نظر گرفته شدند و تصادفی و براساس همگن‌سازی وزنی در ۴ گروه دیابتی قرار گرفتند (۱۸). گروه‌های کنترل سالم نیز هم‌زمان با گروه دیابتی خریداری و با رژیم غذایی معمولی تغذیه شدند و حلال STZ دریافت نمودند موش‌ها به صورت گروه‌های سه تایی در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف به طول ۳۰ عرض و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر ساخت شرکت رازی راد در محیطی با دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. در طی پژوهش غذای استاندارد پلت و آب به صورت آزاد در اختیار نمونه‌ها قرار گرفت (شکل ۱). مطالعه حاضر براساس موازن اخلاقی کار با حیوانات مطابق دستورالعمل‌های کمیته اخلاق پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی انجام شد. تعیین سرعت حداکثر ( $V_{\max}$ )، در انتهای هفته سازگاری، هفته چهارم و هشتم تمرین اصلی، آزمون سرعت حداکثر از همه گروه‌ها گرفته شد. در گروه‌های تمرینی، شدت تمرین با تمرین در دامنه مورد نظر - با استفاده از  $V_{\max}$  به دست آمده در ابتدا و هفته چهارم تمرین - تنظیم شد. موش‌های گروه‌های مختلف روی تردمیل قرار داده شدند و طی ۵ دقیقه با سرعت ۶ متر در دقیقه گرم شدند. سپس سرعت هر ۲ دقیقه به میزان ۲ متر در دقیقه افزایش یافت. تا زمانی که موش‌ها نتوانستند یا تمایلی به ادامه کار نداشتند. سرعت پایانی دویدن موش‌ها به عنوان سرعت حداکثر آن‌ها ثبت و برای جلوگیری از هرگونه اختلال و تاثیر آن بر عملکرد موش‌ها و نتایج پژوهش، سرعت حداکثر برای هر گروه در ساعت مربوط به همان گروه سنجیده شد (۲۰، ۱۹).

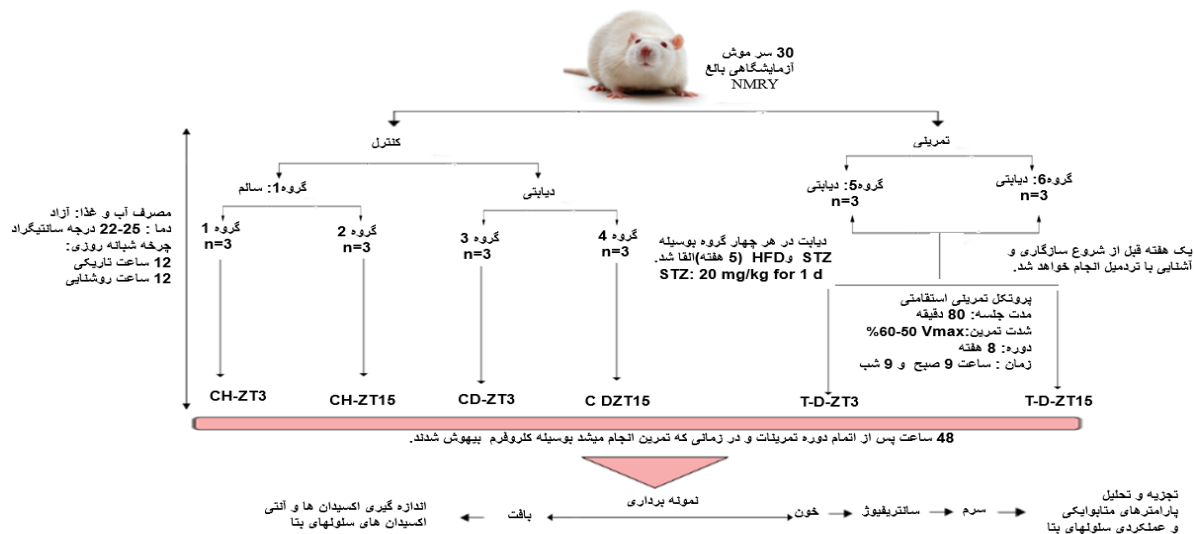
پانکراس - پاسخ مستقیم قوی به استرس، فعالیت ورزشی و یا غذا ایجاد می‌کنند، که مستقل از ساعت تنظیم مرکزی است (۱۱). یکی از ژن‌های اصلی ساعت، *Bmal1* است، بیان این ژن در کنترل ژن‌های متابولیک، ژن‌های پیام رسان و تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیک است (۱۳) شواهد نشان می‌دهند که صرفاً تغییر زمان تغذیه یا فعالیت ورزشی باعث بهتر شدن T2DM می‌شود (۱۴). مطالعات نشان می‌دهند فعالیت ورزشی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تحریک می‌کند و میزان تغییر در این شاخص‌ها به وضعیت تمرین و نوع تارهای عضلانی درگیر بستگی دارد (۱۵). در مورد زمان انجام فعالیت *Tahara* و همکارانش پاسخ‌های فیزیولوژیک به استرس و فعالیت ورزشی را به ساعت تمرین بدنی وابسته دانسته‌اند و ساعت مناسب را در پیشگیری از چاقی، دیابت و بیماری‌های قلبی عروقی موثر گزارش کرده‌اند (۱۶). *Dalbram* و همکارانش نشان داده‌اند که غلظت پروتئین‌های *Bmal1* و *Clock* در بافت عضله پس از فعالیت بدنی افزایش می‌یابد و فعالیت در فاز تاریکی، چاقی را بدون تغییر در عملکرد انسولین یا هموستاز گلوکز بهبود می‌بخشد (۱۰). مطالعات زیادی درباره اکسیدان‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و ارتباط آن‌ها با فعالیت بدنی انجام شده است اما مطالعاتی که به بررسی تاثیر فعالیت استقامتی بر این عوامل در پانکراس بیماران دیابتی و مقایسه آن در دو فاز تاریکی و روشنایی ریت شبانه‌روزی پرداخته باشد، در دسترس نیست. بنابراین پاسخ به این پرسش که آیا می‌توان زمان انجام فعالیت ورزشی را به عنوان یک عامل اثرگذار در کاهش استرس اکسیداتیو در پانکراس در بیماران دیابتی دانست، ضروری می‌باشد. لذا هدف پژوهش حاضر بررسی تاثیر تمرین استقامتی در دوفاز روشنایی و تاریکی بر شاخص‌های مقاومت به انسولین و استرس اکسایشی در بافت پانکراس موش‌های دیابتی می‌باشد.

### روش بررسی

پژوهش حاضر، از نوع تجربی، از لحاظ اجرا آزمایشگاهی و نمونه‌گیری تصادفی ساده می‌باشد. ۱۸ موش آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI هشت تا ده هفته با میانگین وزنی  $26 \pm 3/22$  گرم، از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی

تاریکی یعنی در ساعت ۹ شب (ZT15) بود (۲۱). قبل از اجرای برنامه تمرین اصلی، موش‌ها برای سازگاری با ترمیم به مدت یک هفته به صورت تدریجی با ترمیم آشنا شدند. برنامه تمرینی در گروه‌های تمرینی با شدت متوسط  $V_{max}$  ۶۰-۵۰٪ به مدت ۸۰ دقیقه در هر جلسه، تنظیم و اجرا شد. این تمرین به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هر هفته برگزار شد (۱۹). وزن و گلوکز خون هفتگی ارزیابی شد.

