

## Original Article

# The effect of 6 weeks moderate intensity endurance training on skeletal muscle fibrosis in diabetic rats

Majid Amani<sup>1</sup>, Masoud Rahmati<sup>2\*</sup>, Mohammad Fathi<sup>1</sup>, Hassan Ahmadvand<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Student of Exercise Physiology, Lorestan University, Khoramabad, Lorestan, Iran

<sup>2</sup>Department of Exercise Physiology, Faculty of Literature and Human Sciences, Lorestan University, Khoramabad, Lorestan, Iran

<sup>3</sup>Department of Clinical Biochemistry, Pharmaceutical Razi Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Lorestan, Iran

\*Corresponding author; E-mail: rahmati.mas@lu.ac.ir

Received: 19 June 2018      Accepted: 15 August 2018      First Published online: 19 May 2020  
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 June- July; 42(2):126-134

## Abstract

**Background:** Diabetes leads to both structural and functional dysfunction in the tissues and causes problems such as fibrosis. The purpose of this study was to investigate the effect of 6 weeks moderate intensity endurance training on skeletal muscle fibrosis in diabetic rats.

**Methods:** Twenty eight adult male wistar rats in the weight range of 200-250gr, randomly assigned to four equal groups: diabetes and training, diabetes control, healthy and training, healthy control. After twelve hours of food deprivation, intraperitoneal injection of Streptozotocin solution method was used. Two weeks after STZ injection, the moderate intensity endurance training protocol was performed for six weeks. Twenty four hours after the last training session, soleus and EDL muscles were dissected. Mason's trichrome staining method was used for analysis of fibrosis.

**Results:** Compared with the healthy control group, diabetes caused a significant increase in fibrosis in soleus muscle ( $P=0.002$ ) and extensor digitorum longus muscle ( $P=0.048$ ). Also, endurance training resulted in significant reduction of fibrosis in soleus muscle in the Diabetes and training group compared to the diabetes control group ( $P=0.043$ ), but endurance training did not have a significant effect on fibrosis of the extensor digitorum longus muscle ( $P=0.341$ ). The exercise also significantly reduced blood glucose levels in the diabetic group compared to the control group.

**Conclusion:** It seems that moderate intensity endurance training could inhibit from muscle fibrosis caused by diabetes. So, it is suggested that moderate intensity endurance training could be used as a non-pharmacotherapy intervention for inhibition of fibrosis in diabetic patient's muscles.

**Keyword:** Endurance Training, Diabetes, Fibrosis, Skeletal Muscle

**How to cite this article:** Amani M, Rahmati M, Fathi M, Ahmadvand H. [The effect of 6 weeks moderate intensity endurance training on skeletal muscle fibrosis in diabetic rats]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 June- July; 42(2):126-134. Persian.

## مقاله پژوهشی

## اثر ۶ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط بر فیروز عضله اسکلتی موش‌های صحرایی دیابتی

مجید امانی<sup>۱</sup>، مسعود رحمتی<sup>۲\*</sup>، محمد فتاحی<sup>۲</sup>، حسن احمدوند<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، لرستان، ایران  
<sup>۲</sup> گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، لرستان، ایران  
<sup>۳</sup> گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، لرستان، ایران  
 \* نویسنده مسؤل؛ ایمیل: rahmati.mas@lu.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۷/۳/۲۹ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲۴ انتشار برخط: ۱۳۹۹/۲/۳۰  
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۹؛ ۴۲(۲): ۱۲۶-۱۳۴

## چکیده

**زمینه:** دیابت باعث اختلالات ساختاری و عملکردی در بافت‌ها می‌شود و مشکلاتی نظیر فیروز را ایجاد می‌کند. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر ۶ هفته تمرین استقامتی بر فیروز عضله اسکلتی موش‌های صحرایی دیابتی بود.

**روش کار:** ۲۸ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار با محدوده وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم به روش تصادفی به چهار گروه برابر شامل دیابت تمرین، دیابت کنترل، سالم تمرین، سالم کنترل تقسیم شدند. پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، جهت القای دیابت از تزریق درون صفاقی استرپتوزوسین استفاده شد. دو هفته پس از تزریق، پروتکل تمرین استقامتی با شدت متوسط به مدت ۶ هفته انجام شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، عضلات سولئوس و بازکننده دراز انگشتان موش‌های صحرایی استخراج شد. جهت بررسی فیروز بافتی، از روش رنگ آمیزی ماسون تری کروم استفاده شد.

**یافته‌ها:** در مقایسه با گروه کنترل سالم، بیماری دیابت منجر به افزایش معنی‌دار فیروز در عضله نعلی ( $P=0/002$ ) و عضله باز کننده دراز انگشتان ( $P=0/048$ ) شد. همچنین تمرین استقامتی منجر به کاهش معنی‌دار فیروز در عضله نعلی در گروه دیابت ورزش نسبت به گروه دیابت کنترل شد ( $P=0/043$ ) اما تمرین استقامتی بر میزان فیروز عضله بازکننده دراز انگشتان تاثیر معنی‌دار نداشت ( $P=0/341$ ). همچنین تمرین باعث کاهش معنی‌دار سطوح گلوکز خون در گروه دیابت تمرین نسبت به گروه دیابت کنترل شد.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که تمرین استقامتی با شدت متوسط می‌تواند از ایجاد فیروز بافتی ناشی از دیابت جلوگیری کند. لذا پیشنهاد می‌شود که تمرین استقامتی به عنوان یک مداخله غیر دارویی در جهت جلوگیری از فیروز در عضلات بیماران دیابتی به کار گرفته شود.

