اثر هشت هفته تمرین ترکیبی هوازی و قدرتی به همراه مصرف مکمل تورین بر شاخص‌های آتروفی عضله قلب در موش‌های صحرایی دیابتی

سیروس چوبینه[1]، سیده الهام حسینی[2*]، رحمان سوری[3]، آمنه‌پور رحیم قورقچی[4]

۱-دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲-دانشجوی دکتری فیزیولوژی قلب و عروق تنفس، دانشکده پردیس البرز، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳-دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ تربیت بدنی و علوم وررزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴-دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

یافته / دوره ۲۴ / شماره ۴ / زمستان ۱۴۰۱ / مسلسل ۹۴

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱۸ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۹

مقدمه: کمبود انرژی و انسولین بدن را به سمت کاتابولیسم سوق می‌دهد. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین ترکیبی همراه مصرف مکمل تورین بر برخی شاخص‌های آتروفی قلب در رت‌های دیابتی شده بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۱۰ هفته‌ای در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم تهیه شد. حیوانات به‌طور تصادفی به پنج گروه ۸ تایی شامل گروه‌های تمرین (T)، تمرین و مکمل(T+S)، مکمل (S)، کنترل دیابت (C) و کنترل سالم (CH) تقسیم شدند و رت‌های گروه‌های دیابتی قبل از شروع تمرین با تزریق تک دوز استرپتوزتوسین (۳۵میلی‌گرم/وزن) و قند بالای (۲۵۰میلی‌گرم/دسی‌لیتر) دیابتی در نظر گرفته شد. رت‌ها ۲۴ ساعت پس از آخرین روز پروتکل(هشت هفته تمرین ترکیبی: قدرتی و استقامتی) تمرینی با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند. روش آزمایشگاهی وسترن بلات جهت بررسی تغییرات ایجاد شده و تحلیل واریانس یکطرفه در سطح معناداری ۰/۰۵ مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد پروتئین FOXO3a در گروه تمرین + مکمل، در مقایسه با گروه‌های کنترل دیابتی و گروه تمرین ترکیبی کاهش یافته است (P<۰/۰۰۱)؛ همچنین مکمل تورین، تمرین ترکیبی و تمرین ترکیبی + مکمل تورین تغییر معنی‌داری در میزان بیان پروتئین MURF-1 ایجاد می‌کند (P<۰/۰۰۱) .

بحث و نتیجه‌گیری: چنین به نظر می‌رسد که ترکیب مکمل تورین و تمرین ترکیبی می‌تواند به واسطه کاهش FOXO3a بر شاخص‌های مربوط به آتروفی قلبی ناشی از دیابت موثر باشد و مصرف مکمل تورین همراه تمرین برای افراد دیابتی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آتروفی، مکمل تورین، دیابت، تمرین ترکیبی، FOXO-α3.

*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تهران، دانشکده پردیس البرز، گروه فیزیولوژی قلب و عروق تنفس.

