

## تأثیر ترکیب مکمل ویتامین D3 و تمرین هوازی بر کاتپسین د قلب و مقاومت به انسولین در موش‌های صحرایی دیابتی شده با رژیم غذایی پرچرب و استرپتوزوتوسین

هادی گلپسندی<sup>۱</sup>، دکتر محمد رحمان رحیمی<sup>۱</sup>، دکتر صلاح الدین احمدی<sup>۲</sup>

۱) گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی و اجتماعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، ۲) گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. نشانی مکاتبه با نویسنده‌ی مسئول: کردستان، شهرستان سنندج، بلوار پاسداران، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم انسانی و اجتماعی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دکتر محمدرحمان رحیمی؛  
e-mail: r.rahimi@uok.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** کاردیومیوپاتی دیابتی یک عامل مهم برای افزایش خطر نارسایی قلبی و مرگ و میر در افراد مبتلا به دیابت است. کاتپسین D نقش مهمی در حفظ عملکردهای فیزیولوژیک؛ از جمله تخریب پروتئین‌های درون سلولی و اتوفازی دارد. در پژوهش حاضر، اثرات ترکیب مکمل ویتامین D3 و تمرین هوازی بر کاتپسین‌های قلب و مقاومت به انسولین در موش‌های صحرایی دیابتی شده بررسی گردید. مواد و روش‌ها: در ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، دیابت نوع ۲ توسط رژیم غذایی پرچرب+استرپتوزوتوسین القاء و سپس به ۵ گروه (۱) شاهد سالم (NC)، (۲) شاهد دیابتی (DC)، (۳) دیابت+تمرین هوازی (DAT)، (۴) دیابت+ویتامین D3 (DVD) و (۵) دیابت+تمرین هوازی و ویتامین D3 (DVDAT) تقسیم شدند. بعد از هشت هفته تمرین هوازی و مکمل‌یاری با ویتامین D3، حیوانات قربانی شده و محتوای پروتئینی کاتپسین D بافت قلب و سطوح سرمی انسولین، گلوکز، ویتامین D3 و شاخص مقاومت به انسولین اندازه‌گیری گردید. یافته‌ها: تجزیه و تحلیل آنووا یک طرفه نشان داد که در گروه DC محتوای کاتپسین D افزایش ۳۳۵ درصدی نسبت به گروه NC داشت ( $P < 0/001$ ). در همین حال در گروه DAT، DVD و DVDAT بترتیب کاهش ۴۴/۳۷، ۵۰/۸۰ و ۶۲/۷۶ درصدی نسبت به گروه DC مشاهده گردید ( $P < 0/001$ ). شاخص مقاومت انسولینی نیز در گروه‌های DAT، DVD و DVDAT بترتیب کاهشی معادل ۵۲/۹۵، ۳۹/۲۷ و ۶۸ درصد نسبت به گروه DC داشت ( $P < 0/001$ ). نتیجه‌گیری: هشت هفته تمرین هوازی با مکمل ویتامین D3 احتمالاً از طریق کاهش سطح کاتپسین D بافت قلبی و شاخص مقاومت به انسولین، متابولیسم گلوکز را در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین همراه با رژیم غذایی پرچرب را بهبود می‌بخشد.

**واژگان کلیدی:** مقاومت به انسولین، ویتامین D3، کاتپسین D، تمرین هوازی و کاردیومیوپاتی دیابتی

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱/۲۷ - دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۲/۳/۲۱ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۳/۲۱

### مقدمه

۱۰/۹٪ (۷۰۰ میلیون) افزایش یابد.<sup>۱</sup> دیابت یکی از عوامل خطرزای اصلی برای ایجاد عوارض مرتبط با دستگاه قلبی عروقی است که خطر مرگ و میر را در افراد مبتلا به دیابت افزایش می‌دهد. که این می‌تواند بواسطه بیماری کاردیومیوپاتی دیابتی<sup>۱</sup>، از طریق متابولیسم غیرطبیعی کاردیومیوسیت و بدتر شدن تدریجی عملکرد انقباضی قلب

دیابت ملیتوس یک نگرانی عمده برای سلامت عمومی با عوارض طولانی‌مدت است که شیوعی رو به افزایش دارد. در سال ۲۰۱۹، شیوع تخمینی دیابت ملیتوس در سراسر جهان ۹/۳٪ (۶۶۳ میلیون نفر) بود و انتظار می‌رود که این میزان تا سال ۲۰۳۰ به ۱۰/۲٪ (۵۷۸ میلیون) و تا سال ۲۰۴۵ به

ویتامین D3 بر روی لیزوزوم در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت کاردیومیوپاتی مشخص نشده است.

ورزش نقش اساسی در پیشگیری و درمان دیابت نوع ۲ دارد که بخشی از آن مربوط به بهبود حساسیت به انسولین است.<sup>۱۰</sup> نشان داده شده است که تحریک فعال‌سازی اتوفاژیک در توسعه سازگاری سلولی با تمرین ورزشی بسیار مهم است،<sup>۱۱</sup> به طوری که اختلال اتوفاژی در موش صحرایی باعث اختلال در عملکرد ورزش استقامتی و متابولیسم گلوکز در طول فعالیت ورزشی حاد می‌شود.<sup>۱۲</sup> در حالی که تمرین ورزشی طولانی مدت از طریق فعال‌سازی مجدد سازوکارهای مرتبط با فرایند اتوفاژی-لیزوزومی باعث بهبود هموستاز چربی در استئاتوز کبدی می‌گردد<sup>۱۳</sup> که می‌تواند بواسطه افزایش فعال‌سازی اتوفاژی ناشی از تمرین ورزشی شدید از طریق افزایش بیان کاتپسین D باشد.<sup>۱۴،۱۵</sup> مطالعات محدود در این زمینه، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تعاملی ویتامین D3 و تمرین هوازی بر سطوح کاتپسین D در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت کاردیومیوپاتی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

نوع مطالعه حاضر از نوع تجربی با طرح پس‌آزمون همراه با گروه شاهد بود. به دنبال اخذ مجوز از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه کردستان (IR.UOK.REC.1400.015) و حمایت از کار با حیوانات آزمایشگاهی، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، با میانگین سنی ۶ هفته و وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از مرکز پرورش حیوانات انستیتو پاستور کرج خریداری شد. پس از انتقال موش‌های صحرایی به آزمایشگاه تحقیقات حیوانی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، بصورت گروه‌های ۴ تایی در قفس‌های پلاستیکی مخصوص نگهداری موش صحرایی از جنس پلی‌کربنات شفاف، در اتاقی تحت کنترل دما (۲۲±۲) درجه سانتی‌گراد، چرخه ۱۲ ساعته روشنایی/تاریکی با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی نگهداری شدند. لازم به ذکر می‌باشد که تمام فرایند آزمایشی کار با حیوانات تحت راهنمایی‌های NIH (۲۰۲۰) جهت مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.<sup>۱۶</sup> پس از دوره آشناسازی، موش‌ها به صورت تصادفی به دو گروه شاهد سالم (۸ سر) و دیابتی (۳۲ سر) تقسیم‌بندی شدند.

