مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی بیست و سوم، شماره‌ی ۵، صفحه‌های ۳۴۰ ـ ۳۲۹ (آذر ـ دی ۱۴۰۰)

مقاله‌ی پژوهشی

اثر زمان تمرین هوازی در چرخه‌ی روشنائی- تاریکی بر کنترل قند خون، بیان پروتئین SIRT1 و نسبت NAD+/NADH در عضله‌ی اسکلتی موش‌های مدل دیابت نوع ۲

خدیجه پورعبدی[۱]، دکتر فرشته شهیدی[۱]، دکتر محمدرضا تابنده[۲]، دکتر مجتبی صالح پور[۱]

۱) گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجائی، تهران، ایران، ۲) گروه علوم پایه، بخش بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول**: تهران، شهرک اکباتان، فاز ۳، بلوک E2، ورودی ۸، طبقه ۹، واحد ۲۶۳، کد پستی: ۱۳۹۳۹۳۳۸۶۶، دکتر فرشته شهیدی؛
e-mail:fe-shahidi@sru.ac.ir

چکیده

مقدمه: عملکرد میتوکندری در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک توسط چرخه‌ی روشنائی-تاریکی تنظیم می‌شود. ممکن است مداخلات تمرینی وابسته به زمان؛ با تنظیم هیپرگلیسمی، بر سلامت متابولیک بیماران مبتلا به دیابت تاثیر بگذارد. لیکن، اطلاعات محدودی در مورد ارتباط بین زمان تمرین و تنظیم مسیرهای شبانه‌روزی عضلانی در شرایط دیابت در دسترس است. این تحقیق با هدف بررسی تاثیر زمان تمرین در چرخه‌ی روشنائی- تاریکی بر بیان پروتئین **SIRT1** و نسبت **NAD+/NADH**، در عضله دوقلوی موش‌های مدل دیابت نوع ۲ انجام شد. مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی، تعداد سی سر موش نر سالم نژاد **NMRI** به‌طور تصادفی به سه گروه شاهد، دیابتی و دیابتی+تمرین تقسیم‌بندی شدند. دیابت نوع دو با استفاده از ترکیبی از رژیم غذایی پرچرب (۵ هفته) و تزریق استرپتوزوتوسین (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) القا شد. سپس هشت هفته تمرین هوازی، با شدت متوسط (۵ روز، ۶۰-۸۰ دقیقه) روی تردمیل در دو زمان متفاوت در اوایل مرحله روشنائی (**ZT3**: در ساعت ۹:۰۰ صبح) و اوایل مرحله تاریکی (**ZT15**: در ساعت ۹:۰۰ شب) انجام شد. عضله دوقلو در دو زمان تمرین جمع‌آوری و بیان پروتئین **SIRT1** با روش وسترن بلات ارزیابی شد. محتوای **NAD+/NADH** سلولی و غلظت گلوکز با روش رنگ‌سنجی ارزیابی گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از تحلیل واریانس دو-راهه استفاده شد. یافته‌ها: هشت هفته تمرین هوازی فقط در اوایل مرحله تاریکی باعث افزایش معنی‌دار بیان پروتئین **SIRT1** و سطح **NADH** (P<۰/۰۰۱) و بهبود هایپرگلایسمی (P=۰/۰۰۵) شد. تمرین هوازی بصورت مستقل از زمان بر افزایش نسبت **NAD+/NADH** اثرگذار بود (P=۰/۰۰۳). نتیجه‌گیری: زمان‌بندی مناسب تمرین در اوایل تاریکی، همزمان با تغییرات شبانه‌روزی پروتئین **SIRT1** و سطح **NAD+**، ممکن است باعث تقویت اثرات تمرین و اصلاح مؤثرتر هایپرگلایسمی شود.

واژگان کلیدی: زمان‌بندی تمرین هوازی، ریتم شبانه‌روزی، دیابت نوع دو، SIRT1، NAD+/NADH

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۲/۱۰ـ دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۱/۳/۲۲ ـ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۳/۲۲

مقدمه

بسیاری از فرآیندهای رفتاری و فیزیولوژیک در پستانداران با نوسانات روزانه همراه‌اند که توسط مجموعه‌ای از ژن‌ها موسوم به " ژن‌های ساعت شبانه‌روزی[i]" هدایت می‌شوند.[۱] سیستم زمان‌بندی شبانه‌روزی[ii] از یک ساعت مرکزی در مغز و ساعت‌های محیطی در بافت‌های متابولیک؛

i -Circadian Clock Genes
ii -Circadian Timing System

مثل عضله اسکلتی، تشکیل شده است و مسیرهای متابولیکی مختلف را با زمان روز هماهنگ می‌کند. ساعت‌های شبانه-روزی توسط چرخه‌ی روشنائی-تاریکی تحریک می‌شوند و ریتم‌های شبانه‌روزی فیزیولوژیکی (مثل ترشح هورمون، تنظیم دمای بدن، بیان ژن، گلیکولیز، متابولیسم لیپید و کربوهیدرات، فعالیت میتوکندری) و رفتاری (خواب-بیداری، تغذیه- ناشتائی) را تنظیم می‌کنند.[۲] در هماهنگی با زمان، طیف وسیعی از فرآیندهای زیست‌شناختی در عضله اسکلتی؛ مثل تنفس میتوکندریایی، متابولیسم گلوکز و حساسیت به-انسولین، طی ۲۴ساعت نوسان می‌کنند.[۳-۵] علاوه بر این، رونویسی بیش از ۴۰۰۰ ژن توسط ساعت‌های شبانه‌روزی تنظیم می‌شود که به‌عنوان ژن‌های کنترل‌شونده با ساعت[i] (CCG) شناخته می‌شوند. ساعت‌ها از طریق اعمال تغییر در رونویسی CCG ها نقش مهمی در حفظ سلامت سلولی ایفا می‌کنند.[۶]

سیرتوئین-۱[ii] (SIRT1) یکی از هفت پروتئین سیرتوئین در پستانداران است که به عنوان CCG شناسائی شده است و رونویسی آن به عملکرد ساعت شبانه‌روزی وابسته است.[۷] SIRT1 برای فعالیت خود به نیکوتین‌آمیدآدنین دی-نوکلئوتید[iii] (NAD^+) نیاز دارد و از طریق تنظیم فرآیندهای متابولیکی مانند پیام‌دهی انسولین، عملکرد میتوکندری و ریتم‌های شبانه‌روزی در کنترل هومئوستاز گلوکز شرکت می‌کند و به عنوان یک هدف درمانی در دیابت نوع دو مطرح شده است.[۸] فراتر از تنظیم متابولیسم، پروتئین SIRT1 یک تعدیل‌کننده کلیدی ژن‌های ساعت شبانه‌روزی است.[۹،۱۰] فعالیت SIRT1 به‌صورت روزانه نوسان می‌کند و میزان فعالیت دآستیلازی[iv] آن در مرحله تاریکی بیشتر است.[۱۱] به-طرز جالب توجهی، رونویسی از سایر ژن‌های CCG ؛ مانند آنزیم نیکوتین‌آمیدفسفریبوزیل‌ترانسفراز[v] (NAMPT)، نیز ریتم شبانه‌روزی را نشان می‌دهد، که منجر به نوسانات NAD^+ می‌شود.[۱۲] در واقع، مسیر آنزیمی $NAMPT/NAD^+/SIRT1$ یک چرخه‌ی بازخوردی است که واسطه‌ی تنظیم موزون بسیاری از رویدادهای فیزیولوژیکی در پاسخ به ورودی‌های تغذیه‌ای و محیطی است. در این چرخه، NAD^+ به‌عنوان نوسان‌ساز متابولیکی عمل می‌کند و نوسانات شبانه‌روزی را از طریق SIRT1 تنظیم می‌کند.[۱۳]