**کلید واژه‌ها:** تمرین استقامتی، دیابت، فیروز، عضله اسکلتی

نحوه استناد به این مقاله: امانی م، رحمتی م، فتاحی م، احمدوند ح. اثر ۶ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط بر فیروز عضله اسکلتی موش‌های صحرایی دیابتی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۲): ۱۲۶-۱۳۴

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

## مقدمه

در طول سه دهه گذشته تعداد افراد دچار دیابت ملیتوس (Diabetes mellitus) در جهان به بیش از دو برابر رسیده است. تخمین زده شده است که حدود ۴۱۵ میلیون فرد بزرگسال در سراسر جهان به این بیماری مبتلا هستند که همین امر باعث شده است تا این موضوع به یک چالش مهم تندرستی در سراسر جهان تبدیل شود (۱). کمبود انسولین منجر به هایپرگلیسمی و اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها می‌شود و پیشرفت دیابت در ادامه منجر به بروز عوارض بلندمدتی مانند رتینوپاتی (Retinopathy)، نوروپاتی (Neuropathy)، نفریوپاتی (Nephropathy)، کاردیومیوپاتی (Cardiomyopathy)، نارسایی‌های آگزوکرن، آتروفی عضلات اسکلتی و تغییر در ماتریکس برون سلولی (ECM) (Extracellular matrix) خواهد شد (۲). هایپرگلیسمی می‌تواند از طریق مسیرهای متابولیک و همودینامیک بر نوسازی ECM اثرگذار باشد (۳). در شرایط طبیعی، ECM چرخه‌ای از تخریب و سنتز را دارا می‌باشد که برای حفظ ساختار آن و همچنین عملکرد اندام‌ها و بافت‌ها ضروری می‌باشد (۴). در شرایط پاتولوژیک مثل دیابت، میزان تولید ECM از تخریب آن بیشتر شده و باعث ایجاد فیروز بافتی می‌گردد (۲). فیروز به معنای ذخیره‌ی گسترده‌ای از مولفه‌های ECM است که به کاهش عملکرد بافتی به دلیل تغییر در کیفیت یا کمیت مولفه‌های ماتریکس برون سلولی ایجاد می‌گردد (۵). دلایل ایجاد فیروز بافتی به خوبی درک نشده است، با این وجود شواهد نشان می‌دهد که هایپرگلیسمی در بیماران دیابتی می‌تواند یکی از عوامل هدایت کننده فیروز و تجمع ECM در بافت عضلانی باشد. فیروز باعث نقص در عملکرد عضله اسکلتی شده و مقدار کلی بافت عضلانی را کاهش می‌دهد (۵). عضله اسکلتی یکی از مهمترین بافت‌های تعیین کننده متابولیسم چربی و کربوهیدرات در بدن می‌باشد که از تارهای متفاوت با تفاوت‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک تشکیل شده است و می‌توان آن را به سادگی به دو نوع تند انقباض و کند انقباض تقسیم‌بندی کرد (۶). شواهد نشان می‌دهد که متابولیسم گلوکز و اسیدهای چرب در عضله اسکلتی افراد دیابتی مختل می‌شود و پاسخ نوع تار عضلانی به محرک‌ها می‌تواند متفاوت باشد. نتایج فعالیت ورزشی در بازآرایی (Remodeling) معنادار عضله اسکلتی، شامل سنتز پروتئین‌های انقباضی و آنزیم‌های کلیدی، آنژیوژنز و بیوژنز میتوکندریایی می‌باشد. این سازگاری‌ها منجر به افزایش حساسیت انسولینی و بهبود هموستاز گلوکز می‌شوند (۷). بنابراین حفظ و نگهداری این بافت به همراه تقویت آن می‌تواند نقش مهمی در سلامت فرد ایفا کند به طوری که نتایج برخی تحقیقات حاکی از کاهش محتوای اسیدهای نوکلئیک و فسفولیپیدها در ساختار غشایی و تغییر در ساختار برخی پروتئین‌ها در عضلات است که در نتیجه دیابت ایجاد می‌شود (۸). اثرات

فعالیت جسمانی و تمرین ورزشی در انسان و دیگر گونه‌های جانوری به ویژه در عضلات اسکلتی به خوبی مستند و درک شده است (۹). مطالعات نشان داده است که تمرین ورزشی منجر به کاهش سطوح گلوکز خون در حیوانات و انسان‌های دیابتی می‌شود (۱۰). در حال حاضر درمان‌های موثری برای متوقف کردن پیشرفت فیروز در بیماران دیابتی وجود ندارد (۱۱). برخی مطالعات به بررسی اثر فیروز در عضلات موش‌های میوپاتی شده پرداخته‌اند؛ برای مثال Gutpell و همکاران دریافتند که میزان فیروز در بین انواع تارهای عضلانی در موش‌های دارای دیستروفی عضلانی، متفاوت است (۶). Stilhano و همکاران به بررسی فیروز عضله اسکلتی موش‌های صحرایی و ارتباط آن با فشار خون پرداخته‌اند (۱۲). Kwak و همکاران در تحقیق خود به اثر فعالیت ورزشی بر کاهش فیروز در بافت قلبی موش‌های صحرایی پیر و جوان پرداختند (۱۳). Silva و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی نقش تمرین مقاومتی فزاینده بر فیروز کلیوی ناشی از دیابت پرداختند (۱۴) ولی تاکنون هیچ پژوهشی به بررسی اثر شش هفته تمرین استقامتی بر فیروز عضلات تند انقباض و کند انقباض موش‌های صحرایی نر دیابتی نپرداخته است و از طرف دیگر اهمیت این پژوهش به خاطر تشخیص نقش موثر فعالیت ورزشی استقامتی بر فیروز عضلانی ناشی از دیابت در عضلات نعلی (کند انقباض) و بازکننده دراز انگشتان (تند انقباض) می‌باشد. در این راستا فرض ما این بود که آیا ۶ هفته تمرین استقامتی می‌تواند باعث کاهش و یا جلوگیری از تشکیل فیروز بافتی ناشی از دیابت گردد یا خیر؟ بدین منظور، پژوهش حاضر به بررسی اثرات مزمن تمرین استقامتی با شدت متوسط بر فیروز عضلانی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوسین می‌پردازد.