صورت گیرد.<sup>۱۷</sup> از آنجایی که میوسیت‌های قلبی به سختی می‌توانند از طریق فرایند تکثیر بازسازی شوند، باید سازوکارهای درون سلولی وجود داشته باشد که نه تنها با عوامل استرس‌زا مقابله کند، بلکه محتویات داخل سلولی آسیب دیده ناشی از عوامل استرس‌زا را نیز ترمیم یا حذف کنند.<sup>۱۸</sup>

سیستم اتوفاژی-لیزوزوم نقش اصلی را در حذف و بازیافت مواد سلولی برای حفظ هموستاز سلولی ایفا می‌کند.<sup>۱۹</sup> لیزوزوم اندامکی است که دربردارنده انواع آنزیم‌های هیدرولیتیک است و مسئولیت تخریب درشت مولکول‌ها و بقایای داخل سلولی را به عهده دارد. مشخص شده است که در قلب افراد مبتلا به دیابت، فعالیت اتوفاژیک، ساختار لیزوزومی و فعالیت آنزیم‌های تخریب‌گر همگی مختل می‌شوند.<sup>۲۰</sup> کاتپسین‌ها<sup>۲۱</sup> از فراوان‌ترین پروتئازهای لیزوزوم هستند و پیشنهاد شده است که در مرگ سلول‌های قلبی، ناشی از استرس دیابتی، نقش داشته باشند. کاتپسین D (CATD) عضوی از ابرخانواده کاتپسین و یک آسپارتیل پروتئاز<sup>۲۲</sup> لیزوزومی است که نقش مهمی در حفظ هموستاز بافت و متابولیسم دارد.<sup>۲۳</sup>

اخیراً نشان داده شده است که سطح پلاسمایی کاتپسین D با مقاومت به انسولین و دیس‌گلیسمی<sup>۲۴</sup> در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ ارتباط مثبتی دارد.<sup>۲۵</sup> بررسی بالینی بیانگر رابطه عکس بین سطح سرمی کاتپسین D با اختلال عملکرد قلب در بیماران انفارکتوس حاد میوکارد است.<sup>۲۶</sup> با این حال، رابطه بین اختلال اتوفاژی و تغییر لیزوزومی و همچنین نقش آن‌ها در آسیب قلبی در دیابت تا حدی ناشناخته است.

شیوه زندگی و عوامل تغذیه‌ای، مانند ورزش، ممکن است مزایای سلامتی شناخته شده خود را از طریق مسیر اتوفاژی اعمال کنند.<sup>۲۷</sup> نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که ویتامین D3 از طریق تنظیم متابولیسم کبدی گلوکز و لیپید و ارتقاء عملکرد و بقای سلول‌های بتا؛ اثر ضددیابتی خود را اعمال می‌کند.<sup>۲۸</sup> شواهد در حال ظهور هم‌چنین به نقش تنظیمی بالقوه اتوفاژی توسط ویتامین D3 اشاره کرده‌اند<sup>۲۹</sup> به طوری که درمان با ویتامین D3 باعث فعال‌سازی اتوفاژی مختل شده<sup>۳۰،۳۱</sup> و افزایش فعالیت پروتئاز لیزوزومی<sup>۳۲</sup> می‌گردد. از طرفی هنوز سازوکارهای دقیق اعمال تنظیم

i-Cathepsins  
ii-Aspartyl Protease  
iii-Dysglycemia

## القا دیابت نوع ۲ در موش‌های صحرایی

در پژوهش حاضر، جهت القا نمودن دیابت نوع ۲ در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار از مدل ترکیبی رژیم غذایی پرچرب (HFD) به همراه تزریق استرپتوزوتوسین (STZ)<sup>i</sup> استفاده گردید. ترکیب رژیم HFD شامل چربی (۴۵٪)، کربوهیدرات (۲۵٪) و پروتئین (۲۰٪) بود که به مدت ۴ هفته اعمال و به دنبال آن تزریق داخل صفاقی ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم STZ در محلول بافر سیترات ۰/۱ مول/لیتر و pH ۴/۵ انجام شد.<sup>۲۲</sup> جهت تأیید ایجاد دیابتی در موش‌های صحرایی، ۷۲ ساعت بعد از تزریق STZ، سطوح قند خون ناشتای آن‌ها اندازه‌گیری شد.<sup>۲۲</sup> موش‌های با سطح گلوکز خون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر یا بیشتر دیابتی در نظر گرفته شدند. سطح سرم گلوکز در موش‌های گروه شاهد در خلال مدت زمان مطالعه در محدوده طبیعی (۸۰-۱۰۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) باقی ماند.<sup>۲۳</sup> لازم به ذکر است که موش‌های دیابتی شده، بعد از تزریق STZ رژیم غذایی پرچرب را تا پایان مداخله دریافت کردند.<sup>۲۲</sup> موش‌های صحرایی دیابتی شده به طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی؛ شامل شاهد دیابت (DC) ویتامین D3 DVD، تمرین هوازی DAT و تمرین هوازی + ویتامین D3 تقسیم شدند. برای تصادفی‌سازی حیوانات از روش طرح بلوک تصادفی<sup>ii</sup> استفاده گردید؛ به طوری‌که در این طرح ابتدا نمونه‌ها از لحاظ میزان قند خون یکسان‌سازی شدند و سپس بطور تصادفی در گروه‌های مداخله‌ای پژوهش حاضر تقسیم شدند. لازم به ذکر می‌باشد که تصادفی‌سازی به روش طرح بلوک تصادفی با استفاده از نرم‌افزار مینی تب<sup>iii</sup>، نسخه ۲۱/۴ انجام گردید.

پس از یک هفته آشناسازی، موش‌های صحرایی گروه‌های تمرینی از طریق راه رفتن و دویدن بر روی نوار گردان، جهت محاسبه حداکثر سرعت دویدن، آزمون عملکرد ورزشی درجه‌بندی شده را اجرا نمودند. پس از برآورد حداکثر سرعت دویدن موش‌ها، گروه‌های تمرینی به مدت هشت هفته، هر هفته، ۵ جلسه در هفته به فعالیت ورزشی بر روی تردمیل پرداختند.

اندازه‌گیری VO<sub>2max</sub>، برنامه تمرین و مکمل یاری با

## ویتامین D3

با توجه به ارتباط قوی بین سرعت نوارگردان و حداکثر اکسیژن مصرفی (VO<sub>2max</sub>)، موش‌ها براساس حداکثر سرعت دویدن آن‌ها محاسبه گردید، که در پژوهش حاضر از آزمون فزاینده استاندارد بدفورد و همکاران (۱۹۷۹) برای اندازه‌گیری VO<sub>2max</sub> استفاده شد.<sup>۲۴</sup> این آزمون شامل ۱۰ مرحله سه دقیقه‌ای می‌باشد. سرعت در مرحله اول ۰/۳ کیلومتر در ساعت بود و در هر مرحله ۰/۳ کیلومتر در ساعت به سرعت افزوده شد، در حالی‌که در همه مراحل شیب صفر بود. در هر مرحله از آزمایش که موش‌ها دیگر قادر به دویدن نبودند، سرعت در آن مرحله معادل سرعت موش‌های صحرایی در VO<sub>2max</sub> یا حداکثر سرعت در نظر گرفته شد.