تمرین استقامتی (moderate-intensity continuous training): یک هفته پس از اطمینان از القای دیابت، گروه‌های تمرینی در دو ساعت مختلف از روز تمرین کردند؛ برای تعیین زمان تمرین روز، زمان شروع روشنایی ساعت ۶ صبح (ZT0) و زمان شروع تاریکی ساعت ۶ عصر (ZT12) در نظر گرفته شد (۲۱) و زمان تمرین سه ساعت پس از شروع روشنایی در ساعت ۹ صبح (ZT3) و سه ساعت پس از شروع



شکل ۱: نمودار جریان طراحی پژوهش

اختصاصی گونه (Bioassay Technology، چین) با دقت برون آزمون ۳/۴٪ و درون آزمون ۴/۳٪ ارزیابی شد. برای سنجش میزان مقاومت به انسولین از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Homa-IR} = \frac{\text{Fasting Insulin} (\mu\text{U/ml}) * \text{Fasting Glucose} (\text{mmol/L})}{22.5}$$

افزایش یا کاهش مقدار HOMA-IR در آزمودنی‌های دیابتی نسبت به موشهای سالم به ترتیب نشان‌دهنده افزایش و کاهش مقاومت به انسولین در نظر گرفته شد.

سنجش شاخص استرس اکسایشی: شاخص استرس اکسایشی (OSI) از نسبت وضعیت تام اکسیدان (TOS) به وضعیت تام آنتی‌اکسیدان (TAC) به دست می‌آید. نمونه‌های بافت پانکراس در بافر فسفات سالین pH= ۷/۵ حاوی مهارکننده پروتئاز با استفاده از هموژنایزر، هموژنیزه و پس از سانتیفریوژ با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و

نمونه برداری. ۴۸ ساعت پس از به پایان دوره هشت هفته‌ای تمرین، موش‌ها به سالن نمونه برداری منتقل و با تزریق درون صفاقی کتامین (۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. نمونه‌های خونی مستقیم از قلب دریافت و پس از سانتیفریوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه نمونه سرم آن‌ها جداسازی شد. بافت پانکراس نیز همزمان برداشت و جهت انجام آزمایش‌های بعدی به فریزر -۷۰ انتقال داده شدند. از آنجایی که چند نقطه زمانی برای تشخیص تغییرات در فاز یا دامنه ساعت مولکولی نیاز است، هر گروه در ساعت تمرین مربوط به خود تشریح شد (۱۰). سنجش شاخص مقاومت به انسولین. برای محاسبه شاخص مقاومت به انسولین (HOMA-IR) گلوکز خون با روش گلوکز اکسیداز و اسپکتروفتومتری (پارس آزمون، ایران، و انسولین با روش الایزا

کاست محافظ پلاستیکی حاوی فیلم حساس اتورادیوگرافی (BioBlue-Lite™، آمریکا) قرار داده شدند در دستگاه پردازشگر LD-14)X-RAY، چین) ظهور باندها انجام شد. باندهای ظاهر شده با استفاده از دستگاه اسکنر JS 2000 (BoninTech، چین) اسکن و دانسیته باندها محاسبه گردید. رای کمی سازی باندها دانسیته هر پروتئین نسبت به پروتئین کالیبراتور در گروه های مورد مطالعه نسبت به دانسیته پروتئین هدف نسبت به پروتئین کالیبراتور در گروه کنترل توسط نرم افزار دستگاه JS 2000 مورد بررسی قرار گرفت.

### تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایشات در این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و برای هر نمونه سه تکرار بیولوژیکی در نظر گرفته شد. جهت بررسی نرمال بودن داده ها از آزمون شاپیروویلکز و ارزیابی هماهنگی واریانس ها از آزمون لون، استفاده شد. تجزیه و تحلیل واریانس داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین داده ها با آزمون تعقیبی LSD مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS version 16 با سطح معنی داری ۵ درصد انجام شد.

### ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی تایید شده است (کد اخلاق IR.SSRC.REC.1400.039).

### نتایج

تجزیه و تحلیل واریانس یافته های پژوهش حاضر در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان می دهد که اثر پارامترهای موش مبتلا به دیابت و زمان روشنایی و تاریکی، در تغییر سطوح متغیرهای مورد ارزیابی، در سطح پنج درصد معنادار می باشد. مقایسه میانگین متغیرهای مورد ارزیابی، پس از مداخله، در گروه های مختلف پژوهش در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج آزمون تعقیبی بین گروه های مورد مطالعه (جدول ۲)، نشان دهنده افزایش معنی دار سطح متغیرهای OSI، TOS، گلوکز، انسولین، HOMA-IR و وزن، در موش های دیابتی نسبت به موش های گروه کنترل سالم بود. تاثیر تمرین استقامتی در تغییرات

جداسازی مایع رویی جهت ارزیابی شاخص های مورد مطالعه استفاده شد. میزان پروتئین در نمونه لیز بافتی با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری شد. به منظور اندازه گیری TAS از روش Erel استفاده شد. در این روش ترکیب رنگی احیا شده  $2.2v$  azinobis-3- ethylbenzothiazoline-sulfonic acid (ABTS) در حضور ترکیبات آنتی اکسیدان اکسید و بی رنگ می شود که تغییر میزان جذب در طول موج ۶۶۰ نانومتر با میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی سنجیده می شود. از معرف Trolox به عنوان کالیبراتور استفاده و نتایج به صورت  $\text{mmol Trolox equivalent/L}$  گزارش گردید (۲۲). به منظور سنجش TOS از روش توصیف شده توسط Erel استفاده شد. اساس این روش اکسید شدن آهن فرس به فریک و تشکیل کمپلکس رنگی با xyenol orange می باشد که در طول موج ۵۶۰ نانومتر قابل اندازه گیری می باشد. از  $\text{H}_2\text{O}_2$  به عنوان کالیبراتور استفاده شد و نتایج براساس  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L}$  گزارش شد (۲۳). ارزیابی بیان پروتئین *Bmal1* برای تجزیه و تحلیل وسترن بلات، جداسازی پروتئین ها با استفاده از ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE انجام شد. سپس نمونه های پروتئینی به کاغذ polyvinylidene difluoride منتقل گردید. پس از انتقال پروتئین به غشای PVDF و انجام مراحل شستشو، مسدود سازی غشا به وسیله شیر خشک بدون چربی ۵ تهیه شده در بافر TBS به مدت یک ساعت انجام پذیرفت. سپس کاغذها با آنتی بادی *anti-Bmal1* (رقیق شده ۱:۱۰۰۰) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Calif., USA) در محلول مسدود سازی در دمای اتاق به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بلات ها با بافر TBST سه بار شستشو و سپس با آنتی بادی ثانویه (SC376938) با رقت ۱/۱۰۰۰ به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. از پروتئین هیپوزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HPRT) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. به منظور ظهور باندها از کیت ECL استفاده شد. ۲۵۰ میکرولیتر محلول کار ECL (abcam، ۱۳۳۴۰۸، آمریکا) به بلات ها اضافه و به مدت ۱ دقیقه در آن نگهداری شد. پس از خروج از محلول ظهور، کاغذها در محیط خشک شدند سپس کاغذها درون

