

# تأثیر تمرینات تناوبی شدید و فیستین بر بیان ژنی *NLRP3* و *IL18* در بافت کلیه موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲

شیما بنداد<sup>۱</sup>، معصومه حبیبیان<sup>۱\*</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** چاقی ارتباط زیادی با دیابت نوع ۲، بروز التهاب و اختلال عملکرد کلیوی دارد. در این مطالعه تأثیر تمرینات تناوبی شدید (HIIT) و فیستین بر بیان ژنی *NLRP3* و *IL18* در بافت کلیه موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ بررسی شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۳۰ سر موش نر نژاد C57bl/6 به‌طور تصادفی به ۲ گروه اصلی کنترل (۶ سر) و رژیم غذایی پرچرب (۲۴ سر) تقسیم شدند. دیابت نوع ۲ با مصرف رژیم غذایی پرچرب به مدت ۱۶ هفته القا شد. پس از تأیید دیابت نوع ۲، موش‌های دیابتی به‌طور تصادفی به گروه‌های دیابت، دیابت-تمرین، دیابت-فیستین، دیابت-تمرین-فیستین تقسیم شدند. مکمل فیستین با دوز ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم/روز، به صورت درون‌صفاقی تزریق شد. پروتکل HIIT شامل دوره‌های ۲ دقیقه‌ای با شدت ۸۰-۱۰ درصد توان هوازی حداکثر ( $VO_{2max}$ ) با دوره‌های استراحت دو دقیقه‌ای در شدت ۵۰ درصد  $VO_{2max}$  و ۸-۲ تکرار در ۸ هفته انجام شد. بیان ژنی *NLRP3* و *IL-18* در بافت کلیه تعیین شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه در سطح معناداری  $p < 0/05$  و نرم‌افزار SPSS version 16 انجام شد.

**نتایج:** پس از ۸ هفته، بیان ژنی *NLRP3* ( $p < 0/001$ ) و *IL-18* ( $p < 0/001$ ) در گروه دیابت نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ( $p < 0/001$ ). هم‌چنین بیان ژنی *NLRP3* و *IL-18* در گروه‌های HIIT، فیستین و مداخله ترکیبی نسبت به گروه دیابت کاهش معناداری یافت ( $p < 0/001$ ). به‌علاوه تأثیر مداخله ترکیبی در کاهش بیان ژنی این متغیرها در مقایسه با دو مداخله دیگر به‌طور معناداری بالاتر بود ( $p < 0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد HIIT، فیستین و مداخله ترکیبی می‌توانند از بافت کلیه دیابتی، به‌واسطه کاهش التهاب از طریق مهار مسیر بیان ژنی محور *NLRP3/IL-18* حفاظت کنند.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین تناوبی شدید، دیابت نوع ۲، اینترلوکین ۱۸، *NLRP3*، فیستین

**ارجاع:** بنداد شیما، حبیبیان معصومه. تأثیر تمرینات تناوبی شدید و فیستین بر بیان ژنی *NLRP3* و *IL18* در بافت کلیه موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۴؛ ۳۳ (۷): ۹۲۰۵-۱۵.

۱- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران.

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۱۱۲۸۵۷۲۶، پست الکترونیکی: habibian\_m@yahoo.com، صندوق پستی: ۴۷۶۵۱\_۶۱۹۶۴

## مقدمه

افزایش شیوع چاقی در سراسر جهان با هم‌زمانی شیوع دیابت نوع ۲ همراه است و تجمع بیش از حد چربی بدن می‌تواند باعث دیابت نوع ۲ شود (۱). در چاقی، انرژی اضافی منجر به یک محیط استرس‌زا مزمن و در نتیجه هیپرتروفی بافت چربی می‌شود تا زمانی که سلول‌های چربی به حد انبساط خود برسند. تجمع بیش از حد گونه‌های لیپید سمی به صورت غیرطبیعی در اندام‌های مختلف از جمله بافت کلیه، باعث ایجاد یک اثر مضر به نام سمیت چربی می‌شود (۲). فرآیندهای التهابی در پاتوفیزیولوژی بیماری کلیوی دیابتی نیز مشارکت دارد. چنین حالت التهابی خفیف عمدتاً با افزایش سایتوکین‌های پیش‌التهابی، کموکاین‌ها، مولکول‌های چسبان، فاکتورهای رونویسی و نفوذ سلول‌های ایمنی مشخص می‌شود (۳). نفروپاتی از عوارض میکروواسکولار دیابت شیرین است و علت اصلی بیماری‌های کلیوی در مرحله نهایی محسوب می‌شود (۴). بروز فیبروز بینابینی کلیه، با تغییرات پاتولوژیک مشخص می‌شود، به طوری که لوله‌های کلیوی طبیعی و ساختارهای بینابینی کلیوی با مقدار زیادی ماتریکس خارج سلولی رسوب شده جایگزین می‌شوند و درجه فیبروز بر عملکرد کلیه تأثیر می‌گذارد (۵). اینترلوکین ۱۸ (*IL-18*) یک سایتوکین پیش‌التهابی قوی است و سطوح سرمی آن پیش‌بینی‌کننده اختلال عملکرد کلیوی اولیه است (۶). این سایتوکین از مونوسیت‌ها/ماکروفاژهای فعال ترشح می‌شود و تولید سایر سایتوکین‌های التهابی از جمله فاکتور نکروز تومور آلفا ( $TNF-\alpha$ ) را تحریک می‌کند. *IL-18* اساساً در اپیتلیوم لوله‌ای کلیه بیان می‌شود (۴). مطالعات قبلی نشان دادند که *IL-18* می‌تواند در پاتوژنز بیماری‌های کلیوی مزمن مرتبط با دیابت و کم‌خونی کلیوی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ نقش داشته باشد (۷). سطح سرمی بالاتر *IL-18* (۸، ۷)، کاهش میزان فیلتراسیون گلومرولی (۷) و همبستگی آن با پارامترهای چربی، گلیسمی و التهابی در افراد دیابتی گزارش شده است (۸). اینفلامازوم پروتئین گیرنده شبه NOD ۳