تحقیقات اخیر شواهدی را ارائه می‌دهد که اختلال در زمانبندی شبانه‌روزی ممکن است نقش مهمی در تغییرات پاتولوژیکی پیشرفت دیابت نوع دو ایفا کند.[۱۴،۱۵] گزارش شده است که در بیماران مبتلا به دیابت نوع‌دو، ریتم شبانه‌روزی ژن‌های NAMPT و SIRT1 و گیرنده‌های انسولین مختل شده است.[۱۶] در سال‌های اخیر، اهمیت زمان‌شناسی تمرین در تنظیم سلامت متابولیک، به دلیل تأثیر آن بر مسیرهای متابولیکی،[۱۷،۱۸] تعادل انرژی،[۱۹] ظرفیت ورزشی[۱۸] و متابولیسم گلوکز،[۲۰،۲۱] بسیار مورد توجه قرار گرفته است. برای مثال ساویک و همکاران[vi] (۲۰۱۹)، گزارش کردند که تمرین عصرگاهی باعث تغییرات قابل‌توجهی در کاهش گلوکز خون می‌شود.[۲۰] در مقابل، چیانگ و همکاران[vii] (۲۰۱۹)، تاثیر قوی‌تر تمرین صبح‌گاهی را گزارش کردند.[۲۱] یک زمینه فیزیولوژیک برای تفاوت در نتایج تمرینی ممکن است نوسانات SIRT1 و NAD^+ در عضله اسکلتی باشد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که عضله اسکلتی، و به‌طور ویژه عضله دوقلو، دارای CCG های بسیاری هستند که بر عملکرد ورزشی تاثیر دارند.[۱۷،۱۸] از آنجا که سازگاری‌های متابولیکی و مولکولی در عضلات اسکلتی [۲۲] و فعال‌سازی SIRT1 با واسطه تمرین ورزشی یکی از سازوکارهای مؤثر برای بهبود هومئوستاز گلوکز است،[۲۳-۲۶] و با توجه به نوسانات $NAD^+(H)/SIRT1$، یافتن زمان مناسب تمرین به‌منظور تقویت مزایای متابولیکی تمرین و مدیریت بهتر بیماری دیابت ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق بررسی اثر زمان تمرین در اوایل مرحله‌ی تاریکی و روشنائی بر تغییرات $NAD^+(H)/SIRT1$ در عضله دوقلوی موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو، به‌منظور کاهش هایپرگلیسمی، تعدیل وزن و بهبود عملکرد ورزشی است.

مواد و روش‌ها

آزمودنی‌ها

در این مطالعه تجربی، موش‌های نر سالم ۶-۸ هفته‌ای، نژاد NMRI با میانگین وزنی ۳۰-۲۵ گرم از خانه حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شدند. همه حیوانات در شرایط کنترل شده چرخه ی

i -Clock-Controlled genes
ii -Sirtuin1
iii -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Amide
iv -Deacetylase
v- Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase

vi -Savikj
vii -Chiang

روشنائی-تاریکی ۱۲:۱۲ و دمای ۲±۲۲ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و به‌طور آزادانه آب و غذا دریافت کردند. پس از دو هفته سازگاری، موش‌ها به‌طور تصادفی به دو گروه شاهد (تعداد=۱۰) و دیابت (تعداد=۲۰) تقسیم شدند. موش‌های گروه شاهد با رژیم غذایی معمولی جوندگان؛ با حدود ۱۰ درصد کالری از چربی، و گروه دیابتی با رژیم غذایی پرچرب (HFD)، با حدود ٦٠ درصد کالری از چربی (آزمایشگاه تغذیه رویان، اصفهان، ایران) تغذیه شدند. تمام آزمایش‌های حیوانی با دستورالعمل‌های مربوط به مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (نشریه NIH n.86-23) انجام شد و توسط کمیته‌ی اخلاق در پژوهش موسسه تحقیقات علوم ورزشی (IR/SSRI.REC.2021.10626.1064) تأیید شد.

روش اجرا

در مطالعه تجربی حاضر، ترکیبی از رژیم غذایی پرچرب (HFD) و تزریق استرپتوزوتوسین[i] (STZ) برای القای تجربی دیابت نوع دو در موش‌ها استفاده شد.[۲۷] موش‌های گروه دیابتی به مدت پنج هفته با HFD تغذیه شدند. پس از پنج هفته، حیوانات یک دوز تزریق داخل صفاقی STZ (سیگما[ii]-آلمان) محلول در بافر سیترات سدیم (pH 4.4) را به میزان ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. پنج روز پس از تزریق STZ، گلوکز خون ناشتا با نمونه‌گیری خون از ورید دم و استفاده از دستگاه گلوکومتر (گالا[iii]، تایوان) اندازه‌گیری شد. غلظت گلوکز خون ناشتا >۱۱۷(میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) به عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته شد. سپس، حیوانات در گروه‌های شاهد و دیابتی به‌طور تصادفی، بر اساس زمان تمرین، به دو گروه اوایل مرحله روشنائی (ZT3) و اوایل مرحله تاریکی (ZT15) تقسیم شدند. گروه‌های تجربی در دو زمان به شرح زیر بودند: (۱). شاهد (تعداد=۱۰)، (۲). دیابتی (تعداد=۱۰)، (۳). دیابتی+تمرین (تعداد=۱۰). زمان اجرای تمرین با نشانگر زمانی ZT[iv] تعریف می‌شود، که بیانگر زمان بر اساس نشانه‌های زمانی در حالت ۱۲ ساعت روشنائی و ۱۲ ساعت تاریکی است.[۲۸] زمان شروع روشنایی ساعت شش صبح (ZT0) و زمان شروع تاریکی ساعت شش عصر (ZT12) در نظر گرفته شده است.[۱۷] بر این اساس، موش‌های گروه‌های دیابتی+تمرین در اوایل مرحله روشنائی (ZT3) سه ساعت پس از شروع روشنائی معادل با ساعت ۹:۰۰ صبح، و در اوایل مرحله تاریکی (ZT15)، سه ساعت پس از شروع تاریکی معادل با ساعت ۹:۰۰ شب تحت تمرین قرار گرفتند.[۱۷] موش‌های گروه شاهد و دیابتی نیز مطابق با زمان تمرین روی تردمیل ثابت (شم/ورزشی) قرار گرفتند.

برنامه‌ی تمرینی

آزمون عملکرد ورزشی: تمام موش‌ها سه روز قبل از انجام آزمون عملکرد ورزشی با دویدن روی تردمیل جوندگان (برج صنعت آزما، ایران) آشنا شدند. سپس آزمون عملکرد ورزشی بر اساس آثار منتشر شده قبلی،[۲۹] با پنج دقیقه گرم کردن و سرعت شش متر در دقیقه شروع و سپس افزایش سرعت تردمیل به میزان دو متر در دقیقه هر دو دقیقه تا زمان خستگی انجام شد. حداکثر سرعت واماندگی (Vmax[v]) برای هر موش ثبت شد. این آزمون در پایان هشت هفته به‌منظور اثر بخشی تمرین تکرار شد.

آشنائی اولیه با تمرین: موش‌های دو گروه تمرینی شش روز قبل از برنامه‌ی تمرینی اصلی به شرح زیر با تردمیل آشنا شدند: روز اول، دویدن با سرعت ٥ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه. روزهای دوم – ششم: سرعت به تدریج در هر روز یک متر در دقیقه و زمان ۱۰ دقیقه افزایش یافت؛ تا این‌که به سرعت ۱۰ متر در دقیقه و زمان ٦٠ دقیقه در روز ششم رسید.[۳۰]

تمرین هوازی: تمرین هوازی دویدن روی تردمیل در مطالعات قبلی[۳۲-۲۹] توضیح داده شده است. برنامه‌ی تمرینی شامل دویدن مداوم روی تردمیل با شدت متوسط بود. همه موش‌های گروه‌های دیابتی + تمرین برنامه‌ی تمرینی را به مدت هشت هفته، پنج روز در هفته، ٦٠ تا ۸۰ دقیقه در روز (۱۰ دقیقه گرم کردن، ٤٥-٦٠ دقیقه دویدن، ٥ دقیقه سرد کردن) انجام دادند. شدت تمرین هوازی معادل با ٥٠-٦٠٪ Vmax است که در آخرین تست عملکرد ورزشی به دست آمده است. برای ایجاد سازگاری تمرینی، شدت تمرین و زمان تمرین به تدریج افزایش یافت (سرعت از ۱۰ متر در دقیقه به ۱۲ متر در دقیقه و زمان دویدن از ٤٥ به ٦٠ دقیقه). در تمامی مراحل اجرای تمرین، تردمیل روی شیب صفر درجه و بدون اعمال شوک تنظیم شده بود.

i- Streptozotocin
ii -Sigma
iii -Gala
iv -Zeitgeber Time
v- Maximal Velocity

جداسازی بافت عضلانی و جمع‌آوری نمونه‌های سرم

تمام موش‌ها ٤٨ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین با تزریق داخل صفاقی کتامین[i] (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین[ii] (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. کالبد شکافی موش‌ها با توجه به زمان تمرین انجام شد: در ساعت ۹:۰۰ صبح برای گروه‌های اوایل مرحله روشنائی و ساعت ۹:۰۰ شب برای گروه‌های اوایل مرحله تاریکی.[iv] نمونه‌های خونی از قلب موش اخذ گردید و سرم با سانتریفیوژ (به مدت ۱۵ دقیقه) جدا شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. عضله دوقلو تشریح و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و برای تجزیه و تحلیل بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی

غلظت گلوکز خون ناشتا با استفاده از روش رنگ‌سنجی آنزیمی طبق پروتوکل شرکت سازنده (پیشتاز طب، ایران) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل وسترن بلات