در گروه‌های دیابتی و کنترل، در متغیر TAC تفاوت معناداری نشان ندادند ( $p > 0.05$ ). مقایسه نتایج میانگین (شکل ۲) متغیر *Bmal1*، نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار تغییرات میزان این متغیر در موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های گروه کنترل سالم بود ( $p = 0.000$ ). ارزیابی تأثیر تمرین استقامتی در گروه‌های تمرینی نسبت به گروه‌های دیابتی، نشان داد که روند تغییرات این متغیر در موش‌های تمرین داده شده، افزایشی است و در سطح ۵ درصد معنی‌دار است ( $p = 0.009$ ). تغییرات در *Bmal1* گروه‌های دیابتی و کنترل در دو فاز تاریکی و روشنایی، معنی‌دار بود ( $p = 0.01$ ) ارزیابی تغییرات سرعت حداکثر در بین گروه‌های مورد مطالعه، نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار تمرین استقامتی در افزایش سرعت حداکثر در موش‌های تمرین داده شده نسبت به گروه‌های دیگر بود ( $p < 0.05$ ) تغییرات سرعت حداکثر در دو فاز تاریکی و روشنایی معنی‌دار نبود ( $p = 0.09$ ).

سطوح این متغیرها در گروه‌های تمرینی نسبت به گروه‌های دیابتی، معنی‌دار بود و روند کاهشی در سطح این متغیرها در موش‌های تمرین داده شده، معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) تغییر سطوح متغیرهای OSI، TOS، گلوکز، انسولین و HOMA-IR در دو فاز تاریکی و روشنایی در تمامی گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری با هم نشان دادند ( $p < 0.05$ ) تغییرات وزن در دو فاز تاریکی و روشنایی تفاوت معنی‌داری نداشت ( $p = 0.241$ ). مقایسه نتایج میانگین (جدول ۲) متغیر TAC، نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار سطح این متغیر در موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های گروه کنترل سالم بود ( $p = 0.003$ ). ارزیابی تأثیر تمرین استقامتی در گروه‌های تمرینی نسبت به گروه‌های دیابتی، نشان داد که روند تغییرات TAC در موش‌های تمرین داده شده، افزایشی است و در سطح ۵ درصد معنی‌دار است ( $p = 0.02$ ). تغییرات دو فاز تاریکی و روشنایی

جدول ۱: نتایج تجزیه و تحلیل واریانس یک راهه ANOVA پارامترهای مورد مطالعه

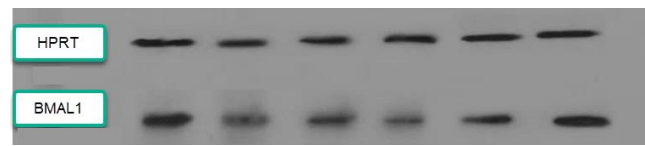
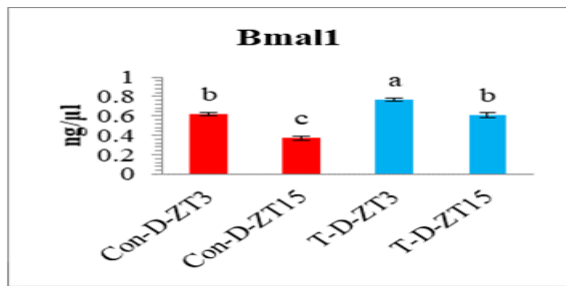
Vmax m/min	Weight gr	Bmal1 ng/μl	Homa-IR μU/ml*mmol/l	Insulin mU/L	Glucose Mg/dl	OSI	TAC μm/l	TOS μm/l	F
۴۰/۹۴۶**	۵/۴۵۵**	۱۲۹/۸۰۵**	۶۶/۸۲۳**	۵۱/۴۲۲**	۲۲/۲۱۷**	۳۳/۹۷۲**	۳۶/۱۹۱**	۴۴/۹۸۵**	F
۰/۰۰۰	۰/۰۰۸	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	p

جدول ۲: میانگین و انحراف استاندارد متغیرهای مورد مطالعه پس از مداخله و نتایج آزمون LSD

Vmax m/min	Weight gr	Homa-IR μU/ml*mmol/l	Insulin mU/L	Glucose Mg/dl	OSI	TAC μm/l	TOS μm/l	
۱۵/۱۶±۱۰/۴ <sup>b</sup>	۳۳/۰±۳/۶ <sup>b</sup>	۹/۹۹±۰/۸۵ <sup>f</sup>	۴۰/۰۸±۳/۶۱ <sup>e</sup>	۱۰۱/۱۸±۴/۱۰ <sup>e</sup>	۴۸/۱۵±۱۳/۲۷ <sup>e</sup>	۱/۱۴±۰/۱۷ <sup>a</sup>	۰/۵۳±۰/۰۷ <sup>d</sup>	CH-ZT3
۱۵/۵۰±۱۰/۳۲ <sup>b</sup>	۳۴/۰±۲/۶۴ <sup>b</sup>	۱۱/۸۳±۱/۷۴ <sup>e</sup>	۴۱/۱۰±۵/۲۵ <sup>e</sup>	۱۱۶/۴۰±۴/۲۲ <sup>d</sup>	۳۳/۷۵±۱۰/۴۷ <sup>f</sup>	۱/۱۹±۰/۱۶ <sup>a</sup>	۰/۳۹±۰/۰۸ <sup>e</sup>	CH-ZT15
۱۴/۸۳±۱۰/۶ <sup>b</sup>	۴۱/۳۳±۱۰/۵۲ <sup>a</sup>	۳۱/۱۷±۰/۷۹ <sup>b</sup>	۸۸/۰۴±۵/۳۶ <sup>b</sup>	۱۴۳/۵۸±۵/۰۹ <sup>b</sup>	۱/۹۴±۵۲/۳۱ <sup>a</sup>	۰/۳۲±۰/۰۶ <sup>d</sup>	۲/۹۳±۰/۳۰ <sup>a</sup>	CD-ZT3
					۹۴۳			
۱۵/۶۰±۰/۹۱ <sup>b</sup>	۴۰/۶۶±۳/۰۵ <sup>a</sup>	۳۷/۸۰±۳/۰۴ <sup>a</sup>	۹۷/۵۳±۶/۴۳ <sup>a</sup>	۱۵۷/۳۳±۵/۴۵ <sup>a</sup>	۲۴±۶۲/۸۰ <sup>b</sup>	۰/۳۷±۰/۰۳ <sup>d</sup>	۲/۲۸±۰/۳۶ <sup>b</sup>	CD-ZT15
					۶۳۰			
۲۴/۶۶±۱۰/۱۵ <sup>a</sup>	۳۴/۳۳±۱۰/۵۲ <sup>b</sup>	۲۵/۲۷±۳/۳۸ <sup>c</sup>	۷۱/۳۲±۷/۱۲ <sup>c</sup>	۱۴۳/۲۰±۵/۶۳ <sup>b</sup>	۱/۸۶±۷۳/۴۰ <sup>c</sup>	۰/۶۴±۰/۰۷ <sup>b</sup>	۲/۰۴±۰/۳۷ <sup>b</sup>	TD-ZT3
					۳۱۸			
۲۴/۸۰±۱۰/۷۰ <sup>a</sup>	۳۶/۳۳±۱۰/۵۲ <sup>b</sup>	۲۰/۱۰±۲/۶۰ <sup>d</sup>	۶۳/۸۰±۵/۸۷ <sup>d</sup>	۱۲۷/۴۰±۳/۳۶ <sup>c</sup>	۱/۸۷±۲۲/۱۷ <sup>d</sup>	۰/۸۲±۰/۰۴ <sup>c</sup>	۱/۶۳±۰/۱۷ <sup>c</sup>	TD-ZT15
					۱۹۷			

