http://dx.doi.org/10.22049/JAHSSP.2023.28916.1578

Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology
Spring/Summer 2024
Volume 11, Number 1
173-191

Original Article **Open Access**

Comparison of the effect of 8 weeks of endurance training in the morning and at night on gene expression of some mitochondrial biogenesis factors in the heart of male diabetic rats

Leila Davoudi[1], Abbasali Gaeini[2*], Siroos Choobineh[3], Reza Nouri [4]

Receive 2023 February 24; Accepted 2023 April 30

Abstract

Aim: Due to the increasing development of metabolic diseases such as diabetes, the heart is one of the most important tissues that are damaged by this disease. Also, long-term oxidative stress in the heart tissue causes changes in the expression of various genes, including mitochondrial biogenesis genes. The effect of exercise in different phases of the circadian cycle on the protection of heart tissue in diabetes is unknown. The aim of this study was the effect of endurance training in the light and dark phase on some indicators of mitochondrial biogenesis in the heart tissue of diabetic rats. **Methods:** In this study, 30 NMRI mice with an average age of 8 to 10 weeks were randomly divided into 6 groups: dark phase healthy control, light phase healthy control, dark phase diabetic control, light phase diabetic control, dark phase diabetic exercise, and exercise. Diabetics were placed in the light phase. Then they became diabetic by feeding with high-fat diet and intraperitoneal injection of streptozotocin. The endurance training protocol (V_{max} 50-60%) was 5 days a week for 8 weeks. After anesthesia, blood and heart tissue were removed. The data were evaluated by ANOVA method at a significance level of $p < 0.05$. **Results**: 8 weeks of endurance training significantly increased the expression of PGC-1α, NRF-1, Atf2, AMPK genes ($P< 0.05$) in the heart tissue of diabetic rats. The changes in the two phases of light and darkness in different groups did not show any significant difference ($P< 0.05$). **Conclusion:** Endurance training can lead to better performance by increasing the expression of mitochondrial biogenesis genes in the heart tissue of subjects with diabetes. Endurance activity in two phases of light and dark has no significant difference in the desired factors and more research is needed.

Keywords: AMPK, Atf2, PGC-1α. Endurance Training, Diabetes .

Scan this QR code to see the accompanying video, or visit jahssp.azaruniv.ac.ir

1. PhD student, Kish International Campus, University of Tehran, Kish, Iran.
2. Professor, Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.***(corresponding author)** (aagaeini@ut.ac.ir)
3. Associate Professor, Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Sport Sciences, Kish International Campus, University of Tehran, Kish, Iran.

Cite as: Davoudi, Leila. Gaeini, Abbasali. Choobineh, Siroos. Nouri, Reza. Comparison of the effect of 8 weeks of endurance training in the morning and at night on gene expression of some mitochondrial biogenesis factors in the heart of male diabetic rats. Applied Health Studies in Sport Physiology. 2024; 11(1): 173-191.
Owner and Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University
Journal ISSN (online): 2676-6507
Access Type: Open Access
DOI: 10.22049/JAHSSP.2023.28916.1578
DOR:

Copyright ©The authors Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

Extended abstract

Background

Due to the increasing development of metabolic diseases such as diabetes, the heart is one of the most important tissues that are damaged by this disease. Also, long-term oxidative stress in the heart tissue causes changes in the expression of various genes, including mitochondrial biogenesis genes. Diabetes is associated with a circadian rhythm disorder, and exercise can improve metabolic disorders related to the circadian rhythm The effect of exercise in different phases of the circadian cycle on the protection of heart tissue in diabetes is unknown. The aim of this study was the effect of endurance training in the light and dark phase on some indicators of mitochondrial biogenesis in the heart tissue of diabetic rats.

Materials and Methods

The current research is experimental and laboratory type. The statistical sample of this research was made up of 30 adult male NMRI laboratory mice with an average age of 8-10 weeks and an average weight of 25-30 grams.

Experimental design

In order to induce diabetes, a combination of low-dose streptotocin (STZ) and high-fat diet (HFD) was used. Based on this, the rats in the diabetic groups received HFD (60% of caloric diet) for 5 weeks. They reached an average weight of 270 ± 20 grams. After reaching the weight of the rats, STZ solution (20 mg per kg) was injected intraperitoneally once to induce diabetes. After purchase, the mice were kept in transparent polycarbonate cages in an environment with humidity of 45-55%, temperature of 22±2 degrees Celsius and light-dark cycle of 12:12 hours. In the next step, the diabetic rats were randomly divided into the following four groups (each group of 5 heads): (1) light phase diabetic control group (CD-ZT3) (2) dark phase diabetic control group (CD- ZT15), (3) light phase diabetic exercise group (TD-ZT3) and (4) dark phase diabetic exercise group (TD-ZT15). Also, the non-diabetic groups were divided into two groups (each group had 5 heads), light phase healthy control (CH-ZT3) and dark phase healthy control (CH-ZT15).

Training protocol

The rats in the training groups received an eight-week program of aerobic exercise including running on the treadmill twice a day (morning and night) after a one-week training adaptation period. The exercise program of the present study was carried out from a one-week adaptation phase in order to acquaint the animals with the laboratory conditions. After that, 8 weeks of endurance training (6 days per week) with a training intensity of 50 to 65% of the maximum speed was implemented incrementally. So, the speed was 8 meters per minute in the first week and 9 meters per minute in the second week, and 1 meter per minute was added every two weeks from the third week onwards. The duration of training in the second, fourth and last two weeks was constant compared to the previous week, but the fifth and sixth weeks were increased by 5 minutes compared to the previous week. The training duration during the period from the first to the eighth week was 60 to 80 minutes. 48 hours after the end of the eight-week training period, rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (75 mg per kg of body weight) and xylazine (10 mg per kg of body weight). Blood samples were taken directly from the heart.

Statistical analysis

The data of the present study were analyzed through the ANOVA statistical test and Tukey's post hoc test. SPSS version 23 software was used and $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results

8 weeks of endurance training significantly increased the expression of PGC-1α, NRF-1, Atf2, AMPK genes ($P< 0.05$) in the heart tissue of diabetic rats. The changes in the two phases of light and darkness in different groups did not show any significant difference ($P< 0.05$). The findings of the present study showed that there is a significant increase in the level of blood glucose variables ($P=0.018$) and weight ($P=0.031$) in diabetic rats compared to healthy control rats. Also, the effect of aerobic training on changes in blood glucose levels ($P=0.002$) and weight ($P=0.040$) was significantly reduced in exercise groups compared to diabetic groups. Changes in the levels of blood glucose variables in two phases of darkness and light in all studied groups showed a significant difference ($P=0.027$). Of course, there was no significant difference in weight changes in two phases of darkness and light ($P=0.07$).

Discussion

The results of the present study showed that the disease of diabetes is due to the disturbances it causes in the metabolism. It reduces mitochondrial biogenesis factors in heart tissue. Also, doing eight weeks of endurance training increases the gene expression of heart mitochondrial biogenesis factors and improves the function of heart tissue. Despite this, in order to prescribe endurance programs for diabetics, the clinical conditions of the subjects such as the type of diabetes, the

Copyright ©The authors Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

http://dx.doi.org/10.22049/JAHSSP.2023.28916.1578

volume and severity of the complications of the disease, as well as the conditions of the training programs such as duration, intensity and other components should be examined in order to The best results can be achieved for these people. Since the effect of endurance training in two phases of light and darkness in the desired factors was not significantly different in diabetic rats. It is not possible to definitely consider the time of exercise as a therapeutic approach in the treatment of patients with diabetes, and more extensive research is needed.

Article message

According to the research findings, Endurance training can lead to better performance by increasing the expression of mitochondrial biogenesis genes in the heart tissue of subjects with diabetes. Endurance activity in two phases of light and dark has no significant difference in the desired factors and more research is needed.

Copyright ©The authors
Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

JAHSSP

http://jahssp.azaruniv.ac.ir/

http://dx. 10.22049/JAHSSP.2023.28916.1578

مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش

سال یازدهم، شماره اول ؛

بهار و تابستان ۱۴۰۳؛ صفحات ۱۷۳-۱۹۱

مقاله پژوهشی

Open Access

مقایسه تأثیر ۸ هفته تمرین استقامتی صبح و شب هنگام بر بیان ژن برخی عوامل بایوژنز میتوکندریایی قلب موش‌های نر مبتلا به دیابت

لیلا داودی[۱]، عباسعلی گائینی[۲]*، سیروس چوبینه[۳]، رضا نوری[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۰

چکیده

هدف: با توجه به پیشرفت روزافزون بیماری‌های سوخت‌وسازی همانند دیابت، قلب از عمده‌ترین بافت‌هایی است که در اثر این بیماری مورد آسیب واقع می‌شود. همچنین فشار اکسایشی درازمدت در بافت قلب سبب تغییر در بیان ژن‌های بایوژنز میتوکندری می‌شود. تاثیر تمرین ورزشی درفازهای گوناگون سیکل شبانه‌روزی بر محافظت بافت قلب در شرایط دیابت ناشناخته است. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر اجرای تمرین استقامتی در فاز روشنایی و تاریکی بر برخی شاخص‌های بایوژنز میوکندریایی در بافت قلب موش‌های دیابتی بود. **روش شناسی:** در این مطالعه، تعداد ۳۰ سر موش NMRI با میانگین سنی ۸ تا ۱۰ هفته، به صورت تصادفی در ۶ گروه کنترل سالم فاز تاریکی، کنترل سالم فاز روشنایی، کنترل دیابتی فاز تاریکی، کنترل دیابتی فاز روشنایی، تمرینی دیابتی فاز تاریکی و تمرینی دیابتی فاز روشنایی قرار گرفتند. سپس به روش تغذیه با رژیم غذایی پرچرب و تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین دیابتی شدند. پروتکل تمرین استقامتی (V_{max} ۵۰-۶۰٪)، ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته بود. میزان بیان ژن‌های PGC-1α، NRF-1، Atf2، AMPK در بافت قلب اندازه‌گیری شد. داده‌ها به روش ANOVA در سطح معناداری P<۰/۰۵ ارزیابی شدند. **یافته‌ها:** ۸ هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنادار بیان ژن‌های PGC-1α، NRF-1، Atf2، AMPK (P <۰/۰۵) در بافت قلب موش‌های مبتلا به دیابت شد. تغییرات در دو فاز روشنایی و تاریکی در گروه‌های مختلف تفاوت معناداری نشان ندادند (P <۰/۰۵). **نتیجه‌گیری:** تمرین استقامتی با افزایش بیان ژن‌های بایوژنز میتوکندریایی در بافت قلب آزمودنی‌های مبتلا به دیابت می‌تواند به عملکرد بهتر آن منجر شود. فعالیت استقامتی در دو فاز روشنایی و تاریکی در عوامل مورد نظر اختلاف معناداری نداشته و نیاز به پژوهش‌های بیشتر است.

با اسکن QR فوق می‌توانید جزئیات مقاله حاضر را در سایت www.jahssp.azaruniv.ac.ir/. مشاهده کنید

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم ورزشی، پردیس بین المللی کیش، دانشگاه تهران، کیش، ایران

۲. استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(نویسنده مسئول): (aagaeini@ut.ac.ir)

۳. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

٤. استادیار، گروه علوم ورزشی، پردیس بین المللی کیش، دانشگاه تهران، کیش، ایران

واژه‌های کلیدی: AMPK، Atf2، PGC-۱ α، تمرین استقامتی، دیابت

نحوه ارجاع: داوودی ، لیلا. گایینی، عباسعلی. چوبینه، سیروس. نوری ، رضا." مقایسه تأثیر ۸ هفته تمرین استقامتی صبح و شب هنگام بر بیان ژن برخی عوامل بایوژنز میتوکندریایی قلب موش‌های نر مبتلا به دیابت". مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش. ۱۴۰۳: ۱۱ (۱)،۱۷۳-۱۹۱.