در دوره آشناسازی، موش‌ها به مدت ۱ هفته، ۵ روز در هفته، با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در روز با نحوه اجرای تمرین سازگار شدند. سپس در برنامه اصلی تمرین، در هفته‌های اول و دوم، موش‌های صحرایی به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۵۵٪ حداکثر سرعت دویدن روی تردمیل دویدند. با رعایت اصل اضافه بار در جهت سازگاری نمونه‌های پژوهش با برنامه تمرینی، در هفته‌های سوم و چهارم، با افزایش تدریجی مدت زمان تمرین تا ۴۵ دقیقه و شدت ۶۰٪ حداکثر سرعت دویدن؛ روی تردمیل دویدند. در هفته‌های پنجم، ششم، هفتم و هشتم نیز سرعت به ۶۵٪ حداکثر سرعت دویدن و زمان به ۶۰ دقیقه افزایش یافت. لازم به ذکر می‌باشد در هفته‌های پایانی (هفتم و هشتم)، تمامی مولفه‌های زمان و سرعت تمرین ثابت بود. با این حال، شیب در تمامی دوره برنامه تمرینی صفر در نظر گرفته شد.<sup>۲۵</sup> لازم به ذکر می‌باشد که در هر جلسه تمرین، ابتدا موش‌های صحرایی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴ تا ۵ متر بر دقیقه فرآیند گرم کردن و در پایان، سردکردن را اجرا نمودند. فرایند مکمل یاری ویتامین D3 نیز بدین صورت بود که در گروه دریافت‌کننده ویتامین D3، بعد از یک هفته از القا مدل دیابت نوع ۲، به مدت هشت هفته هر هفته به میزان ۱۰۰۰۰ واحد/کیلوگرم ویتامین D3، ساخت شرکت دارویی کاسپین تمین رقیق شده در روغن کنجد را از طریق تزریق زیرجلدی دریافت نمودند.<sup>۲۶</sup>

بعد از اتمام دوره مداخلات تمرین و مکمل یاری ویتامین D3، بعد از ناشتایی شبانه (۸ ساعت)، تمامی موش‌ها

i-Streptozotocin.

ii-Randomized Block Design.

iii-Minitab

۲۰ Tween\* (TBST) مسدود شد تا اتصالات غیراختصاصی را مسدود کند. متعاقباً، بلات‌ها شبانه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی اولیه: CATD (C-5), sc-48341, انکوبه شدند. پس غشاء سه بار شستشو داده و با آنتی‌بادی ثانویه مناسب به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق در شیر ۵ درصد در TBST انکوبه شد. نوارهای پروتئینی با یک معرف افزایش یافته نورتابی شیمیایی (ECL) و فیلم رادیوگرافی، با تجزیه و تحلیل چگالی‌سنجی با نرم‌افزار ایمج جی<sup>xi</sup> کمی‌سازی شدند. به طور خلاصه، پس از اجرای جداگانه الکتروفورز بر روی سه ژل جداگانه و رنگ‌آمیزی، قطعات جدا شده ژل در لوله‌های میکروسانتریفیوژ قرار داده شد و با ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر شستشو (۰/۵ میلی‌مولار Tris-HCl، ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl و ۰/۱ میلی‌مولار EDTA؛ pH ۷/۵) پوشانده شد و در یک لرناننده چرخشی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه شد. سپس آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع‌رویی را به یک لوله میکروسانتریفیوژ جدید پیپت شد، پس از آن مایع‌رویی تحت الکتروفورز نهایی صفحه اس دی اس وسترن بلات قرار گرفت.

مقادیر سرمی گلوکز (با استفاده از دستگاه مایندری بی اس<sup>xii</sup> ۲۰۰) به روش رنگ سنجی، ویتامین D3 (با استفاده از کیت حیوانی شرکت مونوباند<sup>xiii</sup>، ساخت کشور آمریکا، به شماره ۳۰۰-۷۷۲۵) به روش کالریتریک و انسولین (با استفاده از کیت حیوانی شرکت آلپکو، به شماره 80-INSRTH-E01, E10) به روش الایزا انجام شد. شاخص HOMA-IR نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

شاخص مقاومت به انسولین = (انسولین ناشتا (میکروواحد/میلی‌لیتر) × گلوکز ناشتا (میلی‌مول/لیتر)) ÷ ۲۲/۵

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری گراف پد پریم<sup>xiv</sup> نسخه 9.0، SPSS انجام شد. جهت ارزیابی تغییرات مربوط به شاخص کاتپسین D، گلوکز، انسولین، مقاومت به انسولین و ویتامین D3 سرمی از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و همچنین جهت بررسی تفاوت‌های جفتی بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی بونفرونی<sup>xv</sup> استفاده شد. تمام داده‌ها به شکل میانگین ± انحراف استاندارد، درصد تغییرات

بی‌هوش شده و بافت‌برداری و خون‌گیری صورت گرفت. فرایند بیهوش نمودن موش‌ها با استفاده از ترکیب، کتامین ساخت کشور بلژیک به میزان ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بصورت تزریق زیرجلدی انجام شد. بعد از تزریق مواد بیهوشی، هر کدام از موش‌ها به مدت ۵ دقیقه در محیطی آرام و بدون استرس تنها گذاشته شدند. پس از اطمینان از بیهوشی، حیوانات از قسمت پشت بر روی تخته تشریح خوابانده شدند، سپس دست و پاها بصورت کشیده و به حالت صلیبی بسته شدند، در نهایت، قفسه‌ی سینه حیوان شکافته شده و خون به‌طور مستقیم از قلب حیوان گرفته شد. نمونه‌های خونی جمع‌آوری شده با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و پلاسمای آن جدا و برای استفاده در ادامه مراحل پژوهش به فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت.

در مرحله بعد بافت قلب جدا، در نیتروژن مایع هم‌ژنیزه شده و پروتئین‌های بافت آن با استفاده از بافر لیزکننده (حاوی: PH=۸، ۵۰۰ میکرولیتر تریس‌هیدروکلراید<sup>i</sup>، ادا<sup>ii</sup> ۰/۰۰۳ گرم، سدیم کلراید ۰/۰۸ گرم، سدیم دی‌اکسی کولات<sup>iii</sup> ۰/۰۲۵ گرم، اس دی اس<sup>iv</sup> ۰/۰۱ گرم، ۱ قرص کوکتل مهارکننده پروتئاز<sup>v</sup> و ۱۰ میکرولیتر تریشن<sup>vi</sup> جدا و سپس نمونه‌ها در سانتریفیوژ مدل آر ۵۴۱۵ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع‌رویی شفاف حاوی پروتئین استخراج و در فریزر ۲۰- نگه‌داری شد.

جهت تعیین غلظت پروتئین از روش بردفورد استفاده گردید.<sup>xvii</sup> پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل اس دی اس-پلی آکریل‌امید با استفاده از ژل آماده دناتوره شده ۸ تا ۱۲ درصد (بایو راد<sup>viii</sup>، ساخت آمریکا) جدا شدند و روی غشای پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید<sup>viii</sup> (PVDF) (وست ساسکس<sup>ix</sup>، ساخت کشور انگلستان) منتقل شدند. غشاء به مدت ۱ ساعت در ۵٪ BSA در سالیین تریس بافر و ۱٪

- i-Tris HCL
- ii-EDTA
- iii-Sodium Deoxycholate
- iv-Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
- v-Protease Inhibitor Cocktail
- vi-Triton
- vii-BioRad
- viii-Polyvinylidene Difluoride
- ix-West Sussex

- x-Tris-buffered Saline with 0.1% Tween® 20 Detergent
- xi-Image J
- xii-Mindrey BS200
- xiii-Monobind
- xiv-Graph Pad Prism
- xv-Bonferroni

میانگین (فرمول ۱) و نمودار ستونی نشان داده شد. مقدار  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