حروف لاتین غیریکسان بالای ستون‌ها نشان‌دهنده معنادار بودن اختلاف آن‌ها در آزمون تعقیبی LSD است. CH-ZT3 = گروه کنترل سالم فاز روشنایی، CH-ZT15 = گروه کنترل سالم فاز تاریکی، CD-ZT3 = گروه کنترل دیابتی فاز روشنایی، CD-ZT15 = گروه کنترل دیابتی فاز تاریکی، TD-ZT3 = گروه تمرین دیابتی فاز روشنایی، TD-ZT15 = گروه تمرین دیابتی فاز تاریکی. HOMA-IR: شاخص مقاومت انسولینی، OSI: نسبت اکسیدان به آنتی اکسیدان تام، Bmal1: یکی از ژن‌های اصلی ساعت





شکل ۲: تغییرات پروتئین Bmal1 در گروه‌های مورد مطالعه

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد، دیابت موجب افزایش مقاومت انسولینی موش‌های مبتلا به دیابت شده، و انجام ۸ هفته فعالیت استقامتی به کاهش معنی‌دار مقاومت انسولینی در این آزمودنی‌ها منجر شد. تمرین ورزشی برداشت گلوکز و فعالیت پروتئین‌های درگیر در پیام‌رسانی انسولین را افزایش می‌دهد (۱۰). بهتر شدن مقاومت انسولینی و افزایش حساسیت سلول‌های مصرف‌کننده گلوکز نسبت به انسولین در مطالعات زیادی (۲۴-۲۷). بررسی شده است که نتایج آن‌ها غالباً همسو با نتایج پژوهش حاضر است. بر طبق نتایج پژوهش حاضر، تمرین استقامتی موجب بهتر شدن مقاومت انسولینی شد که این نتیجه با مطالعات Dela و همکارانش (۲۴)، Park و همکارانش (۲۸). Slent و همکارانش (۲۶) و Malin و همکارانش (۲۹). همسو است، این بهبود شرایط حاصل افزایش ترشح انسولین و برداشت گلوکز توسط سلول‌های مصرف‌کننده می‌باشد. از آنجایی‌که هرگونه اختلال در رفتار لیپیدها و مسیرهای داخل سلولی -از جمله پاسخ‌های استرس سلولی مانند استرس اکسایشی، استرس شبکه آندوپلاسمی، اتوفاژی و تشکیل سرامید / LD - در مرگ سلول‌های بتا ناشی از سمیت سلولی نقش دارند (۳۰) و به هایپرگلیسمی و مقاومت انسولینی منجر می‌شوند، باید گفت، تمرین‌های ورزشی موجب افزایش توانایی سلول‌های بتا در پردازش پیام‌رسانی و ترشح انسولین می‌شود (۲۷). مطابق نتایج پژوهش حاضر دیابت موجب افزایش شاخص فشار اکسایشی در بافت پانکراس موش‌های مبتلا به دیابت می‌گردد. که نتیجه حاضر با گزارشات Oh و همکارانش (۳۰)، Jingbo و

همکارانش (۳۱) و Guichard و همکارانش (۳۲) هم‌سو بود. براساس یافته‌ها افزایش گلوکز خون با اثر گذاری بر گیرندهایی مثل گیرنده‌های CD36 سلول‌های بتا، بر متابولیسم سلول اثر می‌گذارد و گیرنده در سطوح بالاتر گلوکز تنظیم می‌شود، و جذب اسیدچرب را افزایش می‌دهد، که باعث بهبود GSIS و اختلال در متابولیسم اکسیداتیو می‌شود. چندین گیرنده اسید چرب آزاد دیگر نیز در این مسیر درگیر بوده و موجب پاسخ‌های استرس سلولی مانند استرس اکسیداتیو، استرس ER و... می‌گردد (۳۰). هم‌چنین انجام ۸ هفته فعالیت ورزشی استقامتی موجب کاهش شاخص فشار اکسایشی در موش‌های مبتلا به دیابت می‌شود. نتایج عنوان شده با گزارشات Jahedi و همکاران (۳۳) Trivić و همکاران (۳۴)، afzalpur و همکاران (۳۵) و Kantorowicz و همکارانش (۵) هم‌سو بود. می‌توان گفت در کل دو منبع اصلی تولید ROS هنگام و پس از فعالیت بدنی، زنجیره انتقال الکترون میتوکندری و مسیرهای اکسایش NADPH هستند. ROS تعادل سیستم عصبی خودمختار را مختل می‌کند و به تسلط نسبی سمپاتیک و کاهش اثرگذاری واگ منجر می‌شود، که به‌وضوح بر عملکرد متابولیک تأثیر می‌گذارد (۱۴). علاوه‌براین التهاب هنگام و بعد از تمرین بدنی تولید ROS را افزایش می‌دهد (۸). در هنگام فعالیت بدنی، مصرف اکسیژن همراه با افزایش فعالیت متابولیک افزایش می‌یابد و این به تولید ROS و نشت الکترون از زنجیره انتقال الکترون میتوکندری منجر می‌شود، در نتیجه بسیاری از اشکال اکسیژن فعال مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل ظاهر می‌شوند (۹). مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت بدنی زیر بیشینه تغییرات فیزیولوژیکی و