صاحب امتیاز و ناشر: دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

شاپای الکترونیکی: ۲۶۷۶-۶۵۰۷

نوع دسترسی: آزاد

DOI: 10.22049/JAHSSP.2023.28916.1578

DOR: 20.1001.

Copyright ©The authors

Publisher: Azarbaijan Shahid Madani University

مقدمه

دیابت ملیتوس (DM[۱])، بیماری نارسایی ترشح انسولین یا نداشتن تأثیر انسولین است و ویژگی اصلی آن افزایش مقادیر قند خون است. این بیماری عوارضی مانند بیماری‌های کلیوی، قلبی – عروقی و بسیاری از بیماری‌های دستگاه عصبی مرکزی و محیطی را به همراه دارد (۱). استرس اکسایشی بیماری DM بر اندام‌های گوناگون بدن تأثیر می‌گذارد و از جملهٔ این اندام‌ها قلب است. از آنجایی‌که اختلال عملکرد میتوکندریای در بیماران دیابتی دیده شده است، زمینه برای اجرای پژوهش‌هایی در زمینه بررسی بیماری دیابت و عوامل تأثیرگذار بر آن مانند فعالیت ورزشی فراهم است. بیماری DM مهم‌ترین بیماری سوخت و سازی انسان است که بیش از ۱۵۰ میلیون نفر در جهان و نزدیک به ۳ میلیون نفر در ایران به آن مبتلا هستند و شمار زیادی از آنان ناشناخته باقی مانده‌اند (۲). برآورد شده است، تعداد افراد دیابتی در جهان از ۱۷۱ میلیون در سال ۲۰۰۰ به ۳۶۶ میلیون در سال ۲۰۳۰ خواهد رسید (۳). بیماری‌های قلبی – عروقی دلیل اصلی مرگ در بیماران مبتلا به DM است. به طوری که این بیماران در معرض خطر پر فشاری خون، آنروژنز، انفارکتوس قلبی و بیماری عروق کرونری قرار می‌گیرند (۴).

بایوژنز میتوکندریایی در بیماری دیابت دچار اختلال می‌شود. بایوژنز میتوکندریایی فرآیندی درون سلولی است که طی آن تودهٔ میتوکندریایی سلول افزایش می‌یابد (۵). ساخته‌شدن میتوکندری فرآیندی است که در پاسخ به افزایش تقاضای سلولی ویژه تولید آدنوزین تری فسفات (ATP[۲]) در برخی شرایط فیزیولوژیایی انجام می‌شود. از جمله تنظیم‌کنندگان مهم در ساخت میتوکندری، گیرنده فعال کننده تکثیر پراکسی زوم یک–آلفا (PGC-1α[۳]) است که سوخت‌وساز اکسایشی را در برخی بافت‌ها به خوبی تنظیم می‌کند (۶). این شاخص، فعال‌کننده نسخه برداری و عامل کلیدی در بایوژنز میتوکندریایی می‌باشد که نقش مستقیمی در تولید عامل تنفس هسته‌ای–۱ (NRF-1[۴]) داشته و عامل مهمی در هماهنگی بیان ژن میتوکندریایی است (۷). عامل PGC-1α، بیان ژن‌های وابسته به سازگاری‌های سوخت و سازی و میتوکندریایی را تنظیم می‌کند و درنتیجه بر انتخاب سوبسترای قلبی، عملکرد میتوکندری، ظرفیت تولید ATP و نیز تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[۵]) تأثیر می‌گذارد (۸). ازجمله شاخص‌های مهم در فرایند بایوژنز، عامل رونویسی فعال شده ۲ (Atf2[۶]) است و این‌گونه مطرح شده است که محرک‌های بیرونی مانند تمرین‌های ورزشی از راه پروتئین کینازهای فعال شده با میتوژن p38 (p38MAPK[۷]) باعث فعالیت آن می‌شود که پیامد آن در نهایت بیان شاخص PGC-1α است (۹). به طور کلی، PGC-1α و Atf2 عوامل کمکی در هماهنگی بایوژنزی و کاتابولیکی میتوکندری به شمار می‌روند (۶). ازسوی دیگر، فعال‌شدن پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK[۸]) در بیماری DM باید مورد توجه قرار گیرد؛ زیرا آثار گوناگونی در بافت‌های گوناگون دارد. برای مثال، در عضلهٔ قلبی و عضلهٔ اسکلتی، باعث تحریک و برداشت گلوکز، اکسایش اسید چرب آزاد (FAA[۹])، فعال‌شدن انتقال‌دهنده گلوکز نوع ۴ (GULT4[۱۰]) و بایوژنز میتوکندریایی می‌شود و سنتز پروتئین و گلیکوژن را مهار می‌کند (۱۰). از این رو، بررسی شاخص‌هایی که در بالا به آن اشاره شده است در بیماری دیابت دارای اهمیت است. به خوبی معلوم شده است فعالیت ورزشی روشی است که می‌تواند بسیاری از بیماری‌ها به خصوص بیماری دیابت را کنترل و مدیریت کند (۱۱, ۱۲). فعالیت‌های ورزشی، با افزایش کنترل قند خون و افزایش حساسیت به انسولین (۱۳)، راهبرد مؤثری در درمان و پیشگیری بیماری دیابت ملیتوس نوع ۲ (T2DM) به شمار می‌رود. همچنین، تمرین-های ورزشی به سازگاری‌های سوخت‌وساز در سوبستراهای انرژی، چگالی میتوکندری و عملکرد عضله اسکلتی منجر می‌شود (۱۴). در واقع، نتایج پژوهش‌های زیادی نشان می‌دهند که تمرین منظم استقامتی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های میتوکندریایی و افزایش حداکثر اکسیژن مصرفی آن می-شود (۱۵, ۱۶). در مورد تأثیر فعالیت ورزشی بر شاخص‌های PGC-1α ، NRF-1،Atf2 و AMPK پژوهش‌هایی انجام شده است که در بیشتر آن‌ها فعالیت ورزشی تأثیر مثبتی بر بیان این شاخص‌ها داشته است. در یکی از این پژوهش‌ها سیدی و همکارانش (۲۰۲۲) نشان دادند، ۶ هفته تمرین استقامتی باعث افزایش میزان پروتئین PGC-1α و NRF2 شده است (۱۷). نتایج پژوهش وانگ[۱۱] و همکارانش (۲۰۲۰) نیز نشان داد. ۱۶ هفته تمرین استقامتی باعث افزایش بیان پروتئین‌های PGC-1α و AMPK شده است (۱۸). همچنین، پژوهش باقدم و همکارانش (۲۰۱۹) مؤثربودن ۸ هفته تمرین هوازی را در افزایش معنادار بیان ژن PGC-1α بافت قلب رت‌های دیابتی گزارش کرده‌اند (۱۹). بنابراین، تأثیر مؤثر فعالیت ورزشی بر عوامل بایوژنز میتوکندریایی مشهود است (۱۷, ۱۸, ۲۰).

ریتم شبانه‌روزی برای تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بدن ضروری است. هسته سوپراکیاسماتیک[۱۲] هیپوتالاموسی مغز، در کنترل ریتم شبانه‌روزی در حیوانات نقش اساسی دارد (۲۱). ریتم شبانه‌روز که با توجه به نور خورشید نام‌گذاری شده است، آغاز تابش خورشید، فاز روشنایی و آغاز

1. Diabetes Mellitus
2. Adenosine Triphosphate
3. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
4. Nuclear Respiratory Factor 1
5. Reactive Oxygen Species
6. Activating Transcription Factor 2
7. P38 Mitogen-Activated Protein Kinases
8. AMP-Activated Protein Kinase
9. Free Fatty Acid
10. Glucose Transporter Type 4
11. Wang
12. Suprachiasmatic Nucleus

