

## تأثیر هشت هفته تمرین هوازی بر میزان بیان ژن‌های مسیر پیش‌التهابی HMGB1-RAGE/TLR4-NF-kB در بافت قلبی موش‌های صحرائی نر دارای هایپرگلیسمی

حمید تقی بیگی حسین آبادی<sup>۱</sup>، دکتر فهیمه اسفرجانی<sup>۱</sup>، دکتر سیدمحمد مرندی<sup>۱</sup>، دکتر هادی کرمی<sup>۲</sup>

۱) گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، ۲) گروه پزشکی مولکولی و بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: اصفهان، خیابان هزار جریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دکتر فهیمه اسفرجانی؛  
e-mail: f.esfarjani@spr.ui.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** التهاب نقش مهمی در بیماری‌زایی کاردیومیوپاتی دیابتی دارد. بیان ژن HMGB1 که یک سایتوکاین پیش‌التهابی است و ژن‌های دخیل در مسیر پیام‌رسان پایین‌دست آن در دیابت افزایش می‌یابد. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر هشت هفته تمرین هوازی بر میزان بیان ژن‌های مسیر HMGB1-RAGE/TLR4-NF-kB در بافت قلبی موش‌های صحرائی نر دارای هایپرگلیسمی بود. مواد و روش‌ها: سی و شش سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی  $25 \pm 23.1$  گرم به طور تصادفی به سه گروه ۱۲ تایی (شاهد سالم، هایپرگلیسمی شاهد و هایپرگلیسمی آزمون) تقسیم شدند. هایپرگلیسمی با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین و نیکوتین‌آمید القاء شد. چهل و هشت ساعت پس از اتمام برنامه تمرینی (هشت هفته تمرین هوازی)، بافت قلبی تحت شرایط استریل جدا گردید. میزان بیان ژن‌های HMGB1، RAGE، TLR4 و NF-kB به وسیله روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام شد و سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. یافته‌ها: میزان بیان ژن‌های HMGB1، RAGE، TLR4 و NF-kB در بافت قلبی گروه هایپرگلیسمی شاهد نسبت به گروه شاهد سالم به طور معنی‌داری ( $P < 0.001$ ) افزایش یافت. هشت هفته تمرین هوازی باعث کاهش بیان ژن‌های مورد مطالعه شد ( $P < 0.001$ ). نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرین هوازی می‌تواند از طریق کاهش بیان ژن‌های HMGB1، RAGE، TLR4 و NF-kB در بافت قلبی موش‌های صحرائی دارای هایپرگلیسمی از اثرات منفی هایپرگلیسمی جلوگیری کند که این موضوع می‌تواند یک سازوکار مهم برای عملکرد قلبی و پیش‌گیری از کاردیومیوپاتی دیابتی باشد.

**واژگان کلیدی:** تمرین هوازی، HMGB1، RAGE، TLR4، NF-kB، کاردیومیوپاتی دیابتی، هایپرگلیسمی

دریافت مقاله: ۹۷/۷/۱۴ - دریافت اصلاحیه: ۹۷/۱۰/۱۷ - پذیرش مقاله: ۹۷/۱۰/۲۲

### مقدمه

تا ۲۲ درصد گزارش شده است.<sup>۱</sup> DCM باعث ایجاد تغییرات غیرطبیعی در ساختار و عملکرد قلب می‌شود که این تغییرات مستقل از فشار خون، بیماری شریان کرونری و یا هر بیماری شناخته شده قلبی دیگر است.<sup>۲</sup> دیابت عموماً با یک التهاب خفیف مزمن همراه است و شواهد روشنی مبنی بر نقش فرآیندهای التهابی در DCM وجود دارد.<sup>۳</sup>

دیابت یکی از شایع‌ترین اختلالات متابولیکی در جهان است که عوارض مختلفی به دنبال آن ایجاد می‌شود.<sup>۱</sup> یکی از این عوارض، کاردیومیوپاتی دیابتی<sup>۱</sup> (DCM) است که از جمله دلایل اصلی مرگ و میر در بیماران مبتلا به دیابت محسوب می‌شود.<sup>۲</sup> شیوع DMC در بین بیماران دیابتی ۱۲

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی - کاربردی بوده و به منظور انجام آن از ۳۶ سر موش صحرایی نر سالم نژاد ویستار ۶ تا ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی  $25 \pm 231$  گرم که از دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله تهران تهیه شده بودند، استفاده شد. حیوانات در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد، چرخه ۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی و با دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس‌های پلی‌اتیلنی ۶ تایی نگهداری شدند. پروتکل‌های آزمایشی توسط کمیته اخلاق دانشگاه اصفهان (IR.U.LREC.1396.061) تأیید شد. پس از دو هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید، ابتدا موش‌های صحرایی به طور تصادفی به دو گروه شاهد سالم (۱۲ سر) و هایپرگلیسمی<sup>vii</sup> (۲۴ سر) تقسیم شدند. پس از القای هایپرگلیسمی، مجدداً موش‌های صحرایی این گروه به طور تصادفی به دو گروه هایپرگلیسمی شاهد (۱۲ سر) و هایپرگلیسمی آزمون (۱۲ سر) تقسیم شدند.