اضافی رادیکال‌های  $O_2^*$  را افزایش می‌دهد (۸). به‌طور کلی، مطالعات افزایش تولید ROS در نتیجه تمرینات بدنی به مواردی چون میزان آمادگی فردی، جنسیت، شدت، مدت زمان و نوع تمرین بستگی دارد. ما در پژوهش حاضر به این نتیجه رسیدیم که مصرف غذای پرچرب موجب کاهش ژن *Bmal1* در بافت پانکراس می‌گردد. که با ادعاهای Petrenko و همکاران (۳۷)، Lee و همکارانش (۳۸) و Petrenko و همکاران (۳۹) هم‌سو است. سیستم شبانه‌روزی برای کنترل متابولیسمی و تنظیم عملکرد بافت پانکراس ضروری است، و فقدان *Bmal1* اختلال در پتانسیل تکثیر و بازسازی سلول‌های بتا را در پی دارد (۴۰) هم‌چنین کمبود این فاکتور به هایپرگلیسمی می‌انجامد (۳۹). مطالعات اپیدمیولوژیک در انسان نشان می‌دهد ناهماهنگی شبانه‌روزی ممکن است به ایجاد بیماری‌های متابولیک، مانند چاقی و دیابت نوع ۲ (T2D) منجر شود، به‌علاوه ساعت شبانه‌روزی در سلول‌های  $\alpha$  و  $\beta$  انسان در T2D به خطر می‌افتد، در واقع کاهش *Bmal1* اگر سیتوز انسولین را کاهش می‌دهد (۳۷). مطابق نتایج تحقیق حاضر، انجام فعالیت بدنی استقامتی موجب بهبود وضعیت *Bmal1* شده و مقدار آن را در پانکراس موش‌های دیابتی افزایش می‌دهد. که با گزارشات Dalbram و همکارانش (۱۰) هم‌سو است. و انجام فعالیت استقامتی صرف نظر از زمان آن، فراوانی پروتئین اصلی اجزای ساعت، *Bmal1* و *CLOCK* را افزایش می‌دهد، البته مصرف HFD، به عنوان یک عامل منفی اثرگذار بر ریتم شبانه‌روزی جذب گلوکز تحریک شده با انسولین را کاهش می‌دهد، در حالی که فعالیت استقامتی این اثر را خنثی می‌کند (۱۰). مطابق نتایج پژوهش ما انجام ۸ هفته فعالیت در فاز تاریکی باعث کاهش معنی‌دار OSI نسبت به فاز روشنایی شد. به‌علاوه، اختلاف افزایش ژن ساعت مولکولی *Bmal1* در فاز تاریکی نسبت به فاز روشنایی معنی‌دار است. در خصوص زمان انجام تمرین در پژوهش حاضر اختلاف معنی‌داری بین فعالیت در فاز روشنایی و فاز تاریکی موش‌های دیابتی مشاهده شد که از بین مطالعات انجام شده نتایج ما با نتایج Savikj و همکارانش (۴۱)، Dalbram و همکارانش

ایمنی قابل توجهی در شرایط استرس اسمزی و اکسیداتیو ایجاد می‌کند (۸). در درون پانکراس هنگام فعالیت بدنی مسیر ERK1/2 توسط  $H_2O_2$  فعال و تأثیر  $H_2O_2$  بر تمایز سلول  $\beta$  با مهارکننده مسیر ERK1/2 انجام می‌شود (۶). فعال شدن ERK1/2 توسط فشار اکسایشی موید این فرضیه است که مقادیر کم و کافی ROS خواص میتوژنیک دارد (۳۵). در مجموع، این داده‌ها نشان می‌دهد که رشد سلول‌های غدد درون‌ریز پانکراس بستگی زیادی به ROS دارد (۶). در مطالعات انجام شده روی بافت‌ها دلیل افزایش OSI تلاش بافت برای رفع شرایط استرس اکسایشی گزارش شده است (۳۶). به‌طور کلی فعالیت بدنی منظم با شدت متوسط به بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی کمک می‌کند. نتایج بدست آمده با گزارشات Kurkcu و همکاران (۹)، Trivić و همکاران (۳۴)، Kazemi و همکاران (۱۵) نا هم‌سو است، که دلیل آن احتمالاً تفاوت در شدت و مدت زمان فعالیت است، چراکه پس از فعالیت بدنی کوتاه مدت تعادل بین استرس اکسیداتیو و وضعیت آنتی‌اکسیدانی به جهت افزایش اکسیدان‌ها و کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها به سمت فشار اکسایشی حرکت می‌کند (۴،۹). مطالعات ذکر شده غالباً بر روی فعالیت‌های حاد و کوتاه مدت متمرکز بود. البته مطالعه Trivić و همکارانش فعالیت هوازی به مدت ۴ هفته روی کشتی‌گیران بود که شدت این ورزش نیز بالا شناخته شده است (۳۴). ادبیات علمی تخصصی شواهدی مبنی بر ارتباط بین فعالیت بدنی با شدت بالا و تولید بیش‌ازحد رادیکال‌های آزاد را نشان می‌دهد. علاوه‌براین، فعالیت بدنی تا رسیدن به خستگی، به افزایش استفاده از مسیر اکسیداتیو تولید انرژی و تولید ROS منجر می‌شود که باعث ایجاد فشار اکسایشی حاد می‌گردد (۸). هرچند اگر فعالیت بدنی بی‌هوازی را مستقل از تامین اکسیژن انجام دهیم بازهم تولید بیش‌ازحد ROS داریم، که حضور ROS در طول این نوع فعالیت احتمالاً به دلیل ساز و کارهای دیگر است. هم‌چنین باید توجه داشت که تحت شرایط بی‌هوازی، استرس متابولیک، تخریب آدنوزین تری فسفات (ATP) را افزایش داده و مسیر گزانتین اکسیداز (XO) را فعال می‌کند و بدین‌صورت تولید



PERARNT-HIF1 $\alpha$ /HIF1 $\beta$  دارای عوامل رونویسی حوزه- HIF1 $\alpha$ /HIF1 $\beta$  با ساختارهای مشابه هستند، بیان ژن فعال شده با هیپوکسی شامل ژنهای ساعت نیز هست و می‌تواند در میزان تغییر آن نقش داشته باشد (۱۱). کاهش *Bmal1* باعث اختلال در جذب گلوکز عضلات اسکلتی تحریک‌شده با انسولین و تحمل گلوکز کل بدن می‌گردد. برعکس، افزایش بیان *CLOCK* و *Bmal1* مقاومت به انسولین را بهبود داده و تحمل انسولین را در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ بهبود می‌بخشد (۱۰). احتمالاً مسیرهای سیگنال‌دهی رایج تغییردهنده ساعت توسط فعالیت بدنی شامل فعال‌سازی عصبی سمپاتیک و انتشار گلوکوکورتیکوئید می‌باشد (۱۶). احتمالاً تجمع ROS باعث اکسیداسیون کوفاکتور NADPH و جابجایی زیرواحد  $\beta$  کانال  $K^+$  می‌شود که در نهایت به تحریک خواب می‌انجامد، مطالعات جدید نشان می‌دهند ژنهای ساعت خواص ردوکس دارند و ممکن است مستقیماً تحت تأثیر تجمع آدنوزین قرار گیرند، که یک ساز و کار مولکولی قابل دوام برای برهم‌کنش‌های درون سلولی است (۱۴). به این ترتیب، استراتژی‌های درمانی طراحی شده برای تقویت عملکرد ساعت شبانه‌روزی ممکن است برای پیشگیری و درمان دیابت نوع ۲ مفید می‌باشد. از طرفی این نتایج با نتایج *Kloc* و همکارانش (۴۵)، *Toghi-Eshghi* و *Yardley* (۴۶)، *Chiang* و همکارانش (۴۷) ناهمسو بود. در پژوهش *Kloc* و همکارانش آزمودنی‌ها افراد مبتلا به CAD/T2DM بودند که تعدادی از جلسات تمرین را به‌صورت داوطلبانه در منزل اجرا می‌کردند که این موضوع کنترل بر اجرای صحیح پروتکل ورزشی را کاهش می‌دهد. فعالیت مورد مطالعه *Toghi-Eshghi* و *Yardley* تمرین مقاومتی حاد در دو نوبت ۷ صبح و ۵ بعداز ظهر بود. پژوهش *Chiang* و همکارانش نیز روی افراد مبتلا به دیابت به مدت ۱۲ هفته بود. به‌طورکلی، از دلایل ناهمخوانی مطالعات می‌توان به نوع و شدت فعالیت، زمان انجام فعالیت‌ها نیز اشاره کرد. در برخی مطالعات آمده است، سیگنال دهی PI3KAKT فعال‌شده با انسولین، *Bmal1* را فسفریله و فعالیت رونویسی آن را کاهش می‌دهد. علاوه‌براین، از آنجایی‌که سیگنال‌دهی