(*NLRP3*) یک پروتئین کمپلکس است که به عنوان تنظیم‌کننده حیاتی در پاتوژنز بیماری کلیوی دیابتیک در نظر گرفته می‌شود (۹) و نقش مهمی در بیماری‌های التهابی متابولیک مختلف، مانند آترواسکلروز و دیابت دارد (۱۰). فعال شدن *NLRP3*، به ویژه هنگام تحریک توسط متابولیت‌های غیرطبیعی گلوکز و لیپیدها، می‌تواند ترشح سایتوکین‌های پیش‌التهابی *IL-18* را تشدید کند و با ایجاد آبشارهای التهابی منجر به شروع آسیب حاد کلیه، فیبروز و بیماری مزمن کلیوی شود (۱۱، ۱۰). ماکروفاژهای کلیوی دارای تمام اجزای اینفلامازوم *NLRP3* هستند که پس از فعال شدن، پیروپتوز را القا می‌کنند. بنابراین بررسی اینفلامازوم *NLRP3* و اجزای سیگنالینگ آن می‌تواند عوامل درمانی بالقوه‌ای را علیه بیماری کلیوی آشکار سازد (۱۱). مشاهده شده است که بسیاری از محصولات طبیعی دارای خواص ضدالتهابی عالی هستند و ممکن است با مهار *NLRP3*، بیماری کلیوی دیابتی را کاهش دهند (۹). فیستین یک فلاونوئید طبیعی با اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد توموری است که عمدتاً در میوه‌ها و سبزیجات مختلف مانند سیب، خرمالو، انگور، توت فرنگی، خیار و پیاز یافت می‌شود (۱۰) و نقش مهمی در کاهش گلوکز و چربی خون دارد (۱۳، ۱۲). گزارش‌های گسترده‌ای مبنی بر تأثیر فیستین در بهبود انواع مختلف آسیب‌های کلیوی منتشر شده است. با این حال، مکانیسم‌های عملکرد آن در برابر آسیب کلیوی ناشی از دیابت مرتبط با چاقی هنوز مشخص نیست (۱۴، ۱۲). امروزه تمرین ورزشی یک رویکرد ایمن و غیردارویی در پیشگیری و کاهش عوارض ناشی از آسیب کلیوی دیابتی محسوب می‌شود (۳). مشاهده شده است که تمرینات تناوبی شدید (HIIT) در مقایسه با سایر روش‌های ورزشی با توسعه بهتری در حساسیت به انسولین، تراکم میتوکندری، آنزیم‌های اکسایشی، عملکرد ایمنی و برون‌ده قلبی همراه بوده است (۱۶، ۱۵). این تمرینات یک گزینه مناسب برای کنترل و بهبود هیپرگلیسمی، ترکیب بدن، تنظیم فشارخون و بهبود

(۶سر) و رژیم غذایی پرچرب (۲۴ سر) تقسیم شدند. در طول مدت آزمایش، تمامی حیوانات در دمای کنترل شده ۲۱ درجه سانتی‌گراد ( $\pm 2$ ) و رطوبت ۶۵٪ ( $\pm 5$ ) در قفس‌های مخصوص از جنس پلکسی گلاس با درب توری و ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۱۴ سانتی‌متر نگهداری شدند (سه سر رت در هر قفس) و آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. دیابت نوع ۲ با مصرف رژیم غذایی پرچرب (شامل ۴۵٪ چربی، ۳۵٪ کربوهیدرات و ۲۰٪ پروتئین) القا شد. بدین منظور رژیم غذایی موش‌ها با غذای معمولی و پرچرب شروع شد و به تدریج طی ۲ هفته به غذای پرچرب تغییر کرد تا حیوانات با این رژیم غذایی غنی از چربی سازگار شدند. سپس ۱۶ هفته تیمار با رژیم غذایی پرچرب ادامه داشت. پس از ۱۶ هفته نمونه خونی از دم موش‌ها اخذ شد و سطح بالای گلوکز ۲۵۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر نشان دهنده القای دیابت نوع ۲ بوده است (۲۰، ۲۱). پس از تایید القای دیابت نوع ۲ موش‌های دیابتی شده به‌طور تصادفی به ۴ گروه دیابت-کنترل، دیابت-تمرین، دیابت-فیستین و دیابت-تمرین-فیستین (ترکیبی) تقسیم شدند (۶ سر در هر گروه) و رژیم غذایی غنی از چربی برای تمامی گروه‌های دیابتی ادامه داشت و گروه کنترل هم تحت مداخله‌ای قرار نگرفت. در تمامی دوره تحقیق حیوانات توسط یک نفر جابه‌جا و دستکاری شدند. مراقبت از حیوانات نیز مطابق با دستورالعمل‌های و پروتکل‌های اخلاقی بود. پس از حل کردن پودر فیستین (hanghai Yuanye Bio-Technology Co) در حلال دی‌متیل‌سولفید، مکمل فیستین تهیه شد و روزانه با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت درون‌صفاقی به مدت ۸ هفته به موش‌های گروه‌های دیابت-فیستین و ترکیبی تزریق شد (۲۲). یک هفته قبل از شروع پروتکل، حیوانات با چگونگی اجرای تمرینات به‌صورت دویدن روی نوارگردان با سرعت ۵ متر/دقیقه، به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در روز، و ۵ روز در هفته آشنا شدند. برنامه تمرینی شامل ۵ دقیقه گرم کردن، برنامه اصلی (۱۶ تا ۴۰ دقیقه) و ۵ دقیقه سرد کردن بود. HIIT شامل وهله‌های ۲ دقیقه‌ای دویدن روی نوارگردان با شدت ۸۰ درصد توان هوازی حداکثر با وهله‌های استراحت دو دقیقه‌ای با شدت