پست الکترونیک: Ehosseini128@gmail.com

مقدمه

دیابت نوع۲ بیماری شایع متابولیکی است که به دلیل کم تحرکی و تغذیه نامناسب سبب مقاومت انسولینی می‌شود. شایعترین دیابت، دیابت بزرگسالان یا دیابت نوع۲ است که ۹۰ ٪ بیماران را شامل می‌شود (۱). دیابت از سومین عامل مرگ و میر می‌باشد، پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ تعداد مبتلایان به دیابت نوع ۲ به ۳۶۶ میلیون نفر در جهان افزایش یابد. ابتلا به دیابت به علت ایجاد و افزایش خطر ابتلا به عوارضی چون بیماری-های قلبی- عروقی، کلیوی، بیماری‌های مرتبط با بینایی باعث تحمیل رنج و هزینه‌های زیادی به خانواده‌ها و سیستم بهداشتی و درمانی جوامع می‌شود (۲). دیابت مرتبط با بیماری‌های قلبی و عروقی چون فشار خون، افزایش سایتوکین‌های التهابی و پروتئین واکنشی C همچنین کاهش وضعیت آنتی‌اکسیدانی در بیماران دیابتی می‌باشد و منجربه کاردیومیوپاتی دیابتی می‌شود (۳). امّا امروزه بر اساس نتایج تحقیقات مختلف، کاردیومیوپاتی دیابتی (DCM) با شیوع ۱۲٪ در بیماران مبتلا به دیابت اتفاق می‌افتد (۴)، که به عنوان عارضه جدی بیماری دیابت نوع ۲ شناخته می‌شود، و ناشی از هایپرگلیسمی پایدار و هایپرلیپیدمی است. این شرایط منجربه افزایش استرس اکسیداتیو قلبی، التهاب و فیبروز میوکارد شده و همچنین تغییرات زیانباری در تنظیم $Ca2^{+}$ و عملکرد میتوکندری ایجاد می‌کند (۲،۵). کاردیومیوپاتی دیابتی گروه متفاوتی از بیماری-های عضله قلب هستند که در اثر آن قلب نمی‌تواند جریان خون کافی را به اندام‌ها پمپ کند و فرد دچار نارسایی قلبی و اغلب آریتمی می‌شود، ازطرفی مکمل تورین بدلیل نقش اسمزی و تمرین قدرتی بخاطر تاثیرات کانسنتریک هیپرتروفی می‌تواند جهت جلوگیری از کاردیومیوپاتی دیابتی موثر باشد (۶). تمرین ترکیبی متشکل از تمرین استقامتی و مقاومتی است که سبب افزایش تارهای عضلانی و آنزیم‌های سوخت و ساز اکسایشی می‌شود (۲،۱۳). سه شکل کاردیومیوپاتی قلبی عبارتنداز: کاردیومیوپاتی اتساعی (گشادی قلب که شایع-ترین نوع کاردیومیوپاتی است)، کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک (رشد دیواره و ضخیم شدن قلب) و کاردیومیوپاتی محدود کننده (کاهش انعطاف‌پذیری قلب) چندین مسیر متفاوت سیگنالینگ اختلال در عملکرد قلب دیابتی وجود دارد که یافتن راه درمانی مناسب همچنان یک چالش بزرگی است. از نقطه نظر بالینی، کاردیومیوپاتی دیابتی به عنوان وجود اختلال عملکرد بطن چپ (LV) در بیماران مبتلا به دیابت نوع۲ در غیاب فشار خون شریانی، بیماری عروق کرونر (CAD) یا شواهدی از هرگونه بیماری ساختاری قلب تعریف شده است (۳،۶). فشارهایی مثل کمبود مواد مغذی، التهاب سیستمیک، سرطان و عفونت‌های وضعیت کاتابولیکی سبب افزایش پروتئولیز عضله می‌شوند که با انتشار اسید آمینه جهت حفظ گلوکونئوژنز کبد و سنتز پروتئین بافتی مشخص می‌شوند. این شرایط خانواده عوامل رونویسی FOX O را فعال می‌کند (۶) که در طیف وسیعی از فرآیندهای سلولی چون تنظیم کننده مقاومت به فشار، متابولیسم، آپوپتوز نقش دارند و یکی از تنظیم کننده‌های اصلی طول عمر و پیری می‌باشد (۷). عامل رونویسی FOXO3a یکی از اهداف پایین دستی مسیر Akt می‌باشد، واسطه‌گر مهمی در تجزیه پروتئین و آتروفی و از تنظیم کننده‌های مهم اتوفاژی و اندازه سلول‌های قلبی است، که توسط سلول‌های اندوتلیال ورید ناف در انسان تنظیم می‌گردد. با تحریک فاکتور رشد، Akt فعال شده و منجر به فسفریلاسیون و غیر فعال شدن FOXO3a می‌گردد (۸،۹). از دست دادن حجم عضلات با نقش FoxOs در القای سیستم-های اتوفاژی-لیزوزوم و یوبی کویتین-پروتئازوم مشخص می‌شود (۶). مطالعات گوناگون نشان داده‌اند که در