(۱۰)، *Heden* و *Kanaley* (۴۲)، *Mancilla* و همکارانش (۴۳) همسو بود. برطبق مطالعات، فعالیت ورزشی اختلالات شبانه‌روزی را بهبود می‌بخشد، زیرا می‌تواند سیستم ساعت داخلی را تغییر فاز داده یا تنظیم مجدد کند. در واقع انجام فعالیت ورزشی در زمان مشخصی از روز را به‌عنوان اصلاح‌کننده ناهماهنگی ساعت شبانه‌روزی و موثر بر متابولیسم انرژی است (۱۰). افراد مبتلا به T2DM- برعکس افراد سالم -ریتم شبانه‌روزی، حساسیت انسولین و گلیسمی بهتری در شب دارند اما در طول شب و اوایل صبح شرایط برای فعالیت نامساعد می‌شود، در نتیجه میزان قند و چربی خون در هنگام صبح افزایش می‌یابد (۴۱). ترشح ملاتونین در فاز تاریک با کاهش نور افزایش می‌یابد، ملاتونین گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و نیتروژن (RNS) را کاهش می‌دهد و به‌عنوان آبشار آنتی‌اکسیدانی عمل می‌کند. این نه تنها فشار اکسایشی ناشی از فعالیت بدنی را کاهش می‌دهد، بلکه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز را نیز افزایش می‌دهد. فعالیت بدنی، مدت فعالیت و زمان آن در روز اثرات فوری و یا تاخیری بر ترشح ملاتونین دارند. ترکیب فعالیت بدنی هوازی و ملاتونین باعث کاهش رادیکال‌های آزاد ناشی از فعالیت بدنی می‌شوند. ملاتونین، به ویژه زمانی که با تمرین هوازی همراه باشد، می‌تواند پراکسیداسیون لیپیدی و مالون دی‌آلدئید را کاهش دهد. هم‌چنین بوسیله ممانعت از ROS ناشی از فعالیت بدنی، باعث افزایش سلامت بدن و سازگاری وابسته با فعالیت بدنی شود (۴۴). به‌علاوه دیابت موجب کاهش *Bmal1* می‌شود (۱۰) درحالی‌که بیان این ژن در کنترل ژن‌های متابولیکی دخیل است (۱۳). وضعیت متابولیک سلولی می‌تواند بر سطوح NAD<sup>+</sup>/NADH و آنزیم‌های وابسته، مانند SIRT1 و PARP1 تأثیر بگذارد، باید گفت، فعالیت‌بدنی این مسیرها را تحریک می‌کند (۱۱). کاهش سطح اکسیژن (هیپوکسی) در بافت‌های موضعی، پس از فعالیت بدنی دیده می‌شود. فاکتور القاکننده هیپوکسی (HIF 1 $\alpha$ ) در شرایط هیپوکسی فعال شده و بیان ژن‌هایی را برای پاسخ به آن القا می‌کند. از آنجایی‌که هر دو *CLOCK/BMAL1* و

پرداخت و مقایسه بین آن‌ها نبوده است، لذا انجام پژوهش‌هایی با موارد عنوان شده پیشنهاد می‌گردد.

### نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، نتایج پژوهش حاضر نشان داد، بیماری دیابت با توجه اختلالاتی که در متابولیسم بافت‌های گوناگون ایجاد می‌کند موجب افزایش مقاومت انسولینی و OSI بافت پانکراس می‌شود و هم‌چنین غلظت پروتئین *Bmal1* را در این بافت کاهش می‌دهد. انجام ۸ هفته فعالیت استقامتی در ابتدای فاز تاریکی نسبت به ابتدای فاز روشنایی، موجب بهبود بیشتر مقاومت انسولینی و OSI بافت پانکراس در موش‌های دیابتی می‌شود. همین‌طور غلظت پروتئین *Bmal1* را در این بافت افزایش می‌دهد. لذا می‌توان از نتایج این پژوهش در تدوین پروتکل‌های ورزشی مناسب‌تر و سازگار با ریتم شبانه‌روزی برای بیماران مبتلا به دیابت استفاده کرد.

### سپاس‌گزاری

مقاله حاضر برگرفته از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی دانشگاه تهران می‌باشد. بدین‌وسیله از تمامی دوستانی که در این امر یاری کرده‌اند، قدردانی به عمل می‌آید.  
حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

انسولین ممکن است با گرسنگی طولانی‌مدت تقویت شود، تغذیه مجدد پس از یک دوره ناشتایی طولانی، اثر قوی‌تری بر ژن‌های ساعت اعمال می‌کند (۱۱). بعلاوه نوع آزمودنی‌ها و گونه موش‌های مورد مطالعه عامل دیگری در تغییر نتایج است چراکه در برخی سویه‌ها مقاومت انسولینی ایجاد شده بر اثر HFD بیشتر است (۱۰). در مجموع، در پژوهش حاضر ما نشان دادیم که انجام تمرین استقامتی در ابتدای فاز تاریکی نسبت به ابتدای فاز روشنایی، می‌تواند ژن‌های اصلی ساعت را موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ افزایش دهد و در بهبود مقاومت انسولینی و شاخص فشار اکسایشی این آزمودنی‌ها مفید باشد. از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به عدم کنترل میزان غذای مصرفی، عدم سنجش عوامل مورد نظر در سایر ساعت‌های شبانه‌روز (مثل بعداز ظهر) و هم‌چنین ارزیابی سایر ژن‌های وابسته به ریتم شبانه‌روزی اشاره کرد، علاوه بر این پرداختن به اثرگذاری فعالیت ورزشی در ساعات مختلف در سایر بافت‌های مهم در دیابت، نظیر کبد و عضله نیز شایان توجه است. هم‌چنین برخی مطالعات انجام فعالیت‌های با شدت بالا مثل HIIT را بر متابولیسم سلول موثرتر از فعالیت استقامتی دانسته‌اند (۱۰)، که در پژوهش حاضر مجالی برای

### References:

- 1-Kung CP, Murphy ME. *The Role of the P53 Tumor Suppressor in Metabolism and Diabetes*. The J Endocrinol 2016; 231(2): R61-75.
- 2-Jiang WJ, Peng YC, Yang KM. *Cellular Signaling Pathways Regulating B-Cell Proliferation as a Promising Therapeutic Target in the Treatment of Diabetes*. Experimental and Therapeutic Medicine 2018; 16(4): 3275-85.
- 3-Dimauro I, Sgura A, Pittaluga M, Magi F, Fantini C, Mancinelli R, Sgadari A, Fulle S, Caporossi D. *Regular Exercise Participation Improves Genomic Stability in Diabetic Patients: an Exploratory Study to Analyse Telomere Length and DNA Damage*. Sci Rep 2017; 7(1): 1-2.
- 4-Riahi S, Mohammadi MT, Sobhani V. *Role of Oxygen and Nitrogen Free Radicals in Diabetes-*