بدین منظور ۵۰ میلی‌گرم بافت در ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده RIPA[iii] همراه با بازدارنده پروتئاز روی یخ لیز شد. غلظت پروتئین با روش برادفورد تعیین شد. مقادیر مساوی از لیزات‌ها با الکتروفورز روی ژل ۱۰٪ پلی آکریل آمید- سدیم دودسیل سولفات[iv] جدا شدند. پروتئین با استفاده از دستگاه بلات بر روی غشاهای پلی وینیلیدن فلورایدِ[v] منتقل و با استفاده از شیر بدون چربی ۱۰ درصد (سیگما- آلمان) در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد مسدود شد. غشاها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق با آنتی‌بادی اولیه SIRT1 -SC :B-7 :74465(بیوتکنولوژی سانتاکروز[vi]- آمریکا) رقیق شده در محلول مسدود کننده ۱:۱۰۰۰ اتیمار شدند. پس از سه بار شستشو ۱۵ دقیقه‌ای در سالین بافر تریس با Tween 20، غشاها با یک آنتی‌بادی ثانویه (mouse anti-rabbit IgG- HRP: sc-2357) مناسب کونژوگه با پروکسیداز ترب کوهی[vii] رقیق شده در محلول مسدودکننده ۱:۵۰۰ به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو، واکنش پروتئین با استفاده از کیت تشخیص ECL مشاهده شد (Western C; Bio-Rad). بارگذاری پروتئین به رنگ‌پذیری پروتیئن هیپوگزانتین فسفریلاز ترانسفرار[viii] HPRT: F-1, SC- 376938 (بیوتکنولوژی سانتاکروز- آمریکا) نرمال شد. تجزیه و تحلیل چگالی نوری با استفاده از ژل اسکنر Bio-5000 Plus انجام شد.

اندازه‌گیری NAD^+ و NADH

سطوح کلی NAD عضلانی (NAD+ و NADH) با استفاده از کیت رنگ‌سنجی (K337-100) طبق دستورالعمل شرکت سازنده (بایویژن[ix]- آمریکا) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، ۲۰ میلی‌گرم نمونه‌های بافتی در ٤۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج NAD^+/NADH همگن شدند و به مدت ۵ دقیقه در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در این روش به‌منظور اندازه‌گیری NADH تام ابتدا کل NAD^+ سلولی با حرارت تخریب و در لیز سلولی محتوای NADH بررسی می‌شود. سپس کل NAD موجود در سلول به NADH تبدیل و محتوای NADH تام سلول اندازه‌گیری می‌شود. از تفریق نتایج دو اندازه‌گیری فوق مقدار NAD^+ موجود در سلول محاسبه می‌گردد. برای تجزیه NAD^+، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های استخراج شده در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد و محتوای NADH سلولی در ۵۰ میکرولیتر از نمونه فاقد NAD^+ با استفاده از مخلوط واکنش آنزیمی اندازه‌گیری شد. هم‌چنین تبدیل NAD^+ به NADH بر روی ۵۰ میکرولیتر نمونه پس از مخلوط شدن با معرف آنزیمی و انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ٤۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانشگر پلیت (بایوتک[x]، آمریکا) اندازه‌گیری شد. محتوای پروتئین سلول با روش برادفورد اندازه‌گیری و محتوای NAD^+ و NADH سلول بر حسب پیکومول بر میلی‌گرم پروتئین ارائه شدند. ضریب تغیرات داخلی کیت مورد استفاده < ۷٪، ضریب تغییرات خارجی <٦ ٪، ومیزان حساسیت کیت برابر ۰,٤ پیکومول بر میلی‌لیتر می‌باشد.

روش‌های آماری

از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۵ و نرم‌افزار Prism9 جهت تجزیه و تحلیل‌های آماری و ترسیم نمودارها استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شد. نرمال

i -Ketamine
ii- Xylazine
iii- Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
iv -SDS-PAGE
v -Polyvinylidene fluoride
vi -Santa Cruz Biotechnology
vii -Horeseredish peroxidase
viii -Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
ix -Biovision
x- Biotek

بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک و همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون لوین بررسی شد. جهت بررسی تغییرات بین گروهی از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (گروه×زمان) استفاده شد. آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه‌های زوجی بین گروه‌های مورد مطالعه استفاده شد. سطح معنی‌داری P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به شاخص‌های وزن، گلوکز خون و آزمون حداکثر سرعت در پیش آزمون برای گروه‌های تحقیق در جدول شماره (۱) نشان داده شده است. تحلیل واریانس دو طرفه برای غلظت گلوکز سرم نشان داد که اثر خالص گروه (P<۰/۰۰۱) و اثر تعامل (P=۰/۰۱۱) معنی‌دار بود با این وجود تاثیر معنی‌داری از اثر خالص زمان (P=۰/۲۸۳) مشاهده نشد. نتایج آزمون تعقیبی برای اثر گروه نشان‌دهنده‌ی افزایش معنی‌دار سطوح گلوکز در گروه‌های دیابتی (P<۰/۰۰۱) و دیابتی+تمرین (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه شاهد و هم‌چنین کاهش معنی‌دار در گروه دیابتی+تمرین نسبت به گروه دیابتی (P=۰/۰۱۳) بود. نتایج آزمون تعقیبی برای اثر متقابل (زمان×گروه) نشان داد که: الف) سطوح گلوکز در گروه دیابتی در مقایسه با شاهد در هر دو زمان ZT3 و ZT15 افزایش معنی‌دار داشت (P<۰/۰۰۱). ب) تفاوت معنی‌داری در سطح گلوکز گروه‌های شاهد (P=۰/۲۸٤)، دیابتی (P=۰/۳۷۹) و دیابتی+تمرین (P=۰/۲۵۲) بین دو زمان ZT3 و ZT15 وجود نداشت. ج) سطوح گلوکز در گروه دیابتی+تمرین نسبت به گروه دیابتی در ZT15 بهبود معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱) در حالی‌که تفاوتی در زمان ZT3 مشاهده نشد (P=۰/۹۹۹). (**نمودار ۱. الف**).

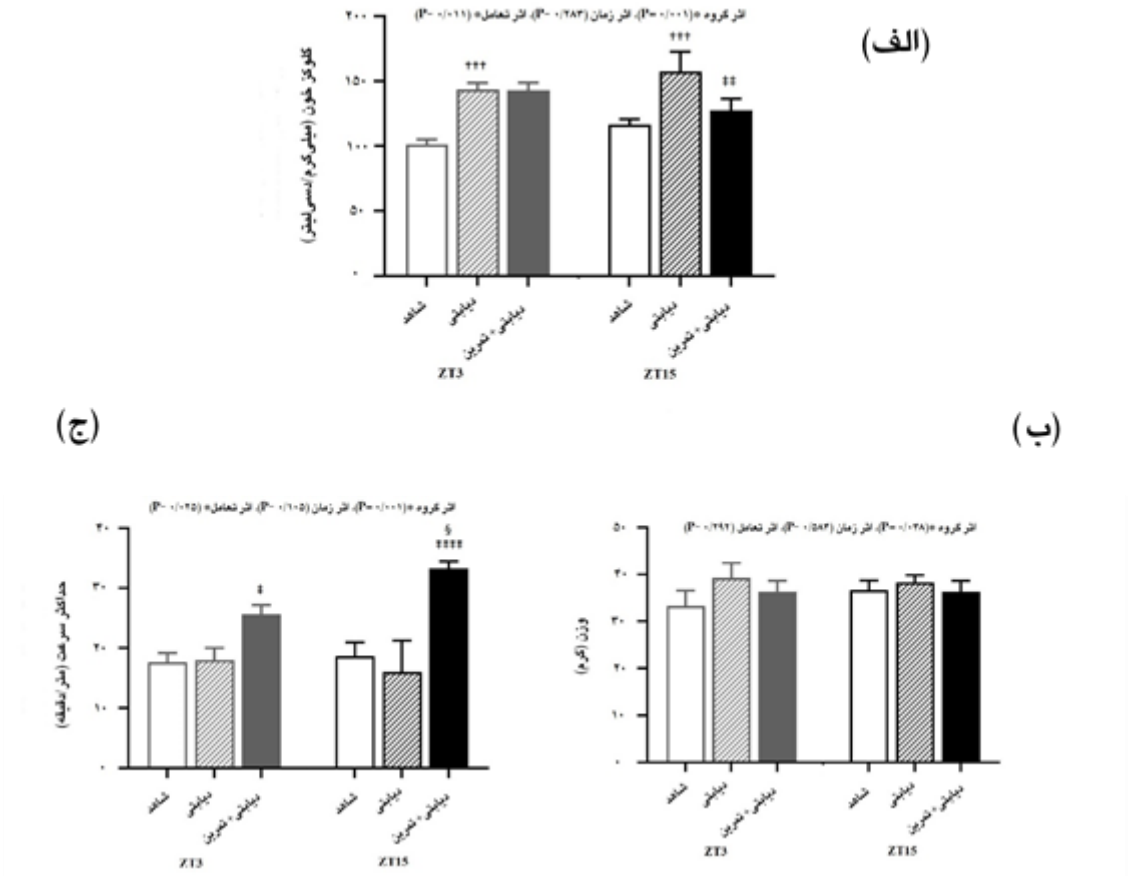
تحلیل واریانس دو طرفه نشان‌دهنده‌ی تاثیر معنی‌دار اثر خالص گروه (P=۰/۰٤۸) و عدم تاثیر معنی‌دار زمان (P=۰/۵۸٤) و اثر تعامل (P=۰/۲۹۲) برای تغییرات وزن بود (**نمودار ۱. ب**). تحلیل واریانس دو طرفه برای آزمون حداکثر سرعت نشان داد اثر خالص گروه (P<۰/۰۰۱) و اثر تعامل (P=۰/۰۲۵) معنی‌دار بود. با این وجود اثر خالص زمان (P=۰/۱۰۵) معنی‌دار نبود. نتایج آزمون تعقیبی برای اثر گروه نشان داد آزمون حداکثر سرعت به صورت معنی‌دار در گروه‌های دیابتی+تمرین نسبت به گروه شاهد (P<۰/۰۰۱) و دیابتی (P<۰/۰۰۱) افزایش یافت. نتایج آزمون تعقیبی برای اثر متقابل (زمان×گروه) نشان داد که: الف) آزمون حداکثر سرعت گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد در هر دو زمان ZT3 (P=۰/۸۲۱) و ZT15 (P=۰/۹۹۹) تفاوت معنی‌دار نداشت. ب) تفاوت معنی‌داری در آزمون حداکثر سرعت گروه‌های شاهد (P=۰/۹۹۷)، دیابتی (P=۰/۹۳٦) بین دو زمان وجود نداشت. با این وجود تفاوت معنی‌داری بین دو گروه دیابتی+تمرین (P=۰/۰۳۹) بین دو زمان ZT3 و ZT15 وجود داشت. ج) آزمون حداکثر سرعت گروه دیابتی+تمرین نسبت به گروه دیابتی در ZT15 (P<۰/۰۰۰۱) و ZT3 (P=۰/۰۳۹) پیشرفت معنی‌داری یافت. (**نمودار ۱. ج**).