پروفایل چربی در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ است (۱۷). اما محققین دیگر گزارش دادند که HIIT اگرچه هموستاز گلوکز را در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ بهبود بخشید ولی منجر به فیروز و آسیب کلیوی شد (۱۸). مشخص شده است که سبک زندگی بی‌تحرک با افزایش بروز دیابت مرتبط است در حالی که تمرین ورزشی کنترل متابولیک را بهبود می‌بخشد و ممکن است به پیشگیری از عوارض بیماری‌های مزمن مختلف کمک کند (۳). به‌علاوه شرکت در فعالیت‌های ورزشی منظم، به عنوان یک عامل جایگزین برای بهبود پاسخ‌های متابولیک سلولی و حساسیت به انسولین، برای تسکین دیابت تجویز می‌شود (۱۹). با این وجود اثربخشی ورزش به عوامل مختلفی از جمله شدت و مدت زمان بستگی دارد و تأثیر تمرینات ورزشی از جمله HIIT بر مهار یا کاهش مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیکی درگیر در ایجاد و پیشرفت بیماری کلیوی دیابتی مشخص نیست (۳). این در حالی است که علی‌رغم درمان‌های دارویی موجود به منظور هدف قرار دادن کنترل گلوکز خون، بروز بیماری کلیوی دیابتی همچنان در حال افزایش است. بنابراین، استراتژی‌های جدید برای جلوگیری یا کاهش پیشرفت بیماری کلیوی دیابتی و اثرات آن بر اندام‌های بدن اهمیت بسیاری دارد. لذا با توجه به نقش *NLRP-3* و *IL-18* در پاتوژنز کلیوی دیابت نوع ۲، درک بهتر از مکانیسم غیردارویی مانند استفاده از فلاونوئید طبیعی فیستین و HIIT در درمان این بیماری ضروری به‌نظر می‌رسد. این مطالعه نیز با هدف بررسی تأثیر HIIT و فیستین بر بیان ژنی پروتئین‌های التهابی *NLRP3* و *IL-18* در بافت کلیه موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ انجام شده است.

### روش بررسی

این مطالعه، یک تحقیق تجربی است و در یک طرح پس‌آزمون همراه با گروه کنترل انجام شد. در ابتدا ۳۰ سر موش نرژاد C57bl/6 ۴ هفته‌ای با میانگین وزن  $14 \pm 2$  گرم از موسسه بیوتکنولوژی رویان اصفهان خریداری شد و به‌طور تصادفی، به ۲ گروه اصلی کنترل سالم با رژیم غذایی نرمال

آن (Zoetis، ایالات متحده) اندازه‌گیری شد. بیان ژن‌های *NLRP3* و *IL-18* به روش کمی Real-Time PCR تعیین شد. پس از استخراج RNA (Ribonucleic Acid) با غلظت و خلوص بالا، مراحل سنتز cDNA (Complementary DNA) انجام شد. ساخت cDNA از روی RNA الگو با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس و دو نوع پرایمر هگزامرهای تصادفی و الیگو dT و کیت Revert Aid First strand cDNA synthesis محصول شرکت تجاری Takara آلمان انجام شد. پرایمرهای موردنظر جهت بررسی ژن‌های در نظر گرفته شده در این آزمایش توسط نرم‌افزار Beacon Designer و Oligo7 طراحی شدند (جدول ۱). از B2m به عنوان ژن کنترل استفاده شد. به‌علاوه نسبت بیان هر ژن با استفاده از روش چرخه آستانه CT ( $2^{-CT\Delta\Delta}$ ) با فرمول محاسبه شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری:

برای توصیف داده‌ها از شاخص‌های مرکزی و پراکندگی استفاده شد. هم‌چنین طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک و تجانس واریانس‌ها با استفاده از آزمون لون بررسی شد. سپس از آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی بن‌فرونی برای مقایسه بیان ژن‌ها در گروه‌های پژوهش استفاده شد. تمامی تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 در سطوح معناداری  $P < 0.05$  انجام شد.

۵۰ درصد توان هوازی حداکثر و ۲ تکرار در هفته اول بود که در هفته به چهارم به ۸ وهله ۲ دقیقه‌ای با شدت ۱۱۰ درصد توان هوازی حداکثر با وهله‌های استراحت دو دقیقه‌ای با شدت ۵۰ درصد توان هوازی حداکثر و ۸ تکرار رسید که تا هفته هشتم ثابت بود. برای تعیین توان هوازی، در ابتدا حیوانات با سرعت ۸ متر در دقیقه روی نوارگردان شروع به دویدن کردند به‌طوری‌که با افزایش سرعت ۲ متر/دقیقه در هر یک دقیقه، به سرعت ۲۰ متر بر دقیقه رسیده و ۵ دقیقه با این سرعت دویدند. در مرحله بعد حیوانات به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت به ۲۵ متر در دقیقه، دویدند. در انتها سرعت نوارگردان به ۳۰ متر در دقیقه افزایش داده شد و حیوانات تا رسیدن به واماندگی دویدند. عدم واکنش موش‌ها به سه بار شوک الکتریکی تعبیه شده در ابتدای نوارگردان رسیدن به واماندگی در نظر گرفته شد که به حالت خوابیدن به پشت باقی می‌ماندند (۲۳).