## روش کار

این مطالعه از نوع تجربی است که در آن ۲۸ سر موش صحرایی بالغ نر از نژاد ویستار ۸ هفته ای با محدوده وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم به عنوان نمونه پژوهش از مرکز تحقیقات رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان خریداری و پس از دو هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه، به روش تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند:

- گروه دیابت تمرین (DT): این گروه شامل ۷ سر موش صحرایی نر بود که از طریق تزریق درون صفاقی استرپتوزوسین دیابتی شده و از هفته دوازدهم زندگی به مدت ۶ هفته و هر هفته ۵ جلسه تمرین استقامتی انجام دادند و ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی تشریح شدند.

- گروه دیابت کنترل (DC): این گروه شامل ۷ سر موش صحرایی نر بود که از طریق تزریق درون صفاقی استرپتوزوسین دیابتی شده

اشتباه، نظیر تورم شکم و مشکلات گوارشی در حیوانات مشاهده نگردید. همچنین، ۲ سر از موش‌های صحرایی نیز ۲۴ ساعت پس از تزریق STZ از بین رفتند. تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوانات و بین ساعت‌های ۱۶ تا ۱۸ عصر برگزار گردید. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، موش‌های صحرایی توسط تزریق درون صفاقی کتامین (Ketamine) (۹۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (Xylazine) (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش (۱۵) و عضلات نعلی و بازکننده دراز انگشتان استخراج شده و برای کارهای هیستولوژیک بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد.

**پروتکل ورزشی:** در پژوهش حاضر جهت تمرین استقامتی از پروتکل chae و همکاران استفاده شد (۱۶): بدین‌صورت که گروه‌های ورزشی در معرض تمرین نوار گردان برای ۵ جلسه در هفته و به مدت ۶ هفته قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به تدریج افزایش یافته و از ۱۰ متر در دقیقه برای ۱۰ دقیقه در هفته اول، ۱۰ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته دوم، ۱۵ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم، به ۱۸-۱۷ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت و در صورت لزوم با استفاده از دست و یا ایجاد محرک صوتی بر روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات تشویق به ادامه تمرین گردیدند. جهت رسیدن سازگاری‌های به دست آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شدند (۱۵).

**آماده سازی بافت‌ها:** پس از بیرون آوردن بافت‌ها از فرمالین و به منظور تهیه مقاطع بافتی ابتدا نمونه‌های بافتی در ظرف‌های حاوی الکل ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۶ درصد به مدت ۱ ساعت و دو ظرف الکل مطلق هر کدام به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از آبیگری بافت، بافت‌ها در دو ظرف محتوی گزلبل (هر کدام به مدت ۱ ساعت) قرار داده شد. سپس بافت‌های آغشته به گزلبل طی دو مرحله متوالی و هر بار به مدت دو ساعت در پارافین مذاب قرار گرفت. جهت آغشته سازی نمونه‌ها با پارافین مذاب، به داخل ظروف حاوی پارافین مذاب که درون انکوباتور (با دمای تنظیم شده ۶۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داشت، انتقال یافتند. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها از این ظروف خارج و درون قالب‌های مخصوص حاوی پارافین مذاب قرار گرفتند. قالب‌ها سپس به داخل ظروف حاوی یخ ذوب شده منتقل گردید تا پارافین سریعاً منجمد گردد و از تشکیل حباب در پارافین جلوگیری شود. پس از آن قالب‌ها به درون یخچال منتقل شده و تا مرحله‌ی برش‌گیری در آنجا نگهداری شدند. برای برش‌گیری از میکروتوم دوار (Rotary microtome) مدل SleeCut4060 استفاده شد. برش‌ها نیز با ضخامت ۵ میکرون بر روی لام‌های آغشته به چسب آلومین چسبانده شدند و به مرحله رنگ‌آمیزی انتقال داده شد.

و در هیچ‌گونه برنامه تمرینی شرکت نکردند. این موش‌ها همزمان با بقیه گروه‌ها تشریح شده و کلیه مراحل و آزمایش‌ها مطابق دیگر گروه‌ها بر روی آن‌ها انجام شد.

- گروه سالم تمرین (HT): این گروه شامل ۷ سر موش صحرایی نر بود که همانند گروه DT در برنامه تمرینی نوار گردان شرکت کردند. این موش‌ها نیز همزمان با بقیه گروه‌ها تشریح شده و کلیه مراحل و آزمایش‌ها مطابق دیگر گروه‌ها بر روی آن‌ها انجام شد.

- گروه سالم کنترل (HC): این گروه شامل ۷ سر موش صحرایی نر بود که هیچ‌گونه فعالیت ورزشی بر روی آن‌ها انجام نشد. همچنین این گروه موش‌های صحرایی همزمان با دیگر گروه‌ها تشریح و کلیه مراحل و آزمایش‌ها بر روی آن‌ها انجام شد.

کلیه موش‌های صحرایی در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای  $22 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش و در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌کربنات و در گروه‌های ۴ تایی نگهداری شدند. تمامی موش‌ها به آب و غذای ویژه موش دسترسی آزاد داشتند. در تمام مراحل پژوهش، موش‌ها توسط یک نفر جابه‌جا و دستکاری شدند. در طول مرحله آشناسازی، به منظور خوگیری موش‌های صحرایی به شرایط آزمایشگاه، نوارگردان و دست‌کاری، حیوانات ۵ روز در هفته به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰-۵ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفته و با نوارگردان و چگونگی دیدن بر آن آشنا شدند. در پژوهش حاضر، کار با حیوانات بر اساس کلیه اصول اخلاقی تأیید شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه لرستان (با کد LU.ECRA.2017.12) و دستورالعمل‌های سازمان بین‌المللی مطالعه درد (International Association for the Study of Pain) انجام پذیرفت. پس از دو هفته خوگیری به شرایط آزمایشگاه، دیابت بر اساس فرآیند ذیل القا شد.