**نحوه القاء هایپرگلیسمی:** بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی، ۱۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، نیکوتین آمید<sup>viii</sup> (ساخت شرکت سیگما، آمریکا) حل شده در نرمال سالین<sup>ix</sup> به صورت داخل صفاقی تزریق شد و بعد از ۱۵ دقیقه، ۶۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین<sup>x</sup> (STZ، سیگما، آمریکا، محلول در بافر سیترات (۰/۱) مولار و PH=۴/۵)) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. با گذشت ۷۲ ساعت، میزان قند خون پس از ۱۲ ساعت ناشتایی توسط دستگاه گلوکومتر (بیورر مدل GL42، ساخت کشور آلمان) با نمونه‌گیری از انتهای دم موش‌های صحرایی اندازه‌گیری شد و موش‌های صحرایی که میزان قند خون آن‌ها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود به عنوان موش‌های صحرایی دارای هایپرگلیسمی در نظر گرفته شدند.<sup>xi</sup>

**برنامه تمرینی هوازی:** پیش از اجرای برنامه تمرین، گروه هایپرگلیسمی آزمون با دویدن به مدت ۵ روز متوالی با سرعت ۱۰ متر در دقیقه با شیب صفر درصد و به مدت ۱۰ دقیقه با نوارگردان ۵ کاناله آشنا شدند و پس از آن

HMGB1<sup>i</sup> یک پروتئین هسته‌ای است که در هسته و سیستم‌پلاسم تقریباً تمامی انواع سلول‌ها وجود دارد<sup>i</sup> و نقش مهمی در فرآیندهای التهابی<sup>i</sup> و عوارض دیابت<sup>v</sup> ایفا می‌کند. اثر پیش‌تهابی این پروتئین از طریق اتصال به گیرنده‌ی RAGE<sup>ii</sup> و گیرنده‌های TLR<sup>iii</sup> اعمال شده<sup>v</sup> و از طریق تعامل تعامل با آن‌ها، در نهایت منجر به فعال‌سازی NF-kB<sup>iv</sup> و تولید سایتوکاین‌های پیش‌تهابی از جمله اینترلوکین ۶ و  $1\beta$  و همچنین فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا ( $IL-6^v$ ، IL-1B، TNF- $\alpha^{vi}$ ) می‌گردد.<sup>vi</sup> اخیراً نقش این پروتئین به عنوان یک مؤلفه کلیدی در دیابت،<sup>v</sup> نارسایی قلبی<sup>vii</sup> و ایجاد و پیشرفت DCM<sup>viii</sup> مورد توجه قرار گرفته است. بر اساس مطالعات انجام شده مهار ژنتیکی HMGB1 باعث کاهش آپوپتوز، فیبروز و تغییر شکل میوکارد و همچنین کاهش اختلال عملکرد قلبی در DCM می‌شود.<sup>ix</sup> TNF- $\alpha$  نیز یکی از فاکتورهای مهم التهابی است که بیان ژن آن در بافت قلبی موش‌های صحرایی دیابتی افزایش می‌یابد و نقش مهمی در ایجاد DCM ایفا می‌کند.<sup>x</sup> بررسی‌ها نشان می‌دهد که HMGB1 از واسطه‌های مهم بیان ژن TNF- $\alpha$  در سلول‌های قلبی موش‌های دیابتی می‌باشد.<sup>xi</sup>

در سال‌های اخیر، از تمرینات ورزشی به عنوان یک استراتژی غیردارویی برای کنترل دیابت و عوارض ناشی از آن استفاده شده است.<sup>xii</sup> تمرینات ورزشی با کاهش ترشح سایتوکاین‌های التهابی و افزایش ترشح سایتوکاین‌های ضد التهابی در کنترل بیماری‌های مرتبط با التهاب نظیر دیابت، نقشی اساسی دارند.<sup>xiii</sup> تمرینات هوازی بلندمدت موجب کاهش سطوح HMGB1 در خون و بافت بیماران مبتلا به سکته قلبی<sup>xiv</sup> و زنان مبتلا به سرطان سینه می‌شود.<sup>xv</sup> با این حال، نظر به این که مطالعات اندکی در این زمینه انجام گرفته است، سازوکارهای دقیق تأثیر تمرینات ورزشی بر این پروتئین و مسیر پایین دست آن در بیماران دیابتی کاملاً شناخته شده نیست. از این رو، هدف این مطالعه بررسی تأثیر هشت هفته تمرین هوازی بر بیان ژن‌های مسیر پیش‌تهابی HMGB1-RAGE/TLR4-NF-kB در بافت قلبی موش‌های صحرایی نر دارای هایپرگلیسمی می‌باشد.