دیابت نوع۲، محرک‌های مختلفی مانند گلوکز اضافی، چربی‌های اضافی، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، سایتوکین‌ها و سایر عامل‌های رشد باعث تنظیم فعالیت و عملکرد FOXO-1 می‌شود. پروتئین AKt فسفوریلاسیون و انتقال FOXO1 به سیتوزول را از طریق مسیرهای پروتئینی تقویت می‌کند، در حالی که پروتئین فسفاتاز ۲(PP2A) A باعث دفسفوریلاسیون می‌شود و FOXO1 را از سیتوزول به هسته منتقل می‌کند. عامل FOXO-1 فعال شده در هسته به محل اتصال FOXO متصل می‌شود و چندین ژن دخیل در التهاب، استرس اکسیداتیو، استرس نیتروزاسیون، متابولیسم گلوکز و لیپید، هیپرتروفی، اتوفاژی و آپوپتوز را فعال کرده و در نهایت منجر به تغییر ساختار قلب، متابولیسم، عملکرد و مرگ سلول‌های قلبی می‌شود (۱۰). نتایج برخی از مطالعات حاکی از آن است که کاهش انرژی سلولی در تمرینات ترکیبی باعث فعال شدن مسیر سگنالینگ FOXO و فعال شدن MAFbx و MURF-1 شده که منجر به تخریب پروتئین ها می-گردد (۹) و از طرفی در تمرینات ترکیبی با تحریک عامل رشد IGF-1 پروتئین AKT فعال شده و به دنبال آن در طی مسیر سگنالینگ باعث مهار mTOR و فعال شدن پروتئین p70s6K و در نهایت افزایش سنتز پروتئین می‌گردد. همچنین افزایش سطح مزمن سیتوکین های التهابی مانند TNF-α و IL-6 (اینترلوکین -۶) با سرکوب آبشار سیگنالینگ Akt-mTOR و همچنین عوامل تنظیم کننده میوژن، از عاملان مهم در آتروفی عضله هستند (۱۱). کوهن و همکاران گزارش کردند که MAFbx و MURF-1 عامل‌های اصلی در جریان آتروفی عضله می‌باشند که سبب آتروفی سریع اما برای رشد طبیعی عضله لازم نیستند. تمرین ترکیبی با مهار روند کاهش حجم عضله و آتروفی ناشی از توقف سوخت و ساز، سبب نگهداری عضله در حالت طبیعی می شود (۱۲). از طرفی تورین یک اسید آمینه گوگردی نیمه ضروری است که از متابولیسم متیونین و سیستئین حاصل می شود که در قلب و عضله با غلظت بسیار بالایی یافت می شود (۱۳، ۱۴). نقش تورین در تنظیم اسمزی، اقدامات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی و برای کنترل عملکرد کانال‌های یونی و در نتیجه تحریک‌پذیری غشا و همچنین هموستاز کلسیم در مطالعات روشن شده است (۱۵). تورین ممکن است با تنظیم مسیرهای کاتابولیکی، بر کاتابولیسم پروتئین تأثیر بگذارد. در واقع تورین از طریق مسیر AKT، PI3K باعث سرکوب فعالسازی NFkB و در نهایت سرکوب مسیر FOXO می‌گردد و در مسیر دیگر از طریق mTOR باعث سرکوب FOXO شده که به نظر می رسد تجویز تورین در این مسیر باعث تنظیم بیان آتروژن و افزایش سنتز پروتئین می‌گردد (۱۶). نشان داده شده است که کمبود تورین می تواند منجر به کاردیومیوپاتی در گربه و روباه شود (۱۷) و تغییرات سطح تورین ممکن است با پیشرفت دیابت ارتباط مستقیم داشته باشد (۱۸). تجویز تورین می‌تواند سطح بیان ژن‌های MAFbx و MURF-1 را در خوکچه‌های که در مجاورت یک نوع آفت کش(Diquat) قرار گرفته بودند باعث کاهش پروتئین در عضله بازکننده ستون فقرات و نعلی نشد (۱۹). اگرچه مکانیزم زمینه ساز کاردیومیوپاتی با کمبود تورین مرتبط نیست ، اما به طور کلی در مطالعاتی مشاهده گردید که نارسایی قلبی با اختلال انقباض ناشی از کاهش کار با کلسیم توسط قلب، اختلال در حساسیت کلسیم پروتئین‌های انقباضی، از دست دادن کاردیومیوسیت‌ها و ATP کافی برای تحریک انقباض مشخص می‌شود که می تواند وابسته به تورین باشد. ضرورت پژوهش حاضر نبود سنجش همزمان تمرین ترکیبی و مکمل درمانی تورین است. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین ترکیبی همراه