**القاء دیابت:** پس از اتمام پروتکل آشناسازی، پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، با تزریق درون صفاقی محلول استرپتوزوسین (STZ) (۴۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، Sigma, St.Louis, MO) حل شده در بافر سیترات تازه، نیم مول در لیتر،  $\text{pH} 4.5$ : دیابت القاء شد (۱۵). به موش‌های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق گردید و ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحی کوچک توسط لانسیت بر روی ورید دم موش‌های صحرایی، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (EmpError, Isotech) کره‌جنوبی) اندازه‌گیری و موش‌های صحرایی که قند خون آن‌ها بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. برای اطمینان از عدم بازگشت قند خون در پایان برنامه تمرینی نیز، قند خون موش‌ها اندازه‌گیری شد (۱۵، ۱۶). لازم به ذکر است که در پژوهش حاضر، پس از تزریق STZ، هیچ‌گونه از علائم ناشی از تزریق

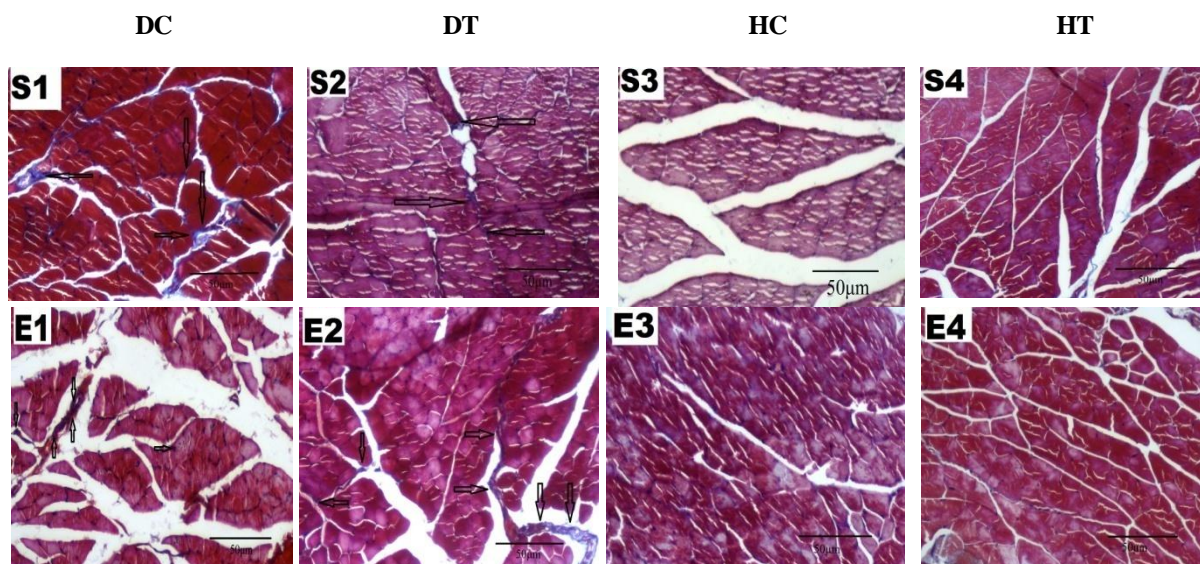
تعاملی ( $F=4/835, P=0/043$ ) بین دو متغیر فوق بود. بیماری دیابت منجر به افزایش معنی دار فیروز در عضله بازکننده دراز انگشتان شد ( $P=0/048$ ) اما اثر تعاملی بین فیروز عضله بازکننده دراز انگشتان و تمرین معنی دار نبود ( $F=0/961, P=0/341$ ). در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به طور معنی دار بالاتر بود ( $P=0/001$ ) و پس از شش هفته تمرین استقامتی نیز همچنان از اختلاف معنی دار برخوردار بود ( $P=0/001$ ). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که این اختلاف، بین گروه DC و DT با سایر گروه‌ها معنی دار است ( $P=0/001$ ). در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه DT نسبت به گروه DC به طور معنی داری پایین تر بود ( $P=0/002$ ) (نمودار شماره ۱). وزن اولیه گروه‌ها اختلاف معنی دار با یکدیگر نداشتند ( $P \leq 0/05$ ). اما در پایان پژوهش، میانگین تغییرات وزن گروه‌های دیابت تمرین و دیابت کنترل، نسبت به گروه‌های سالم تمرین و سالم کنترل به طور معنی داری کمتر بود (به ترتیب  $P=0/001$  و  $P=0/001$ ). اگرچه میانگین وزن گروه HT نسبت به گروه HC کمتر بود، اما این اختلاف به لحاظ آماری معنی دار نبود ( $P=0/83$ ). تصاویر رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم در عضلات نعلی و بازکننده دراز انگشتان در گروه‌های مختلف پژوهش در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. تصاویر S1 و E1 مرتبط با گروه DC، S2 و E2 مرتبط با گروه DT، S3 و E3 مربوط به گروه HC و E4 و S4 مرتبط با گروه HT به ترتیب در عضلات نعلی و بازکننده دراز انگشتان است.

رنگ‌آمیزی بافت‌ها: جهت بررسی فیروز بافتی، از روش رنگ آمیزی ماسون تری کروم (Masson's trichrome staining) که یک روش رنگ‌آمیزی برای تشخیص میزان فیروز بافت عضلانی است، استفاده گردید (۱۷). مراحل آماده‌سازی بافتی برای تهیه لام‌ها انجام و برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون از نمونه‌ها تهیه شد و با استفاده از روش اختصاصی ماسون تری کروم رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری الیمپوس (Olympus) ساخت ژاپن مدل CX31 بررسی شدند. در این نوع رنگ‌آمیزی، کلاژن موجود در بافت عضلانی به رنگ آبی خود را نشان می‌دهد. درصد کلاژن موجود در هر تصویر به عنوان درصد نواحی آبی رنگ، تقسیم بر کل ناحیه تصویر مورد نظر محاسبه شد. جهت بررسی میزان فیروز در تصاویر عضلات، از نرم افزار Image J استفاده شد.