i- High mobility group box 1

ii- Receptor for advanced glycation end products

iii - Toll-like receptors

iv - Nuclear Factor Kappa B

v - Interleukin 6

vi - Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

vii - Hyperglycemia

viii - Nicotinamide

ix - Normal saline

x - Streptozotocin

شد<sup>۱۷</sup> (جدول ۱). این برنامه بر اساس اصول انجمن علمی ACSM<sup>i</sup> و به صورت فزاینده طراحی شد.<sup>۱۷</sup>

تمرین هوازی به مدت هشت هفته، پنج جلسه در هفته و با شدت تقریبی ۶۵ تا ۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی اجرا

### جدول ۱- برنامه تمرین هوازی

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
سرعت (متر بر دقیقه)	۱۲	۱۲	۱۶	۱۶	۲۰	۲۰	۲۴	۲۴
مدت (دقیقه)	۱۵	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۴۰	۴۵	۴۵
شیب (درصد)	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵

نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به شیوه اسپکتروفوتومتری برای تمامی نمونه‌های استخراج شده بین ۱/۸ تا ۲ بود. به منظور سنتز cDNA، ۵ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از دستورالعمل کیت First standard cDNA synthesis (تاکارا، ژاپن) و به وسیله پرایمرهای Oligo-dT به cDNA تبدیل گردید.

**Real-time qPCR:** واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه و طولی سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه، انجام شد. PCR توسط دستگاه Lightcycler96 (Roche- آلمان) و مسترمیکس سایبرگرین<sup>iv</sup> (یکتا تجهیز، ایران) و به صورت سه بار تکرار (Triplicate) انجام شد. کنترل‌های منفی فاقد cDNA و فاقد آنزیم جهت بررسی آلودگی و صحت کارآیی PCR در تمام آزمایشات لحاظ شد. پرایمرهای مورد نیاز توسط نرم‌افزار Primer3 طراحی گردید (جدول ۲).

**نمونه‌گیری بافتی:** چهل و هشت ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و پس از ۱۴ ساعت ناشتایی، موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین<sup>ii</sup> (۱۰ درصد و با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین<sup>iii</sup> (۲ درصد و با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. پس از باز کردن قفسه سینه، بخشی از بافت قلبی تحت شرایط استریل خارج شد و پس از پاکسازی از بافت چربی و هم‌بند، بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفته و تا انجام آزمایشات سلولی- مولکولی، در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌گیری بافتی هر سه گروه در یک روز انجام شد.

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** به منظور استخراج RNA، ۵۰ میلی‌گرم از بافت قلبی با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر معرف RNX Plus (سینا ژن، ایران) هموژن گردید. سپس مراحل مختلف طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA تا مرحله نهایی و تهیه RNA خالص انجام شد. محلول RNA استخراج شده با آنزیم DNase I از هر گونه آلودگی به DNA و آنزیم‌های تخریب‌کننده RNA پاکسازی شد.

### جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Genes	Primer sequence	Tm (°C)	Product size	Gene Bank
<b>β-actin</b>	F: CGTTGACATCCGTAAGACCTC	59.08	110 bp	NM_031144.3
	R: TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT	60.06		
<b>HMGB1</b>	F: GTAATTTTCCGCGCTTTTGT	55.86	114 bp	NM_012963.2
	R: TCATCCAGGACTCATGTTTCAGT	58.82		
<b>RAGE</b>	F: CTACCTATTCCTGCAGCTTC	55.33	346 bp	XM_006256025.2
	R: CTGATGTTGACAGGAGGGCTTTC	63.44		
<b>TLR4</b>	F: GGATGATGCCTCTCTTGCAT	57.73	127 bp	NM_019178.1
	R: TGATCCATGCATTGGTAGTAA	57.21		
<b>NF-κB</b>	F: CGATCTGTTTCCCCTCATCT	56.71	174 bp	NM_199267.2
	R: ATTGGGTGCGTCTTAGTGGT	59.31		

i- American College of Sports Medicine

ii- Ketamine

iii- Xylazine

iv- SYBR Green Master Mix

v- β-actin

و آزمون تعقیبی توکی<sup>iv</sup> انجام شد و سطح معنی داری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، بعد از هشت هفته تمرین هوازی، وزن موش‌های صحرایی گروه هایپرگلیسمی آزمون نسبت به گروه هایپرگلیسمی شاهد کاهش یافت ولی از نظر آماری معنی دار نبود.