مصرف مکمل تورین بر برخی شاخص‌های آتروفی در قلب رت‌های دیابتی شده بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نظر هدف بنیادی و به لحاظ روش در دسته مطالعات تجربی طبقه‌بندی می‌شود. در این پژوهش تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۱۰ هفته‌ای در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد (مرکز مطالعات تجربی و تحقیقات دانشگاه محقق اردبیلی). این حیوانات در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی) با دسترسی آزاد به آب و غذا با تعداد چهار سر موش صحرایی در هر قفس پلی‌کربنات با قابلیت اتوکلاو به اندازه (۲۵×۴۵×۱۵) در مرکز تحقیقات دانشگاه محقق اردبیلی نگه‌داری شدند. درجه حرارت برای آن‌ها در محدوده ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. در تمام موارد مسائل اخلاقی بر اساس استانداردهای کمیته اخلاق دانشگاه تهران رعایت گردید (IR.UT.SPORT.REC.1400.010). شرایط و کار با حیوانات طبق مقررات و بر اساس توصیه‌های قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی (NIH) انجام شد (۲۰). رت‌های گروه‌های دیابتی با تزریق تک‌دوز استرپتوزتوسین (۳۵میلی‌گرم/وزن) و قند بالای (۲۵۰میلی‌گرم/دسی‌لیتر) دیابتی شدند. حیوانات پس از سازگاری با محیط آزمایشگاه به طور تصادفی به پنج گروه ۸ تایی شامل گروه تمرین دیابتی(T)، تمرین و مکمل(T+S)، مکمل (S)، کنترل دیابتی(C) و کنترل سالم (CH) تقسیم شدند. بخاطر کنترل متغیرهای مداخله‌گر از گروه کنترل دیابتی و سالم استفاده شد. مکمل به صورت ترکیب با آب آشامیدنی به حیوانات داده شد و حیوانات در انتهای مطالعه پس از بیهوشی عمیق تشریح شدند. رت‌ها ۲۴ ساعت پس از آخرین روز پروتکل تمرینی با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و زایلازین) بی هوش و کشته شدند و با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن بلات متغیرهای پژوهش اندازه‌گیری شدند (۲۱).

آشناسازی و پروتکل تمرینی

جهت تعیین سرعت بیشینه حداکثراکسیژن مصرفی از آزمون فزآینده استاندارد بیدفورد و همکاران (۱۹) که به وسیله کارول گویز ریندلو و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد (۲۲). از هر موش صحرایی به صورت جداگانه آزمون گرفته شد. آزمون فزآینده موش های صحرایی بر روی تردمیل با سرعت m/min ۵ شروع شد و هر سه دقیقه سرعت تردمیل m/min ۰/۵ افزایش یافت آزمون تا لحظه رسیدن موش صحرایی به واماندگی ادامه می‌یافت .سرعت نهایی موش صحرایی به عنوان سرعت بیشینه در زمان رسیدن به حداکثر اکسیژن مصرفی جهت محاسبه شدت‌های تمرینی موش‌های صحرایی استفاده گردید. از حیوانات هر دو هفته یک بار آزمون وامانده ساز گرفته و شدت تمرین با توجه به مقادیر جدید آزمون تعیین شد.

آزمون ۱ تکرار بیشینه: تعیین حداکثر بارتمرین: وزنه‌ای معادل ۷۵ ٪ وزن حیوانات در اولین مجموعه به دم موش ها متصل می شود و سپس در مجموعه های دیگر، در هر تکرار ۱۵ ٪ از وزن موش ها برای رسیدن به آستانه لاکتات اضافه می‌شد. پس از مرحله آشناسازی رت‌ها، به مرحله پروتکل اصلی وارد شدند. تمرینات ورزشی ترکیبی بر روی تردمیل (تمرین هوازی) و بالا رفتن از نردبان (تمرین مقاومتی)، به صورت تناوبی ۵ روز در هفته و به مدت ۸ هفته انجام شدیعنی اول تمرین مقاومتی سپس تمرین استقامتی اجرا شد. مرحله: الف) مرحله تمرین مقاومتی: پروتکل تمرینی مقاومتی در طی ۸ هفته، به مدت ۵ روز در هفته و با آزمون ۱تکرار بیشینه ۶۰-۴۰ ٪ حاصل از آزمون با ۱۵ بار صعود در هر جلسه و یک فاصله زمانی ۱ دقیقه ای بین صعودها انجام گرفت. و ب) مرحله تمرین استقامتی: شامل دویدن بر