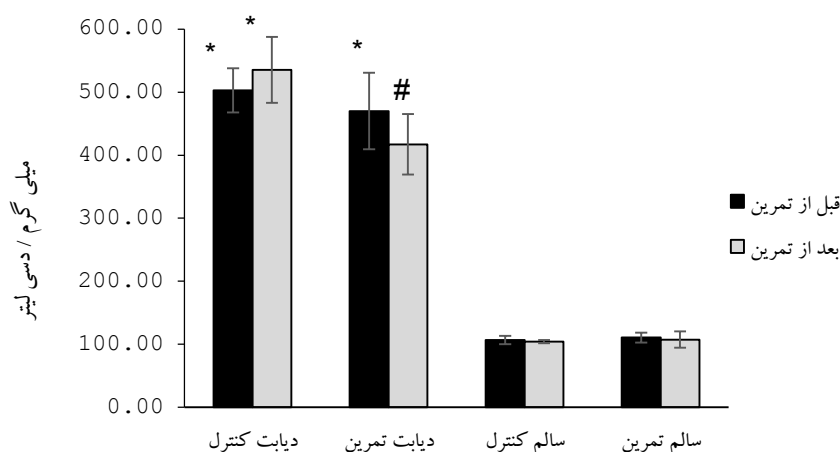
روش آماری: از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف (kolmogorov smirnov test) برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها و از آزمون لون (Leven) برای بررسی همگنی واریانس‌ها استفاده شد. برای مقایسه گروه‌ها در متغیر مورد مطالعه، از تحلیل واریانس دوطرفه و جهت انجام آزمون تکمیلی از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌های پژوهش با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید و سطح معناداری نیز  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

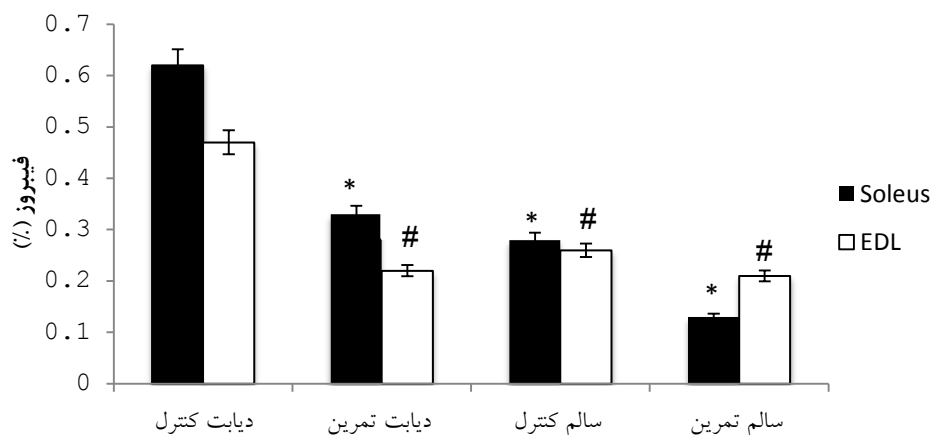
نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه (تمرین  $\times$  دیابت) نشانگر اثر معنی دار تمرین بر فیروز عضله نعلی ( $F=9/44, P=0/001$ ) و اثر



شکل شماره ۱: عکس‌های S1-S4 مربوط به عضله نعلی در گروه‌های مختلف و عکس‌های E1-E4 مربوط به عضله بازکننده دراز انگشتان می‌باشد. رنگ آبی در تصاویر نشانگر فیروز در عضلات گروه‌های دیابتی است که با علامت فلش بر روی آنها نشان داده شده است. فیروز بافتی در عضله نعلی در گروه DC از سایر گروه‌ها بالاتر بود ( $P \leq 0/05$ ). مقیاس خط مشخص شده در عکس‌ها ۵۰ میکرومتر می‌باشد.



نمودار شماره ۱: تغییرات گلوکز پلاسما در گروه‌های مختلف. \* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم. # اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دیابت ( $P \leq 0.05$ ).



نمودار شماره ۲: تغییرات میزان فیبروز عضلات در گروه‌های مختلف. \* اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت کنترل در عضله بازکننده دراز انگشتان. # اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت کنترل در عضله بازکننده دراز انگشتان.

خون گروه DT نسبت به گروه DC به طور معنی‌داری پایین تر بود. این نتایج با نتایج Rahmati و همکاران (۱۵) و Chen و همکاران (۱۰) موافق است. برای توجیه کاهش گلوکز خون در پایان ۶ هفته تمرین استقامتی می‌توان اینگونه گفت که فعالیت ورزشی شکلی از مصرف انرژی می‌باشد که نسبت AMP و ADP را به ATP افزایش می‌دهد (۱۸). این افزایش در AMP باعث فعال شدن AMPK می‌شود که به عنوان حسگر کمبود انرژی عمل می‌کند. با انجام فعالیت ورزشی مداوم، گلیکوزن عضلانی کاهش می‌یابد اما فعالیت AMPK افزایش پیدا می‌کند (۱۹). در مطالعاتی که بر روی موش‌های ترانس ژنیک که در عضله اسکلتی آن‌ها زیر واحدهای AMPK بتا ۱ و بتا ۲ سرکوب شده بود جذب گلوکز عضله اسکلتی آن‌ها در مقایسه با موش‌های طبیعی، بسیار پایین تر بود. AMPK یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی جذب گلوکز ناشی از فعالیت ورزشی است (۲۰). از طرفی دیگر انقباض عضلانی از طریق آزادسازی  $Ca^{2+}$  فعال می‌شود و علاوه بر آن منجر به فعال شدن کلسیم-کالمودولین-کیناز (CaMKs) می‌شود. CaMKs و

نتایج هیستولوژیک نشان داد که میانگین فیبروز بافتی در عضله نعلی در گروه DC از سایر گروه‌ها بالاتر بود و بین گروه DC با گروه‌های DT و HC و HT تفاوت معنی‌دار وجود دارد (به ترتیب  $P=0.04$ ،  $P=0.01$ ،  $P=0.01$ ). میانگین میزان فیبروز در عضله بازکننده دراز انگشتان در گروه DC نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌دار داشت ( $P=0.048$ ) (نمودار شماره ۲).