۴۸ ساعت پس از آخرین مداخله‌های تمرینی و مکمل‌دهی، حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین ۱۱ درصد (دوز ۵۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلوزین ۲ درصد (دوز ۱۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس قفسه سینه حیوان شکافته شده و نمونه خونی برای اندازه‌گیری گلوکز خون در پایان پروتکل، به‌طور مستقیم از قلب حیوان گرفته شد. در ادامه کلیه جدا شد و پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در نیتروژن مایع فریزر شد. سطوح قند خون ناشتا (FBS) با استفاده از یک گلوکومتر Alpha TRAK و نوارهای استاندارد

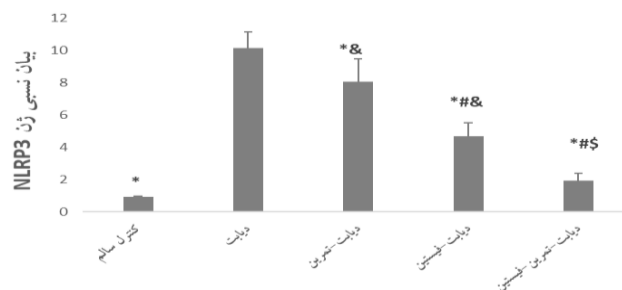
جدول ۱: توالی پرایمر متغیرهای تحقیق

Genes	Primer Sequences	Temperature	Size (bp)
B2m	Forward: 5'- ACAGTTCCACCCGCCTCACATT -3' Reverse: 5'-TAGAAAGACCAGTCCTTGCTGAAG -3'	60	105
IL-18	Forward: 5'- CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC -3' Reverse: 5'- TCTACTCGAAGCCTTGTCAGCAC -3'	59	114
NLRP3	Forward: 5'- CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC -3' Reverse: 5'- TCTACTCGAAGCCTTGTCAGCAC -3'	58	133

فیستین ( $P < 0.001$ ) با گروه کنترل سالم اختلاف معناداری وجود داشت اما بین گروه‌های دیابت-تمرین-فیستین و کنترل این اختلاف معنادار نبوده است ( $P = 0.326$ ). در مقایسه مقادیر بیان ژنی IL-18 و سطوح سرمی گلوکز نیز اختلاف معناداری بین گروه‌های دیابت-تمرین، دیابت-فیستین و دیابت-تمرین-فیستین با گروه کنترل مشاهده شد ( $P < 0.001$ ). همچنین اختلاف معناداری بین بیان ژنی *NLRP3* گروه‌های دیابت-تمرین و دیابت-فیستین وجود داشت ( $P < 0.001$ ) اما بین بیان ژنی IL-18 بافت کلیه ( $P = 0.284$ ) و سطوح سرمی گلوکز ( $P = 0.805$ ) گروه‌های دیابت-تمرین و دیابت-فیستین تفاوت معناداری مشاهده نشد. با این وجود تاثیر مداخله ترکیبی در کاهش بیان ژنی *NLRP3* (به ترتیب  $P < 0.001$  و  $P < 0.001$ ) و *IL-18* (به ترتیب  $P < 0.001$  و  $P < 0.001$ ) بافت کلیه و کاهش سطوح سرمی گلوکز (به ترتیب  $P < 0.001$  و  $P < 0.001$ ) در مقایسه با دو مداخله دیگر به‌طور معناداری بالاتر بود.

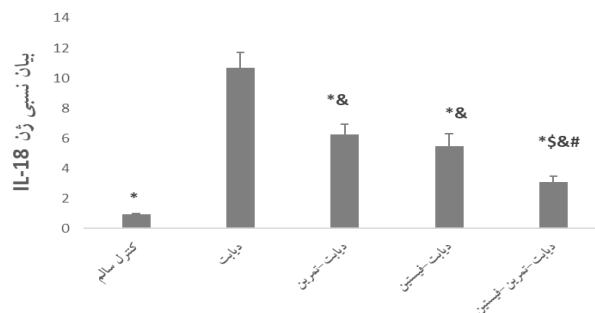
## نتایج

نتایج نشان داد که بین بیان ژنی *NLRP3* ( $F = 116/557$ )؛ *IL-18* ( $F = 173/228$ )؛ و ( $P < 0.001$ ) در بافت کلیه و سطوح سرمی گلوکز ( $F = 157/358$ )؛ گروه‌های مختلف تفاوت معناداری وجود دارد. همچنین القای دیابت منجر به افزایش بیان ژنی *NLRP3* ( $P < 0.001$ ) و *IL-18* ( $P < 0.001$ ) بافت کلیه و افزایش سطوح سرمی گلوکز ( $P < 0.001$ ) در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه کنترل سالم شد. همچنین اختلاف معناداری بین بیان ژنی *NLRP3* (به ترتیب  $p = 0.004$ ،  $P = 0.004$  و  $P < 0.001$ )؛ *IL-18* (به ترتیب  $P < 0.001$ ،  $P < 0.001$  و  $P < 0.001$ )؛ و سطوح سرمی گلوکز (به ترتیب  $P < 0.001$ ،  $P < 0.001$  و  $P < 0.001$ )؛ گروه‌های دیابت-تمرین، دیابت-فیستین و دیابت-تمرین-فیستین با گروه دیابت مشاهده شد. به علاوه بین مقادیر بیان ژنی *NLRP3* گروه‌های دیابت-تمرین ( $P < 0.001$ )، دیابت-



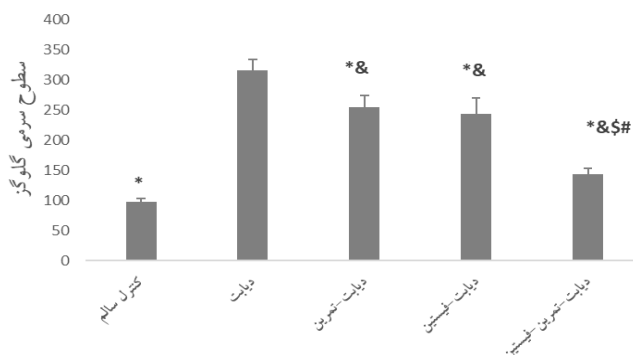
شکل ۱: مقایسه بیان ژنی *NLRP3* بافت کلیه در گروه‌های مختلف پژوهش