پس از اتمام واکنش PCR، منحنی‌های تکثیر و ذوب مورد ارزیابی قرار گرفتند و با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  میزان بیان ژن‌های HMGB1، RAGE، TLR4 و NF-kB در هر گروه نسبت به گروه شاهد محاسبه شد. ژن بتا اکتین<sup>i</sup> به منظور کنترل داخلی لحاظ شد.

تجزیه تحلیل آماری: برای چک کردن توزیع نرمال از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف<sup>ii</sup> استفاده شده است. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه<sup>iii</sup>

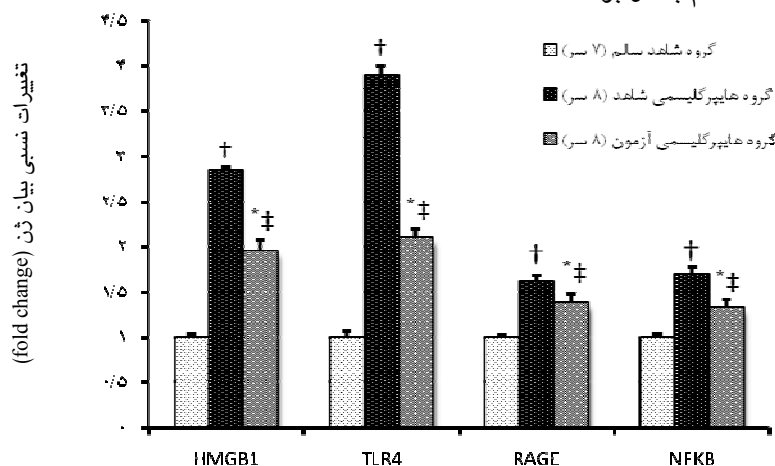
جدول ۳- میانگین و انحراف معیار وزن و گلوکز خون گروه‌های مختلف تحقیق

گروه‌ها			متغیرها
هایپرگلیسمی آزمون (۸ سر)	هایپرگلیسمی شاهد (۸ سر)	شاهد سالم (۷ سر)	
$220.0 \pm 34^*$	$250.7 \pm 48$	$279.4 \pm 28$	وزن بدن (گرم)
$179.3 \pm 34^\ddagger$	$325 \pm 22^\ddagger$	$73.4 \pm 8$	گلوکز خون ناشتا (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)

\* نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه هایپرگلیسمی آزمون و گروه شاهد سالم، † نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه هایپرگلیسمی شاهد و گروه شاهد سالم، ‡ نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه هایپرگلیسمی آزمون و گروه هایپرگلیسمی شاهد

بیان ژن‌های HMGB1 (۲/۸۵ برابر)، RAGE (۱/۶ برابر)، TLR4 (۳/۹ برابر) و NF-KB (۱/۷ برابر) در گروه هایپرگلیسمی شاهد نسبت به گروه شاهد سالم به طور معنی داری ( $P=0.001$ ) بالاتر بود (نمودار ۱).

غلظت گلوکز خون ناشتای گروه هایپرگلیسمی شاهد نسبت به گروه شاهد سالم افزایش معنی داری ( $P=0.001$ ) یافت. هشت هفته آزمون هوازی، باعث کاهش غلظت گلوکز خون ناشتای گروه هایپرگلیسمی آزمون نسبت به گروه هایپرگلیسمی شاهد شد ( $P=0.001$ )، با این حال میزان غلظت آن نسبت به سطح گلوکز خون گروه شاهد سالم بالاتر بود.