روی تردمیل بود. گروه تمرین، تمرینات هوازی را روی تردمیل با شدت کم تا متوسط (حداکثر سرعت دویدن ۴۰-۶۰ ٪) به مدت ۱ ساعت در روز و ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته با رعایت اصل اضافه بار انجام دادند. در ضمن رت‌ها در ابتدای هر جلسه تمرین ترکیبی ۵ دقیقه تمرین برای گرم کردن (با شدت ۱۰ متر در دقیقه) و در انتها ۵ دقیقه برای سرد کردن (شدت ۱۰ متر در دقیقه و با کاهش تدریجی شدت به کمترین مقدار) فعالیت کردند (۲۱). در مورد گروه های تحت درمان با مکمل نیز، مکمل تورین از شرکت سیگما (St.Louis) تهیه شد و به صورت محلول ۱٪ در آب آشامیدنی روزانه (۱۹) در دسترس رت‌ها قرار گرفت و جهت اطمینان از میزان مصرف مکمل، آب مصرفی رت های گروه مکمل یک روز درمیان یا روزانه ثبت می‌گردید (۹).

مطالعه میزان بیان پروتئین

به منظور مطالعه بیان پروتئین‌های FOXO3a، MURF-1، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی حیوان بیهوش شد. پس از باز کردن قفسه سینه قلب به ظرف حاوی بافر سالین فسفات ۰/۱ مولار منتقل شد. سپس بافت قلب در فویل آلومینیومی قرار گرفته شد و به جهت فریز شدن داخل نیتروژن مایع انداخته شد و تا زمان آزمایش‌های وسترن بلاتینگ در فریز ۸۰- نگهداری شد (۱۵).

وسترن بلات

در ابتدای روش اجرا نمونه‌ها از فریز خارج و بر روی قطعات یخ به محل اجرای پروتکل منتقل شدند. ۲۰۰ میکرولیتر lysis buffer به هر نمونه اضافه شد و سه مرتبه در طول یک ساعت انکوبه شدند. بلافاصله، نمونه به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۳۰۰ دور (rpm) و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. Supernatant، به یک میکروتیوپ cc ۱ منتقل شد و µl ۰/۵ آن برای تعیین غلظت پروتئین در یک میکروتیوپ دیگر ریخته شد. مقدار cc ۵۰ بافر RIPA با protein inhibitor cocktail 5µl حل شد. برای تعیین غلظت پروتئین، از ۳ استاندارد، یک blank و نهایتا نمونه‌های اصلی استفاده شد. هر یک از نمونه‌های به صورت جداگانه تهیه و چند دقیقه در محیط آزمایشگاه انکوبه شدند و سپس به داخل کووت‌های مربوطه ریخته شدند و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان غلظت پروتئین ثبت شد. قبل از الکتروفروز، نمونه‌ها برای load شدن بهتر با Loading buffer: 2X Laemmli buffer به نسبت یک به یک حل شدند. پس از آماده کردن Stacking gel solution ۱۰ درصد، مطابق با دستور داده شده، آماده و با استفاده از سمپلر به داخل فضای مربوطه ریخته شد. قبل از بستن ژل، شانه، داخل ژل قرار گرفت تا چاهک‌ها جهت ریختن نمونه ایجاد شوند. سپس به آرامی شانه‌ها خارج شدند. با استفاده از سر سمپلر نمونه‌های آماده شده، با دقت کامل در چاهک‌ها ریخته شد. بافر الکتروفورز ۵X به نسبت ۱ به ۴ با آب مقطر حل شد.