## بحث

میانگین تغییرات وزن گروه‌های دیابت تمرین و دیابت کنترل، نسبت به گروه‌های سالم تمرین و سالم کنترل به طور معنی‌داری کمتر بود. اگرچه میانگین وزن گروه HT نسبت به گروه HC کمتر بود، اما این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. پس از شش هفته تمرین استقامتی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم از اختلاف معنی‌دار برخوردار بود. نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که این اختلاف، بین گروه DC و DT با سایر گروه‌ها معنی‌دار بود. در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز

آسیبی که میوپاتی بر عضلات اسکلتی ایجاد می‌کند، باشد. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که دلایل ایجاد فیبروز بافتی به خوبی درک نشده است، با این وجود برخی شواهد نشان می‌دهد که هایپرگلیسمی در بیماران دیابتی می‌تواند یکی از عوامل هدایت کننده فیبروز و تجمع ECM در بافت عضلانی باشد (۵). افزایش شواهد از اهمیت ECM در حفظ هموستاز بافت حمایت می‌کند. تجمع پروتئین‌های ECM مانند کلاژن، حین مراحل اولیه دیابت یک قسمت مهم از فرآیند بازآرایی بافت است که در شرایط پاتولوژیک، تجمع گسترده ECM منجر به ایجاد فیبروز شده که قویاً با افزایش سلول‌های ایمنی پیش التهابی مرتبط است (۲۲). به طور مهم، چنین تغییراتی در ECM و ایجاد فیبروز در بافت چربی و عضلات با مقاومت انسولینی و دیابت نوع ۲ به طور قوی ارتباط دارد. برای مثال کلاژن نوع ۶ یک پروتئین مهم در ECM است که به میزان زیادی در شرایط چاقی و دیابت تجمع پیدا می‌کند (۲۳). سلول‌های عضلانی آسیب دیده ناشی از دیابت به تدریج توسط بافت فیبروز غنی از کلاژن جایگزین می‌شوند (۱۷). پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهند که عضله اسکلتی، سلول‌های ماهواره‌ای و سلول‌های اندوتلیال می‌توانند تغییر فیبروزیک و تولید سطوح بالای پروتئین‌های ماتریکس را تحمل کنند. پیشنهاد شده است که این تغییرات سلولی در کاهش ظرفیت نوزایش عضله اسکلتی و همچنین افزایش فیبروز سهمیم هستند (۲۴). از طرف دیگر، فعال سازی فاکتور  $TGF\beta$ ، فیبروبلاست‌ها را برای تولید پروتئین‌های ECM مانند کلاژن و فیبرونکتین تحریک می‌کند. در برخی مطالعات تزریق  $TGF\beta$  به عضله اسکلتی (in vivo) باعث القای تجمع بافت فیبروتیک در ناحیه تزریق شد (۲۴). موش‌های ترانس ژنیک که در عضلات آن‌ها  $TGF\beta$  بیش از اندازه بیان شده بود، آتروفی عضله و ایجاد فیبروز را از خود نشان دادند (۲۵). از سوی دیگر فیبروزیس اغلب با التهاب مزمن در ارتباط است. در عضلات دیستروفی شده،  $TGF\beta$  اساساً توسط ماکروفاژها تولید می‌شود و این موضوع باعث افزایش ایجاد ماتریکس می‌شود (۲۶). پیشنهاد شده است که ماکروفاژهای التهابی شرایط فیبروتیک را به پیش می‌برند (۲۷). از طرف دیگر مطالعات نشان داده‌اند که STZ موجب تجمع گونه‌های رادیکال آزاد و سیستم محافظتی ناکارآمد آنتی‌اکسیدانی و افزایش فشار اکسایشی می‌گردد (۲۸) و از سوی دیگر نشان داده شده است که ورزش می‌تواند دستگاه آنتی‌اکسیدانی را تقویت کرده (۲۹) و بیان انتقال دهنده‌های گلوکز را افزایش دهد (۳۰) و سرانجام کاهش سطوح گلوکز را در حیوانات و انسان‌های دیابتی به همراه داشته باشد (۱۲). شاید بتوان اینگونه گفت که در این پژوهش فعالیت ورزشی توانسته است با کاهش سطوح گلوکز خون و تقویت دستگاه آنتی‌اکسیدانی از افزایش بافت فیبروز در عضلات موش‌های صحرائی تمرین کرده جلوگیری کند، لکن کشف دلایل موثر بودن ورزش استقامتی و اثر