نمودار ۱- میانگین و انحراف معیار مقادیر بیان ژن‌های HMGB1 (High mobility group box1)، RAGE (products) و TLR4 (Toll-like receptors) و Nuclear Factor Kappa B NF-kB در بافت قلبی گروه‌های مورد مطالعه

\* نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه هایپرگلیسمی آزمون و گروه شاهد سالم، † نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه هایپرگلیسمی شاهد و گروه شاهد سالم، ‡ نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه هایپرگلیسمی آزمون و گروه هایپرگلیسمی شاهد

i-  $\beta$ -actin  
 ii- Kolmogorov-Smirnov test  
 iii- One way analysis of variance test  
 iv- Tukey's post hoc test

کاهش بیان گیرنده‌ی TLR4 ناشی از تمرین هوازی، تنها در شرایط التهابی یا مقاومت انسولینی (نظیر دیابت و چاقی) ایجاد می‌شود.<sup>۲۴</sup>

همسو با مطالعه حاضر، مشخص شده است که تمرینات ورزشی موجب کاهش بیان گیرنده RAGE در بافت قلبی موش‌های دیابتی<sup>۲۵</sup> و آئورت موش‌های مسن می‌گردد.<sup>۲۶</sup> البته RAGE محلول<sup>iii</sup> (sRAGE) نیز در بیماران دیابتی مورد مطالعه قرار گرفته و گزارش شده است که ارتباط منفی معنی داری بین sRAGE و التهاب عروقی وجود دارد<sup>۲۷</sup> و تمرینات ورزشی منظم موجب افزایش آن در گردش خون بیماران مبتلا به دیابت می‌شود.<sup>۲۸</sup> sRAGE با اتصال به لیگاندهای خود نظیر AGE<sup>iv</sup> و HMGB1 به عنوان یک مهارکننده رقابتی برای لیگاندهای فعال کننده RAGE عمل کرده و با از کار انداختن اکتودومین<sup>v</sup> گیرنده مرتبط با غشاء، باعث عدم اتصال لیگاندها به گیرنده می‌گردد.<sup>۲۷، ۲۹</sup> از آنجایی که در شرایط قند خون طبیعی، این گیرنده تا سطوح پایه کاهش یافته و افزایش قند خون مزمن باعث افزایش بیان این گیرنده می‌شود،<sup>۳۰، ۳۱</sup> تأثیر کاهشی تمرینات هوازی (از جمله مطالعه حاضر) بر سطح قند خون بیماران دیابتی نیز ممکن است از جمله سازوکارهای کاهش بیان RAGE در بافت قلبی موش‌های صحرایی دیابتی محسوب شود.

در پژوهش حاضر، هشت هفته تمرین هوازی موجب کاهش میزان بیان ژن NF-kB در بافت قلبی گروه هایپرگلیسمی آزمون شد. هم‌راستا با این مطالعه، یک دوره تمرین هوازی باعث کاهش بیان و میزان فعالیت NF-kB در عضلات اسکلتی<sup>۳۲</sup> و بافت ریه‌ی<sup>۳۳</sup> موش‌های صحرایی دیابتی گردید. به نظر می‌رسد کاهش مشاهده شده در بیان ژن NF-kB در مطالعه حاضر، مربوط به کاهش HMGB1، AGEها و آنزیم NADPH اکسیداز به دنبال تمرینات ورزشی باشد. در همین راستا مشخص شده است که تحت تأثیر فعالیت‌های ورزشی هوازی میزان فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز در بافت قلبی موش‌های دیابتی<sup>۳۴</sup> و میزان AGEها نیز در گردش خون موش‌های مسن<sup>۳۵</sup> کاهش می‌یابد. از طرفی کاهش پروتئین HMGB1 نیز به دنبال تمرینات ورزشی (از جمله در مطالعه حاضر) مورد تأیید قرار گرفته است.<sup>۱۴، ۱۵</sup> بررسی‌ها نشان می‌دهد HMGB1

پس از هشت هفته تمرین هوازی، میزان بیان ژن‌های HMGB1 (۲۴/۰۳ درصد)، RAGE (۱۴/۸۱ درصد)، TLR4 (۴۷/۴ درصد) و NF-kB (۲۱/۷۶ درصد) در گروه هایپرگلیسمی آزمون نسبت به گروه هایپرگلیسمی شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P=0/001$ ). با این وجود، مقادیر مذکور در موش‌های صحرایی گروه هایپرگلیسمی آزمون نسبت به گروه شاهد سالم هنوز در سطح بالاتری قرار داشت (نمودار ۱).

## بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که هشت هفته تمرین هوازی منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های HMGB1، RAGE، TLR4 و NF-kB در بافت قلبی موش‌های صحرایی دارای هایپرگلیسمی می‌شود.

هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، جیالوریا<sup>i</sup> و همکاران گزارش کرده‌اند که تمرینات هوازی بلند مدت موجب کاهش پروتئین HMGB1 در بیماران مبتلا به سکته قلبی<sup>۱۴</sup> و زنان مبتلا به سرطان سینه<sup>۱۵</sup> می‌شود. همچنین، تمرینات هوازی منظم میزان بیان گیرنده TLR4 را در بافت‌های مختلف موش‌های صحرایی چاق<sup>۱۸</sup> و در لنفوسیت‌های بزرگسالان کم‌تحرك و در معرض ابتلا به دیابت<sup>۱۹</sup> کاهش می‌دهد. این احتمال وجود دارد که افزایش پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP<sup>ii</sup>) در کاهش بیان HMGB1 و TLR4 موثر باشد چرا که تمرینات ورزشی باعث افزایش HSPها شده<sup>۲۰</sup> و انتقال و ترشح سیتوپلاسمی HMGB1 را به طور منفی تنظیم می‌کند؛<sup>۲۱</sup> در عین حال منجر به القاء مقاومت در گیرنده‌ی TLR4 و کاهش بیان آن می‌شود.<sup>۱۹</sup> از سوی دیگر مشخص شده است که مهار آنزیم NADPH اکسیداز، انتقال HMGB1 از هسته به سیتوزول را کاهش می‌دهد<sup>۲۲</sup> و از طرفی نقش مونوسیت‌ها نیز در افزایش بیان ژن TLR4 به خوبی نشان داده شده است.<sup>۲۳</sup> از این رو به نظر می‌رسد کاهش مشاهده شده در فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز<sup>۲۴</sup> و مونوسیت‌ها<sup>۲۳</sup> در موش‌های صحرایی دیابتی تمرین کرده، به ترتیب در کاهش بیان ژن HMGB1 و گیرنده‌ی TLR4 موثر باشند. اما مغایر با نتایج پژوهش حاضر، چهار ماه تمرین هوازی تأثیری بر میزان بیان گیرنده‌ی TLR4 در عضله اسکلتی افراد مسن نداشت. این احتمال وجود دارد که

iii- Soluble RAGE

iv- Advanced glycation end products

v- Ectodomain

i - Giallauria

ii- Heat shock proteins

### نتیجه گیری

با توجه به این که در مطالعه حاضر یک دوره تمرین هوازی منجر به کاهش بیان ژن‌های HMGB1 و مسیر پایین دست آن در بافت قلبی موش‌های صحرایی دارای هایپرگلیسمی شد، می‌توان بیان کرد که تمرین هوازی ممکن است به عنوان یک روش مداخله‌ای تأثیرگذار و نیز یک درمان غیردارویی برای بهبود التهاب ناشی از دیابت و در پی آن جلوگیری از کاردیومیوپاتی دیابتی مورد استفاده قرار گیرد. با این حال با توجه به مطالعات اندک در این حوزه، برای روشن شدن سایر سازوکارهای درگیر، نیاز به مطالعات بیشتر احساس می‌شود.

سپاسگزاری: این پژوهش برگرفته از رساله‌ی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گرایش قلب و عروق و تنفس می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان از مسئولین محترم دانشکده علوم ورزشی دانشگاه اصفهان صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

### References

1. Diabetes Atlas. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation 2015.
2. Wu H, Sheng ZQ, Xie J, Li R, Chen L, Li GN, et al. Reduced HMGB1-Mediated Pathway and Oxidative Stress in Resveratrol-Treated Diabetic Mice: A Possible Mechanism of Cardioprotection of Resveratrol in Diabetes Mellitus. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 9836860.
3. Trachanas K, Sideris S, Aggeli C, Poulidakis E, Gatzoulis K, Tousoulis D, et al. Diabetic cardiomyopathy: from pathophysiology to treatment. *Hellenic J Cardiol* 2014;55: 411-21.
4. Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res*. 2018; 122: 624-38.
5. Nunes S, Soares E, Pereira F, Reis F. The role of inflammation in diabetic cardiomyopathy. *Int J Inflamm Cytokine Mediator Res* 2012; 4: 59-73.
6. Yang H, Tracey KJ. Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799: 149-56.
7. Wu H, Chen Z, Xie J, Kang LN, Wang L, Xu B. High Mobility Group Box-1: A Missing Link between Diabetes and Its Complications. *Mediators Inflamm*. 2016; 2016: 3896147.
8. Volz HC, Seidel C, Laohachewin D, Kaya Z, Muller OJ, Pleger ST, et al. HMGB1: the missing link between diabetes mellitus and heart failure. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: 805-20.
9. Wang WK, Lu QH, Zhang JN, Wang B, Liu XJ, An FS, et al. HMGB1 mediates hyperglycaemia-induced cardiomyocyte apoptosis via ERK/Ets-1 signalling pathway. *J Cell Mol Med* 2014; 18: 2311-20.