جدول ۱- مقادیر پایه متغیرهای گلوکز خون، وزن، و آزمون حداکثر سرعت در گروه‌های تحقیق

زمان	ZT3			ZT15		
گروه / متغیرها	شاهد	دیابتی	دیابتی+تمرین	شاهد	دیابتی	دیابتی+تمرین
تعداد	٥	٥	٥	٥	٥	٥
گلوکز (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۰٤/٦±۷/۰	۱۰۰/۰۰±۲/٦	۱۰۰/٦٦±۱/۱٥	۱۰۲/۳±٤/۷	۱۰۲/۳±۸/۷	۱۰۷/۰±۹/۰
وزن (گرم)	۲۷/۰±۱/۰	۲۸/۰۰±۱/۰	۲۷/۰±۲/٦	۲۷/٦±۰/٥	۲۸/٦±۱/٥	۲۸/۰±۱/۰
حداکثر سرعت (متر/دقیقه)	۲۱/۱±۳۳/٥	۲۲/٦±۰۰/۲	۱۸/۳±۰۰/۰	۲۰/٦±۲/٥	۱۸/۳±۸/٥	۲۳/۳±۳/۲

ZT3: سه ساعت پس از شروع روشنائی معادل با ۹ صبح، ZT15: سه ساعت پس از شروع تاریکی معادل با ۹ شب. نتایج بصورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده است.

تحلیل واریانس دو طرفه برای پروتیئن SIRT1 اثر گروه اصلی معنی‌دار، اثر زمان اصلی معنی‌دار و اثر متقابل معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) نشان داد. نتایج آزمون تعقیبی برای اثر خالص گروه نشان داد SIRT1 در گروه‌های دیابتی و دیابتی+تمرین در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌دار یافت (P<۰/۰۰۱). هم‌چنین افزایش معنی‌دار SIRT1 در گروه‌های دیابتی+تمرین نسبت به گروه دیابتی مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). اثر خالص زمان نشان‌دهنده‌ی افزایش معنی‌دار SIRT1 در زمان ZT15 به نسبت به ZT3 بود (P<۰/۰۰۱).



نمودار ۱- تاثیر زمان تمرین بر (الف): گلوکز خون. (ب): وزن، (ج): آزمون عملکرد ورزشی حداکثر سرعت در موش‌های شاهد و دیابتی (تعداد= ۵ موش در هر گروه). سه ساعت پس از شروع روشنائی معادل با ۹ صبح (ZT3)، سه ساعت پس از شروع تاریکی معادل با ۹ شب (ZT15). نتایج بصورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده است.*تاثیر معنی‌دار اثر خالص گروه، زمان و اثر متقابل (آزمون آنوا دو طرفه)، †تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های دیابتی و شاهد، ‡ تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های دیابتی+تمرین با گروه دیابتی، § تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها در زمان ZT3 به نسبت ZT15

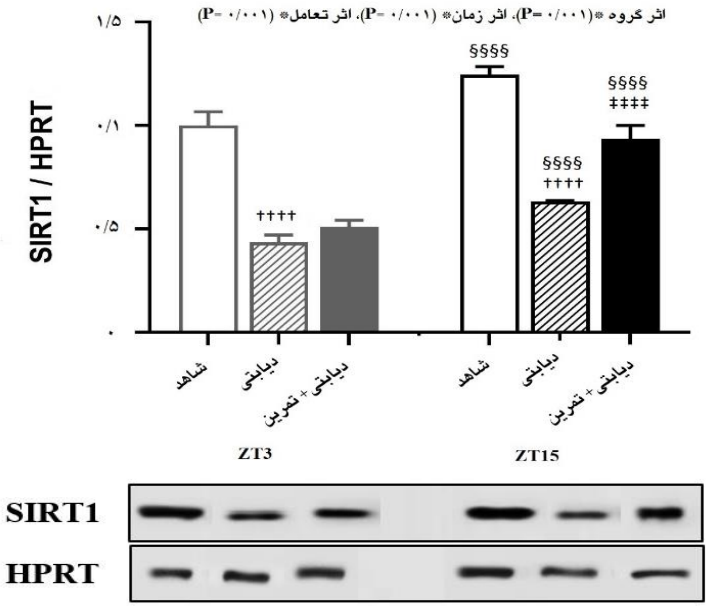
نتایج آزمون تعقیبی برای اثر متقابل (زمان×گروه) نشان داد که: الف) SIRT1 در گروه دیابتی در مقایسه با شاهد در هر دو زمان ZT15 وZT3 کاهش معنی‌داری یافت (P<۰/۰۰۱). ب) SIRT1 در گروه‌های شاهد (P< ۰/۰۰۱)، دیابتی (P<۰/۰۰۱) و دیابتی+تمرین (P<۰/۰۰۱) در زمان ZT15 نسبت به زمان در ZT3 افزایش معنی‌داری نشان داد. ج) SIRT1 در گروه دیابتی+تمرین نسبت به دیابتی در زمان ZT15 افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) و عدم تغییر معنی‌دار (P=۰/۱۳۲) را در ZT3 نشان داد. **(نمودار۲)**.

تحلیل واریانس دو طرفه برای سطح NAD^+ در عضله نشان داد که اثر گروه اصلی معنی‌دار (p<۰/۰۰۱)، اثر زمان اصلی معنی‌دار (p<۰/۰۰۱)، اما اثر متقابل (p=۰/۰۶۶) معنی-دار نبود. نتایج آزمون تعقیبی برای اثر خالص گروه نشان داد NAD^+ در گروهای دیابتی و دیابتی+تمرین در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌دار داشت (P=۰/۰۳۸). با این وجود، تغییر معنی‌داری در سطح NAD^+ گروه دیابتی+تمرین نسبت به گروه دیابتی مشاهده نشد (P=۰/۰۹۶). بعلاوه، اثر خالص زمان نشان‌دهنده‌ی افزایش معنی‌دار NAD^+ در زمان ZT15 نسبت به زمان ZT3 بود (P<۰/۰۰۱). **(نمودار ۳. الف)**.