در مرحله اول وسترن بلات پس از آن‌که بافر مورد نظر آماده شد، نمونه پروتئینی با بافر مخلوط می‌شود و به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه جوشانده می‌شود. سپس روی ژل پلی آکریل آمید به مدت ۲ تا ۳ ساعت در ولتاژ ۱۰۰ run می‌شود. بافر بلاکینگ را به آنتی بادی اولیه FOXO3a، MURF-1، جهت رقیق کردن آنتی بادی اضافه شد (با رقت ۱ در ۱۰۰۰) و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از آن کاغذ نیتروسلولز در بافر TBST چندین بار شستشو داده شد. بعد از آن، بافر بلاکینگ را با آنتی بادی ثانویه ضد آنتی بادی اولیه اضافه شد و کاغذ نیتروسلوز به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق داخل آن قرار داده شد. کاغذ نیتروسلولز با بافر TBST چندین بار شستشو داده شد. در این مرحله کاغذ نیترو سلولز یا

DAB به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد تا باند مورد نظر نمایان شد. در مرحله آخر با آب مقطر کاغذ شستشو داده شد. بعد از مشخص شدن باند، اسکن شد و با استفاده از نرم افزار Lab work آنالیز شد (۲۲).

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تعیین نرمال بودن توزیع داده‌های کمی از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد و از شاخص های میانگین و انحراف معیار برای توصیف داده‌ها و از آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه تحت α=۰/۰۵ جهت مقایسه کلی گروه ها استفاده شد و همچنین از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسات دو به دو استفاده شد. داده‌های جمع‌آوری شده به کمک نرم‌افزار آماری SPSS 21 تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک در تمامی گروه‌ها بطور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد توزیع داده‌ها در همه گروه‌ها نرمال بود (P>۰/۱). همچنین از آزمون لون برای بررسی همگنی واریانس‌ها استفاده شد که نتایج نشان داد فرض همگنی واریانس‌ها رعایت شده است (P>۰/۱).

جدول ۱. تغییرات سنتز پروتئین MURF-1 موش‌های صحرایی در گروه‌های تحقیق (M±SD) بعد از هشت هفته هر گروه (n=8)

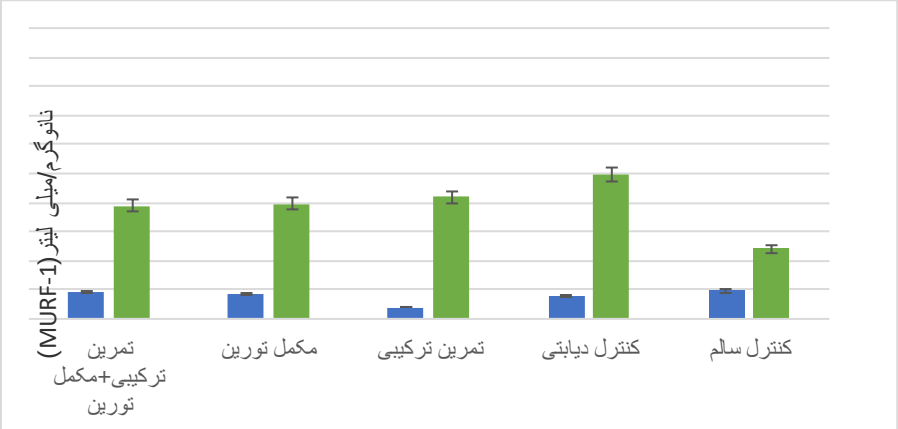
گروه	MURF-1	P- مقدار
کنترل سالم بدون تمرین	۶/۴۱±۰/۲۹	۰/۱۹۲
کنترل دیابتی بدون تمرین	۵/۲۱±۰/۱۱#	۰/۰۰۳
تمرین ترکیبی دیابتی بدون مکمل	۵/۶۳±۰/۶۷†*	<۰/۰۰۱
تمرین ترکیبی دیابتی با مکمل	۵/۸۱±۰/۱۲†*	<۰/۰۰۱
تمرین ترکیبی سالم مکمل	۵/۷۷±۰/۳۲†*	۰/۰۰۱

نتایج به صورت انحراف معیار± میانگین بیان شده‌اند.