درصد تغییرات میانگین = (تفاوت مقدار اولیه - مقدار ثانویه) / مقدار اولیه  $\times 100$

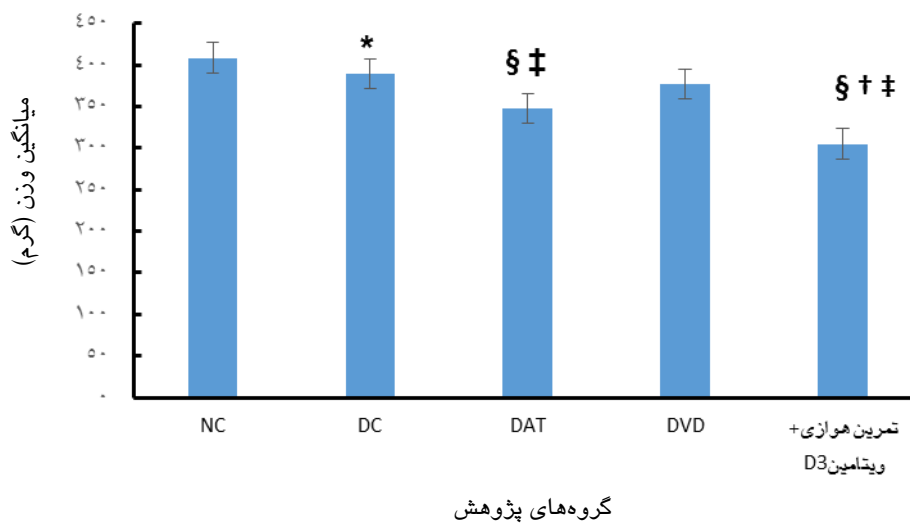
## یافته‌ها

میانگین وزن، سطوح سرمی انسولین، گلوکز و ویتامین D3 موش‌ها در جدول ۱ بصورت میانگین و انحراف استاندارد ارائه شده است. نتایج نشان‌دهنده وجود تفاوت

جدول ۱- میانگین و انحراف استاندارد وزن، سطوح گلوکز، انسولین و ویتامین D3 سرمی در گروه‌های پژوهش حاضر

گروه‌های پژوهش	NC	DC	DAT	DVD	DVDAT
وزن پایان دوره مداخلات	40.8/20 ± 11/92	38.9 ± 12/17 *	34.8/12 ± 10/77 § ‡	37.7/05 ± 15/16 †	30.5/80 ± 9/8 § ‡ †
سطوح گلوکز (میلی‌گرم / دسی‌لیتر)	94 ± 8/16	44.5/3 ± 32/58 *	31.9/2 ± 20/16 §	30.7/2 ± 25/24 §	27.7/2 ± 26/58 § ‡ †
سطوح انسولین (نانوگرم / میلی‌لیتر)	0.10 ± 0.02	0.42 ± 0.03 *	0.28 ± 0.03 §	0.33 ± 0.04 §	0.25 ± 0.03 § †
سطوح ویتامین D3 (نانوگرم / میلی‌لیتر)	20/97 ± 2/21	14/22 ± 1/68 *	29/42 ± 4/52 §	37/45 ± 2/96 § †	41/90 ± 2/23 § †

(\*) معنی‌داری نسبت به گروه شاهد سالم، (§) معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دیابت، (†) معنی‌داری نسبت به گروه تمرین هوازی و (‡) معنی‌داری نسبت به گروه ویتامین D3.

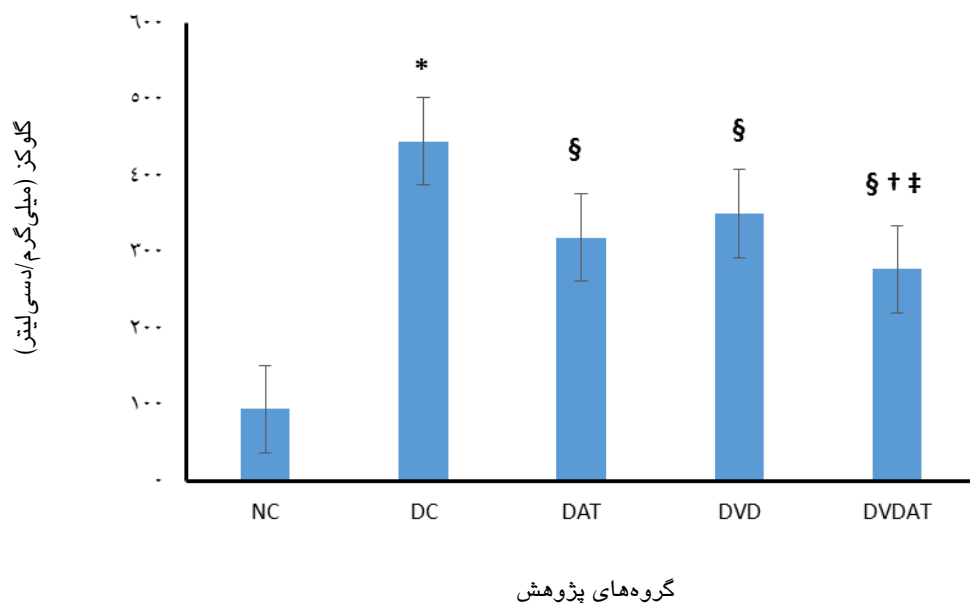


نمودار ۱- میانگین وزن موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲

\* معنی‌داری نسبت به گروه شاهد سالم و § معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دیابتی، † معنی‌داری نسبت به گروه تمرین هوازی و ‡ معنی‌داری نسبت به گروه ویتامین D3

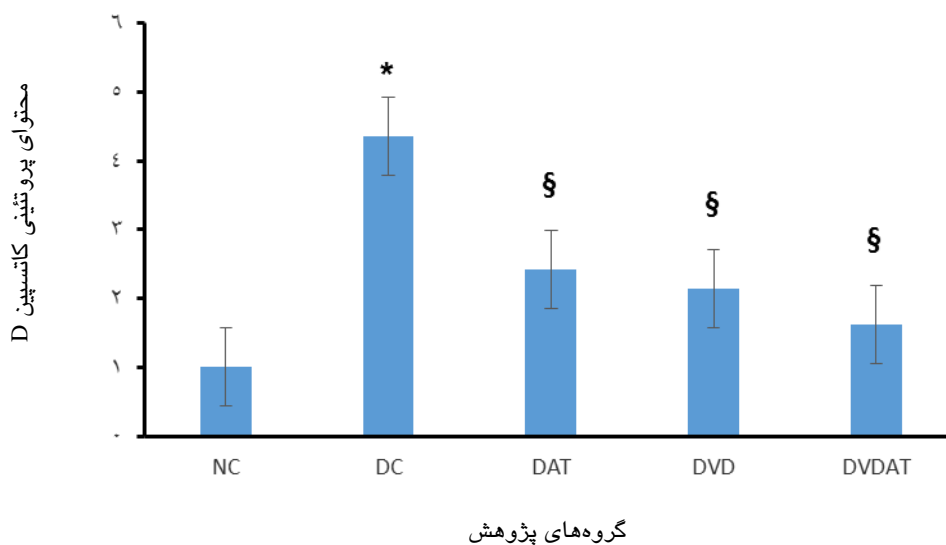
DVDAT نسبت به شاهد دیابتی مشاهده شد ( $P < 0.001$ )،  $\eta^2 = 0.96$ ). یافته‌ها هم‌چنین نشان داد که میانگین سطوح گلوکز در DVDAT نسبت به DAT و DVD کاهش بترتیب ۱۵/۱۵ و ۲۶/۳۳ درصدی داشت ( $P < 0.001$ ) و سطوح انسولین در گروه DVDAT نسبت به DVD کاهش ۳۲ درصدی داشت ( $P < 0.001$ ) (جدول ۱ و نمودار ۲).