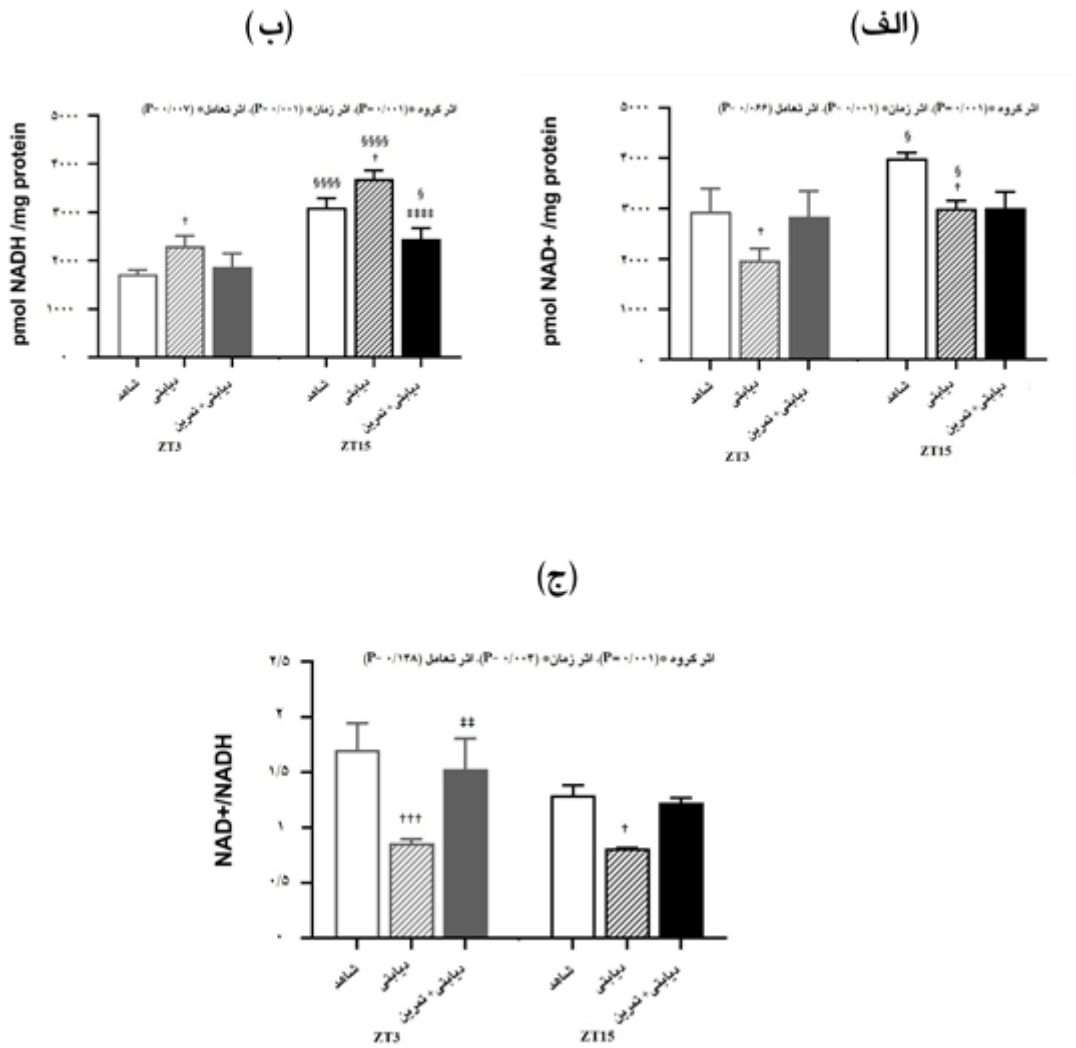
تحلیل واریانس دو طرفه برای سطح NADH نشان داد اثر خالص زمان (p<۰/۰۰۱)، اثر خالص گروه (p<۰/۰۰۱) و اثر تعامل (p=۰/۰۰۷) معنی‌دار بود. نتایج آزمون تعقیبی برای اثر خالص گروه نشان داد NADH در گروهای دیابتی و دیابتی+تمرین در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت (P=۰/۰۳۸). علاوه بر این، سطح NADH در گروه‌های دیابتی+تمرین در مقایسه با گروه دیابتی کاهش معنی‌دار

داشت (P<۰/۰۰۱). بعلاوه، اثر خالص زمان نشان‌دهنده‌ی افزایش معنی‌دار NADH در زمان ZT15 به نسبت ZT3 بود (P< ۰/۰۰۱). هم‌چنین، نتایج آزمون تعقیبی برای اثر متقابل (زمان×گروه) نشان داد که: الف) NADH در گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد در هر دو زمان ZT15 (P=۰/۰۳٦) و ZT3 (P= ۰/۰٤۳) افزایش معنی‌داری یافت. ب) سطح NADH در گروه‌های شاهد (P<۰/۰۰۱)، دیابتی (P<۰/۰۰۱) و دیابتی+تمرین (P=۰/۰۳۸) در ZT15 نسبت به زمان ZT3 افزایش معنی‌داری نشان داد. ج) سطح NADH در گروه دیابتی+تمرین نسبت به گروه دیابتی در ZT15 کاهش معنی-دار (P<۰/۰۰۱) و عدم تغییر معنی‌دار (P=۰/۱۷۵) در ZT3 نشان داد (**نمودار ۳. ب**).

تحلیل واریانس دو طرفه برای نسبت $NAD^+/NADH$ در عضله نشان داد که اثر خالص گروه (P<۰/۰۰۱) و اثر خالص زمان معنی‌دار بود (P= ۰/۰۰٤)، اما اثر تعامل (P=۰/۱٤۸) معنی‌دار نبود. نتایج آزمون تعقیبی برای اثر خالص گروه نشان داد NAD+/NADH در گروه‌های دیابتی و دیابتی+تمرین در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌دار داشت (P<۰/۰۰۱). در مقابل افزایش معنی‌داری در $NAD^+/NADH$ در گروه‌های دیابتی+تمرین نسبت به گروه دیابتی مشاهده شد (P=۰/۰۰۳). هم‌چنین، اثر خالص زمان نشان‌دهنده‌ی کاهش معنی‌دار $NAD^+/NADH$ در زمان ZT15 نسبت به زمان در ZT3 بود (P=۰/۰۲۲). (**نمودار ۳. ج**).



نمودار ۲- تاثیر زمان تمرین بر بیان پروتئین SIRT1 در عضله‌ی دو قلوی موش‌های شاهد و دیابتی(تعداد= ۵ موش در هر گروه). نتایج وسترن بلات در پائین نمودار نمایش داده شده است. سه ساعت پس از شروع روشنائی معادل با ۹ صبح (ZT3)، سه ساعت پس از شروع تاریکی معادل با ۹ شب (ZT15). نتایج بصورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده است.*تاثیر معنی‌دار اثر خالص گروه، زمان و اثر متقابل (آزمون آنوا دو طرفه)، †تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های دیابتی و شاهد، ‡ تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های دیابتی+تمرین با گروه دیابتی، § تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها در زمان ZT3 به نسبت ZT15



نمودار ۳- تاثیر زمان تمرین بر (الف): سطح +NAD، (ب): سطح NADH. (ج): نسبت NAD+/NADH در عضله‌ی دو قلوی موش‌های شاهد و دیابتی(تعداد= ۵ موش در هر گروه). سه ساعت پس از شروع روشنائی معادل با ۹ صبح (ZT3)، سه ساعت پس از شروع تاریکی معادل با ۹ شب (ZT15). نتایج بصورت میانگین± انحراف معیار ارائه شده است.*تاثیر معنی‌دار اثر خالص گروه، زمان و اثر متقابل (آزمون آنوا دو طرفه)، †تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های دیابتی و شاهد، ‡ تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های دیابتی+تمرین با گروه دیابتی، § تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها در زمان ZT3 به نسبت ZT15

بحث

تمرین ورزشی منظم با شدت متوسط یک راه مؤثر برای مدیریت هایپرگلایسمی در بیماری دیابت نوع دو است. علاوه‌براین، زمان‌بندی مداخلات تمرینی بر اساس چرخه‌ی روشنائی-تاریکی ممکن است الگوی متفاوتی برای کنترل هایپرگلایسمی ایجاد کند. در تحقیق حاضر تاثیر زمان تمرین در اوایل مرحله روشنائی و اوایل مرحله تاریکی بر پروتئین SIRT1 و نسبت NAD^+/NADH در عضله‌ی دوقلوی موش-های دیابتی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین هوازی فقط در اوایل تاریکی باعث تنظیم مثبت گلوکز خون شد. این مزیت متابولیکی با تعامل و هم-افزایی اثرات تمرین هوازی با زمان روز بر پروتئین SIRT1 و سطح NADH و ریتم شبانه‌روزی NAD^+ در اوایل مرحله‌ی تاریکی میانجی‌گری می‌شود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که القاء دیابت نوع دو باعث کاهش معنی‌دار میزان پروتئین SIRT1 در عضله اسکلتی شد. کمبود پروتئین SIRT1 باعث اختلال در پیام‌دهی انسولین می‌شود و ارتباط نزدیکی با مقاومت به انسولین و عدم تحمل گلوکز دارد.[۲۳] یکی از نتایج قابل توجه در تحقیق حاضر این است که هشت هفته تمرین هوازی با شدت متوسط، فقط در اوایل مرحله تاریکی تاثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین

SIRT1 موش‌های دیابتی دارد. نتیجه دیگر تحقیق نشان داد که بیان پروتئین SIRT1 قویا تحت تاثیر چرخه‌ی روشنائی-تاریکی روزانه قرار می‌گیرد؛ بطوری‌که با افزایش معنی‌دار در اوایل مرحله تاریکی و کاهش در اوایل مرحله روشنائی همراه است. این نتایج نشان می‌دهد که تمرین و زمان در اوایل مرحله تاریکی اثر هم‌افزائی بر تغییرات پروتئین SIRT1 دارند و تاثیر یکدیگر را تقویت می‌کنند. افرایش معنی‌دار پروتئین SIRT1 در پاسخ به زمان تمرین ممکن است به دلیل افزایش بیشتر از منابع مختلف انرژی و فعال‌سازی مسیرهای متابولیکی در عضله اسکلتی در طول تمرین در اوایل مرحله تاریکی باشد.[۱۷،۱۸]

مطالعات انسانی و حیوانی با تمرکز بر نوع و شدت تمرین اثربخشی برنامه‌های مختلف تمرینی را در شرایط دیابتی بر میزان SIRT1 نشان داده‌اند.[۲۳-۲۶] برای مثال، لوئی و همکاران[i] (۲۰۱۹ و ۲۰۱۸)، گزارش دادند که هشت هفته تمرین در ساعت ۹-۱۱ صبح با افزایش بیان SIRT1 و PGC-1α اختلال عملکرد متابولیکی ناشی از دیابت را کاهش داد.[۲۳،۲۶] محسن‌زاده و همکاران (۲۰۲۰)، تاثیر تمرین تناوبی با شدت بالا (HHIT) بر افزایش بیان ژن SIRT1 در عضله نعلی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت را نشان دادند.[۲۴] این نتایج در مطالعات انسانی نیز تائید شده است.[۲۵] لازم به ذکر است که در تحقیقات فوق نمونه‌های بافتی در یک مقطع زمانی جمع‌آوری شدند و اشاره‌ای به زمان بافت‌برداری و زمان اجرای تمرین نشده است.

پروتئین SIRT1 برای فعالیت آنزیمی خود به سوبسترای متابولیکی NAD^+ نیاز دارد. در شرایط استرس انرژی مانند محدودیت در کالری دریافتی، ناشتائی و فعالیت ورزشی؛ سطح NAD^+ سلول افزایش می‌یابد و با فعال‌سازی SIRT1 باعث حفظ عملکرد میتوکندری و تولید ATP می‌شود.[۳۴] برعکس، مصرف بیش از حد انرژی ناشی از رژیم‌های پرچرب، منجر به تخلیه NAD^+ در عضله اسکلتی می‌شود.[۳۵] کاهش نسبت $NAD^+/NADH$ و افزایش NADH یکی از اختلال‌های بیوشیمائی در بیماری دیابت است که به‌عنوان علتی برای کاهش ظرفیت اکسیداتیو سلولی معرفی شده است.[۳۶] در تحقیق حاضر کاهش معنی‌داری در سطح NAD^+ و نسبت $NAD^+/NADH$ و هم‌چنین افزایش معنی‌داری در سطح NADH عضله دوقلوی موش‌های دیابتی مشاهده شد.

نتایج تحقیقات پیشین نشان دادند که تمرین ورزشی با شدت متوسط باعث تنظیم مجدد NAD^+ و NADH (افزایش و کاهش به‌ترتیب) و بهبود ظرفیت اکسیداتیو سلول عضلانی در موش‌های دیابتی می‌شود.[۳۶،۳۷] نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین هوازی از طریق افزایش معنی‌دار نسبت $NAD^+/NADH$ و کاهش معنی‌دار سطح NADH باعث تنظیم تغییرات متابولیکی در موش‌های دیابتی شد. با این حال، زمان‌بندی تمرین هوازی نتوانست تغییرات قابل‌توجهی در افزایش سطح NAD^+ ایجاد کند.

به نظر می‌رسد که افزایش سطح پروتئین NAMPT در نتیجه‌ی استرس انرژی با واسطه‌ی تمرین، سازوکار اولیه‌ای باشد که از طریق آن افزایش در نسبت $NAD^+/NADH$ و SIRT1 اتفاق می‌افتد.[۳۸] علاوه بر این، رونویسی NAMPT توسط فاکتورهای شبانه‌روزی تنظیم می‌شود و میزان بیان آن در مرحله‌ی تاریکی بیشتر است.[۱۲] بر این اساس، اوج بیان NAD^+ حدود اوایل مرحله تاریکی (ZT14) (معادل با هشت شب) اتفاق می‌افتد و باعث افزایش میزان SIRT1 با شروع تاریکی می‌شود.[۱۲،۳۹] در توافق با این داده‌ها، نتایج تحقیق حاضر در مورد اثر زمان نشان داد که سطوح NAD^+ و NADH عضلانی در اوایل مرحله‌ی تاریکی افزایش معنی-داری یافت. در مقابل نسبت $NAD^+/NADH$ در مرحله‌ی روشنائی افزایش معنی‌داری نشان داد.

با توجه به تاثیر متقابل تمرین و زمان، یک نتیجه جالب به دست آمده این است که علی‌رغم این‌که انتظار می‌رود تعامل تمرین با زمان در مرحله تاریکی، تاثیر هم‌افزایی بر غلظت NAD^+ داشته باشد، احتمالا هم‌زمانی مداخله تمرین هوازی با زمان در اوایل مرحله تاریکی (زمانی که غلظت NAD^+ در اوج است) اثرات یکدیگر را محدود نموده‌اند. در مقابل، زمانیکه غلظت NAD^+ کمتر است (اوایل مرحله روشنائی)، تمرین هوازی تأثیر بیشتری بر افزایش غلظت NAD^+ و نسبت $NAD^+/NADH$ نشان داده است. تاثیر معنی‌دار تعامل تمرین با زمان بر سطح NADH نشان داد که تمرین هوازی فقط در اوایل مرحله تاریکی باعث کاهش معنی‌دار سطح NADH به نسبت گروه دیابتی شد. در واقع، افزایش NADH با واسطه زمان و کاهش NADH با واسطه تمرین ممکن است که تاثیرات غالب تمرین بر زمان در اوایل تاریکی را به تصویر بکشد.

در مجموع، به‌نظر می‌رسد که تمرین هوازی، هم‌زمان با اوج نوسانات NAD^+ با واسطه‌ی زمان و تاثیر غالب زمان

i- Liu

تمرین بر سطح NADH در اوایل مرحله تاریکی، ممکن است همپوشانی گسترده‌تری بر تغییرات فیزیولوژیکی و عملکردی پروتئین SIRT1 و متابولیسم انرژی داشته باشد. افزایش پروتئین SIRT1 می‌تواند با فعال‌سازی PGC-1α[i] و تعدیل عملکرد میتوکندری، متابولیسم گلوکز-لیپید،[۴۰] و فعال‌سازی پروتئین ناقل گلوکز-٤ (GLUT4)[ii] توانایی میوسیت‌ها را برای جذب و انتقال گلوکز تحت تاثیر قرار دهد.[۴۱] و از این طریق به تعدیل هومئوستاز گلوکز کمک کند. در تائید این مطلب، نتایج ما نشان داد که هشت هفته تمرین هوازی، بطور ویژه‌ای فقط در اوایل مرحله تاریکی باعث بهبود معنی‌دار هایپرگلایسمی شد. در حالی‌که تمرین در اوایل فاز روشنائی تاثیر معنی‌داری بر هایپرگلایسمی ندارد.