Copyright ©The authors

تاریک شدن هوا فاز تاریکی در نظر گرفته می‌شود که در این دوفاز سوخت‌وساز بدن، به دلیل تأثیرگذاری نور، تغذیه و فعالیت بدنی، با یکدیگر فرق می‌کند (۲۲). سیگنال‌های نوری از طریق اعصاب بینایی، تنظیم ساعت و همگام‌سازی رفتارهای گوناگون را برعهده دارند. به طور متناوب، هر دو سیستم عصبی مرکزی و تقریبا تمام بافت‌ها و سلول‌های محیطی بیانگر عوامل رونویسی نوسانگر شبانه‌روزی از قبیل Bmal1[۱] و CLOCK[۲] هستند. که عملکردهای سلولی را تنظیم می‌کنند (۲۱). این سیستم ساعت داخلی تنظیم عملکردهای مورد نیاز برای حفظ هموستاز گلوکز را تنظیم می‌کند (۲۳). پژوهش‌های گوناگونی وجود رابطه بین تغییر شیفت کاری و خطر توسعه مشکلات قلبی عروقی، سرطان و دیابت را نشان داده‌اند (۲۴). مطالعات نشان می‌دهد که بیماری‌های متابولیک و دیابت نوع ۲ با اختلال در ریتم شبانه‌روزی همراه است (۲۳). از آنجایی‌که، دستگاه ساعت شبانه‌روزی در پستانداران نقش اساسی در حفظ هموستاز دارد (۲۵) به‌نظر می‌رسد فعالیت ورزشی بتواند اختلالات متابولیک وابسته به ریتم شبانه‌روزی را بهبود ببخشد (۲۳). سازوکار بالقوه‌ای که فعالیت ورزشی از طریق آن عمل کند، بار مکانیکی است، زیرا فشرده‌سازی سلولی بر نوسان ساعت مولکولی در سلول‌های بدن تأثیر می‌گذارد و تغییرات مکانیکی، تأثیر فعالیت ورزشی بر ساعت مولکولی را بیشتر می‌کند (۲۶). یکی از دلایلی که باعث افزایش بروز دیابت می‌شود، تغییر در ریتم‌های شبانه‌روزی است (۲۷). جانبزرگی و همکارانش (۲۰۲۲)، به بررسی تاثیر فاز روشنایی و فاز تاریکی اجرای تمرین استقامتی بر برخی شاخص‌های سالمندی، فشار اکسایشی و عملکرد بافت پانکراس در موش‌های دیابتی پرداختند. پروتکل تمرین استقامتی (Vmax ۵۰-۶۰٪)، ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته بود. آنان بیان داشتند که تمرین استقامتی موجب افزایش بیان پروتئین‌های ساعت در موش‌های مبتلا به دیابت شد؛ و تمرین در دو فاز روشنایی و تاریکی با یکدیگر اختلاف معناداری داشت. فعالیت در فاز تاریکی سبب افزایش بیشتر متابولیسم پروتئین‌های ساعت در موش‌های دیابتی شده است (۲۸). همچنین، ترشح طبیعی انسولین ناشی از گلوکز در انسان در چرخه روز و شب متفاوت است و اختلال در نوسان شبانه‌روزی متابولیسم گلوکز یکی از دلایل ابتلا به دیابت نوع ۲ است (۲۹). مارچوا[۳] و همکارانش (۳۰)، گزارش کردند که اختلال در اجزای مولکول‌های ساعت (CLOCK و BMAL1) منجر به دیابت می‌شود. آنها شواهدی را نشان دادند که پانکراس موش دارای یک ساعت شبانه‌روزی عملکردی است. این ساعت پستانداران، بیان ژن‌های دخیل در سنجش گلوکز، ترشح انسولین و رشد و تکامل سلول‌های جزایر را تنظیم می‌کند (۳۰). آنان نشان دادند که موش‌هایی که ساعت شبانه‌روزی در آنها مختل است، انسولین کمتری در حالت استراحت تولید می‌کنند و انسولین کمتری در پاسخ به گلوکز ترشح می‌کنند. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل‌های مورفومتریک نشان می‌دهد که جزایر پانکراس کوچک‌تر هستند و تولید انسولین کاهش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که ساعت جزایر پانکراس در تولید انسولین دخالت مستقیم دارد (۳۰). یکی از مسائل مهم در نقش ریتم شبانه‌روزی در دیابت این است که اختلال در CLOCK یا BMAL1 با تأثیر بر ریتم شبانه‌روزی یا مکانیسم های غیر مرتبط با عملکرد ژن‌های ساعت منجر به نقص متابولیک می‌شود. امروزه ریتم‌های غیرمعمول غذا خوردن، روزه گرفتن، خوابیدن، بیداری و فعالیت بدنی کم و زیاد به دلیل الزامات زندگی، بر افراد بیشتر و بیشتر تحمیل می‌شود. از نقطه نظر بالینی، انجام یک مطالعه اپیدمیولوژیک که به بررسی اختلال در ریتم شبانه‌روزی توسط تغیر در شیفت کاری یا سایر اختلالات سبک زندگی در چرخه روز و شب در ایجاد دیابت و اختلالات مربوط به آن مورد نیاز است (۳۱). بنابراین، مکانیسمی که توسط آن اختلال در ژن‌های مرتبط با ساعت بر ریتم‌های شبانه‌روزی تأثیر می‌گذارد، ممکن است زمینه‌ساز افزایش سریع دیابت در سراسر جهان باشد. علاوه بر مطالعه مداوم اهمیت فیزیولوژیکی و پاتفیزیولوژیکی ریتم‌های شبانه‌روزی در ایجاد دیابت، به پیشرفت‌های فنی که امکان اصلاح کنترل‌های خاص و انتخابی عملکرد ساعت را می‌دهد، مورد نیاز است (۲۱). در یک مطالعه مروری، تئو و همکاران (۲۰۱۱)، تحقیقاتی را که تاثیر چرخه‌های شبانه‌روزی بر فعالیت ورزشی بررسی کرده بودند را خلاصه کردند. آنها دریافتند که در طی فعالیت هوازی در اواخر روز، عملکرد جسمانی و اکسیژن مصرفی بیشینه افزایش می‌یابد. افزایش عملکرد جسمانی با افزایش دمای مرکزی بدن و افزایش هدایت عصبی و هماهنگی بهتر در انقباض عضلات موافق- مخالف، در انتهای روز همبستگی بالایی دارد (۳۲). تمرین در ساعت‌های معینی از روز می‌تواند بهبود عملکرد ورزشی را به همراه داشته باشد. با این وجود، عملکرد بهتر در ساعات انتهایی روز گزارش شده است. در مورد تفاوت عملکرد جسمانی در ساعات متفاوت توجیهاتی وجود دارد. افزایش دمای بدن می‌تواند دسترسی به منابع سوخت کربوهیدرات را نسبت به چربی بیشتر کند و مکانیک اکتین- میوزین در واحدهای عضلانی را تسهیل کند (۳۳). به همین دلیل، تصور می‌شود اوج عملکرد در ساعات ابتدایی عصر رخ می‌دهد که همزمان با بالاترین دمای ممکن بدن است (۳۴). ریتم شبانه‌روزی مستقیماً با گیرنده‌های متابولیکی تحریک شده از جمله AMPK ارتباط زیادی دارد (۲۲). فعالیت ورزشی از طریق بیان ژن‌های AMPK و PGC1α بر بیان ژن‌های ساعت مولکولی تأثیر می‌گذارند و از این طریق می‌تواند منجر به تغییرات در ریتم شبانه‌روزی شود. سازوکار بالقوه‌ای که از طریق آن فعالیت ورزشی به عنوان یک نشانه زمان شبانه‌روزی عمل می‌کند، میزان AMPKبر اثر فعالیت ورزشی افزایش می‌یابد و این افزایش AMPK، ثبات بیان ژن پروتئین‌های، دوره ژن حاوی جعبه- E (PER[۴]) و کریپتوکروم (CRY[۵]) را تغییر می‌دهد و بر ژن‌های ساعت مولکولی هسته

۱. brain-muscle arntlike 1
۲. circadian locomotor output control kaput
۳. Marcheva
۴. E box-containing genes Period
۵. Cryptochrome

Copyright ©The authors

تأثیرگذار است (۳۵). از سوی دیگر، نوسانات زمانی در شبانه‌روز بر عملکرد ورزشی در ورزش‌های گوناگون بررسی شده است و به نظر می‌رسد، این نوسانات بر انجام تمرین استقامتی تأثیر می‌گذارد، زیرا ژن‌های وابسته به ریتم‌های شبانه‌روزی، مسئول تنظیم زمانی بسیاری از پدیده‌های فیزیولوژیایی در بدن انسان هستند (۳۶). بنابراین در سطح سلولی– مولکولی، ریتم‌های شبانه‌روزی را عاملی موثر بر مقادیر بیان ژن در یک دوره ۲۴ ساعته می‌شناسند (۳۷). ازآنجایی‌که دربارهٔ تأثیر کارآمدتر اجرای تمرین‌های استقامتی در زمان‌های گوناگون روز و یا زمان بهتر اجرای فعالیت ورزشی بر سازگاری‌های سلولی– مولکولی قلب بیماران دیابتی، مطالعات کم است و برخی شواهد نشان می‌دهند در زمان‌های گوناگون شبانه‌روز، میزان بیان ژن‌ها احتمالاً تغییر می‌کند (۳۸, ۳۹). در واقع، بررسی این مهم و آثارش بر میزان بیان ژن‌های میتوکندریایی که تحت تنش دیابت دچار اختلال می‌شوند، دارای اهمیت است. مطالعات نشان داده‌اند که اختلالات متابولیکی مانند چاقی و دیابت با اختلال در عملکرد میتوکندری، کاهش محتوای میتوکندری (۴۰) و کاهش نشانگرهای بایوژنز میتوکندریایی (۴۱) همراه است. افزایش عملکرد میتوکندری می‌تواند از نظر درمانی برای دیابت نوع ۲ بسیار حائز اهمیت باشد (۴۲). به رغم مطالعات انجام یافته در خصوص بررسی تاثیر تمرینات هوازی بر بیان ژن‌های بایوژنز میتوکندری، نتایج حاصل در موارد بسیاری ضد و نقیض بوده، علاوه براین، پاسخ‌های هورمونی و متابولیکی به فعالیت ورزشی در ساعات مختلف روز متفاوت است، و با توجه به نامشخص بودن ارتباط ریتم شبانه‌روزی بر بایوژنز میتوکندری در بافت قلب، به ویژه در افراد دیابتی، و با توجه به اینکه مطالعه‌ای که به بررسی تاثیر فعالیت استقامتی در دو فاز تاریکی و روشنایی ریتم شبانه‌روزی بر بایوژنز میتوکندری در بافت قلب بیماران دیابتی پرداخته باشد، در دسترس نیست. بنابراین پاسخ به این پرسش که آیا می‌توان زمان انجام فعالیت ورزشی را به عنوان یک عامل اثرگذار در افزایش بیان ژن‌های بایوژنز میتوکندری در بیماران دیابتی دانست، ضروری می‌باشد. لذا هدف از پژوهش حاضر، بررسی تاثیر ۸ هفته تمرین استقامتی در صبح و شب بر مقادیر بیان ژن‌های PGC-1α، Atf2، NRF-1 و AMPK میتوکندریایی قلب موش‌های نر مبتلا به دیابت است.

روش پژوهش

پژوهش حاضر از نوع تجربی، از لحاظ هدف، توسعه‌ای و از لحاظ اجرا آزمایشگاهی است. نمونه آماری این پژوهش را ۳۰ سر موش آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با میانگین سنی ۸ تا ۱۰ هفته و میانگین وزنی ۲۵ تا ۳۰ گرم تشکیل دادند. موش‌ها از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز خریداری شدند. به منظور القای دیابت، ترکیبی از داروی استرپتوزتوسین[۱] (STZ) سیگما (S0130) ساخت کشور آلمان و رژیم غذائی پرچرب (HFD[۲]) استفاده شد. برای چهار گروه دیابتی، جهت ایجاد بیشترین شبیه‌سازی به دیابت نوع ۲ از غذای پرچرب استفاده شد. غذای مورد نظر از مرکز پژوهشگاه رویان اصفهان تهیه شد. ترکیب رژیم غذایی کنترل شده پرچرب در قالب پلت، در جدول ۱ آمده است. بر این اساس، موش‌هایی که در گروه‌های دیابتی قرار داشتند به مدت ۵ هفته HFD (۶۰ درصد کالری جیره) دریافت کردند. تا به میانگین وزن ۲۰±۲۷۰ گرم رسیدند (۴۳).

جدول ۱. ترکیب رژیم غذای پرچرب

ترکیب غذایی	مقدار (گرم/کیلوگرم)
پودر غذای استاندارد رت	۳۶۵
چربی گوسفندی	۳۱۰
مخلوط ویتامین‌ها و مواد معدنی	۶۰
DL میتونین	۳
پودر مخمر	۱
کلرید سدیم	۱

پس از به وزن رسیدن رت‌ها، برای ایجاد دیابت محلول STZ (۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) برای یک بار به روش تزریق درون صفاقی انجام شد (۴۴). ۵ روز پس از دریافت STZ برای اطمینان از القای دیابت، میزان قند خون با استفاده از دستگاه تست قند خون شرکت اکیو چک و نمونه خونی گرفته شده از سیاهرگ دمی به منظور اطمینان از دیابتی شدن بررسی و اندازه‌گیری شد و اگر گلوکز ناشتا بیشتر از ۱۲۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود نمونه‌ها دیابتی در نظر گرفته شدند (۴۵, ۴۶) و به صورت تصادفی و با توجه به همگن‌سازی وزنی در ۴ گروه دیابتی (دیابت کنترل صبح، دیابت تمرین صبح، دیابت کنترل شب و دیابت تمرین شب) قرار گرفتند. گروه‌های کنترل سالم نیز هم زمان با گروه دیابتی خریداری و با رژیم غذایی معمولی تغذیه شدند. در این پژوهش دو گروه کنترل وجود داشت، زیرا گروه صبح در زمان مخصوص به خود و گروه شب نیز در زمان مخصوص به خودش بافت‌برداری شد. همچنین مقادیر گلوکز خون موش‌ها هر دو هفته یک بار سنجیده شد (۴۶). ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات مطابق دستورالعمل‌های کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده علوم ورزشی و تندرستی – دانشگاه تهران (با کد:

۱. Streptozotocin
۲. High Fat Diet

Copyright ©The authors

IR.UT.SPORT.REC.1401.036) و با رعایت کامل مفاد کمیته اخلاق در پژوهش، اجرا شد.