همچنین AMPK، جذب گلوکز ناشی از فعالیت ورزشی را مستقل از انسولین تنظیم می‌کند. این فرآیند از طریق تحریک انتقال کیسه‌های حاوی GLUT4 به غشای سلول و ترکیب آن‌ها با گلوکز صورت می‌گیرد (۱۹،۲۰) که در این پژوهش ورزش استقامتی با شدت متوسط توانسته است میزان گلوکز خون در گروه دیابت ورزش را نسبت به گروه دیابت کنترل کمتر کند. نتایج نشان داد که میانگین فیبروز بافتی در عضله نعلی در گروه DC از سایر گروه‌ها بالاتر بود و بین گروه DC با گروه‌های DT و HC و HT تفاوت معنی‌دار وجود داشت و میانگین میزان فیبروز در عضله EDL در گروه DC نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌دار داشت و از طرف دیگر میزان فیبروز در عضله کند انقباض نعلی از عضله تند انقباض بازکننده دراز انگشتان بیشتر بود. نتایج به دست آمده در این پژوهش با نتایج Kwak و همکاران، Silva و همکاران، Dostar و همکاران به خاطر اثر مثبت فعالیت ورزشی در کاهش میزان فیبروز همسو است اما در خصوص مقایسه فیبروز بافتی بین دو عضله تند و کند انقباض در این پژوهش با نتایج Gutpell و همکاران ناهمسو است. Kwak و همکاران در تحقیق خود به اثر فعالیت ورزشی بر کاهش فیبروز در بافت قلبی موش‌های صحرائی پیر و جوان پرداختند. آن‌ها موش‌ها را به دو گروه ورزش و بی تحرک تقسیم کردند. گروه ورزش به صورت روزانه ۴۵ دقیقه، ۵ روز در هفته و به مدت ۱۲ هفته تمرین هوازی بر روی نوار گردان داشتند. مطالعه هیستولوژیک بر روی بطن چپ نشان داد که فعالیت ورزشی هوازی با تضعیف  $TGF-\beta$  (Transforming growth factor) باعث کاهش تشکیل فیبرهای کلاژن می‌گردد و می‌تواند از قلب در برابر فیبروز محافظت کند (۱۳). Silva و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی نقش تمرین مقاومتی فزاینده بر فیبروز کلیوی ناشی از دیابت پرداختند. آنها نتیجه گرفتند که دیابت باعث ایجاد فیبروز در بافت‌های کلیه شده و ورزش مقاومتی می‌تواند سطوح  $TGF-\beta$  را در بیماران دیابتی کاهش دهد (۱۴). Dostar و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی تأثیر ورزش شنای استقامتی بر میوپاتی ناشی از دیابت در موش‌های دیابتی پرداختند. ورزش شنا هفته ای ۵ روز در هفته و هر روز به مدت یک ساعت و به مدت ۱۲ هفته اجرا گردید. آن‌ها اینگونه نتیجه گرفتند که دیابت باعث ایجاد معنادار فیبروز در بین عضلات شده و از طرف دیگر ورزش شنا توانست باعث بهبود معنادار در کاهش فیبروز عضلانی گردد (۲۱). Gutpell و همکاران در تحقیق خود نتیجه گرفتند که میزان فیبروز بافتی ناشی از دیابت در عضلات تند انقباض از عضلات کند انقباض بیشتر است. در پژوهش آن‌ها از مدل القای دیستروفی عضلانی دوشن در موش‌ها استفاده شد و هدف آن‌ها مقایسه فیبروز و آسیب تارچه‌های عضلانی بود. شاید دلیل این تفاوت با نتیجه تحقیق حاضر بخاطر تفاوت در نوع بیماری (دیستروفی عضلانی دوشن در مقابل دیابت) و یا حتی نوع

### ملاحظات اخلاقی

این پژوهش برگرفته از رساله دکتری در رشته فیزیولوژی ورزشی است که دارای کد اخلاقی به شماره lu.ecra.2017.12 می‌باشد.

### منابع مالی

منابع مالی ندارد.

### منافع متقابل

مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارد.

### مشارکت مولفان

م، الف، م، ر؛ و بقیه همکاران؛ طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشته‌اند و همچنین مقاله توسط م، الف؛ تالیف شده و سایر افراد مورد نظر نسخه نهایی آن را خوانده و پس از اصلاح ایرادات، آن را تایید کرده‌اند.

آن بر جلوگیری از فیروز، نیازمند مطالعات بیشتری است. یکی از محدودیت‌های این پژوهش عدم بررسی سازوکارهای سلولی و مولکولی درگیر در تشکیل فیروز بافتی و اثر ورزش بر آن بود که پیشنهاد می‌شود تحقیقات آتی بر این مهم متمرکز شوند.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی پژوهش حاضر نشان می‌دهد که احتمالاً فعالیت ورزشی به شکل تمرین استقامتی می‌تواند از اثرات مزمن بر بهبود قند خون و کاهش تشکیل فیروز در عضلات تند انقباض و کند انقباض برخوردار باشد. لذا پیشنهاد می‌شود که ورزش به عنوان یک مداخله درمانی غیر دارویی برای بیماران دیابتی استفاده شود.

### قدردانی

از زحمات خانم دکتر فاطمه بیرانوند و مسئولین محترم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی خرم آباد جهت تسریع در انجام این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