تنوع روزانه در تحمل گلوکز توسط تنظیم زمانی استفاده از گلوکز در بافت‌های محیطی،[۴۲] و عملکرد سلول‌های بتا در پانکراس،[۴۳] تنظیم می‌شود. برای مثال، جذب گلوکز تحریک شده توسط انسولین از طریق GLUT4 به عنوان یک CCG در عضله اسکلتی، توسط ژن‌های ساعت شبانه‌روزی از جمله گیرنده هیدروکربنی شبه انتقال‌دهنده‌ی هسته‌ای-۱ مغز و عضله (BMAL1)[iii] تنظیم می‌شود. ژن BMAL1 در عضله اسکلتی با تعدیل مسیر سیگنالینگ انسولین از طریق بیان دآستیلاز SIRT1 حساسیت به انسولین عضلانی را تنظیم می‌کند.[۴،۱۴،۴۲] با توجه به تغییرات روزانه در بیان GLUT4 و افزایش موقت آن قبل از مرحله فعال (مرحله تاریکی در موش)، تصور می‌شود که ساعت عضلانی در آماده‌سازی تقاضای زیاد انرژی در اوایل مرحله‌ی تاریکی نقش دارد.[۴] دو مطالعه تکمیلی اخیر گزارش داده‌اند که تمرین در اوایل مرحله تاریکی، پاسخ متابولیکی بسیار قوی در عضله اسکلتی ایجاد می‌کند و به منابع انرژی متعددی؛ از جمله کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و اسیدهای آمینه نیاز دارد. هم‌چنین، عملکرد تنفسی میتوکندری و مسیرهای گلیکولیز، در عضله اسکلتی، پس از ورزش در اوایل مرحله تاریکی تنظیم می‌شود.[۱۷،۱۸] این نتایج در تنظیم قوی‌تر هایپرگلایسمی در اوایل مرحله تاریکی منعکس می‌شود.

برتری تمرین در اوایل مرحله تاریکی بر بهبود هایپرگلایسمی در موش‌های دیابتی، در غیاب تغییرات معنی-دار وزن در گروه‌های تحقیق مشاهده شد. سایر مطالعات مربوط به تمرین طولانی مدت نتایج متفاوتی را در رابطه با نتایج وزن گزارش داده‌اند. در مطالعه‌ای بر روی موش‌های تغذیه شده با رژیم غذائی پرچرب، نشان داده شد که چهار هفته دویدن روی چرخ‌گردان در اواخر تاریکی نسبت به اوایل تاریکی در جلوگیری از افزایش وزن موش‌ها مؤثرتر بوده است.[۴۴] محققان اظهار داشتند که ورزش در اواخر مرحله تاریکی ممکن است از افزایش وزن به دلیل تغییر در زمان مصرف غذا محافظت کند.[۴۴] گزارش شده است که در کارآمدترین زمان‌های تنظیم حرارتی (بعدازظهر)، بیشترین عملکرد هوازی مشاهده می‌شود.[۴۵] نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عملکرد ورزشی (حداکثر سرعت دویدن تا خستگی) موش‌های گره‌های تمرینی، خصوصا در اوایل مرحله تاریکی، پیشرفت معنی‌داری یافت. در مطالعه‌ی دیگری تفاوت ظرفیت ورزشی موش‌ها بین دو نقطه زمان در اوایل و اواخر مرحله تاریکی بررسی گردید. نتایج نشان داد که مدت دویدن در شدت پایین یا شدت متوسط در اواخر مرحله تاریکی طولانی‌تر است. جالب توجه است که تغییر روزانه در ظرفیت ورزشی موش‌ها به پروتئین‌های PER1/2[iv] (اجزای ضروری ساعت شبانه‌روزی) بستگی دارد.[۱۸] نویسندگان گزارش دادند که تنظیم شبانه‌روزی مسیرهای پیام‌رسان سلولی مرتبط با ورزش، از جمله فاکتور القاءکننده هایپوکسی-۱ (HIF-1α)[v] و ZMP[vi] که فعال‌کننده AMPK[vii] است، ممکن است به عنوان عوامل کلیدی القاء اثرات زمان تمرین باشند.[۱۸]

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که دیابت نوع‌دو با اختلال در تنظیم پروتئین SIRT1 و نسبت $NAD^+/NADH$ عضلانی ارتباط نزدیکی دارد. با توجه به نقش SIRT1 و NAD^+ و ریتم شبانه‌روزی در هومئوستاز گلوکز و متابولیسم میتوکندری، این تغییرات ممکن است شرایطی که با اختلال در جذب و متابولیسم گلوکز در عضله اسکلتی و هایپرگلایسمی می‌شود را توضیح دهد. نتایج تحقیق حاضر تاثیر تمرین هوازی در اوایل مرحله تاریکی بر بیان پروتئین SIRT1 و افزایش سطح NADH و هم‌چنین تاثیر کمتر زمان‌بندی تمرین در اوایل مرحله روشنائی بر سطح NAD^+ و نسبت $NAD^+/NADH$ را نشان داد. هم‌چنین یافته‌های ما

i -Peroxisome Proliferator-activated Receptor-gamma Coactivator (PGC)-1alpha
ii- Glucose Transporter Type 4
iii- Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator–like-1
iv- Period 1/2
v- Hypoxia-inducible Factor 1 Alpha
vi -5-aminoimidazole-4-carboxamide Ribonucleotide
vii -AMP-activated protein kinase

نشان داد که مزایای متابولیکی تمرین؛ مانند بهبود هایپرگلایسمی، به تمرین در اوایل تاریکی پاسخ می‌دهد اما به تمرین در روشنائی پاسخ نمی‌دهد. این یافته‌ها می‌تواند در طراحی موثر مداخله‌های تمرینی مبتنی بر زمان تمرین، در جهت ارتقاء سلامت متابولیک در بیماران دیابتی، کاربرد داشته باشد.

چشم‌انداز و محدودیت‌های تحقیق

مطالعه حاضر به‌منظور همگام‌سازی تمرین با ریتم شبانه‌روزی؛ به‌عنوان یک رویکرد مؤثر برای مدیریت هایپرگلایسمی در بیماری دیابت طراحی شده است. یکی از نقاط قوت مطالعه حاضر این است که زمان بافت‌برداری متناسب با زمان مداخله تمرینی استاندارد شده بود تا اطلاعات دقیق‌تری در مورد اثرات زمان روز و تمرین ارائه شود. با این حال، نمونه‌برداری متناوب در یک چرخه ۲٤ ساعته اطلاعات وسیع‌تری در مورد اثربخشی و پایداری نتایج تمرینی در طول روز ارائه می‌دهد. طیف گسترده‌ای از عوامل فیزیولوژیک؛ مثل تغذیه و فعالیت خودبخودی، بر عملکرد تمرین در زمان‌های شبانه‌روز تأثیر می‌گذارد. بنابراین در این تحقیق از مداخله در فعالیت یا رفتار تغذیه‌ای حیوانات قبل و بعد از برنامه تمرین خودداری شد. با این حال اندازه‌گیری میزان انرژی دریافتی و مصرفی در تحقیقات می‌تواند پاسخ دقیق‌تری به تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی بدهد. انتظار می‌رود که مطالعات آینده نقش ترکیبی الگوهای متنوع تمرین و تغذیه در زمان‌های مختلف را بر ابعاد وسیع هومئوستاز گلوکز و متابولیسم در عضله اسکلتی بررسی کند. این نتایج می‌تواند زمینه تحقیقات بیشتری را برای شناسائی بهترین زمان تمرین جهت به حداکثر رساندن بازیابی SIRT1 و ذخایر NAD^+ و مزایای متابولیکی مرتبط با آن در تحقیقات مرتبط با دیابت و سالمندی ایجاد کند. در نهایت، ما امیدواریم که دانش"مطالعه‌ی ریتم‌های زیستی" یا "کرونوبیولوژی[i]" درک عمیق‌تری از نقش درمانی زمان تمرین بر بیماری دیابت ارائه دهد.

سپاسگزاری: این تحقیق بخشی از رساله دکتری گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه تربیت دبیر شهید رجائی تهران می‌باشد. این تحقیق هیچ کمک مالی خاصی از سازمان‌های تامین مالی در بخش-های دولتی، تجاری و غیرانتفاعی دریافت نکرده است. بدین‌وسیله از همکاری تمامی پرسنل آزمایشگاه‌های فیزیولوژی و بیوشیمی و مدیریت خانه حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز برای همکاری در نمونه‌برداری و آزمایشات حیوانی تشکر می‌کنیم.