تغذیه موش‌ها با غذاهای مخصوص پس از انتقال موش‌ها به محیط آزمایشگاه حیوانات شروع شد. موش‌ها پس از خریداری در قفس‌های پلی-کربنات شفاف به طول ۳۰ عرض و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر ساخت شرکت رازی راد (در گروه‌های دو و سه‌تایی) در محیطی با رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد، دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه تاریکی – روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. شروع فاز روشنایی از ساعت ۶ صبح و شروع فاز تاریکی از ساعت ۱۸ در نظر گرفته شد؛ و تنظیمات آن به وسیله تایمر آنالوگ انجام شد. در طول پژوهش آب و غذای استاندارد پلت به صورت آزاد در اختیار موش‌ها قرار گرفت. برای گروه‌های کنترل سالم از رژیم غذایی معمولی و در مرحله بعد، موش‌های دیابتی شده، تصادفی در چهار گروه (هر گروه ۵ سر) زیر قرار گرفتند: (۱) گروه کنترل دیابتی فاز روشنایی (CD-ZT3)[1] (۲) گروه کنترل دیابتی فاز تاریکی (CD-ZT15)[2]، (۳) گروه تمرینی دیابتی فاز روشنایی (TD-ZT3)[3] و (۴) گروه تمرینی دیابتی فاز تاریکی (TD-ZT15)[4]. همچنین، گروه‌های غیردیابتی در دو گروه (هر گروه ۵ سر) کنترل سالم فاز روشنایی (CH-ZT3)[5] و کنترل سالم فاز تاریکی (CH-ZT15)[6] قرار گرفتند. موش‌هایی که در گروه‌های کنترل قرار داشتند در دو نوبت صبح و شب به صورت بی‌تحرک در قفس مانده و در دوره هشت هفته‌ای مطالعه هیچ‌گونه برنامه تمرینی دریافت نکردند. اما، موش‌هایی که در گروه‌های تمرینی قرار داشتند، پس از یک هفته دوره سازگاری با تمرین، برنامه هشت هفته‌ای تمرین هوازی شامل دویدن روی تردمیل را دو نوبت در روز (صبح و شب) را دریافت کردند. جهت تحریک موش‌ها برای ادامه تمرین در طول جلسات تمرینی از شوکر الکتریکی استفاده نشد.

آزمون تعیین سرعت حداکثر

آزمون سرعت حداکثر در انتهای هفته سازگاری (هفته چهارم و هشتم تمرین اصلی) از همه گروه‌های مطالعه گرفته شد. در گروه‌های تمرینی، سرعت تمرین با استفاده از تمرین در دامنه مورد نظر با استفاده از سرعت حداکثر حاصل شده در ابتدای مطالعه و هفته چهارم تمرین تنظیم شد.

این پروتکل طبق مطالعه چاوانلی[7] و همکارانش توسعه یافته است (۴۷, ۴۸) که شامل مراحل زیر است: (۱) موش‌های موجود در گروه‌های گوناگون مطالعه روی تردمیل قرار داده شدند و ظرف پنج دقیقه با سرعت ۶ متر در دقیقه گرم می‌شدند؛ (۲) سپس سرعت هر ۲ دقیقه به میزان ۲ متر در دقیقه افزایش پیدا کرد، تا زمانی که موش‌ها با وجود تحریک خفیف با خطکش چوبی افزایش سرعت نداشتند یا تمایلی به ادامه کار نداشتند (۳) و سرعت پایانی دویدن موش‌ها به‌عنوان سرعت حداکثر آن‌ها ثبت گردید. همچنین لازم به ذکر است جهت پیشگیری از هرگونه اختلال مربوط به بیان ژن‌های شبانه‌روزی و تأثیر آن بر عملکرد موش‌ها و در نهایت یافته‌های پژوهش، سرعت حداکثر برای هر گروه مطالعه در ساعت مربوط به همان گروه سنجیده شد.

پروتکل تمرین استقامتی

در پژوهش حاضر از برنامه ورزشی مبتنی بر چند برنامهٔ ورزشی دیگر استفاده شد (جدول ۲). یک هفته مرحله سازگاری به منظور آشنایی حیوانات با شرایط آزمایشگاهی انجام شد. پس از آن ۸ هفته تمرین استقامتی (۶ روز در هفته) با شدت تمرینی ۵۰ تا ۶۵ درصد سرعت حداکثر به صورت فزاینده به اجرا در آمد. به‌طوری که سرعت در هفته اول ۸ متر در دقیقه و هفته دوم ۹ متر در دقیقه بود و از هفته سوم به بعد هر دو هفته ۱ متر در دقیقه به آن اضافه شد. مدت زمان تمرین در دو هفته دوم، چهارم و آخر نسبت به هفته قبل از آن ثابت اما هفته پنجم و ششم در مقایسه با هفته قبل از آن ۵ دقیقه اضافه شد. مدت تمرین در طول دوره از هفته اول تا هشتم ۶۰ تا ۸۰ دقیقه بود (۴۷). لازم به ذکر است ساعت اجرای تمرین در نوبت صبح ۹ صبح و در نوبت عصر ۹ شب بود (۲۲).

جدول ۲. پروتکل تمرینی

	روز	سرعت (متر/ دقیقه)	مدت (دقیقه)
مرحله سازگاری (یک هفته قبل از شروع تمرین)	روز اول	۵	۳۰
	روز دوم	۶	۴۰
	روز سوم	۷	۵۰
	روز چهارم	۸	۶۰
	Type equation here.روز پنجم	۹	۶۰

[6]. Control Diabetes Zeitgeber Time 3
[7]. Control Diabetes Zeitgeber Time 15
[8]. Training Diabetes Zeitgeber Time 3
[9]. Training Diabetes Zeitgeber Time 15
[10]. Control Healthy Zeitgeber Time 3
[11]. Control Healthy Zeitgeber Time 15
[1]. Chavanelle

Copyright ©The authors

	روز ششم	۱۰	۶۰
مرحله تمرین اصلی (هفته اول تا هشتم)	**هفته‌ها**	**سرعت** (متر/ دقیقه)	**مدت** (دقیقه)
	هفته اول	۸	۶۰
	هفته دوم	۹	۶۰
	هفته سوم	۱۰	۶۵
	هفته چهارم	۱۰	۶۵
	هفته پنجم	۱۱	۷۰
	هفته ششم	۱۱	۷۵
	هفته هفتم	۱۲	۸۰
	هفته هشتم	۱۲	۸۰

روش بافت برداری

۴۸ ساعت پس از به پایان دوره هشت هفته‌ای تمرین، موش‌ها به سالن نمونه برداری منتقل و با تزریق درون صفاقی کتامین (۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. نمونه‌های خون مستقیم از قلب دریافت و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه نمونه سرم آنها جداسازی شد. در ادامه بافت قلب در شرایط استریل از آن‌ها جدا شد. پس از استخراج، بافت قلب به‌سرعت داخل نیتروژن مایع قرار داده شد و این نمونه‌ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند و تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی نگهداری شد (۲۳). استخراج RNA بر اساس روش ارائه شده توسط شرکت و با استفاده از کیت تجاری سینا کلون (تهران، ایران) انجام شد. میزان خلوص و غلظت نمونه‌های RNA پس از خواندن جذب آن‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر و نیز محاسبه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ با استفاده از اسپکتروفوتومتر تعیین شد. نمونه‌هایی که نسبت جذب آن‌ها بیش از ۱/۸ بود. جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت تجاری سایبرگرین (یکتا تجهیز تهران، ایران) صورت پذیرفت. به‌منظور تأیید بیان ژن‌های مورد بررسی، ابتدا واکنش روی بافت‌های انتخابی انجام شد و سپس برای بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها از آزمون PCR در زمان حقیقی استفاده شد. همچنین برای طراحی پروب و پرایمر، از نرم‌افزار Beacon designer TM7/01 استفاده شد. برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها، روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و کیت تجاری qPCR Probe Master Bioneer به کار گرفته شد. مقادیر مقایسه‌ای بیان ژن‌های موردنظر در مقایسه با بیان GAPDH در هر بافت توسط نرم افزار ژن، ارزیابی و بر اساس رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ گزارش شد. از آزمون PCR در زمان حقیقی (Real-time PCR) به منظور ارزیابی بیان گیرنده AdipoR2 استفاده شد. لیست پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، توالی و طول قطعه‌ای که توسط آن‌ها تکثیر شد و نیز Gen Bank هر یک در جدول ۳ ارائه شده است. طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳[1] انجام گرفت.

جدول ۳: توالی پرایمری ژن‌های ارزیابی شده

GENE NAME	SEQUENCE	Length bp	Gene Bank ACC
GAPDH-rat-F	AGTTCAACGGCACAGTCAAG	119	XM_017593963.1
GAPDH-rat-R	TACTCAGCACCAGCATCACC		
PGC1-rat-F	GCAACATGCTCAAGCCAAAC	133	NM_031347.1
PGC1-rat-R	TGCAGTTCCAGAGAGTTCCA		
AMPK-rat-F	GATAGCTGACTTCGGACTCTCT	150	NM_023991.1
AMPK-rat-R	AGGATAACACCACAGCTCCA		
NRF1-rat-F	TCGGAAACTCAGAGCCACATT	142	NM_001100708.
NRF1-rat-R	GTACTTGCGCACCACATTCT		
ATF2-rat-F	AGAAGTCTGGCTATCATACTGCTG	150	NM_031018.2
ATF2-rat-R	AAGTGGCTCCAGCTTCTGTT		

[2]. Primer

Copyright ©The authors

تجزیه و تحلیل داده‌ها

طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو- ویلک ارزیابی و تأیید شد. از آزمون لون برای تعیین همگن بودن واریانس‌ها استفاده شد. به منظور بررسی تاثیر عوامل زمان تمرین (فاز روشنایی- فاز تاریکی) و وضعیت دیابت (دیابتی – غیر دیابتی) و اثر متقابل آنها بر پارامترهای مورد مطالعه از آزمون اماری آنالیز واریانس دوراهه استفاده شد. به منظور مقایسه میانگین متغیرهای گوناگون بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون آنالیز واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد (۴۹). کلیه بررسی‌های آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد و سطح آماری معنی‌دار برای همه متغیرها $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که افزایش معنی‌داری در سطح متغیرهای گلوکز خون (P=۰/۰۱۸) و وزن (P=۰/۰۳۱)، در موش‌های دیابتی نسبت به موش‌های گروه کنترل سالم وجود دارد. همچنین تاثیر تمرین هوازی در تغییرات سطوح متغیرهای گلوکز خون (P=۰/۰۰۲) و وزن (P=۰/۰۴۰) در گروه‌های تمرینی نسبت به گروه‌های دیابتی، کاهش معنی‌داری یافت (جدول ۴). تغییر سطوح متغیرهای گلوکز خون در دو فاز تاریکی و روشنایی در تمامی گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری با هم نشان دادند (P=۰/۰۲۷). البته تغییرات وزن در دو فاز تاریکی و روشنایی تفاوت معنی‌داری نداشت (P=۰/۰۷).

جدول ٤. میانگین و انحراف استاندارد وزن، گلوکز و سرعت

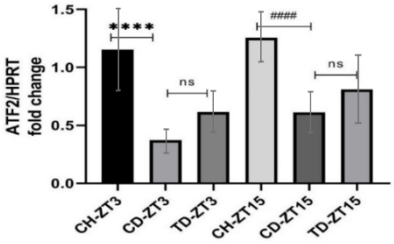
متغیر	وزن (گرم)	گلوکز (میلی‌گرم / دسی لیتر)	حداکثر سرعت (متر/ دقیقه)
CH-ZT3	۳۳/۰۰±۳/۶۰^{b}	۱۰۱/۱۸± ۴/۱۰^{e}	۱۵/۱۶± ۱/۰۴^{b}
CH-ZT15	۳۴/۰۰± ۲/۶۴^{b}	۱۱۶/۴۰± ۴/۲۲^{d}	۱۵/۵۰± ۱/۳۲^{b}
CD-ZT3	۴۱/۳۳± ۱/۵۲^{a}	۱۴۳/۵۸± ۵/۰۹^{b}	۱۴/۸۳± ۱/۶۰^{b}
CD-ZT15	۴۰/۶۶±۳/۰۵^{a}	۱۵۷/۳۳± ۵/۴۵^{a}	۱۵/۶۰± ۰/۹۱^{b}
TD-ZT3	۳۴/۳۳± ۱/۵۲^{b}	۱۴۳/۲۰± ۵/۶۳^{b}	۲۴/۶۶± ۱/۱۵^{a}
TD-ZT15	۳۶/۳۳± ۱/۵۵^{b}	۱۲۷/۴۰± ۳/۳۶^{c}	۲۴/۸۰± ۱/۷۰^{a}

حروف لاتین غیریکسان بالای ستون‌ها نشان‌دهنده معنادار بودن اختلاف آن‌ها درآزمون تعقیبی است. CH-ZT3= گروه کنترل سالم فاز روشنایی ،CH-ZT15 = گروه کنترل سالم فاز تاریکی،CD-ZT3 = گروه کنترل دیابتی فاز روشنایی، CD-ZT15= گروه کنترل دیابتی فاز تاریکی، TD-ZT3= گروه تمرین دیابتی فاز روشنایی، TD-ZT15= گروه تمرین دیابتی فاز تاریکی.