\*: تفاوت نسبت به گروه دیابت، &: تفاوت نسبت به گروه کنترل سالم، # تفاوت نسبت به گروه دیابت-تمرین، \$: تفاوت نسبت به گروه دیابت-فیستین



شکل ۲: مقایسه بیان ژنی *IL-18* بافت کلیه در گروه‌های مختلف پژوهش

\*: تفاوت نسبت به گروه دیابت، &: تفاوت نسبت به گروه کنترل سالم، # تفاوت نسبت به گروه دیابت-تمرین، \$: تفاوت نسبت به گروه دیابت-فیستین



شکل ۳: مقایسه سطوح سرمی گلوکز در گروه‌های مختلف پژوهش

\*: تفاوت نسبت به گروه دیابت، &: تفاوت نسبت به گروه کنترل سالم، # تفاوت نسبت به گروه دیابت-تیمون، \$: تفاوت نسبت به گروه دیابت-فیستین

ژنی *NLRP3* و *IL-18* بافت کلیه و کاهش سطوح سرمی گلوکز نسبت به گروه دیابت شده است. در این راستا دانگ و همکاران در سال ۲۰۲۲ در بررسی مکانیسم‌های فیستین در آسیب پودوسیت ناشی از نفروپاتی دیابتی نشان دادند که فیستین آسیب پودوسیت ناشی از گلوکز بالا و نفروپاتی دیابتی ناشی از استریتوزوتوسین را در موش‌ها بهبود بخشید که با مهار بیان *NLRP3* همراه بوده است (۱۲). به‌علاوه در یک مطالعه دیگر گزارش شده است که ۱۶ هفته تیمار با رژیم غذایی پرچرب با افزایش قابل توجه وزن بدن، مقاومت به انسولین و عدم تحمل گلوکز قابل توجه در موش‌های C57BL/6 همراه بود در حالی که تیمار با فیستین به کاهش سایتوکاین‌های پیش‌تهابی از جمله  $IL-1\beta$ ،  $TNF-\alpha$  و *IL-18* و کاهش بیان *NLRP3* و مهار سیگنالینگ فاکتور هسته‌ای  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) منجر شد (۲۷). رن و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که تزریق لیپوپلی‌ساکارید به موش‌های C57BL/6 J، منجر به تولید سایتوکاین‌های پیش‌تهابی و پروتئین‌های مرتبط با التهاب در کلیه‌ها شد. با این حال، فیستین با مهار بیان کلیوی  $IL-6$ ،  $IL-1\beta$ ،  $TNF-\alpha$  پاسخ‌تهابی را بهبود بخشید (۱۴). در شرایط هایپرگلیسمی، سلول‌های سیستم ایمنی طبیعی و ثانویه، سایتوکاین‌های التهابی را سنتز و ترشح می‌کنند و فیستین از طریق تغییرات اپی‌ژنتیکی شامل فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF- $\kappa B$ )، تولید سایتوکاین ناشی از هایپرگلیسمی را در مونوسیت‌ها مهار می‌کند (۱۳). گزارش شده است که فیستین فعال شدن

## بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر HIIT و فیستین بر بیان ژنی *NLRP3* و *IL18* در بافت کلیه موش‌ها با استفاده از یک مدل القای دیابت نوع ۲ از طریق مصرف غذای پرچرب انجام شد. نتایج نشان داد که القای دیابت با افزایش بیان ژنی *NLRP3* و *IL-18* در بافت کلیه و افزایش سطوح سرمی گلوکز در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ در مقایسه با گروه سالم شد. مشابه با یافته‌های تحقیق حاضر ایسکندر و همکاران در سال ۲۰۲۳ نشان دادند که القای دیابت، با افزایش سطوح *IL-18* در بافت کلیه همراه بوده است (۴). در یک مطالعه اخیر نیز نشان داده شد که *NLRP3* با مهار اتوفاژی در پودوسیت‌ها، آسیب کلیوی را در مدل موش‌های نفروپاتی دیابتی واسطه‌گری می‌کند (۲۴). یانگ و همکاران (۲۳) در یک مطالعه بر روی ۱۵۳ بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ با سطوح مختلف نفروپاتی دیابتی نشان دادند که سطوح *NLRP3* و *IL-18* در همه رده‌ها به طور قابل توجهی بالاتر از افراد سالم بوده است و همبستگی مثبت و معناداری بین مقادیر *NLRP3* و *IL-18* با مراحل نفروپاتی دیابتی وجود داشته است (۲۵). فعال شدن اینفلامازوم ناشی از گلوکز، تمایز سلول‌های اپیتلیال توبولی کلیوی را افزایش می‌دهد، که نشان می‌دهد اینفلامازوم *NLRP3* نقش کلیدی در تمایز سلول‌های اپیتلیال دارد (۲۶). به‌علاوه یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که ۸ هفته تیمار با فیستین منجر به کاهش بیان

از ۸ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط و زیاد نیز توسط محققین دیگر گزارش شده است (۳۱). تمرین ورزشی با افزایش برون‌ده قلبی و انقباض عروق کلیوی باعث ایجاد تنش برشی و در نتیجه تولید نیتریک اکسید می‌شود. افزایش سطح نیتریک اکسید نیز به‌واسطه کاهش فیبروز منجر به افزایش رگ‌زایی و بهبود عملکرد اندوتلیال می‌گردد (۳). شواهد اخیر نشان می‌دهد که کمپلکس التهابی *NLRP3* و فاکتورهای پایین‌دست آن،  $IL-1\beta$  و *IL-18*، در موش‌های فاقد *NLRP3* به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافته‌اند، که تأکید می‌کند *NLRP3* برای تولید سایتوکاین التهابی ضروری است (۲۶). بنابراین HIIT ممکن است از طریق کاهش اینفلازوم *NLRP3* و در نتیجه تنظیم منفی *IL-18* در بافت کلیه، به بهبود عملکرد کلیه در مقابل آسیب ناشی از دیابت نوع ۲ کمک نماید و هم‌زمانی HIIT با مصرف فیستین با تقویت این اثرات همراه است. از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به نبود مطالعات مربوط به اثر HIIT و یا سایر تمرینات ورزشی بر مسیر *NLRP3/IL-18* بافت کلیه دیابتی اشاره نمود. لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات دیگر تاثیر انواع تمرینات ورزشی بر مسیر التهابی فوق بررسی شود.