میانگین سطوح سرمی گلوکز و انسولین در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم، به ترتیب افزایش ۳۳۰ و ۳۷۲/۷۲ درصدی داشت ( $P < 0.001$ )،  $\eta^2 = 0.96$  و این در حالی است که کاهش ۲۸/۳۲ و ۳۴/۸۸ درصدی در گروه DAT، کاهش ۲۱/۳۶ و ۲۲/۲۶ درصدی، در گروه DVD و کاهش ۳۷/۷۵ و ۴۱/۸۶ درصدی در گروه



### نمودار ۲- سطوح سرمی گلوکز در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲

\* معنی‌داری نسبت به گروه شاهد سالم و § معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دیابتی، † معنی‌داری نسبت به گروه تمرین هوازی و ‡ معنی‌داری نسبت به گروه ویتامین D3



### نمودار ۳- محتوای پروتئینی کاتپسین D در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲

\* معنی‌داری نسبت به گروه شاهد سالم و § معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دیابتی.

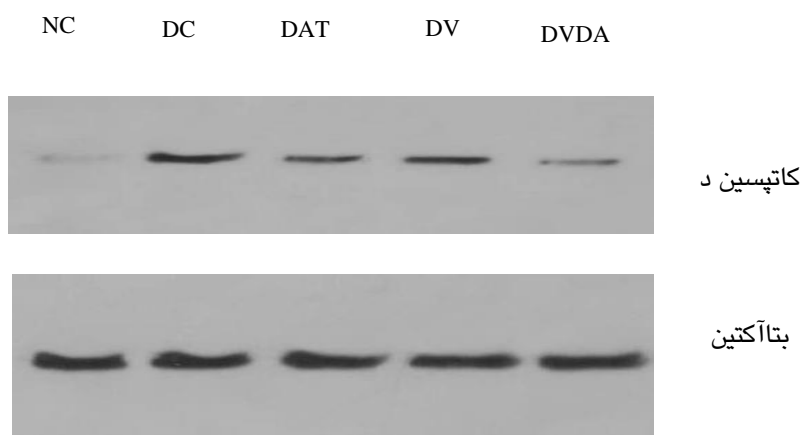
DVD افزایش ۱۶۳/۱۸ درصدی و در گروه DVDAT افزایش ۱۹۴/۴۵ درصدی نسبت به گروه DC مشاهده شد ( $P < 0.001$ )، نتایج همچنین نشان داد که در گروه DVDAT

در ارتباط با سطوح ویتامین D3 نیز در گروه شاهد دیابتی کاهش ۳۱/۱۹ درصدی نسبت به گروه شاهد سالم مشاهده شد ( $P < 0.008$ ,  $F = 75/79$ ,  $\eta^2 = 0.92$ )، در حالی‌که در گروه‌های DAT افزایش ۱۰۶/۸۲ درصدی، در گروه

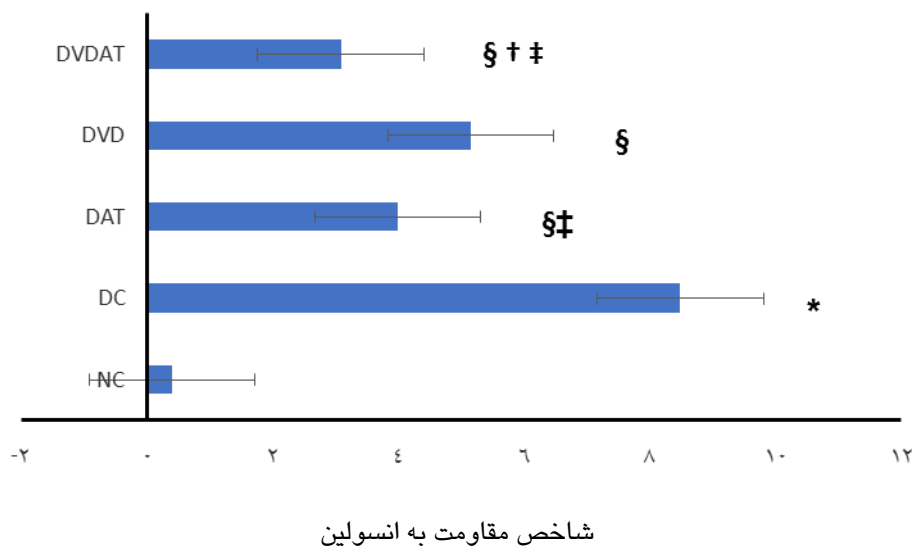
افزایش ۳۳۵ درصدی در گروه شاهد دیابت نسبت به گروه شاهد سالم مشاهده شد. در گروه‌های DAT کاهش ۴۴/۳۷ درصدی، DVD کاهش ۵۰/۸۰ درصدی و در گروه DV DAT کاهش ۶۲/۷۶ درصدی نسبت به گروه DC وجود داشت ( $P < 0.009$ ) (شکل ۱ و نمودار ۳).

افزایش ۴۱/۹۰ درصدی نسبت به گروه DAT رخ داده است ( $P < 0.001$ ) (جدول ۱).

نتایج مربوط به محتوای پروتئینی کاتپسین D در بافت قلب نشان داد که تفاوت معناداری بین گروه‌های پژوهش وجود دارد ( $F = 8.75$ ،  $\eta^2 = 0.58$  و  $P < 0.001$ )، به طوری که



شکل ۱- تجزیه و تحلیل بیان پروتئین کاتپسین در بافت قلب در گروه‌های مختلف پژوهش به روش وسترن بلات



نمودار ۴- نمودار کمی شاخص HOMA-IR در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲

\* معنی‌داری نسبت به گروه شاهد سالم و § معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دیابتی، † معنی‌داری نسبت به گروه تمرین هوازی و ‡ معنی‌داری نسبت به گروه ویتامین D3

می‌شود.<sup>۲۴</sup> ارتباط بین سطوح CATD پلاسما با مقاومت به انسولین در دیابت نوع ۲ و همچنین به عنوان نشانگرهای غیرتهاجمی برای مراحل مختلف بیماری کبد چرب غیرالکلی، یک وضعیت متابولیک مرتبط با دیابت نوع ۲، در نظر گرفته شده است.<sup>۷</sup> علاوه بر این، شواهدی دال بر وجود یک ارتباط متابولیکی عملکردی بالقوه بین مقاومت به انسولین و فعالیت کاتپسین D پلاسما در موش‌های صحرایی دیابتی تحت درمان انسولین گزارش شده است.<sup>۳۵</sup> این یافته‌ها همسو با پژوهش حاضر می‌باشد چرا که هم‌زمان با بالا رفتن محتوای پروتئینی کاتپسین D در گروه شاهد دیابت، شاخص مقاومت به انسولین و سطوح سرمی انسولین نیز افزایش معناداری داشت. از طرفی گزارش شده است که دیابت ناشی از STZ باعث افزایش سطوح تام و آزاد CATD در بافت‌های مختلف از جمله قلب می‌گردد.<sup>۳۰</sup> بنابراین بنظر می‌رسد که یکی از سازوکارهای احتمالی افزایش سطوح CATD در گروه شاهد دیابتی همین امر باشد.