نتایج آزمون آنالیز واریانس نشان می‌دهد. تاثیر متقابل بین تمرین و زمان تمرین بر میزان بیان ژن‌های ATF2 (P=۰/۷۱۰)، AMPK (P=۰/۳۵)، NRF1 (P=۰/۹۰۶) و PGC1α (P=۰/۶۵۵) بافت قلب معنادار نیست. همچنین اثر بیماری دیابت و تمرین بر میزان بیان ژن‌های ATF2 (P=۰/۴۴)، AMPK (P=۰/۱۱)، NRF1 (P=۰/۳۱) و PGC1α (P=۰/۷۶۲) بافت قلب معنادار نبوده است. همچنین اثر بیماری دیابت و زمان تمرین بر میزان بیان ژن‌های ATF2 (P=۰/۲۴۳)، AMPK (P=۰/۰۷)، NRF1 (P=۰/۰۶۱) و PGC1α (P=۰/۴۸) بافت قلب معنادار نبوده است. از این رو مداخله، توامان تمرین و زمان تمرین تاثیر هم‌افزایی بر افزایش غلظت این عوامل نداشته است.

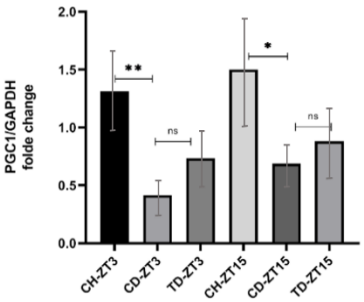
همان طور که در شکل‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌شود؛ میزان بیان ژن Atf2 وPGC1 میتوکندریایی قلب موش‌های نر دیابتی در دو زمان روز و شب نسبت به موش‌های سالم کاهش معناداری (P<۰/۰۰۰۱) داشته است. اما میزان بیان ژن Atf2 و PGC1 میتوکندریایی قلب در موش‌های دیابتی تمرین داده شده در روز و شب افزایش معناداری نداشته (P=۰/۶۶۶) و در این آزمون زمان فعالیت ورزشی تاثیری بر میزان بیان ژن Atf2 و PGC1 میتوکندریایی قلب نداشته است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت؛ تمرین استقامتی صبح و شب هنگام بر مقادیر بیان ژن Atf2 و PGC1 میتوکندریایی قلب موش‌های نر دیابتی نوع ۲ تاثیر یکسانی دارد.

Copyright ©The authors



شکل۱. میزان بیان ژن Atf2 میتوکندریایی قلب موش‌های نر دیابتی در هر دو زمان روز و شب در مقایسه با موش‌های سالم

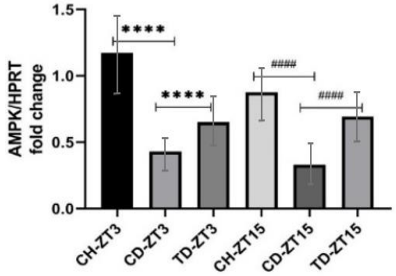
CH-ZT3= گروه کنترل سالم فاز روشنایی، CH-ZT15 = گروه کنترل سالم فاز تاریکی، CD-ZT3 = گروه کنترل دیابتی فاز روشنایی، CD-ZT15= گروه کنترل دیابتی فاز تاریکی، TD-ZT3= گروه تمرین دیابتی فاز روشنایی، TD-ZT15= گروه تمرین دیابتی فاز تاریکی (* * * * وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کنترل سالم و کنترل دیابتی در فاز روشنایی؛ #### وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کنترل سالم و گروه کنترل دیابتی در فاز تاریکی ؛ ns: عدم تفاوت معنی دار)



شکل ۲. میزان بیان ژن PGC1α میتوکندریایی قلب موش‌های نر دیابتی در هر دو زمان روز و شب در مقایسه با موش‌های سالم

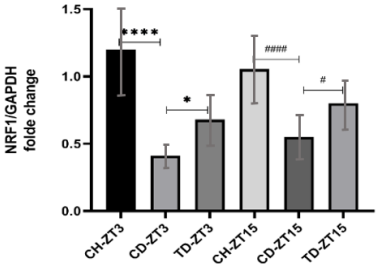
CH-ZT3= گروه کنترل سالم فاز روشنایی، CH-ZT15 = گروه کنترل سالم فاز تاریکی، CD-ZT3 = گروه کنترل دیابتی فاز روشنایی، CD-ZT15= گروه کنترل دیابتی فاز تاریکی، TD-ZT3= گروه تمرین دیابتی فاز روشنایی، TD-ZT15= گروه تمرین دیابتی فاز تاریکی (** وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کنترل سالم و کنترل دیابتی فاز روشنایی ؛ * وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کنترل سالم و گروه کنترل دیابتی در فاز تاریکی؛ ns: عدم تفاوت معنی دار)

همان طور که در شکل‌های ۳ و ۴ مشاهده می‌شود، میزان بیان ژن‌های AMPK و NRF1 میتوکندریایی قلب موش‌های نر دیابتی در دو زمان روز و شب در مقایسه با موش‌های سالم کاهش معناداری (P<۰/۰۰۰۱) داشته است. همچنین، میزان بیان ژن‌های AMPK و NRF1 میتوکندریایی قلب در موش‌های دیابتی تمرین داده شده در روز و شب در مقایسه با موش‌های دیابتی بدون تمرین افزایش معناداری داشته (P<۰/۰۰۰۱) است و در این آزمون زمان فعالیت ورزشی تاثیر معناداری بر میزان بیان ژن AMPK و NRF1 میتوکندریایی قلب نداشته است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت تمرین استقامتی صبح و شب هنگام بر مقادیر بیان ژن AMPK و NRF1 میتوکندریایی قلب موش‌های نر مبتلا به دیابت نوع ۲ تاثیر یکسانی دارد.



شکل ۳. میزان بیان ژن AMPK میتوکندریایی قلب موش‌های نر دیابتی در هر دو زمان روز و شب در مقایسه با موش‌های سالم

CH-ZT3= گروه کنترل سالم فاز روشنایی، CH-ZT15 = گروه کنترل سالم فاز تاریکی، CD-ZT3 = گروه کنترل دیابتی فاز روشنایی، CD-ZT15= گروه کنترل دیابتی فاز تاریکی، TD-ZT3= گروه تمرین دیابتی فاز روشنایی، TD-ZT15= گروه تمرین دیابتی فاز تاریکی (**** وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها در فاز روشنایی؛ #### وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها در فاز تاریکی)



شکل٤. میزان بیان ژن NRF1 میتوکندریایی قلب موش‌های دیابتی در هر دو زمان روز و شب در مقایسه با موش‌های سالم

CH-ZT3= گروه کنترل سالم فاز روشنایی، CH-ZT15 = گروه کنترل سالم فاز تاریکی، CD-ZT3 = گروه کنترل دیابتی فاز روشنایی، CD-ZT15= گروه کنترل دیابتی فاز تاریکی، TD-ZT3= گروه تمرین دیابتی فاز روشنایی، TD-ZT15= گروه تمرین دیابتی فاز تاریکی (**** وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کنترل سالم و کنترل دیابتی فاز روشنایی؛ * وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تمرین دیابتی و کنترل دیابتی در فاز روشنایی؛ # وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تمرین دیابتی با گروه کنترل دیابتی در فاز تاریکی؛ #### وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کنترل سالم و گروه کنترل دیابتی در فاز تاریکی)