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که القای دیابت نوع ۲ با آسیب کلیوی به‌واسطه افزایش پروتئین‌های التهابی *NLRP3* و *IL-18* همراه بوده است و مداخله‌های تمرینی HIIT و فیستین هر یک به‌تنهایی می‌توانند منجر به تنظیم منفی بیان ژنی *NLRP3* و *IL-18* و در نتیجه بهبود عملکرد کلیه شوند. اما مداخله ترکیبی HIIT و فیستین ممکن است تاثیر بیشتری در کاهش التهاب بافت کلیه از طریق مهار بیان ژنی محور *NLRP3/IL-18*، در مقایسه با دو مداخله دیگر داشته باشد. با توجه به اثرات مثبت مکمل فیستین به‌نظر می‌رسد نیاز بیشتری به انجام تحقیقات در این زمینه وجود دارد تا مکانیسم‌های احتمالی مشخص گردد.

اینفلامازوم *NLRP3* و بلوغ بعدی اینترلوکین ۱بتا ( $IL-1\beta$ ) را کاهش می‌دهد و می‌تواند از تجمع میتوکندری‌های آسیب دیده و تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) میتوکندری جلوگیری نماید (۲۸). از جمله یافته‌های مهم دیگر در تحقیق حاضر، تاثیر HIIT در تنظیم منفی بیان ژنی *NLRP3* و *IL-18* بافت کلیه و کاهش سطوح سرمی گلوکز بوده است. اما مداخله ترکیبی HIIT و فیستین با کاهش بیشتر التهاب کلیه به‌واسطه کاستن قابل توجه بیان ژنی *NLRP3* و *IL-18* منجر شد که نشان دهنده اثرات سینرژی یا هم‌افزایی این دو مداخله در کاهش التهاب بافت کلیه در شرایط دیابت نوع ۲ است. با این وجود تاثیر مداخله تمرینی در تنظیم منفی *NLRP3* در مقایسه با فیستین به‌طور معناداری بالاتر بود. مشابه با یافته‌های تحقیق حاضر محققین نشان دادند که ۸ هفته تمرین هوازی (۵ روز در هفته و به مدت ۶۰ دقیقه دویدن در روز) منجر به کاهش سطوح *IL-18*، کاهش فسفوریلاسیون NF- $\kappa$ B p65 و هم‌چنین کاهش بیان *NLRP3* در بافت کلیه موش‌های db/db دیابتی شد (۲۹). هم‌چنین فاطمی و همکاران در سال ۲۰۲۲ در بررسی اثر شدت‌های مختلف تمرینی بر بیان ژن *NLRP3* بافت پانکراس موش‌های دیابتی نشان دادند که هر دو نوع تمرین تناوبی با شدت متوسط (شامل ۱۳ وهله ۴ دقیقه‌ای دویدن؛ با شدت ۷۰-۶۵٪ سرعت بیشینه) و HIIT (شامل ۱۰ وهله ۴ دقیقه‌ای دویدن؛ با شدت ۹۰-۸۵٪ سرعت بیشینه) منجر به کاهش معنادار بیان اینفلامازوم *NLRP3* بافت پانکراس و هم‌چنین کاهش گلوکز در مقایسه با گروه دیابتی شد به طوری که HIIT به کاهش بیشتر این ژن منتج شد (۳۰). هم‌چنین خدایی و همکاران در سال ۲۰۲۴ گزارش دادند که القا دیابت با افزایش سطوح *NLRP3* بافت قلبی موش‌های صحرائی مبتلا به دیابت نوع دوم همراه بود که به دنبال ۸ هفته HIIT (شامل ۶ تا ۱۲ تناوب دو دقیقه‌ای با شدت ۹۰ درصد سرعت بیشینه همراه با دوره یک دقیقه‌ای با شدت ۱۰ درصد سرعت بیشینه دویدن روی نوارگردان و ۵ بار در هفته) کاهش یافت (۱۶). به‌علاوه کاهش معنادار بیان ژنی پروتئین *NLRP3* بافت چربی احشایی، پس

## ملاحظات اخلاقی

این پژوهش توسط کمیته تخصصی اخلاق در پژوهش‌های زیستی دانشگاه آزاد واحد ساری تصویب شد (کد اخلاق: IR.IAU.SARI.REC.1403.329).