- Induced Atherosclerosis, and Effects of Exercise on It.* *Physiol Pharmacol* 2014; 18(1): 1-5.
- 5-Kantorowicz M, Augustyn G, Więcek M. *Oxidative Stress and Training.* *Antropomotoryka. Journal of Kinesiology and Exercise Sciences. JKES* 2015; 72 (25): 69-78.
- 6-Hoarau E, Chandra V, Rustin P, Scharfmann R, Duvillie B. *Pro-Oxidant/Antioxidant Balance Controls Pancreatic B-Cell Differentiation through the ERK1/2 Pathway.* *Cell Death & Disease* 2014; 5(10): e1487.
- 7-Li N, Liu F, Yang P, Xiong F, Yu Q, Li J, Zhou Z, Zhang S, Wang CY. *Aging and Stress Induced B Cell Senescence and Its Implication in Diabetes Development.* *Aging (Albany NY)* 2019; 11(21): 9947.
- 8-Nunes-Silva A, Freitas-Lima LC. *The Association between Physical Exercise and Reactive Oxygen Species (ROS) Production.* *J Sports Med Doping Stud* 2015; 5(01): 1-7.
- 9-Recep K. *The Effects of Short-Term Exercise on the Parameters of Oxidant and Antioxidant System in Handball Players.* *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2010; 4(7): 448-52.
- 10- Dalbram E, Basse AL, Zierath JR, Treebak JT. *Voluntary Wheel Running in the Late Dark Phase Ameliorates Diet-Induced Obesity in Mice without Altering Insulin Action.* *J Applied Physiology* 2019; 126(4): 993-1005.
- 11- Tahara Y, Shibata S. *Entrainment of the Mouse Circadian Clock: Effects of Stress, Exercise, and Nutrition.* *Free Radical Biology and Medicine* 2018; 119: 129-38.
- 12- Kurose T, Yabe D. *Inagaki N: Circadian Rhythms and Diabetes.* *J Diabetes Investig* 2011; 2(3): 176-77.
- 13- Lee Y. *Roles of Circadian Clocks in Cancer Pathogenesis and Treatment.* *Experimental & Molecular Medicine* 2021:1529-38.
- 14- Parameswaran G, Ray DW. *Sleep, Circadian Rhythms, and Type 2 Diabetes Mellitus.* *Clinical Endocrinology* 2022; 96: 12-20.
- 15- Kazemi M, Marandi SM, Movahedian A, Rezaee Z, Mohammadian H, Emamzadeh SN. *Action of L-Arginin on Oxidative-Nitrosative Stress Induced by Acute Exercise in Muscle of Rats.* *Med J Tabriz Uni Med Sci* 2018; 40(2): 64-71.
- 16- Tahara Y, Aoyama S, Shibata S. *The Mammalian Circadian Clock and its Entrainment by Stress and Exercise.* *J Physiol Sci* 2017; 67(1): 1.
- 17- Khalili R, Hasanzadeh S, Jalali AS, Shahrooze R, Najafi G, Eimani M. *The Effects of Liraglutide on in Vitro Fertilization in Mice Following Experimental Diabetes.* *Qom University of Medical Sciences Journal* 2020; 14(1): 51-60.
- 18- Nazari M, Moghimipour E, Tabandeh MR. *Betaine Down Regulates Apelin Gene Expression in Cardiac and Adipose Tissues of Insulin Resistant Diabetic Rats Fed by High-Calorie Diet.* *International J Peptide Research and Therapeutics* 2017; 23(2): 181-90.
- 19- Chavanelle V, Boisseau N, Otero YF, Combaret L, Dardevet D, Montaurier C, et al. *Effects of High-Intensity Interval Training and Moderate-Intensity Continuous Training on Glycaemic Control and Skeletal Muscle Mitochondrial Function in Db/Db Mice.* *Sci Rep* 2017, 7:1-10.

- 20- Ostler JE, Maurya SK, Dials J, Roof SR, Devor ST, Ziolo MT, et al. *Effects of Insulin Resistance on Skeletal Muscle Growth and Exercise Capacity in Type 2 Diabetic Mouse Models*. American J Physiology-Endocrinology and Metabolism 2014; 306(6): E592-605.
- 21- Sato S, Basse AL, Schönke M, Chen S, Samad M, Altıntaş A, et al. *Time of Exercise Specifies the Impact on Muscle Metabolic Pathways and Systemic Energy Homeostasis*. Cell metabolism 2019; 30(1): 92-110.
- 22- Erel O. *A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using A New Generation, More Stable ABTS Radical Cation*. Clin Biochem 2004; 37(4): 277-85.
- 23- Erel O. *A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status*. Clin Biochem 2005; 38(12): 1103-11.
- 24- Dela F, von Linstow ME, Mikines KJ, Galbo H. *Physical Training May Enhance B-Cell Function in Type 2 Diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2004; 287(5): E1024-31.
- 25- Kirwan JP, Kohrt WM, Wojta DM, Bourey RE, Holloszy JO. *Endurance Exercise Training Reduces Glucose-Stimulated Insulin Levels in 60-to 70-Year-Old Men and Women*. J Gerontol 1993; 48(3): M84-90.
- 26- Slentz CA, Tanner CJ, Bateman LA, Durham MT, Huffman KM, Houmard JA, Kraus WE. *Effects of Exercise Training Intensity on Pancreatic B-Cell Function*. Diabetes Care 2009; 32(10): 1807-11.
- 27- Heiskanen MA, Motiani KK, Mari A, Saunavaara V, Eskelinen JJ, Virtanen KA, et al. *Exercise Training Decreases Pancreatic Fat Content and Improves Beta Cell Function Regardless of Baseline Glucose Tolerance: A Randomised Controlled Trial*. Diabetologia 2018; 61(8): 1817-28.
- 28- Park S, Hong SM, Sung SR. *Exendin-4 and Exercise Promotes B-Cell Function and Mass Through IRS2 Induction in Islets of Diabetic Rats*. Life Sci 2008; 82(9-10): 503-11.
- 29- Malin SK, Solomon TP, Blaszczyk A, Finnegan S, Filion J, Kirwan JP. *Pancreatic B-Cell Function Increases in a Linear Dose-Response Manner Following Exercise Training in Adults with Prediabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metabol 2013; 305(10): E1248-54.
- 30- Oh YS, Bae GD, Baek DJ, Park EY, Jun HS. *Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells during Development of Type 2 Diabetes*. Frontiers in Endocrinol 2018; 9: 384.
- 31- Pi J, Zhang Q, Fu J, Woods CG, Hou Y, Corkey BE, et al. *ROS Signaling, Oxidative Stress And Nrf2 In Pancreatic Beta-Cell Function*. Toxicol Applied Pharmacol 2010; 244(1): 77-83.
- 32- Guichard C, Moreau R, Pessayre D, Epperson TK, Krause K-H. *NOX Family NADPH Oxidases in Liver and in Pancreatic Islets: A Role in the Metabolic Syndrome and Diabetes?* Biochem Soc Trans 2008; 36(5): 920-9.
- 33- Emami A, Sahranavard GA. *Effects of Aerobic Training and Chlorella Consumption on Renal Antioxidant Indices in Male Diabetic Rats*. Journal of Animal Physiology and Development (Quarterly Journal of Biological Sciences) 2020; 13(2): 1-11. [Persian]
- 34- Trivić T, Drid P, Obadov S, Ostojic S. *Effect of Endurance Training on Biomarkers of Oxidative Stress in Male Wrestlers*. Journal of Martial Arts Anthropology 2011; 11(2):6-9.