Copyright ©The authors

بحث

پژوهش حاضر نشان داد که انجام تمرین استقامتی به تنظیم مجدد بیان ژن‌های ATF2، AMPK، NRF1 و PGC1α در موش‌های مبتلا به دیابت کمک می‌کند. در این مطالعه، مصرف غذای پرچرب و دیابت موجب کاهش ژن‌های ATF2، AMPK، NRF1، PGC1 و انجام فعالیت استقامتی موجب افزایش بیان این ژن‌ها در بافت قلب می‌شود. این نتیجه با گزارش‌های لئوریدنو[۱] و همکاران (۵۰)، سیدی و همکاران (۲۰۲۲)، وانگ[۲] و همکاران (۱۸)، لاین[۳] و همکاران (۵۱)، برنجیان و همکاران (۵۲) و کلوس[۴] و همکاران (۵۳) همسو است. برای مثال در پژوهش سیدی و همکارانش (۲۰۲۲)، که به بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط بر بیان مقادیر پروتئین‌های PGC-1α و NRF در قلب موش‌های دیابتی پرداخته بودند. نتایج نشان داد که این شدت از تمرین استقامتی به مدت ۶ هفته باعث افزایش میزان بیان ژن PGC-1α و NRF در قلب موش‌های دیابتی می‌شود (۱۷). از دلایل همسو بودن می‌توان به مشابهت مکانیسم اثربخشی تمرین استقامتی، بر عوامل بایوژنز میتوکندریایی سلول اشاره کرد. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که تمرینات استقامتی باعث بهبود در عملکرد هوازی می‌گردد که این امر به علت افزایش فعالیت آنزیم‌های میتوکندریایی، حداکثر اکسیژن مصرفی و بایوژنز میتوکندریایی به دنبال تمرین می‌باشد (۱۵). نمی‌توان فقط یک عامل را بیان کرد که همه مسیرهای درگیر در ایجاد سازگاری‌های استقامتی را تنظیم کند؛ اما از جمله سازوکارهای احتمالی این است که فعالیت‌های ورزشی از طریق افزایش بیان ژن‌های CaMKIV، CnA و MAPKp38 فعالیت ژن‌های MEF2C و ATF2 را افزایش می‌دهند که در نهایت موجب بیان بیشتر PGC-1α می‌شوند (۵۴). که همراه با افزایش mRNA سیتوکروم C، سیترات سنتاز و تنظیم‌های بالادستی در پروتئین‌های میتوکندری می‌باشد (۵۵). ژن PGC-1α در بیشتر مسیرها درگیر بوده و عاملی برای هماهنگی‌های کاتابولیکی و بایوژنز میتوکندری می‌باشد (۵۶). همچنین، فعالیت ورزشی باعث تحریک فعال‌سازی گیرنده‌های β2 آدرنرژیکی توسط کاتکولامین‌ها می‌شود؛ این امر منجر به افزایش cAMP و در نتیجه فعال شدن فاکتورهای رونویسی CREB می‌شود و در نهایت بیان PGC-1α را افزایس می‌دهند. افزایش بیان PGC-1α احتمالا سازوکاری برای تعدیل جریان‌های متابولیکی در پاسخ به کاهش سطوح ATP و دگرگونی نیازهای سوختی ناشی از فعالیت ورزشی یا محدودیت کالری است (۵۴). میزان بیان ژن PGC-1α در تمرین هوازی بالاتر است. چون فعالیت استقامتی باعث کاهش سطح ATP و افزایش کلسیم درون سلولی می‌شود؛ که تغییر این عوامل مسیرهای CaMK و AMPK را فعال می‌کند و بایوژنز میتوکندری اتفاق می‌افتد. در طی فعالیت ورزشی ذخایر فسفوکراتین و ATP به وسیله تزریق هم‌زمان اسید گوانیدینوپروپیونیک[۵] تخلیه می‌شوند و ظرفیت اکسیداتیو میتوکندری افزایش پیدا می‌کند؛ که این اتفاق به - واسطه افزایش فعالیت آنزیم‌های میتوکندریایی و فعال کردن NRF-1 و PGC-1α است (۵۷). همچنین، وانگ و همکاران (۲۰۲۰)، به بررسی تاثیر تمرین هوازی با سرعت ۱۰متر بر دقیقه برای یک ساعت در هفته بر روی قلب موش‌های دیابتی پرداختند. میزان پروتئین‌های AMPK و PGC1α در گروه تمرین دیابتی افزایش معنی‌داری یافته بود. از جمله دلایل همسو بودن با نتایج تحقیق حاضر می‌توان به نوع تمرین ورزشی استفاده شده و دیابتی بودن آزمودنی‌ها در هر دو تحقیق اشاره کرد. شایان ذکر است که در تحقیق وانگ و همکاران مدت زمان تمرین ورزشی ۱۶ هفته و در تحقیق حاضر ۸ هفته بوده است که با این وجود در هر دو افزایش پروتئین‌های AMPK و PGC1α دیده می‌شود (۱۸). علاوه براین، مطالعات مورد بررسی در چند بافت گوناگون (قلب، عضله و پانکراس) انجام گرفته است؛ که گزارش‌ها در مورد ژن‌های مورد نظر تقریبا یکسان است. به علاوه نوع و شدت فعالیت‌های مورد مطالعه مشابه بوده و آزمودنی‌ها یکسان بودند. در مورد تاثیر شدت تمرین می‌توان گفت که تأثیر تمرین‌های استقامتی بر بایوژنز میتوکندریایی در تارهای کند انقباض و تند انقباض به شدت تمرین وابسته بوده که تمرین با شدت‌های پایین تارهای کند را بیشتر در بر می‌گیرد و تمرین با شدت‌های بالا بر تارهای تند بیشتر مؤثر است (۱۴۲،۱۴۳). یافته‌های مطالعاتی که به بررسی تأثیر تمرین‌های استقامتی و مقاومتی بر شاخص PGC-1α پرداخته‌اند. حاکی از این است که، تمرین‌های ورزشی با شدت بالا می‌توانند سطح PGC-1α را در هر دو نوع عضله تند و کند انقباض افزایش دهند (۵۸). پاسخ به ورزش به عواملی مانند شدت، مدت و نوع تمرین بستگی دارد (۵۹). شدت تمرین از عوامل کلیدی موثر در فعالیت مسیر PGC1 است (۶۰). و از جمله متغیرهای تمرینی است که می‌تواند بر تغییرات هورمون‌ها موثر باشد. این احتمال وجود دارد که تمرین ورزشی با شدت‌های بالاتر در مقایسه با شدت‌های پایین‌تر به دلیل دگیری بیشتر انواع مختلف تارهای عضلانی و ایجاد تغییراتی مانند افزایش سطح لاکتات و اپی‌نفرین جریان خون و همچنین تخلیه‌ی فسفوکراتین موجب تحریک و بیان بیشتر PGC1 mRNA شود (۶۱). بنابراین، ممکن است شدت‌های مختلف تمرین استقامتی با تحریک و بیان متفاوت PGC1 پاسخ‌های متفاوتی را در پی داشته باشد.

[1]. Lauridno
[2]. Wang
[3]. Line
[4]. Kloc
[5]. Guanidinopropionic acid

Copyright ©The authors

همچنین نتایج ما با یافته‌های لیک و همکاران (۶۲)، تبری و همکاران (۶۳)، لیتل و همکاران (۶۴) و چاوانلی و همکاران (۴۷) ناهمسو بود. به طور مثال، تبری و همکارانش (۲۰۱۹)، به بررسی تاثیر ۱۲ هفته تمرین تناوبی شامل ۱۳ وهله فعالیت ۴ دقیقه‌ای با شدت بالا (۸۵–۹۰درصد VO2max) و تمرین تناوبی شدت متوسط (۷۰–۶۵ درصد VO2max) بر سطوح NRF-1 و PGC1 موش‌های دیابتی پرداختند. نتایج مطالعه آنها، نشان داد، که تمرین تناوبی با شدت متوسط اثر معنی‌داری بر سطوح PGC1 و NRF-1 موش‌های دیابتی نداشته است، که ناهمسو با یافته‌های مطالعه ما می‌باشد، و تنها تمرین تناوبی با شدت بالا موجب افزایش معنی‌دار سطوح PGC1 شده که همسو با یافته-های مطالعه ما است. انها با توجه به تاثیر بیشتر تمرین تناوبی با شدت بالا بر PGC1 در مقایسه با شدت متوسط نشان دادند که شدت تمرین می-تواند نقش موثری در تنظیم PGC1 و بایوژنز میتوکندری در نمونه‌های دیابتی نوع دو ایفا می‌کنند (۶۳). از دلایل ناهمسو بودن نتایج می توان به شدت استفاده شده در تمرین اشاره کرد که با مطالعه ما متفاوت بوده است. چرا که با افزایش شدت فعالیت ورزشی، مصرف ATP نسبت AMP به ATP افزایش می‌یابد و باعث واماندگی تولید انرژی شده که آغازی برای انطباق بافت و فعال‌سازی AMPK می‌شود (۶۵). این تغییرات در ترکیب با عملکردهای NRF-1 و PGC-1α روی ژنوم هسته‌ای، مسئول هماهنگی بین پاسخ‌های mRNA میتوکندریایی و هسته‌ای به فعالیت-های استقامتی هستند (۶۶). همچنین، لیتل و همکاران (۲۰۱۰)، عدم تغییرات قابل توجه در PGC1 وNRF-1 عضله اسکلتی را به دنبال دو هفته تمرینات تناوبی با شدت بالا را گزارش کردند (۶۴). که به نظر می‌رسد به دلیل مدت زمان کم (۲ هفته‌ای) تمرین برای دستیابی به سازگاری‌های فیزیولوژیکی در عضله باشد. همچنین چاوانلی و همکاران (۲۰۱۷)، گزارش کردند که هیچ یک از پروتکل‌های تمرین تناوبی با شدت بالا و متوسط اثرات قابل توجهی بر بایوژنز میتوکندری و PGC1 ندارد (۴۷). اگر چه سازوکار پاسخ متفاوت این مطالعه با یافته‌های مطالعه حاضر به وضوح مشخص نیست، اما به نظر می‌رسد که تفاوت در موش‌های دیابتی باشد که نمونه‌های انان موش‌های دیابتی از نوع db/db بودند. این نوع موش‌ها در حدود سن ۶۰ تا ۱۲۰ روزگی به صورت ژنتیکی دچار دیابت می‌شوند (۶۳). دلیل احتمالی این پاسخ متفاوت باشد. در حقیقت چاوانلی و همکاران (۲۰۱۷)، از نمونه‌های دیابتی استفاده کردند. که این نمونه‌ها به سرعت چاق شده و به دلیل جهش در ژن گیرنده لپتین به دیابت مبتلا می‌شوند (۶۷). از سوی دیگر، گزارش شده است که سازگاری-های میتوکندری در پاسخ به تمرین ورزشی در غیاب گیرنده لپتین ممکن است مهار شود (۶۸). از این رو تفاوت در نمونه‌های دیابتی دو مطالعه، دلیلی بر نتایج متضاد بین مطالعه حاضر با مطالعه چاوانلی و همکاران باشد.

لیک و همکارانش (۲۰۱۰)، به بررسی تأثیر یک جلسه تمرین حاد استقامتی بر پاسخ AMPK و PGC-1α روی موش‌های سیاه C57BL/6 پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که یک جلسه تمرین حاد استقامتی تأثیری بر سطوح AMPK و PGC-1α نداشته است (۶۲). به علاوه گونهٔ موش‌های مورد مطالعه، عامل دیگری در تفاوت نتایج است. ما از موش‌های NMRI استفاده کردیم و لیک و همکاران از موش‌های سیاه C57BL/6 این گونه از موش‌ها طول عمری تقریبا نصف موش‌ها دیگر است و مقاومت انسولینی ایجاد شده در آنان بر اثر HFD بیشتر است (۲۳)؛ و مقاومت به انسولین خود باعث افزایش قابل‌توجه شیوع بیماری-های قلبی عروقی در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌شود (۶۹). به طور کلی، انجام فعالیت استقامتی، فراوانی ژن‌های اصلی بایوژنز میتوکندریایی را افزایش می‌دهد، البته مصرف HFD، به عنوان عاملی منفی، جذب گلوکز تحریک شده با انسولین را کاهش می‌دهد. اما فعالیت استقامتی این اثر را خنثی می‌کند (۲۳).

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که انجام تمرین استقامتی در دو فاز صبح و شب هنگام در عوامل مورد نظر در موش‌های دیابتی اختلاف معناداری نداشته است. این نتیجه با گزارش‌های لئوریدنو[۱] و همکارانش (۵۰)، وانگ[۲] و همکارانش (۱۸)، لاین[۳] و همکارانش (۵۱) وکلوس[۴] و همکارانش (۵۳) همسو است. برای مثال در مطالعه‌ی کلوس و همکاران (۲۰۱۶)، که به بررسی تاثیر ۶ ماه تمرین ورزشی هوازی و ریتم شبانه‌روزی بر روی ژن‌های ساعت در ۱۹ بیمار بیماران مبتلا به دیابت پرداخته بودند. ارتباط معناداری بین بی‌نظمی ریتم شبانه‌روزی و پیشرفت بیماری دیابت گزارش شد و عنوان کردند، فعالیت‌بدنی تاثیری بر ژن‌های ساعت (CLOCK، PER و CRY) ندارد. از دلایل همسو بودن می‌توان به نوع تمرین اشاره کرد؛ که از نوع هوازی بوده است و شدت تمرین مورد استفاده در دو فاز صبح و شب در مطالعه ما نتوانسته تاثیرگذاری لازم را بر عملکرد ژن‌های تاثیرگذار بر ریتم شبانه‌روزی داشته باشد. در برخی مطالعات آمده است، سیگنال‌دهی PI3KAKT فعال‌شده با انسولین، Bmal1 را فسفریله و فعالیت رونویسی آن را کاهش می‌دهد (۲۵)؛ و کاهش رونویسی Bmal1 با تأثیر بر ریتم شبانه‌روزی یا مکانیسم‌های غیر مرتبط با عملکرد ژن‌های ساعت منجر به نقص متابولیک می‌شود (۳۱). شاید این امر دلیلی بر عدم تاثیرگذاری ریتم شبانه‌روزی بر بایوژنز میتوکندری باشد. با توجه به اینکه مطالعات مورد بررسی در بافت‌های گوناگون انجام گرفته است اما گزارش‌ها در مورد ژن‌های مورد نظر تقریبا یکسان است. به علاوه شدت فعالیت‌های مورد مطالعه مشابه بوده و در