AGEها با اتصال به گیرنده‌های خود از طریق مسیرهای مختلف باعث فعال‌سازی NF-kB در بافت‌های مختلف بیماران دیابتی می‌شوند.<sup>۲۷</sup> همین‌طور، نقش NADPH اکسیداز (از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال) در ترشح و انتقال هسته‌ای NF-kB مشخص شده است؛<sup>۲۴</sup> از این رو به نظر می‌رسد کاهش موارد مذکور به دنبال تمرینات ورزشی، در کاهش میزان بیان NF-kB تأثیرگذار باشند.

با توجه به این که در مطالعه حاضر، علی‌رغم کاهش مشاهده شده در متغیرهای مورد مطالعه پس از دوره تمرینی، این متغیرها هنوز نسبت به گروه شاهد سالم در سطح بالاتری قرار داشتند، پیشنهاد می‌گردد طول دوره، شدت و حتی نوع تمرین هوازی بر میزان کاهش این متغیرها مورد بررسی قرار گیرد. به نظر می‌رسد موارد مذکور در نتایج حاصل از تمرین ورزشی تأثیرگذار باشند. از طرفی با توجه به محدودیت‌های پژوهش حاضر نظیر عدم امکان انجام آزمایشات وسترن بلات و آزمایشات موزی روی نمونه‌های سرم خون، پیشنهاد می‌شود در آینده مطالعات مشابهی با در نظر گرفتن آزمایشات مذکور انجام گیرد.

10. Wang Wk, Wang B, Lu QH, Zhang W, Qin WD, Liu XJ, et al. Inhibition of high-mobility group box 1 improves myocardial fibrosis and dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2014; 172: 202-12.
11. Volz C, Heger P, Laohachewin D, Lasitschka F, Kaya Z, Katus H, et al. The role of HMGB1 in diabetic cardiomyopathy. *Diabetologie und Stoffwechsel* 2013; 8(S 01): FV39.
12. Sharma NM, Rabeler B, Zheng H, Raichlin E, Patel KP. Exercise Training Attenuates Upregulation of p47phox and p67phox in Hearts of Diabetic Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 5868913.
13. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 607-15.
14. Giallauria F, Cirillo P, D'Agostino M, Petrillo G, Vitelli A, Pacileo M, et al. Effects of exercise training on high-mobility group box-1 levels after acute myocardial infarction. *J Card Fail* 2011; 17: 108-14.
15. Giallauria F, Gentile M, Chiodini P, Berrino F, Mattiello A, Maresca L, et al. Exercise training reduces high mobility group box-1 protein levels in women with breast cancer: findings from the DIANA-5 study. *Monaldi Arch Chest Dis* 2014; 82: 61-7.
16. Punitha IS, Rajendran K, Shirwaikar A, Shirwaikar A. Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; 2: 375-81.
17. Kazemi F, Zahediasl SJG. Effects of exercise training on adipose tissue apelin expression in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Gene* 2018; 662: 97-102.