در ارتباط با تاثیر هشت هفته تمرین هوازی بر محتوای پروتئینی کاتپسین D بافت قلبی، نتایج نشان‌دهنده کاهش ۴۴/۳۴ درصدی نسبت به گروه شاهد دیابتی می‌باشد. در این راستا نتایج پژوهش حاضر با نتایج نتایج پژوهش پاولوسکا<sup>v</sup> و همکاران،<sup>۳۶</sup> جیان<sup>vi</sup> و همکاران،<sup>۳۷</sup> یون<sup>vii</sup> و همکاران<sup>۳۸</sup> و پی<sup>viii</sup> و همکاران<sup>۳۹</sup> ناهمسو است. از جمله دلایل احتمالی ناهمسو بودن شامل تفاوت در نوع مداخلات ورزشی، نوع مکمل یاری، نوع نمونه‌های پژوهش و سطوح پایه CATD می‌باشد. در پژوهش حاضر در گروه شاهد دیابت افزایش ۳/۳۵ برابری را نسبت به گروه شاهد سالم داشت. کاتپسین D به طور معمول در داخل لیزوزوم‌ها قرار دارد و در تجزیه پروتئین‌ها و پردازش پروتئین‌های پیش‌ساز نقش دارد. لایه‌های فرعی از طریق اتوفازای از نوع ماکرواتوفازای به واسطه تشکیل اتوفازوزوم‌ها، محموله‌ها را به لیزوزوم‌ها تحویل داده و توسط آن‌ها تجزیه می‌شوند.<sup>۳۸</sup> با این حال بنظر می‌رسد سطوح افزایش یافته CATD در گروه شاهد دیابتی نشانگر اتوفازای بیش از حد باشد. از طرفی این گونه گزارش شده است که اتوفازای بیش از حد یکی از اختلالات درگیر در کاردیومیوپاتی دیابتی می‌باشد که با اختلال متابولیسم گلوکز و مقاومت به انسولین همراه است.<sup>۳۹،۴۰</sup> این

نتایج مربوط به شاخص مقاومت به انسولین در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ نیز نشان‌دهنده افزایش معناداری ( $P < 0.001$ ) در گروه شاهد دیابتی نسبت به شاهد سالم بود، در حالی‌که در گروه‌های DAT، کاهش ۵۲/۹۵ درصدی، در گروه DVD کاهش ۳۹/۲۷ درصدی و در گروه DVDAT کاهش ۶۳/۶۸ درصدی نسبت به گروه DC وجود داشت ( $P < 0.001$ )، یافته‌ها همچنین نشان داد که شاخص مقاومت به انسولین در گروه DVDAT، کاهش ۲۹/۵۵ درصدی نسبت به DAT و ۶۷/۲۱ درصدی نسبت به DVD داشت ( $P < 0.001$ ) (نمودار ۴).

## بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تعاملی هشت هفته تمرین هوازی به همراه ویتامین D3 بر محتوای پروتئینی کاتپسین D بافت قلب در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ انجام شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطح پروتئینی CATD در گروه شاهد دیابتی افزایش ۳۳۵ درصدی نسبت به گروه شاهد سالم داشت، که با نتایج پژوهش دینگ<sup>i</sup> و همکاران،<sup>۲۸</sup> ردی<sup>ii</sup> و همکاران<sup>۲۹</sup> و نورکار<sup>iii</sup> و همکاران<sup>۳۰</sup> همسو بود. مشخصه دیابت نوع ۲، که تقریباً ۹۰ درصد از کل موارد دیابت را تشکیل می‌دهد، مقاومت نسبت به انسولین است که در آن سلول‌ها به خوبی به انسولین پاسخ نمی‌دهند.<sup>۳۱</sup> با این حال، اگرچه آبشارهای متابولیک خاص در ایجاد مقاومت به انسولین پیشنهاد شده است، اما بینش کاملی در مورد تصویر متابولیک مقاومت به انسولین هنوز وجود ندارد. یک سازوکار کلیدی در ایجاد مقاومت به انسولین، تاثیر سمی چربی است که معمولاً برای شناسایی اثرات مضر تجمع لیپید در بافت غیرچربی استفاده می‌شود.<sup>۳۲</sup> در شرایط لیپوتوکسیک، به عنوان مثال در هنگام افزایش تجمع چربی سلولی، عملکرد لیزوزوم‌ها (اندامک‌های سلولی تنظیم کننده تخریب لیپیدها) به مخاطره می‌افتد. در واقع، آسیب ناشی از لیپید به غشاهای لیزوزومی منجر به انتقال ناخواسته آنزیم‌های لیزوزومی به داخل سیتوزول و/یا محیط خارج سلولی می‌شود.<sup>۳۳</sup> در همین راستا، گزارش شده است که تجمع لیپیدهای اکسید شده خاص در لیزوزوم‌ها منجر به ترشح خارج سلولی پروتئین‌های لیزوزومی آسپارتیک<sup>iv</sup> CATD

v-Powlowska M  
vi-Jian Y  
vii-Yuan JQ  
viii-Pi H

i-Ding L  
ii- Reddy S  
iii-Nerurkar MA  
iv-Aspartic protease



شاخص مقاومت به انسولین در DVDAT، کاهش بیشتری نسبت به DAT و DVD داشته است. لذا بنظر می‌رسد که تعامل تمرین هوازی و ویتامین D3 اثراتی مستقل از CATD بر کاهش مقاومت انسولینی در موش‌های صحرایی القاء شده به دیابت نوع ۲ داشته‌اند.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، عدم بررسی عملکرد قلبی (شاخص‌های مرتبط با اکوکاردیوگرافی) موش‌های صحرایی مبتلا به دیابتی می‌باشد، که در مطالعات آینده می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد. از طرفی با توجه به اثرات احتمالی فرایند خونگیری مستقیم از قلب بر محتوای کاتپسین‌های قلبی، یکی از محدودیت پژوهش حاضر می‌تواند این مسئله باشد.

### نتیجه‌گیری

هشت هفته تمرین هوازی با مکمل یاری ویتامین D3 احتمالاً از طریق کاهش سطح کاتپسین D بافت قلبی و شاخص مقاومت به انسولین، متابولیسم گلوکز را در موش‌های صحرایی دیابتی شده با HF-STZ بهبود می‌بخشد. سپاسگزاری: پژوهش حاضر برگرفته از رساله تصویب شده دانشجوی دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی هادی گلپسندی با کد اخلاق IR.UOK.REC.1400.015 مصوب از کمیته اخلاق طرح‌های پژوهشی دانشگاه کردستان می‌باشد. نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت محترم پژوهش، تحقیقات و فناوری دانشگاه کردستان جهت تصویب طرح، جناب آقای دکتر عباس احمدی، مسئول آزمایشگاه حیوانی دانشگاه علوم پزشکی کردستان و جناب آقای دکتر شمس‌الدین احمدی، مسئول آزمایشگاه سلولی مولکولی گروه زیست‌شناسی دانشگاه کردستان اعلام می‌نمایند. لازم به ذکر می‌باشد که پژوهش حاضر هیچ‌گونه حمایت مالی از سازمان خاصی دریافت نکرده است.

تعارض منافع: بنابر اظهار نویسندگان، هیچ‌گونه تعارض منافعی در راستای پژوهش حاضر وجود ندارد.