تعارض و منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

i- Chronobiology

References

1. Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the Mammalian circadian clock. Handb Exp Pharmacol 2013: 3-27.
2. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. Annu Rev Physiol 2010 Mar 17; 72: 517-49.
3. Dyar KA, Hubert MJ, Mir AA, Ciciliot S, Lutter D, Greulich F, et al. Transcriptional programming of lipid and amino acid metabolism by the skeletal muscle circadian clock. PLoS Biol 2018; 16: e2005886.
4. Dyar KA, Ciciliot S, Wright LE, Biensø RS, Tagliazucchi GM, Patel VR, et al. Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock. Mol Metab 2014; 3: 29-41.
5. Perrin L, Loizides-Mangold U, Chanon S, Gobet C, Hulo N, Isenegger L, et al. Transcriptomic analyses reveal rhythmic and CLOCK-driven pathways in human skeletal muscle. Elife 2018; 7: e34114.
6. Bozek K, Relógio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, Kramer A, et al. Regulation of clock-controlled genes in mammals. PloS One 2009; 4: e4882.
7. Hudec M, Dankova P, Solc R, Bettazova N, Cerna M. Epigenetic regulation of circadian rhythm and its possible role in diabetes mellitus. Int J Mol Sci 2020; 21: 3005.
8. Kitada M, Koya D. SIRT1 in type 2 diabetes: mechanisms and therapeutic potential. Diabetes Metab J 2013; 37: 315-25.
9. Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, et al. The NAD+-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. Cell 2008; 134: 329-40.
10. Asher G, Gatfield D, Stratmann M, Reinke H, Dibner C, Kreppel F, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. Cell 2008; 134: 317-28.
11. Sato T and Greco CM. Expanding the link between circadian rhythms and redox metabolism of epigenetic control. Free Radic Biol Med 2021; 170: 50-8.
12. Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD+ biosynthesis. Science 2009; 324: 651-4.
13. Imai S-i. “Clocks” in the NAD World: NAD as a metabolic oscillator for the regulation of metabolism and aging. Biochim Biophys Acta 2010; 1804: 1584-90.
14. Stenvers DJ, Scheer FA, Schrauwen P, la Fleur SE, Kalsbeek A. Circadian clocks and insulin resistance. Nat Rev Endocrinol 2019; 15: 75-89.
15. Mason IC, Qian J, Adler GK, Scheer FA. Impact of circadian disruption on glucose metabolism: imply-

cations for type 2 diabetes. Diabetologia 2020; 63: 462-72.
16. Hansen J, Timmers S, Moonen-Kornips E, Duez H, Staels B, Hesselink MK, et al. Synchronized human skeletal myotubes of lean, obese and type 2 diabetic patients maintain circadian oscillation of clock genes. Sci Rep 2016; 6: 1-12.
17. 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 Metab 2019; 30: 92-110. e4.
18. Ezagouri S, Zwighaft Z, Sobel J, Baillieul S, Doutreleau S, Ladeuix B, et al. Physiological and molecular dissection of daily variance in exercise capacity. Cell Metab 2019; 30: 78-91. e74.
19. Veronda AC, Kline CE, Irish LA. The impact of circadian timing on energy balance: an extension of the energy balance model. Health Psychol Rev 2021: 1-43.
20. 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: 233-7.
21. Chiang S-L, Heitkemper MM, Hung Y-J, Tzeng W-C, Lee M-S, Lin C-H. 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: e16860.
22. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. Cell Metab 2013; 17: 162-84.
23. Liu H-W, Chang S-J. Moderate exercise suppresses NF-κB signaling and activates the SIRT1-AMPK-PGC1α axis to attenuate muscle loss in diabetic db/db mice. Front Physiol 2018; 9: 636.
24. Mohsenzadeh M, Aghaei F, Nameni F. The effect of high intensity interval training on SIRT1 and PGC1-α gene expression in soleus muscle of type 2 diabetes in male rat. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences 2020; 42: 447-55 [Farsi]
25. Vizvari E , Farzanegi P. The effect of vigorous aerobic exercise on serum levels of SIRT1, FGF21 and Fetuin A in women with type Ⅱ diabetes. Medical Laboratory Journal 2018; 12: 1-6.
26. Liu H-W, Kao H-H, Wu C-H. Exercise training upregulates SIRT1 to attenuate inflammation and metabolic dysfunction in kidney and liver of diabetic db/db mice. Nutr Metab 2019; 16: 1-10.
27. Veerapur VP, Prabhakar KR, Kandadi MR, Srinivasan KK, Unnikrishnan MK. Antidiabetic effect of Dodonaea viscosa aerial parts in high fat diet and low dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: A mechanistic approach. Pharm Biol 2010; 48: 1137-48.
28. Kemler D, Wolff CA, Esser KA. Time of Day Dependent Effects of Contractile Activity on the Phase of the Skeletal Muscle Clock. J Physiol 2020; 3631-44.
29. Chavanelle V, Boisseau N, Otero YF, Combaret L, Dardevet D, Montaurier C, Delcros G, 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: 1-0.
30. Wang J, Polaki V, Chen S, Bihl JC. Exercise improves endothelial function associated with alleviated inflamemation and oxidative stress of perivascular adipose tissue in type 2 diabetic mice. Oxid Med Cell Longev 2020; 2020: 8830537.
31. Lee S, Park Y, Dellsperger KC, Zhang C. Exercise training improves endothelial function via adiponectin-dependent and independent pathways in type 2 diabetic mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011; 301: H306-14.
32. 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. Am J Physiol Endocrinol Metab 2014; 306: E592-605.
33. Zhou S, Tang X, Chen H-Z. Sirtuins and insulin resistance. Front Endocrinol 2018: 748.
34. Katsyuba E, Romani M, Hofer D, Auwerx J. NAD+ homeostasis in health and disease. Nat Metab 2020; 2: 9-31.
35. Cantó C, Houtkooper RH, Pirinen E, Youn DY, Oosterveer MH, Cen Y, et al. The NAD+ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. Cell Metab 2012; 15: 838-47.
36. Uddin GM, Youngson NA, Sinclair DA, Morris MJ. Head to head comparison of short-term treatment with the NAD+ precursor nicotinamide mononucleotide (NMN) and 6 weeks of exercise in obese female mice. Front Pharmacol 2016; 7: 258.
37. Uddin GM, Youngson NA, Doyle BM, Sinclair DA, Morris MJ. Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation ameliorates the impact of maternal obesity in mice: comparison with exercise. Sci Rep 2017; 7: 15063.
38. Lamb DA, Moore JH, Mesquita PHC, Smith MA, Vann CG, Osburn SC, et al. Resistance training increases muscle NAD+ and NADH concentrations as well as NAMPT protein levels and global sirtuin activity in middle-aged, overweight, untrained individuals. Aging (Albany NY) 2020; 12: 9447-60.
39. Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD+ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. Science 2009; 324: 654-7.
40. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1α. EMBO J 2007; 26: 1913-23.
41. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 3820-5.
42. Harfmann BD, Schroder EA, Kachman MT, Hodge BA, Zhang X, Esser KA. Muscle-specific loss of Bmal1 leads to disrupted tissue glucose metabolism and systemic glucose homeostasis. Skelet Muscle 2016; 6: 1-13.
43. Perelis M, Marcheva B, Moynihan Ramsey K, Schipma MJ, Hutchison AL, Taguchi A, et al. Pancreatic β cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. Science 2015; 350: aac4250.
44. 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 Appl Physiol 2019; 126: 993-1005.
45. Smolander J, Härmä M, Lindgvist A, Kolari P, Laitinen LA. Circadian variation in peripheral blood flow in relation to core temperature at rest. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 1993; 67: 192-6.

Original Article

Effect of Time of Aerobic Exercise in the Light-dark Cycle on Glycemic Control, SIRT1 Protein Expression, and NAD^+/NADH Ratio in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetes Model Mice

Pourabdi KH[1], Shahidi F [1], Tabandeh M.R[2], Salehpour M[1]

[1]Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran,
[2]Department of Basic Sciences, Division of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R. Iran

e-mail: fe-shahidi@sru.ac.ir

Received: 30/04/2022 **Accepted:** 12/06/2022

Abstract

Introduction: Mitochondrial function is regulated by the dark-light cycle under physiological and pathological conditions. Time-dependent exercise interventions may affect metabolic health in diabetic patients by regulating hyperglycemia. However, limited data are available about the correlation between the time of exercise and the regulation of muscle circadian rhythm in diabetes conditions. This study aimed to investigate the effect of time of exercise in the dark-light cycle on SIRT1 protein expression and the NAD+/NADH ratio in the gastrocnemius muscle of diabetic mice. Materials and Methods: In this experimental study, thirty healthy male NMRI mice were randomly divided into three groups: control, diabetic, and diabetic+exercise. Type 2 diabetes was induced using a combination of a high-fat diet (five weeks) and streptozotocin injection (20 mg/kg body weight). Eight weeks of aerobic exercise with moderate intensity (5 days, 80-60 minutes) were performed on a treadmill at two times of the day, the early light phase (ZT3) at 9:00 AM and the early dark phase (ZT15) at 9:00 PM. Gastrocnemius muscles were collected at two times of the day, and SIRT1 protein expression was evaluated by Western blot analysis. The cellular NAD^+/NADH content and glucose concentrations were measured using the colorimetric method. A two-way analysis of variance was used to analyze the data. Results: Eight weeks of aerobic exercise significantly increased SIRT1 protein and NADH levels (P<0.001) and improved hyperglycemia (P=0.005) only in the early dark phase. Aerobic exercise increased the NAD^+/NADH ratio independently of time (P=0.003). Conclusion: Proper exercise timing in the early dark, along with SIRT1 protein and NAD+ level circadian changes, may strengthen the effects of exercise and correct hyperglycemia more effectively.

Keywords: Aerobic exercise timing, Circadian rhythm, Type 2 diabetes, SIRT1, NAD^+/NADH