† نشان دهنده اختلاف معنادار گروه ها در سطح معناداری ۰/۰۵ در مقایسه با گروه دیابتی

* نشان دهنده اختلاف معنادار گروه ها در سطح معناداری ۰/۰۵ در مقایسه با سالم

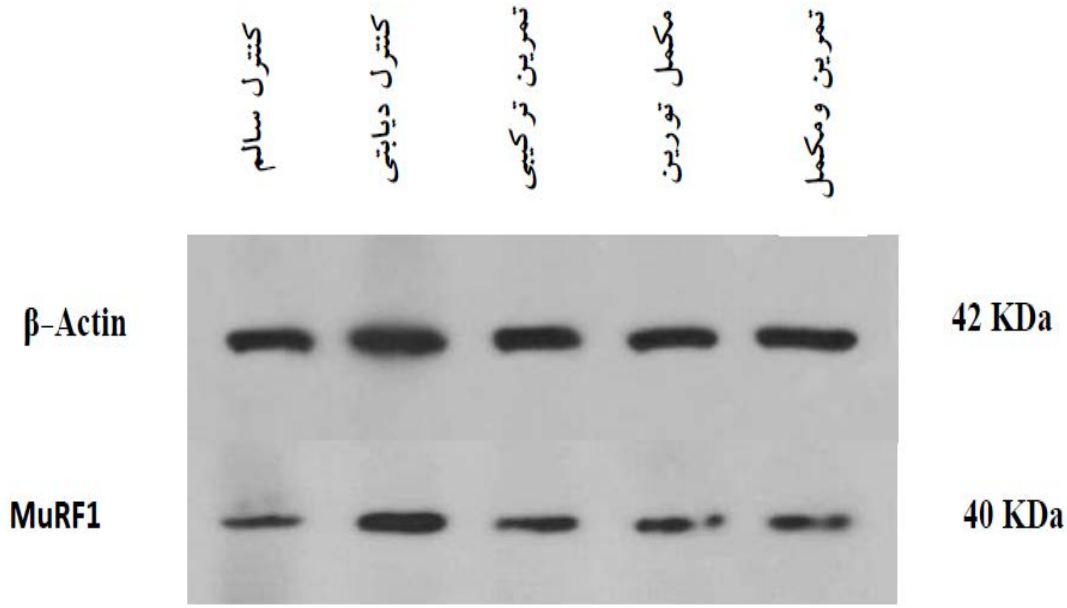
نشان دهنده اختلاف معنادار در گروه ها در سطح معناداری ۰/۰۵ در مقایسه با گروه تمرین ترکیبی



نمودار ۱. مقایسه بین‌گروهی و درون‌گروهی میزان پروتئین MURF-1 در گروه‌های مختلف بعد از هشت هفته

جدول ۱ و نمودار ۱ کـه میـزان تغییـرات پـروتئین MURF-1 را نشان می دهـد حـاکی از نتـایج تحلیـل واریانس یک طرفه در مقایسه گروه‌هـای مطالعـه بعـد از هشت هفتـه تمـرین ترکیبـی مـی باشـد. نتـایج آزمـون واریانس یک طرفه نشـان دهنـده تفـاوت معنـی‌دار بـین گروه‌ها در بیان پـروتئین MURF-1 بـود (P=۰/۰۱۷).

با بررسی آزمون توکی، تفاوت معنـی‌دار بـین گـروه‌هـای کنترل سالم و کنترل دیابتی (P=۰/۰۰۹) وجود داشـت؛ اما بین دیگر گروه‌هـا تفـاوت معنـی‌داری مشـاهده نشـد. همچنین با تجزیه و تحلیـل بـافتی روش وسـترن بـلات تغییرات پروتئین MURF-1 در مقایسه با بتا اکتین در شکل (۱) نشان داده شده است.



شکل ۱. تصاویر وسترن بلات پروتئین MURF-1 و بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی در بافت عضله ی قلب

جدول۲. تغییرات سنتز پروتئین FOXO3α موش‌های صحرایی در گروه‌های تحقیق (M±SD)بعد از هشت هفته هر گروه (n=8)