در حالی است که کاهش در سطوح CATD در گروه DAT با کاهش سطوح گلوکز، انسولین و مقاومت به انسولین همراه بود. بنابراین می‌توان گفت که تمرین هوازی احتمالاً باعث کاهش اتوفاژی بیش از حد از طریق تنظیم کاهش فعالیت لیزوزومی بافت قلب می‌گردد.

در ارتباط با تأثیر هشت هفته مکمل یاری ویتامین D3 نیز نتایج حاکی از کاهش ۵۰/۸۰ درصدی سطوح CATD، کاهش ۲۱/۳۶ درصدی گلوکز، کاهش ۳۹/۲۷ درصدی شاخص مقاومت به انسولین نسبت به گروه شاهد دیابتی بود. در این راستا نتایج پژوهش حاضر با نتایج تحقیقات وانگ<sup>۴۱</sup> و همکاران،<sup>۴۱</sup> یین<sup>۴۲</sup> و همکاران<sup>۴۲</sup> همسو بود. شواهد نشان داده‌اند که ارتباط مستقیمی بین سطوح ۲۵ هیدروکسی ویتامین D3 و مقاومت به انسولین وجود دارد، که به التهاب نسبت داده شده است، به طوری که کمبود ویتامین D3 باعث ایجاد مقاومت به انسولین و التهاب می‌گردد.<sup>۴۳</sup>

از طرفی CATD به عنوان یک واسطه بالقوه بین چاقی و التهاب مزمن بافت چربی پیشنهاد شده است، که یک عامل مهم در مقاومت به انسولین است که با افزایش فعالیت آن تحریک می‌گردد.<sup>۴۴</sup> پس می‌توان گفت که ویتامین D3 احتمالاً نقش ضد التهابی خود را از طریق کاهش سطوح CATD انجام داده است و از این طریق سبب بهبود متابولیسم گلوکز شده است. نکته قابل توجه افزایش چشمگیر سطوح ویتامین D3 سرمی در گروه DVD می‌باشد و این افزایش متعاقباً می‌تواند تأثیرات ضد دیابتی ایفا نماید. سازوکارهایی که ویتامین D می‌تواند بر حساسیت انسولین تأثیر بگذارد، هنوز دقیقاً مشخص نیست.<sup>۴۵</sup> برخی از مطالعات نشان دادند که ویتامین D از طریق تعامل گیرنده ویتامین D3 در بافت‌های پاسخ‌دهنده به انسولین، سبب افزایش رونویسی گیرنده‌های انسولین می‌شود. همچنین، ویتامین D می‌تواند بر غلظت کسبیم خارج سلولی تأثیر بگذارد و از طریق نفوذ در سلول‌های بافت هدف پاسخ‌دهنده به انسولین باعث فعال شدن ناقل‌های گلوکز گردد و در نهایت باعث افزایش پاسخ به انسولین شود.<sup>۴۶</sup>

در ارتباط با تأثیر تعاملی تمرین هوازی و ویتامین D3 بر محتوای کاتپسین D، نتایج نشان‌دهنده کاهش غیرمعنادار در گروه DVDAT نسبت به گروه‌های DAT و DVD می‌باشد ( $P > 0.001$ )، این در حالیست که سطوح گلوکز، انسولین و

## References

- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Res Clin Pract* 2019; 157: 107843.
- Ritchie RH, Abel ED. Basic mechanisms of diabetic heart disease. *Circ Res* 2020; 126: 1501-25.
- Terman A, Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. The involvement of lysosomes in myocardial aging and disease. *Curr Cardiol Rev* 2008; 4: 107-15.
- Cruz-Topete D, Dominic P, Stokes KY. Uncovering sex-specific mechanisms of action of testosterone and redox balance. *Redox Biol* 2020; 31: 101490.
- Xu X, Kobayashi S, Chen K, Timm D, Volden P, Huang Y, et al. Diminished autophagy limits cardiac injury in mouse models of type 1 diabetes. *J Biol Chem* 2013; 288: 18077-92.
- Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D—many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 68: 12-28.
- Liu L, Chen B, Zhang X, Tan L, Wang DW. Increased cathepsin D correlates with clinical parameters in newly diagnosed type 2 diabetes. *Dis Markers* 2017; 2017: 5286408.
- Yamac AH, Sevgili E, Kucukbuzcu S, Nasifov M, Ismailoglu Z, Kilic E, et al. Role of cathepsin D activation in major adverse cardiovascular events and new-onset heart failure after STEMI. *Herz* 2015; 40: 912.
- Levine B, Packer M, Codogno P. Development of autophagy inducers in clinical medicine. *J Clin Invest* 2015; 125: 14-24.
- Leung PS. The potential protective action of vitamin D in hepatic insulin resistance and pancreatic islet dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Nutrients* 2016; 8: 147.
- Wu S, Sun J. Vitamin D, vitamin D receptor, and macroautophagy in inflammation and infection. *Discov Med* 2011; 11: 325-35.
- Hu W, Zhang L, Li MX, Shen J, Liu XD, Xiao ZG, et al. Vitamin D3 activates the autolysosomal degradation function against *Helicobacter pylori* through the PDIA3 receptor in gastric epithelial cells. *Autophagy* 2019; 15: 707-25.
- Shivakumar S, Rohit S, Ghosh A, Jeyabalan N. Vitamin D enhances the autophagic lysosomal clearance in oxidatively stressed human corneal epithelial cells: A therapeutic intervention for keratoconus. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2019; 60: 2819.
- Høyer-Hansen M, Bastholm L, Mathiasen IS, Elling F, Jäättelä M. Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. *Cell Death Differ* 2005; 12: 1297-309.
- Kumar AS, Maiya AG, Shastry BA, Vaishali K, Ravishankar N, Hazari A, et al. Exercise and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Ann Phys Rehabil Med* 2019; 62: 98-103.
- Martin-Rincon M, Morales-Alamo D, Calbet JA. Exercise-mediated modulation of autophagy in skeletal muscle. *Scand J Med Sci Sports* 2018; 28: 772-81.
- He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* 2012; 481: 511-5.
- Pi H, Liu M, Xi Y, Chen M, Tian L, Xie J, et al. Long-term exercise prevents hepatic steatosis: a novel role of FABP1 in regulation of autophagy-lysosomal machinery. *FASEB J* 2019; 33: 11870-83.
- Yuan JQ, Yuan Y, Pan SS, Cai K. Altered expression levels of autophagy-associated proteins during exercise preconditioning indicate the involvement of autophagy in cardioprotection against exercise-induced myocardial injury. *J Physiol Sci* 2020; 70: 1-3.
- Parousis A, Carter HN, Tran C, Erlich AT, Mesbah Moosavi ZS, Pauly M, et al. Contractile activity attenuates autophagy suppression and reverses mitochondrial defects in skeletal muscle cells. *Autophagy* 2018; 14: 1886-97.
- Smith AC, Fosse RT, Ramp WK, Swindle MM. Ethics and regulations for the care and use of laboratory animals. In *Animal Models in Orthopaedic Research 2020 Apr 30* (pp. 3-14). CRC Press. Available from: [UR L:https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102807-0.00013-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102807-0.00013-2).
- Fu F, Tian F, Zhou H, Lv W, Tie R, Ji L, et al. Semen cassiae attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in high-fat diet streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Am J Chin Med* 2014; 42: 95-108.
- Kanter M, Aksu F, Takir M, Kostek OS, Kanter B, Oymagil A. Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in Streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2017; 125: 583-91.
- Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Oppliger RA, Gisolfi CV. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1979; 47: 1278-83.
- Zguira MS, Vincent S, Le Douairon Lahaye S, Malarde L, Tabka Z, Saïag B. Intense exercise training is not effective to restore the endothelial NO-dependent relaxation in STZ-diabetic rat aorta. *Cardiovasc Diabetol* 2013; 12: 1-8.
- Mehdipoor M, Damirchi A, Razavi Tousi SM, Babaei P. Concurrent vitamin D supplementation and exercise training improve cardiac fibrosis via TGF- $\beta$ /Smad signaling in myocardial infarction model of rats. *J Physiol Biomech* 2021; 77: 75-84.
- Khani M, Motamedi P, Dehkhoda MR, Dabagh Niku kheslat S, Karimi P. Effect of thyme extract supplementation on lipid peroxidation, antioxidant capacity, PGC-1 $\alpha$  content and endurance exercise performance in rats. *J Int Soc Sports Nutr* 2017; 14: 11.
- Ding L, Houben T, Oligschlaeger Y, Bitorina AV, Verwer BJ, Tushuizen ME, et al. Plasma cathepsin D activity rather than levels correlates with metabolic parameters of type 2 diabetes in male individuals. *Front Endocrinol* 2020; 11: 575070.
- Reddy S, Amutha A, Rajalakshmi R, Bhaskaran R, Monickaraj F, Rangasamy S, et al. Association of increased levels of MCP-1 and cathepsin-D in young onset type 2 diabetes patients (T2DM-Y) with severity of diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications* 2017; 31: 804-9.
- Nerurkar MA, Satav JG, Katyare SS. Insulin-dependent changes in lysosomal cathepsin D activity in rat liver, kidney, brain and heart. *Diabetologia* 1988; 31: 119-22.
- DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 1: 1-22.
- Engin A. The pathogenesis of obesity-associated adipose tissue inflammation. *Adv Exp Med Biol* 2017: 221-45.