- 35- Afzalpur ME, Taheri Chadorneshin H. *Physical Activity and Oxidative Stress*. Tehran: Bamdad Ketab; 2015: 51-5. [Persian]
- 36- Uzar E, Tamam Y, Evliyaoglu O, Tuzcu A, Beyaz C, Acar A, et al. *Serum Prolidase Activity and Oxidative Status in Patients with Diabetic Neuropathy*. *Neurol Sci* 2012; 33(4): 875-80.
- 37- Petrenko V, Gandasi NR, Sage D, Tengholm A, Barg S, Dibner C. *In Pancreatic Islets from Type 2 Diabetes Patients, the Dampened Circadian Oscillators Lead to Reduced Insulin and Glucagon Exocytosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2020; 117(5): 2484-95.
- 38- Lee J, Moulik M, Fang Z, Saha P, Zou F, Xu Y, et al. *Bmal1 and B-Cell Clock are Required for Adaptation to Circadian Disruption, and their Loss of Function Leads to Oxidative Stress-Induced B-Cell Failure in Mice*. *Mol Cellular Boil* 2013; 33(11): 2327-38.
- 39- Petrenko V, Philippe J, Dibner C. *Time Zones of Pancreatic Islet Metabolism*. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2018; 20(S2): 116-26.
- 40- Rakshit K, Hsu TW, Matveyenko AV. *Bmal1 is Required for Beta Cell Compensatory Expansion, Survival and Metabolic Adaptation to Diet-Induced Obesity in Mice*. *Diabetologia* 2016; 59(4):734-43.
- 41- Savikj M, Gabriel BM, Alm PS, Smith J, Caidahl K, Björnholm M, et al. *Afternoon Exercise is More Efficacious Than Morning Exercise at Improving Blood Glucose Levels in Individuals with Type 2 Diabetes: A Randomised Crossover Trial*. *Diabetologia* 2019; 62(2): 233-7.
- 42- Heden TD, Kanaley JA. *Syncing Exercise with Meals and Circadian Clocks*. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 2019; 47(1): 22-8.
- 43- Mancilla R, Brouwers B, Schrauwen-Hinderling VB, Hesselink MK, Hoeks J, Schrauwen P. *Exercise Training Elicits Superior Metabolic Effects When Performed in the Afternoon Compared to Morning in Metabolically Compromised Humans*. *Physiol Rep* 2021; 8(24): e14669.
- 44- Rastegar Moghadam Mansouri M, Abbasian S, Khazaie M. *Melatonin and Exercise: Their Effects on Malondialdehyde and Lipid Peroxidation* In: Manuela Drăgoi C, Crenguța Nicolae A, editors. *Melatonin-Molecular Biology, Clinical and Pharmaceutical Approaches*. London: IntechOpen.2018. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/62754> . Access ed Aug 21, 2022.
- 45- Steidle-Kloc E, Schönfelder M, Müller E, Sixt S, Schuler G, Patsch W, Niebauer J. *Does Exercise Training Impact Clock Genes in Patients with Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes Mellitus?*. *Eur J Prev Cardiol* 2016; 23(13): 1375-82.
- 46- Toghi-Eshghi SR, Yardley JE. *Morning (Fasting) Vs Afternoon Resistance Exercise in Individuals with Type 1 Diabetes: A Randomized Crossover Study*. *J Clinical Endocrinol & Metab* 2019; 104(11): 5217-24.
- 47- Chiang SL, Heitkemper MM, Hung YJ, Tzeng WC, Lee MS, Lin CH. *Effects of a 12-Week Moderate-Intensity Exercise Training on Blood Glucose Response in Patients With Type 2 Diabetes: A Prospective Longitudinal Study*. *Medicine* 2019; 98(36): e16860.



## Effect of Eight Weeks of Endurance Training in Light and Dark Phases of Circadian Rhythm on the Oxidative Stress Index in Pancreas of Diabetic Mice

Maryam Janbozorgi<sup>1</sup>, Abassali Gaini<sup>\*2</sup>, Siroos Choobineh<sup>2</sup>, Mohammad Reza Tabandeh<sup>3</sup>

### Original Article

**Introduction:** Chronic hyperglycemia is associated with an increase in cellular damage due to oxidative stress in pancreatic tissue. The effect of exercise in different phases of the circadian cycle on protecting pancreatic tissue from oxidative stress in diabetic patients is unknown. The aim of this study was to investigate the effect of eight weeks of endurance training in light and dark phases of circadian rhythm on the oxidative stress index in pancreas of diabetic mice.

**Methods:** In this study, 18 mice from the Naval Medical Research Institute (26.3±3.22 gr) were selected and after inducing diabetes through high-fat food and Streptozotocin injection (20 mg/kg), randomly divided into 6 groups: light phase healthy control, dark phase healthy control, light phase diabetic control, dark phase diabetic control, light phase diabetic training and dark phase diabetic training. The endurance training protocol (50-60 %Vmax) was performed 5 d/w for 8 weeks. After anesthesia, blood samples and pancreatic tissues were removed. Insulin resistance markers, oxidative stress index and expression of Brain and Muscle ARNT-Like1 protein expression were measured in pancreas of diabetic rats. Data were analyzed by one way analysis of variance at the significance level of  $p < 0.05$ .

**Results:** The eight weeks of endurance training significantly decreased insulin resistance markers ( $p = 0.005$ ), oxidative stress index ( $p < 0.05$ ) and significantly increased the Bmal1 protein expression ( $p = 0.009$ ). The mean values of all variables showed significant differences between light and dark phases.

**Conclusion:** Endurance training may improve insulin sensitivity and oxidant damage in diabetic conditions by increasing the function of the antioxidant system and the expression of Circadian regulation proteins. Activity in the dark phase causes further increases the metabolism of cells. As a result, performing these types of exercises in the dark phase is recommended to these patients as a new treatment strategy.

**Keywords:** Diabetes, , Endurance Training, Oxidative Stress, Bmal1

**Citation:** Janbozorgi M, Gaini A.A, Choobineh S, Tabandeh M.R. **Effect of Eight Weeks of Endurance Training in Light and Dark Phases of Circadian Rhythm on the Oxidative Stress Index in Pancreas of Diabetic Mice.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 30(6): 4973-86.

<sup>1-2</sup>Department of Sport Physiology, University of Tehran, Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

\*Corresponding author: Tel: 021-61118820, email: aagaeini@ut.ac.ir