## مشارکت نویسندگان

معصومه حبیبیان در ارائه ایده، معصومه حبیبیان در طراحی مطالعه، شیما بنداد در جمع‌آوری داده‌ها، معصومه حبیبیان و شیما بنداد در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

## سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد گرایش فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر است. بدینوسیله از کلیه افرادی که در این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

## References:

- 1-Klein S, Gastaldelli A, Yki-Järvinen H, Scherer PE. *Why does Obesity Cause Diabetes?* Cell Metab 2022; 34(1): 11-20.
- 2-Martinez-Garcia C, Izquierdo-Lahuerta A, Vivas Y, Velasco I, Yeo TK, Chen S, et al. *Renal Lipotoxicity-Associated Inflammation and Insulin Resistance Affects Actin Cytoskeleton Organization in Podocytes.* PLoS One 2015; 10(11): e0142291.
- 3- Amaral LSB, Souza CS, Lima HN, Soares TJ. *Influence of Exercise Training on Diabetic Kidney Disease: A Brief Physiological Approach.* Exp Biol Med (Maywood) 2020; 245(13): 1142-54.
- 4- Iskender H, Dokumacioglu E, Hayirli A, Kapakin KAT, Bolat I, Kirman EM. *Effects of Oleanolic Acid Administration on Renal NF- $\kappa$ B, IL-18, IL-6, YKL-40, and KIM-1 in Experimental Diabetic Rats.* Iran J Basic Med Sci 2023; 26(10): 1188-93.
- 5- Kakuta Y, Satoh S, Watarai Y, Aikawa A, Tanabe K, Harada H, et al. *Successful Desensitization of T Cell Flow Cytometry Crossmatch Positive Renal Transplant Recipients Using Plasmapheresis and Super High-Dose Intravenous Immunoglobulin.* Transplant Direct 2017; 4(1): e336.
- 6- Araki S, Haneda M, Koya D, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, et al. *Predictive Impact of Elevated Serum Level of IL-18 for Early Renal Dysfunction in Type 2 Diabetes: An Observational Follow-up Study.* Diabetologia 2007; 50(4): 867-73.
- 7- Pchelin I, Shishkin A, Vasilkova V, Hudiakova N, Kulibaba T, Slepkykh L, et al. *FP522 Interleukin-18 and Renal Anemia in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Early Stages of Chronic Kidney Disease.* Nephrology Dialysis Transplantation 2019; 34(Supplement\_1): gfz106.FP522.
- 8- Zaharieva E, Kamenov Z, Velikova T, Tsakova A, El-Darawish Y, Okamura H. *Interleukin-18 Serum Level is Elevated in Type 2 Diabetes and Latent Autoimmune Diabetes.* Endocr Connect 2018; 7(1): 179-85.

- 9- Wang Y, Sui Z, Wang M, Liu P. *Natural Products in Attenuating Renal Inflammation via Inhibiting the NLRP3 Inflammasome in Diabetic Kidney Disease*. *Front Immunol* 2023; 14: 1196016.
- 10- Zhao W, Zhou L, Novák P, Shi X, Lin CB, Zhu X, et al. *Metabolic Dysfunction in the Regulation of the NLRP3 Inflammasome Activation: A Potential Target for Diabetic Nephropathy*. *J Diabetes Res* 2022; 2022: 2193768.
- 11- Islamuddin M, Qin X. *Renal Macrophages and NLRP3 Inflammasomes in Kidney Diseases and Therapeutics*. *Cell Death Discov* 2024; 10: 229.
- 12- Dong W, Jia C, Li J, Zhou Y, Luo Y, Liu J, et al. *Fisetin Attenuates Diabetic Nephropathy-Induced Podocyte Injury By Inhibiting NLRP3 Inflammasome*. *Front Pharmacol* 2022; 13: 783706.
- 13- Prasath GS, Pillai SI, Subramanian SP. *Fisetin Improves Glucose Homeostasis Through the Inhibition of Gluconeogenic Enzymes in Hepatic Tissues of Streptozotocin Induced Diabetic Rats*. *Eur J Pharmacol* 2014; 740: 248-54.
- 14- Ren Q, Guo F, Tao S, Huang R, Ma L, Fu P. *Flavonoid Fisetin Alleviates Kidney Inflammation and Apoptosis Via Inhibiting Src-Mediated NF-Kb P65 and MAPK Signaling Pathways in Septic AKI Mice*. *Biomed Pharmacother* 2020; 122: 109772.
- 15- Jabardo-Camprubí G, Donat-Roca R, Sitjà-Rabert M, Milà-Villaruel R, Bort-Roig J. *Drop-out Ratio between Moderate to High-Intensity Physical Exercise Treatment by Patients with, or at Risk of, Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Physiol Behav* 2020; 215: 112786.
- 16- Khodaei, O, Bolboli, L, Siakkohian, M, Bagaee, B. *The Effect of 8-Weeks of High Intensity Interval Training (HIIT) Along with L-Cysteine Consumption on the Level of NLRP3 in the Heart Tissue of Rats with Type 2 Diabetes*. *JAHSSP* 2024; 12(In Press):1-10. [Persian]
- 17- Wormgoor SG, Dalleck LC, Zinn C, Harris NK. *Effects of High-Intensity Interval Training on People Living with Type 2 Diabetes: A Narrative Review*. *Can J Diabetes* 2017; 41(5): 536-47.
- 18- Zheng L, Qin R, Rao Z, Xiao W. *High-Intensity Interval Training Induces Renal Injury and Fibrosis in Type 2 Diabetic Mice*. *Life Sci* 2023; 324: 121740.
- 19- Colberg SR. *Physical Activity, Insulin Action, And Diabetes Prevention and Control*. *Curr Diabetes Rev* 2007; 3(3): 176-84.
- 20- Rahimi G, Heydari S, Rahimi B, Abedpoor N, Niktab I, Safaeinejad Z, et al. *A Combination of Herbal Compound (SPTC) Along with Exercise or Metformin more Efficiently Alleviated Diabetic Complications through Down-regulation of Stress Oxidative Pathway upon Activating Nrf2-Keap1 Axis in AGE Rich Diet-Induced Type 2 Diabetic Mice*. *Nutr Metab* 2021; 18:1-14.
- 21- Haghparast Azad M, Niktab I, Dastjerdi S, Abedpoor N, Rahimi G, Safaeinejad Z, et al. *The Combination of Endurance Exercise and SGTC (Salvia-Ginseng-Trigonella-Cinnamon) Ameliorate Mitochondrial Markers' Overexpression With Sufficient ATP Production in the Skeletal Muscle of Mice Fed AGEs-Rich High-Fat Diet*. *Nutr Metab* 2022; 19(1): 17.