۲. Wang
۳. Line
۴. Lauridno
۵. Kloc

Copyright ©The authors

بیشتر موارد آزمودنی‌ها یکسان بودند. اما با نتایج توقی–عشقی[۱] و همکارانش (۳۹)، جانبزرگی و همکاران (۲۸) و مونسیلا[۲] و همکارانش (۳۸) ناهمسو بود. برای مثال، جانبزرگی و همکاران (۲۰۲۲)، به بررسی تاثیر ۸ هفته تمرین استقامتی در دو فاز روشنایی و تاریکی ریتم شبانه‌روزی بر شاخص استرس اکسایشی در موش‌های دیابتی پرداختند. آنها عنوان کردند که، انجام تمرین استقامتی در فاز تاریکی سبب افزایش بیشتر متابولیسم سلول شده و انجام این نوع تمرین‌ها در فاز تاریکی می‌تواند به عنوان یک استراتژی درمانی در بیماران دیابتی مورد نظر باشد. از دلایل ناهمسو بودن نتایج پژوهش احتمالا نوع بافت مورد بررسی باشد. آنان بافت پانکراس را مورد بررسی قرار داده بودند، و این بافت برای کنترل متابولیکی و تنظیم عملکرد خود، تحت تاثیر مستقیم ریتم شبانه‌روزی قرار دارد (۷۰). در پژوهش مونسیلا و همکارانش (۲۰۲۱)، که به بررسی تأثیر تمرین مقاومتی در دو زمان صبح (۱۰–۸) و عصر (۱۸–۱۵) بر روی داوطلبان مبتلا به اختلالات سوخت‌وسازی پرداخته بودند. نتایج پژوهش آنان نشان داد، افراد دارای مشکل سوخت‌وسازی، می‌توانند از مزایای سوخت‌وسازی بیشتر تمرین‌های ورزشی در هنگام بعد از ظهر بهره ببرند (۳۸). از دلایل ناهمسو بودن نتایج پژوهش احتمالا نزدیکی زمان تمرین در صبح و عصر باشد. چرا که فاصله زمانی تمرین استقامتی در دو زمان صبح و عصر ۷ ساعت بوده و تنها در فاز روشنایی انجام گرفته ولی در مطالعه ما این فاصله زمانی ۱۲ ساعت و در دو فاز تاریکی و روشنایی می‌باشد. زمان تمرین آنان در فاز روشنایی بوده است. در مورد اینکه زمان تمرین چگونه می‌تواند بر ریتم بیولوژیکی تاثیر گذاشته و باعث تغییر در پاسخ شود. می‌توان گفت که ریتم بیولوژیکی مربوط به تغییرات چرخه‌ای است که به طور منظم در طول زمان‌های مشخصی از شبانه‌روز اتفاق می‌افتد و فرایندهای بیولوژیکی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۷۱). شواهد نشان می‌دهند که صرفا تغییر زمان تغذیه یا زمان فعالیت ورزشی باعث بهتر شدن دیابت نوع ۲ می‌شود (۷۲). در مورد زمان انجام فعالیت، تاهارا و همکارانش، پاسخ‌های فیزیولوژیک به استرس و فعالیت ورزشی را به ساعت تمرین بدنی وابسته دانسته‌اند و زمان مناسب تمرین را در پیشگیری از چاقی، دیابت و بیماری‌های قلبی عروقی موثر گزارش کرده‌اند (۷۳). ساعت بیولوژیکی در دو دسته از سلول-های عصبی که هسته سوپراکیاسماتیک (SCN) نامیده می‌شوند، ساکن هستند. این سلول‌ها در قسمت پایه مغز که هیپوتالاموس قدامی نامیده می‌شود؛ قرار دارند که در طول ۲۴ ساعت ریتم تمام ارگان‌های بدن را هماهنگ می‌کند (۷۱, ۷۴). مطالعات نشان داده‌اند که ریتم شبانه‌روزی، برخی شاخص‌های متابولیکی و هورمونی اثرگذار بر سوخت‌وساز را کنترل می‌کند. مثلا اوج ضربان قلب در ساعت ۳ بعد از ظهر است، ریتم شبانه-روزی مشابهی نیز در ساعات ۴ بعد ازظهر در حجم ضربه‌ای، برون ده قلب، جریان خون و فشار خون مشاهده شده است (۷۵). همچنین هومون-ها نیز دارای ریتم شبانه‌روزی هستند و مطالعات نشان می‌دهند که سطوح اپی‌نفرین و نوراپی‌نفرین نیز در اوایل بعد از ظهر به حداکثر می‌رسد (۷۶). لذا احتمال اینکه تغییر زمان انجام فعالیت ورزشی بتواند متابولیسم پروتئین را دستخوش تغییر کند وجود دارد (۷۷). در مورد مکانیسم اثربخشی فعالیت ورزشی، بر ریتم شبانه‌روزی می‌توان گفت که ژن‌های پاسخ‌دهنده به فعالیت ورزشی، از جمله AMPK، HIF-1α و PGC1α بر بیان ژن‌های ساعت مولکولی اصلی تأثیر می‌گذارند و سازوکار بالقوه‌ای را نشان می‌دهند که از طریق آن فعالیت ورزشی به‌عنوان یک نشانه زمان شبانه‌روزی عمل می‌کند، میزان AMPK بر اثر فعالیت ورزشی افزایش می‌یابد و این افزایش AMPK ثبات پروتئین‌های PER و CRY را تغییر می‌دهد و بر ژن‌های ساعت مولکولی هسته تأثیرگذار است (۲۶). بنابراین فعالیت AMPK به‌طور مستقیم بر ساعت مولکولی تأثیر دارد و سازوکاری را نشان می‌دهد که فعالیت ورزشی به عنوان یک عامل شبانه‌روزی موجب بیان HIF-1α[۳] می‌شود و بر خروجی ساعت مولکولی از راه اتصال به ژن اصلی ساعت تأثیر می‌گذارد (۲۶). همچنین، عملکرد ساعت شبانه‌روزی با گیرنده‌های متابولیکی تحریک شده به واسطه فعالیت‌بدنی از جمله AMPK ارتباط زیادی دارد (۲۲). و از آنجایی‌که دیابت موجب کاهش سطح ژن‌های ساعت شبانه‌روزی می‌شود (۲۳) و بیان این ژن در کنترل ژن‌های سوخت‌وسازی دخیل است (۷۸). فعالیت ورزشی بر وضعیت سوخت‌وساز سلولی و سطوح $NAD^+/NADH$، PGC1α و آنزیم‌های وابسته تأثیر می‌گذارد و این مسیرها را فعال می‌کند (۲۵). نوسان‌های ساعت شبانه‌روزی سلولی به عنوان تنظیم‌کننده‌ی مهم بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی، در سلامتی و بیماری ظاهر می‌شوند. تکثیر سلولی، به شدت تحت تأثیر ساعت شبانه-روزی قرار دارد (۷۹). از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به عدم سنجش عوامل مورد نظر در سایر ساعت‌های شبانه‌روز (مثل بعد از ظهر) و همچنین ارزیابی ژن‌های وابسته به ریتم شبانه‌روزی اشاره کرد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد، بیماری دیابت با توجه به اختلالاتی که در متابولیسم ایجاد می‌کند. موجب کاهش عوامل بایوژنز میتوکندریایی در بافت قلب می‌شود. همچنین انجام هشت هفته تمرین استقامتی، بیان ژن عوامل بایوژنز میتوکندریایی قلب را افزایش می‌دهد و موجب بهبود عملکرد بافت قلب می‌شود. با وجود این، به منظور تجویز برنامه‌های استقامتی برای افراد دیابتی باید شرایط بالینی آزمودنی‌ها مانند نوع دیابت، حجم و شدت عوارض بیماری و همچنین شرایط برنامه‌های تمرینی مانند مدت زمان، شدت و دیگر مولفه‌ها را بررسی کرد؛ تا بتوان بهترین نتایج را برای این افراد رقم زد. از آنجایی‌که تاثیر انجام تمرین استقامتی در دو

۱. Toghi-Eshghi
۲. Moncilla

Copyright ©The authors

فاز روشنایی و تاریکی در عوامل مورد نظر در موش‌های دیابتی اختلاف معناداری نداشته است. نمی‌توان به طور قطع ساعت انجام تمرین ورزشی را به عنوان یک رویکرد درمانی در درمان بیماران مبتلا به دیابت در نظر گرفت و نیاز به پژوهش‌های گسترده‌تری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی دانشگاه تهران (پردیس بین المللی کیش) می‌باشد. بدین وسیله از تمامی دوستانی که ما را در اجرای این تحقیق یاری رساندند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

تضاد منافع

نویسندگان این مقاله، هیچ نفع متقابلی از انتشار آن ندارند.

Reference

1. David G, Gardner D, Dolores R. Greenspan's basic & clinical endocrinology. New York: McGram Hill Medical. 2011.
2. Alberti KGMM, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. Diabetic medicine. 1998;15(7):539-53.
3. Hu G, Jousilahti P, Barengo NC, Qiao Q, Lakka TA, Tuomilehto J. Physical activity, cardiovascular risk factors, and mortality among Finnish adults with diabetes. Diabetes care. 2005;28(4):799-805.
4. Barauna VG, Rosa KT, Irigoyen MC, De Oliveira EM. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. Clinical medicine & research. 2007;5(2):114-20.
5. Dominy JE, Puigserver P. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2013;5(7):a015008.
6. Arany Z. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. Current opinion in genetics & development. 2008;18(5):426-34.
7. Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1994;91(4):1309-13.
8. Damirchi A, Ebadi B. The effects of the intensity of interval training on mitochondrial dynamics-related proteins in the heart of male rats with myocardial infarction. Journal of Applied Exercise Physiology. 2019;14(28):159-72.
9. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1α, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. The American journal of clinical nutrition. 2011;93(4):884S-90S.
10. Carling D. AMPK signalling in health and disease. Current opinion in cell biology. 2017;45:31-7.
11. Warst A, Wang P, LaValley M, Avorn J, Solomon D. American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations Diabetes Care: 1 (S1) 12. Self management education program in chronic disease: a systematic revue and methodological critique of the literature. Arch Intern Med. 2004;164:1641-9.
12. Weinger K, de Groot M, Cefalu WT. Psychosocial research and care in diabetes: altering lives by understanding attitudes. Diabetes Care. 2016;39(12):2122-5.
13. Thackray AE, Deighton K, King JA, Stensel DJ. Exercise, appetite and weight control:

Copyright ©The authors

23. 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. Journal of Applied Physiology. 201.۱۰۰۵-۹۹۳:(٤)۱۲٦;۹
24. Cabri J, De Witte B, Clarys J, Reilly T, Strass D. Circadian variation in blood pressure responses to muscular exercise. Ergonomics. 1988;31(11):1559-65.
25. Tahara Y, Shibata S. Entrainment of the mouse circadian clock: Effects of stress, exercise, and nutrition. Free Radical Biology and Medicine. 2018;119:129-38.
26. Li X, Liu J, Lu Q, Ren D, Sun X, Rousselle T, et al. AMPK: A therapeutic target of heart failure—not only metabolism regulation. Bioscience reports. 2019;39(1).
27. Bozorgnejad Negin AMH, Afshari Mehdi, Serhangi Negar, Hassanzad Mandana. Investigating the relationship between rs10830962 variant of MTNR1B gene and the risk of type 2 diabetes. Iran's diabetes and metabolism. 2019;3(19):122-14. [In Persian]
28. Maryam Joghregi GA, Chubeena Siros, Tabandeh Mohammad Reza. Effect of eight weeks of endurance training in two phases of light and dark circadian rhythm on oxidative stress index in pancreatic tissue of diabetic rats. Scientific Research Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd. 2022;30(6):86-4973. [In Persian]
29. Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, et al. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. New England Journal of Medicine. 1988;318(19):1231.۹-
30. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. Nature. 2010;466(7306):627-31.
31. Green CB, Takahashi JS, Bass J. The meter of metabolism. Cell. 2008;134(5):728-42.
32. Teo W, Newton MJ, McGuigan MR. Circadian rhythms in exercise performance: implications for hormonal and muscular adaptation. Journal of sports science & medicine. 2011;10(4):600.
are there differences between men and women? Nutrients. 2016;8(9):583.
14. Binsch C, Jelenik T, Pfitzer A, Dille M, Müller-Lühlhoff S, Hartwig S, et al. Absence of the kinase S6k1 mimics the effect of chronic endurance exercise on glucose tolerance and muscle oxidative stress. Molecular metabolism. 2017;6(11):1443-53.
15. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. Cell metabolism. 2013;17(2):162-84.
16. Arabmomeni A, Mohebbi H, Riasi A, Marandi M. Effect of intermittent training on oxidative and glycolytic capacity in rat skeletal muscles. SSU_Journals. 2014;22(5):1554-66.
17. Seyydi SM, Tofighi A, Rahmati M, Azar JT. Exercise and Urtica Dioica extract ameliorate mitochondrial function and the expression of cardiac muscle Nuclear Respiratory Factor 2 and Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha in STZ-induced diabetic rats. Gene. 2022;822:146351.
18. Wang SY, Zhu S, Wu J, Zhang M, Xu Y, Xu W, et al. Exercise enhances cardiac function by improving mitochondrial dysfunction and maintaining energy homoeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy. Journal of Molecular Medicine. 2020;98:245-61.
19. Baghadam M, Azizbeidi K, Baesi K. The Effect Of 8 Weeks Aerobic Training On Cardiac Pgc-1α And Plasma Irisin In Stz-Induced Diabetics'rats. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism. 2019;18(5):228-35.[In Persian]
20. Baghadam M, Mohamadzadeh salamat K, Azizbeidi K, Baesi K. The Effect Of 8 Weeks Aerobic Training On Cardiac Pgc-1α And Plasma Irisin In Stz-Induced Diabetics' Rats. Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders. 2019;18(5):228-35. [In Persian]
21. Kurose T, Yabe D, Inagaki N. Circadian rhythms and diabetes. Journal of diabetes investigation. 2011;2(3):176.
22. Sato S, Basse AL, Schönke M, Chen S, Samad M, Altıntaş A, et al. Time of exercise specifies the impact on muscle metabolic pathways and systemic energy homeostasis. Cell metabolism. 2019;30(1):92-110. e4.

Copyright ©The authors

42. Kaikini AA, Kanchan DM, Nerurkar UN, Sathaye S. Targeting mitochondrial dysfunction for the treatment of diabetic complications: Pharmacological interventions through natural products. Pharmacognosy Reviews. 2017;11(22):128.
43. Fathi R, Ebrahimi M, Khenar Sanami S. Effects of high fat diet and high intensity aerobic training on interleukin 6 plasma levels in rats. Pathobiology Research. 2015;18(3):109-16. [In Persian]
44. Khalili R, Hasanzadeh S, Jalali AS, Shahrooze R, Najafi G, Eimani M. The Effects of Liraglutide on In Vitro Fertilization in Mice Following Experimental Diabetes. Qom university of medical sciences journal. 2020;14(1):51-60. [In Persian]
45. Ghodratnama A, Sherafati Moghadam M, Shabani M. The effect of endurance and high-intensity interval training on the content of mTOR, CRTC1 and CRTC2 proteins in subcutaneous adipose tissue of type 1 and 2 diabetic rats. Daneshvar Medicine. 2022;30(2):24-36. [In Persian]
46. Nazari M, Moghimipour E, Tabandeh MR. Betaine down regulates apelin gene expression in cardiac and adipose tissues of insulin resistant diabetic rats fed by high-calorie diet. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2017;23:181-90.
47. Chavanelle V, Boisseau N, Otero YF, Combaret L, Dardevet D, Montaurier C, et al. Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on glycaemic control and skeletal muscle mitochondrial function in db/db mice. Scientific reports. 2017;7(1):1-10.
48. Ostler JE, Maurya SK, Dials J, Roof SR, Devor ST, Ziolo MT, et al. Effects of insulin resistance on skeletal muscle growth and exercise capacity in type 2 diabetic mouse models. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2014;306(6):E592-E605.
49. Maryam Johorgi GA, Chubeena Siros, Tabandeh Mohammad Reza. The effect of eight weeks of endurance training in two light and dark phases of the circadian rhythm on the index of oxidative stress in pancreatic tissue of diabetic
33. Starkie RL, Hargreaves M, Lambert DL, Proietto J, Febbraio MA. Effect of temperature on muscle metabolism during submaximal exercise in humans. Experimental physiology. 1999;84(4):775-84.
34. Cappaert TA. Time of day effect on athletic performance: An update. The Journal of Strength & Conditioning Research. 1999;13(4):412-21.
35. Wolff G, Esser KA. Scheduled exercise phase shifts the circadian clock in skeletal muscle. Medicine and science in sports and exercise. 2012;44(9):1663.
36. Mirizio GG, Nunes RSM, Vargas DA, Foster C, Vieira E. Time-of-day effects on short-duration maximal exercise performance. Scientific reports. 2020;10(1):1-17.
37. Liu AC, Lewis WG, Kay SA. Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. Nature chemical biology. 2007;3(10):630-9.
38. Mancilla R, Brouwers B, Schrauwen-Hinderling VB, Hesselink MK, Hoeks J, Schrauwen P. Exercise training elicits superior metabolic effects when performed in the afternoon compared to morning in metabolically compromised humans. Physiological Reports. 2021;8(24):e14669.
39. Toghi-Eshghi SR, Yardley JE. Morning (fasting) vs afternoon resistance exercise in individuals with type 1 diabetes: a randomized crossover study. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2019;104(11):5217-24.
40. Ritov VB, Menshikova EV, Azuma K, Wood R, Toledo FG, Goodpaster BH, et al. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2010;298(1):E49-E58.
41. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1α-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. Nature genetics. 2003;34(3):267-73.

Copyright ©The authors

activation and mitochondrial biogenesis. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism. 2001;281(6):E1340-E6.
58. Zanuso S, Jimenez A, Pugliese G, Corigliano G, Balducci S. Exercise for the management of type 2 diabetes: a review of the evidence. Acta diabetologica. 2010;47(1):15-22.
59. Huh JY, Mougios V, Kabasakalis A, Fatouros I, Siopi A, Douroudos II, et al. Exercise-induced irisin secretion is independent of age or fitness level and increased irisin may directly modulate muscle metabolism through AMPK activation. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2:(۱۱)۹۹;۰۱٤E2154-E61.
60. Egan B, Carson BP, Garcia-Roves PM, Chibalin AV, Sarsfield FM, Barron N, et al. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. The Journal of physiology. 2010;588(10):1779-90.
61. Baar K. Nutrition and the adaptation to endurance training. Sports medicine. 2014;44:5-12.
62. Leick L, Lyngby SS, Wojtasewski JF, Pilegaard H. PGC-1α is required for training-induced prevention of age-associated decline in mitochondrial enzymes in mouse skeletal muscle. Experimental gerontology. 2010;45(5):336-42.
63. Tabari E, Mohebbi H, Karimi P, Moghaddami K, Khalafi M. The Effects Of Interval Training Intensity On Skeletal Muscle Pgc-1α In Type2 Diabetic Male Rats. Iranian Journal of Diabetes and Lipid Disorders. 2019;18(4):179-88. [In Persian]
64. Little JP, Safdar A, Wilkin GP, Tarnopolsky MA, Gibala MJ. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. The Journal of physiology. 2010;588(6):1011-22.
65. López-Lluch G, Santos-Ocaña C, Sánchez-Alcázar JA, Fernández-Ayala DJM, Asencio-Salcedo C, Rodríguez-Aguilera JC, et al. Mitochondrial responsibility in ageing process: innocent, suspect or guilty. Biogerontology. 2015;16:599-620.
rats. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd. 2022;6:4973-86. [In Persian]
50. Laurindo CP, Gregorio KCR, Moreno ACR, Agostinho JMV, Campos EC, Nai GA, et al. Resistance training mitigates hepato-cardiac changes and muscle mitochondrial protein reductions in rats with diet-induced obesity. Heliyon. 2021;7(11):e08374.
51. Lin J-Y, Kuo W-W, Baskaran R, Kuo C-H, Chen Y-A, Chen WS-T, et al. Swimming exercise stimulates IGF1/PI3K/Akt and AMPK/SIRT1/PGC1α survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus. Aging (albany NY). 2020;12(8):6852.
52. Berenjeian Tabrizi H, Mirdar S, Moghanibashi MM, Ansari Pirsaraei Z. The Effect of High-Intensity Interval Training on Mitochondrial Biogenesis of Lung Tissue. Journal of Advanced Biomedical Sciences. 2016;6(4):522-9.
53. Steidle-Kloc E, Schönfelder M, Müller E, Sixt S, Schuler G, Patsch W, et al. Does exercise training impact clock genes in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus? European journal of preventive cardiology. 2016;23(13):1375-82.
54. Novelle MG, Contreras C, Romero-Picó A, López M, Diéguez C. Irisin, two years later. International journal of endocrinology. 2013;2013.
55. Wright DC, Han D-H, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1α expression. Journal of Biological Chemistry. 2007;282(1):194-9.
56. O'Hagan KA, Cocchiglia S, Zhdanov AV, Tambuwala MM, Cummins EP, Monfared M, et al. PGC-1α is coupled to HIF-1α-dependent gene expression by increasing mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;106(7):2188-93.
57. Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, et al. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1

Copyright ©The authors

66. Gordon JW, Rungi AA, Inagaki H, Hood DA. Selected contribution: effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle. Journal of Applied Physiology. 2001;90(1):389-96.
67. Boquist L, Hellman B, Lernmark A, Taljedal I-B. Influence of the mutation" diabetes" on insulin release and islet morphology in mice of different genetic backgrounds. The Journal of cell biology. 1974;62(1):77-89.
68. Li L, Pan R, Li R, Niemann B, Aurich A-C, Chen Y, et al. Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator–activated receptor-γ coactivator-1α (PGC-1α) deacetylation by physical activity: intact adipocytokine signaling is required. Diabetes. 2011;60(1):157-67.
69. Kumar AS, Maiya AG, Shastry B, Vaishali K, Ravishankar N, Hazari A, et al. Exercise and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. Annals of physical and rehabilitation medicine. 2019;62(2):98-103.
70. Rakshit K, Hsu TW, Matveyenko AV. Bmal1 is required for beta cell compensatory expansion, survival and metabolic adaptation to diet-induced obesity in mice. Diabetologia. 2016;59:73.٤٣-٤
71. Froy O. Metabolism and circadian rhythms—implications for obesity. Endocrine reviews. 2010;31(1):1-24.
72. Parameswaran G, Ray DW. Sleep, circadian rhythms, and type 2 diabetes mellitus. Clinical endocrinology. 2022;96(1):12-20.
73. Tahara Y, Aoyama S, Shibata S. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. The Journal of Physiological Sciences. 2017;67(1):1-10.
74. Stokkan K-A, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. Science. 2001;291(5503):490-3.
75. Garrett WE, Kirkendall DT. Exercise and sport science: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
76. SUDO A, MIKI K. Circadian rhythm of catecholamine excretion in rats after phase shift of light-dark cycle. Industrial health. 1995;33(2):57-66. .
77. Darvakh H, Mousaviyan AS. Comparison of the effect of twelve weeks of aerobic training in the morning and afternoon sessions on protein catabolism of diabetic women. Iranian Journal of Women, Obstetrics and Infertility. 2017;20(2):60-7.
78. Lee Y. Roles of circadian clocks in cancer pathogenesis and treatment. Experimental & molecular medicine. 2021;53(10):1529-38.
79. Chakrabarti S, Michor F. Circadian clock effects on cellular proliferation: Insights from theory and experiments. Current Opinion in Cell Biology. 2020;67:17-26.

Copyright ©The authors