18. Oliveira AG, Carvalho BM, Tobar N, Ropelle ER, Pauli JR, Bagarolli RA, et al. Physical exercise reduces circulating lipopolysaccharide and TLR4 activation and improves insulin signaling in tissues of DIO rats. *Diabetes* 2011; 60: 784-96.
19. Robinson E, Durrer C, Simtchouk S, Jung ME, Bourne JE, Voth E, et al. Short-term high-intensity interval and moderate-intensity continuous training reduce leukocyte TLR4 in inactive adults at elevated risk of type 2 diabetes. *J Appl Physiol* 2015; 119: 508-16.
20. Atalay M, Oksala NK, Laaksonen DE, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J, et al. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol* 2004; 97: 605-11.
21. Tang D, Kang R, Xiao W, Jiang L, Liu M, Shi Y, et al. Nuclear heat shock protein 72 as a negative regulator of oxidative stress (hydrogen peroxide)-induced HMGB1 cytoplasmic translocation and release. *J Immunol* 2007; 178: 7376-84.
22. Wang Y, Shan J, Yang W, Zheng H, Xue S. High mobility group box 1 (HMGB1) mediates high-glucose-induced calcification in vascular smooth muscle cells of saphenous veins. *Inflammation* 2013; 36: 1592-604.
23. Markofski MM, Flynn MG, Carrillo AE, Armstrong CL, Campbell WW, Sedlock DA. Resistance exercise training-induced decrease in circulating inflammatory CD14+ CD16+ monocyte percentage without weight loss in older adults. *Eur J Appl Physiol* 2014; 114: 1737-48.
24. Ghosh S, Lertwattanak R, de Jesus Garduño J, Galeana JJ, Li J, Zamarripa F, et al. Elevated muscle TLR4 expression and metabolic endotoxemia in human aging. *J Gerontol A Bio Sci Med Sci* 2015; 70: 232-46.
25. Mohammadi R, Matin Homaei H, Azerbaijani MA, Basesi K. Effect of 12 weeks resistance training on gene expressions of RAGE, ICAM, VCAM in the heart of diabetic rats with STZ. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism* 2016; 16: 1-8. [Farsi]
26. Gu Q, Wang B, Zhang XF, Ma YP, Liu JD, Wang XZ. Contribution of receptor for advanced glycation end products to vasculature-protecting effects of exercise training in aged rats. *Eur J Pharmacol* 2014; 741: 186-94.
27. Yang SJ, Kim S, Hwang SY, Kim TN, Choi HY, Yoo HJ, et al. Association between sRAGE, esRAGE levels and vascular inflammation: analysis with 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Atherosclerosis* 2012; 220: 402-6.
28. Choi KM, Han KA, Ahn HJ, Hwang SY, Hong HC, Choi HY, et al. Effects of exercise on sRAGE levels and cardiometabolic risk factors in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 3751-8.
29. Zhang F, Su X, Huang G, Xin X-F, Cao E-H, Shi Y, et al. sRAGE alleviates neutrophilic asthma by blocking HMGB1/RAGE signalling in airway dendritic cells. *Sci Rep* 2017; 7: 14268.
30. Asif M, Egan J, Vasani S, Jyothirmayi GN, Masurekar MR, Lopez S, et al. An advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age-related increases in myocardial stiffness. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 14: 97: 2809-13.
31. Van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, et al. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 2008; 117: 43-51.
32. Liu HW, Chang S-J. Moderate exercise suppresses NF- $\kappa$ B signaling and activates the SIRT1-AMPK-PGC1 $\alpha$  axis to attenuate muscle loss in diabetic db/db mice. *Fron Physiol* 2018; 9: 636.
33. Fashi M, Agha-Alinejad H, Mahabadi HA, Rezaei B, Pakrad BB, Rezaei S. The effects of aerobic exercise on NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  in lung tissue of male rat. *Novelty in Biomedicine* 2015; 3: 131-4.
34. Clark RA, Valente AJ. Nuclear factor kappa B activation by NADPH oxidases. *Mech Ageing Dev* 2004; 125: 799-810.

Original Article

## Effects of Eight Weeks of Aerobic Training on Expression Levels of the HMGB1-RAGE/TLR4-NF- $\kappa$ B Proinflammatory Pathway in Cardiac Tissue of Male Rats with Hyperglycemia

Taghibeigi Hoseinabadi H<sup>1</sup>, Esfarjani F<sup>1</sup>, Marandi SM<sup>1</sup>, Karami H<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran, <sup>2</sup>Department of Molecular Medicine and Biotechnology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, I.R. Iran

e-mail: esfarjani@spr.ui.ac.ir

Received: 06/10/2018 Accepted: 12/01/2019

### Abstract

**Introduction:** Inflammation plays a critical role in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. The expression of HMGB1, a proinflammatory cytokine, and its downstream signaling pathway is upregulated in diabetes. The aim of this study was to investigate the effect of 8 weeks aerobic training on the expression levels of the HMGB1-RAGE/TLR4-NF- $\kappa$ B pathway in cardiac tissue of male rats with hyperglycemia. **Materials and Methods:** Thirty-six male Wistar rats (mean weight, 231±25g) were randomly divided into three groups (n=12 each): Healthy control, control hyperglycemia and trained hyperglycemia. Hyperglycemia was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin and nicotinamide. Forty-eight hours after completion of the training program (eight weeks aerobic training), cardiac tissue was removed under sterile conditions. Gene expression of HMGB1, RAGE, TLR4 and NF- $\kappa$ B were investigated, using Real-time PCR. For data analysis, one-way ANOVA and post-hoc Tukey's test were used, with P<0.05 considered statistically significant. **Results:** Gene expression levels of HMGB1, RAGE, TLR4 and NF- $\kappa$ B were significantly (P=0.001) increased in the cardiac tissue of the hyperglycemic control group, compared with healthy controls. Eight weeks of aerobic training decreased the expression levels of the studied genes (P=0.001). **Conclusion:** It seems that aerobic training can prevent the negative effects of hyperglycemia via by attenuating gene expression levels of HMGB1, RAGE, TLR4 and NF- $\kappa$ B in the cardiac tissue of rats with hyperglycemia, and could hence be an important mechanism for cardiac function and preventing diabetic cardiomyopathy.

**Keywords:** Aerobic Training, HMGB1, RAGE, TLR4 and NF- $\kappa$ B, Diabetic Cardiomyopathy, Hyperglycemia