- 22- Qian X, Lin S, Li J, Jia C, Luo Y, Fan R, et al. *Fisetin Ameliorates Diabetic Nephropathy-Induced Podocyte Injury by Modulating Nrf2/HO-1/GPX4 Signaling Pathway*. Evid Based Complement Alternat Med 2023; 2023: 9331546.
- 23- Khoramipour K, Rajizadeh MA, Akbari Z, Arjmand M. *The Effect of High-Intensity Interval Training on Type 2 Diabetic Muscle: A Metabolomics-Based Study*. Heliyon 2024; 10(15): e34917.
- 24- Hou Y, Lin S, Qiu J, Sun W, Dong M, Xiang Y, et al. *NLRP3 Inflammasome Negatively Regulates Podocyte Autophagy in Diabetic Nephropathy*. Biochem Biophys Res Commun 2020; 521(3): 791-8.
- 25- Yang M, Wang X, Han Y, Li C, Wei L, Yang J, et al. *Targeting the NLRP3 Inflammasome in Diabetic Nephropathy*. Curr Med Chem 2021; 28(42): 8810-24.
- 26- Huang G, Zhang Y, Zhang Y, Ma Y. *Chronic Kidney Disease and NLRP3 Inflammasome: Pathogenesis, Development and Targeted Therapeutic Strategies*. Biochem Biophys Rep 2022; 33: 101417.
- 27- Ge C, Xu M, Qin, Y, Gu, T, Lou, D, Li Q, et al. *Fisetin Supplementation Prevents High Fat Diet-Induced Diabetic Nephropathy by Repressing Insulin Resistance and RIP3-Regulated Inflammation*. Food Funct 2019; 10(5): 2970-85.
- 28- Molagoda IMN, Athapaththu AMGK, Choi YH, Park C, Jin CY, Kang CH, et al. *Fisetin Inhibits NLRP3 Inflammasome by Suppressing TLR4/MD2-Mediated Mitochondrial ROS Production*. Antioxidants (Basel) 2021; 10(8): 1215.
- 29- Zhou Z, Ying C, Zhou X, Shi Y, Xu J, Zhu Y, Wang M, Li Y, Li X, Xiang J. *Aerobic Exercise Training Alleviates Renal Injury in Db/Db Mice through Inhibiting Nox4-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation*. Exp Gerontol 2022; 168: 111934.
- 30- Fatemi SA, FrzaneH Hesari A, Dadban shahamat M. *NLRP-3 Expression in Pancreatic Tissue Following Moderate and High Intensity Interval Training with Liposomal Alpha-Lipoic Acid Supplement in Diabetic Rats*. JSSU 2022; 30(2): 4593-606. [Persian]
- 31- Abbasi A, Faramarzi M, Ghatreh Samani M, Bbanitalebi E. *The Effect of Different Intensities of Endurance Training on NLRP-3 Inflammasome Protein Expression in Visceral Adipose Tissue, SerumG glucose Levels and Insulin in Streptozotocin-induced Diabetic Rats*. JME 2017; 7(1): 1-19. [Persian]

## Effect of High-Intensity Interval Training and Fisetin on the Gene Expression of *NLRP3* and *IL18* in Kidney Tissue of Mice with Type 2 Diabetes

Shima Bandad<sup>1</sup>, Masoumeh Habibian<sup>\*1</sup>

### Original Article

**Introduction:** Obesity is closely associated with type 2 diabetes, inflammation and kidney dysfunction. In this study, the effect of high-intensity interval training (HIIT) and Fisetin on *NLRP3* and *IL18* gene expression in kidney tissue of mice with type 2 diabetes was investigated.

**Methods:** In this experimental study, 30 male C57bl/6 mice were randomly divided into 2 main control groups (6 mice) and a high-fat diet (24 mice). T2D was induced by a high-fat diet over 16-week period. Upon confirming T2D, diabetic mice were randomly allocated into diabetes, diabetes-exercise, diabetes-Fisetin, and diabetes-exercise-Fisetin groups. The Fisetin supplement was injected via intraperitoneal injection at a dosage of 20 mg/kg/day. The HIIT protocol consisted of 2-minute intervals at an intensity of 80-110% of maximal aerobic power (VO<sub>2</sub>max) followed by 2-minute rest periods at an intensity of 50% of VO<sub>2</sub>max, with 2-8 repetitions over 8 weeks. *NLRP3* and *IL-18* gene expression in kidney tissue was determined. Data analysis utilized one-way analysis of variance along with SPSS Software version 16 (p<0.05).

**Results:** Following 8 weeks, *NLRP3* (p<0.001) and *IL-18* (p<0.001) gene expression increased in the diabetic group compared to the control group (p<0.001). Additionally, gene expression of *NLRP3* and *IL-18* was significantly lower in the HIIT, fisetin, and combined intervention groups when compared to the diabetes group (p<0.001). The effect of the combined intervention in reducing gene expression of these variables was significantly higher compared to the other two interventions (p<0.0001).

**Conclusion:** HIIT, Fisetin and their combined intervention can protect diabetic kidney tissue by decreasing inflammation via inhibition of the *NLRP3/IL-18* axis gene expression pathway.

**Keywords:** High-intensity interval training, Type 2 diabetes, Interleukin-18, *NLRP3*, Fisetin.

**Citation:** Bandad SH, Habibian M. Effect of High-Intensity Interval Training and Fisetin on the Gene Expression of *NLRP3* and *IL18* in Kidney Tissue of Mice with Type 2 Diabetes. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2025; 33(7): 9205-15.

<sup>1</sup>Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Qaemshahr Branch., Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

\*Corresponding author: Tel: 011-42241041, email: habibian\_m@yahoo.com