33. Petty HR. Frontiers of complex disease mechanisms: membrane surface tension may link genotype to phenotype in glaucoma. *Front Cell Dev Biol* 2018; 6: 32.
34. Walenbergh S, Houben T, Rensen SS, Bieghs V, Hendriks T, van Gorp PJ, et al. Plasma cathepsin D correlates with histological classifications of fatty liver disease in adults and responds to intervention. *Sci Rep* 2016; 6: 1-0.
35. Khurana P, Yadati T, Goyal S, Dolas A, Houben T, Oligschlaeger Y, et al. Inhibiting extracellular cathepsin D reduces hepatic steatosis in Sprague–Dawley rats. *Biomolecules* 2019; 9: 171.
36. Pawłowska M, Mila-Kierzenkowska C, Boraczyński T, Boraczyński M, Szewczyk-Golec K, Sutkowy P, et al. The effect of submaximal exercise followed by short-term cold-water immersion on the inflammatory state in healthy recreational athletes: a cross-over study. *J Clin Med* 2021; 10: 4239.
37. Jian Y, Yuan S, Yang J, Lei Y, Li X, Liu W. Aerobic Exercise Alleviates Abnormal Autophagy in Brain Cells of APP/PS1 Mice by Upregulating AdipoR1 Levels. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 9921.
38. Vickers NJ. Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?. *Current Biology* 2017; 27: R713-5.
39. Kubli DA, Gustafsson ÅB. Unbreak my heart: targeting mitochondrial autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Antioxid Redox Signal* 2015; 22: 1527-44.
40. Kobayashi S, Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852: 252-61.
41. Wang W, Zhang J, Wang H, Wang X, Liu S. Vitamin D deficiency enhances insulin resistance by promoting inflammation in type 2 diabetes. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2019; 12: 1859. PMID:31934009.
42. Yin X, Chen JY, Huang XJ, Lai JH, Huang C, Yao W, et al. Association between vitamin D serum levels and insulin resistance assessed by HOMA-IR among non-diabetic adults in the United States: Results from NHANES 2007–2014. *Front Nutr* 2022; 9: 883904.
43. Wang W, Zhang J, Wang H, Wang X, Liu S. Vitamin D deficiency enhances insulin resistance by promoting inflammation in type 2 diabetes. *Int J Clin Exp Pathol* 2019; 12: 1859-67.
44. Eguchi A, Feldstein AE. Lysosomal Cathepsin D contributes to cell death during adipocyte hypertrophy. *Adipocyte* 2013; 2: 170-5.
45. Maestro B, Molero S, Bajo S, Dávila N, Calle C. Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Cell Biochem Funct* 2002; 20: 227-32.
46. Szymczak-Pajor I, Drzewoski J, Śliwińska A. The molecular mechanisms by which vitamin D prevents insulin resistance and associated disorders. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 6644.

Original Article

## Combined Effects of Vitamin D3 Supplementation and Aerobic Training on Cardiac Cathepsin D and Insulin Resistance in Diabetic Rats Induced by High-fat Diet and Streptozotocin

Golpasandi H<sup>1</sup> , Rahimi MR<sup>1</sup> , Ahmadi S<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Department of Exercise Physiology, Faculty of Humanities and Social Sciences, Kurdistan University, Sanandaj, Iran. <sup>2</sup>Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, I.R. Iran

e-mail: [r.rahimi@uok.ac.ir](mailto:r.rahimi@uok.ac.ir)

Received: 16/04/2023 Accepted: 11/06/2023

### Abstract

**Introduction:** Diabetic cardiomyopathy is an important factor in increasing the risk of heart failure and mortality in people with diabetes. Cathepsin D has been shown to play a crucial role in maintaining multiple physiological functions, including the degradation of intracellular proteins and enzyme precursors. This research aimed to investigate the combined effects of vitamin D3 supplementation and aerobic exercise on cardiac cathepsins and insulin resistance in diabetic rats induced by the combination of high-fat diet and streptozotocin (HFD-STZ). **Materials and Methods:** In 40 male Wistar rats, type 2 diabetes was induced by a high-fat diet fed+ streptozotocin, and they were divided into 5 groups: 1) Normal control (NC), 2) Diabetic control (DC), 3) Diabetes+Aerobic training (DAT), 4) Diabetes+Vitamin D3 (DVD), and 5) Diabetes+Aerobic training and Vitamin D3 (DVDAT). After eight weeks of aerobic training and vitamin D3 supplementation, cathepsin D protein content of heart tissue and serum levels of insulin, glucose, vitamin D3, and insulin resistance index were measured. **Results:** One-way ANOVA showed that cathepsin D content increased by 335% in the DC group compared to the NC group ( $P<0.0001$ ). In contrast, there were significant decreases in the DAT, DVD, and DVDAT groups (44.37%, 50.80%, and 62.76%, respectively) compared to the DC group ( $P<0.0001$ ). The HOMA-IR index also decreased in the DAT, DVD, and DVDAT groups by 52.95%, 39.27%, and 63.68%, respectively ( $P<0.0001$ ). **Conclusion:** Eight weeks of aerobic training with vitamin D3 supplementation improves glucose metabolism in diabetic rats induced by HFD-STZ, probably via reducing cardiac tissue level of cathepsin D and insulin resistance index.

**Keywords:** Insulin resistance, Vitamin D3, Cathepsin D, Aerobic training, Diabetic cardiomyopathy