## References

- Chen L, Magliano D J, Zimmet P Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nature reviews Endocrinology* 2011; **8**(4): 228-236. doi: 10.1038/nrendo.2011.183
- Zhang X, Liu Y, Shao R, Li W. Cdc42-interacting protein 4 silencing relieves pulmonary fibrosis in STZ-induced diabetic mice via the Wnt/GSK-3beta/beta-catenin pathway. *Experimental cell research* 2017; **359**(1): 284-290. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.07.018
- Khan ZAC, S. Endothelin's in chronic diabetic complications. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2003; **81**(6): 622-634. doi: 10.1139/y03-053
- Tyagi S C, Kumar S G, Banks J, Fortson W. Co-expression of tissue inhibitor and matrix metalloproteinase in myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1995; **27**(10): 2177-2189. doi: 10.1016/S0022-2828(95)91443-9
- Rockey D C, Bell P D, Hill J A. Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. *The New England journal of medicine* 2015; **372**(12): 1138-1149. doi: 10.1056/NEJMra1300575
- Gutpell K M, Hrinivich W T, Hoffman L M. Skeletal muscle fibrosis in the mdx/utrn+/- mouse validates its suitability as a murine model of Duchene muscular dystrophy. *PloS one* 2015; **10**(1): e0117306. doi: 10.1371/journal.pone.0117306
- Jamart C N, Gilson H, Francaux M. Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2013; **305**(8): E964-974. doi: 10.1152/ajpendo.00270.2013
- Goodpaster BHW D. Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Pediatric diabetes* 2004; **5**(4): 219-226. doi: 10.1111/j.1399-543X.2004.00071.x
- Wang Q-a CM-x, Tianz -j. Effects of Resistance Training on NRG1 Express of Heart and Skeletal Muscle in Different Gender Rats with Myocardial Infarction. *Beijing Sport University* 2014; **11**: 12. doi: 10.1113/EP086049
- Chen Y W, Li Y T, Chen Y C, Li Z Y, Hung CH. Exercise training attenuates neuropathic pain and cytokine expression after chronic constriction injury of rat sciatic nerve. *Anesthesia and analgesia* 2012; **114**(6): 1330-1337. doi: 10.1213/ANE.0b013 e31824c4ed4
- Milara J N R, Juan G, Peiro T, Serrano A, Ramon M, Morcillo E, et al. Sphingosine-1-phosphate is increased in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates epithelial to mesenchymal transition. *Thorax* 2012; **67**(2): 147-156. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-200026
- Stilhano R S, Samoto V Y, Silva L M, Pereira G J, Erustes A G, Smaili S S, et al. Reduction in skeletal muscle fibrosis of spontaneously hypertensive rats after laceration by microRNA targeting angiotensin II receptor. *PloS one* 2017; **12**(10): e0186719. doi: 10.1371/journal.pone.0186719
- Kwak H B, Jong-hee K, Kumar J, Alvin Y, Daniel A. Exercise training reduces fibrosis and matrix metalloproteinase dysregulation in the aging rat heart. *The FASEB journal* 2011; **25**: 1106-1117. doi: 10.1096/fj.10-172924
- Silva KAS, de Alcântara Santos R, Arlotti M R, Jorge L, da Silva Luiz R. Progressive Resistance Exercise Training



- Attenuated Renal Damages, but did not improve Muscle Force in STZ-Induced Diabetic Rats. *J Diabetes Metab* 2014; **5**: 461. doi: 10.4172/2155-6156.1000461
15. Rahmati M G R, Movahedin M, Mowla S J, Khazani A, Fouladvand M, Jahani Golbar S. Treadmill Training Modifies KIF5B Motor Protein in the STZ-induced Diabetic Rat Spinal Cord and Sciatic Nerve. *Arch Iran Med* 2015; **18**(2): 94-101. doi: 10.18869/acadpub.hmj.21.1.10.
  16. Chae C H J, Park S H, Wang B Y, Cho S W, Cho I H, Kim J Y. Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. *Neuroscience* 2009; **164**(4): 1665-1673. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.09.075
  17. Gui C Z, Hu M, Lei L, Long Q. Neuregulin-1/ErbB signaling is impaired in the rat model of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular pathology: the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 2012; **21**(5): 414-420. doi: 10.1016/j.carpath.2011.12.006
  18. Xiao B, Sanders M J, Underwood E, Heath R, Mayer F V, Carmena D, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 2011; **472**(7342): 2303. doi: 10.1038/nature09932.
  19. Hudson E R, Pan D A, James J, Lucocq J M, Hawley S A, Green K A, et al. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Current biology C B* 2003; **13**(10): 861-866. doi: 10.1016/S09609822(03)00249-5.
  20. O'Neill H M, Maarbjerg S J, Crane J D, Jeppesen J, Jorgensen S B, Schertzer J D, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; **108**(38): 16092-16097. doi: 10.1073/pnas.1105062108.
  21. Doustar Y, Mohajeri D, Rezaei A, Hashemi M. The effect of endurance swimming exercise on the occurrence of apoptosis in experimental diabetic myopathic rats. *Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch* 2010; **4**: 629-636. (Persian)
  22. Sun K T, Clement K, Scherer P E. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell metabolism* 2013; **18**(4): 470-477. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.016
  23. Dankel S N S, Mattha J, Claussnitzer S, Kloting M, Glunk N, Fandalyuk V, et al. COL6A3 expression in adipocytes associates with insulin resistance and depends on PPAR gamma and adipocyte size. *Obesity* 2014; **22**(8): 1807-1813. doi: 10.1002/oby.20758.
  24. Pessina P K Y, Jardi M, Fukada S, Serrano A L, Perdiguero E, Munoz-Canoves P. Fibrogenic Cell Plasticity Blunts Tissue Regeneration and Aggravates Muscular Dystrophy. *Stem cell reports* 2015; **4**(6): 1046-1060. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.04.007.
  25. Narola J, Pandey S N, Glick A, Chen Y W. Conditional expression of TGF-beta1 in skeletal muscles causes endomysial fibrosis and myofibers atrophy. *PloS one* 2013; **8**(11): e79356. doi: 10.1371/journal.pone.0079356.
  26. Zhou L P, Cheng G, Gong B, Hatala D A, Merriam A P, Zhou X, Rafael J A, Kaminski H J. Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF-beta1, 2, 3 and T beta RI, II, III in skeletal muscles of mdx mice. *Neuromuscular disorders: NMD* 2006; **16**(1): 32-38. doi: 10.1016/j.nmd.2005.09.009
  27. Murray P J, Allen J E, Biswas S K, Fisher E A, Gilroy D W, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014; **41**(1): 14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
  28. Wattiez A S B, Dupuis A, Courteix C. Rodent Models of Painful Diabetic Neuropathy: What Can We Learn from Them? *Diabetes/metabolism research and reviews* 2012; **5**(1). doi: 10.4172/2155-6156.S5-008
  29. Radak Z, Sasvari M, Nyakas C, Taylor A W, Ohno H, Nakamoto H, et al. Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fractions of rat skeletal muscle. *Archives of biochemistry and biophysics* 2000; **383**(1): 114-118. doi: 10.1006/abbi.2000.2042
  30. Osborn B A, Daar J T, Laddaga R A, Romano F D, Paulson D J. Exercise training increases sarcolemmal GLUT-4 protein and mRNA content in diabetic heart. *Journal of applied physiology* 1997; **82**(3): 828-834. doi: 10.1152/jappl.1997.82.3.828