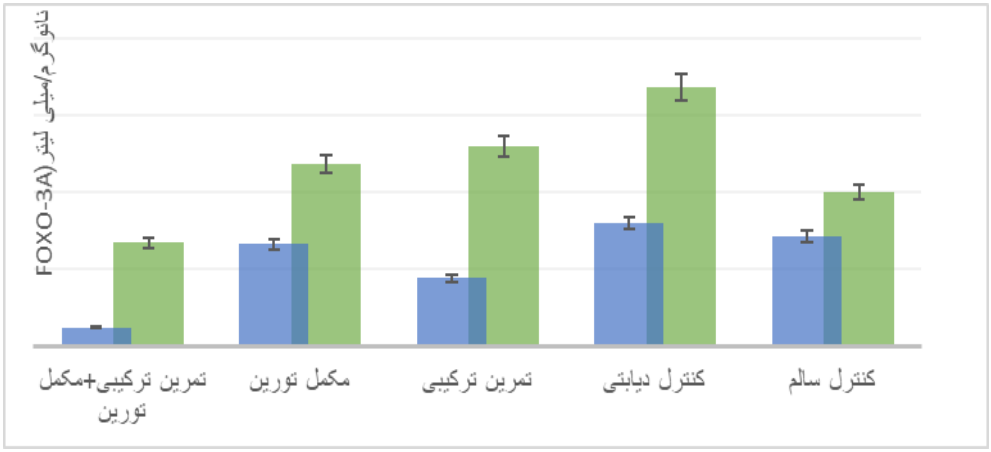
گروه	MURF-1	P- مقدار
کنترل سالم بدون تمرین	۴/۲۹±۰/۳۳	۰/۰۷۵
کنترل دیابتی بدون تمرین	۳/۶۵±۰/۱۸#	۰/۰۰۲
تمرین ترکیبی دیابتی بدون مکمل	۴/۸۲±۰/۳۳†*	<۰/۰۰۱
تمرین ترکیبی دیابتی با مکمل	۵/۱۱±۰/۷۲†*	۰/ ۰۰۲
تمرین ترکیبی سالم مکمل	۴/۹۲±۰/۱۶†*	۰/۰۰۱

نتایج به صورت انحراف معیار± میانگین بیان شده‌اند.

† نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح معناداری ۰/۰۵ در مقایسه با گروه دیابتی

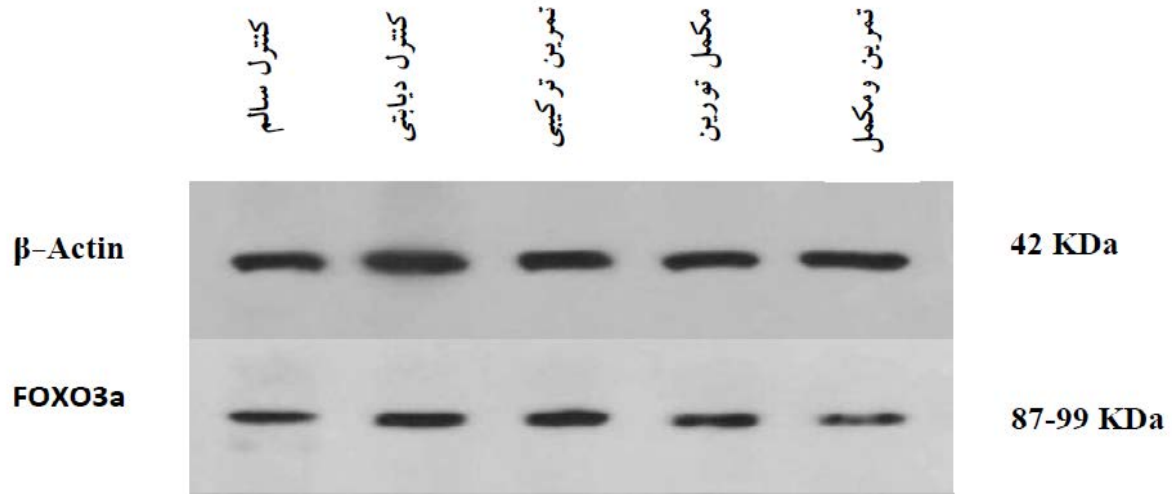
* نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح معناداری ۰/۰۵ در مقایسه با سالم

نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح معناداری ۰/۰۵ در مقایسه با گروه تمرین ترکیبی



نمودار ۲. مقایسه بین‌گروهی و درون‌گروهی میزان پروتئین *FOXO-3α* در گروه‌های مختلف بعد از هشت هفته

جدول ۲ و نمودار ۲ نتایج تحلیل واریانس یکطرفه در گروه‌های مطالعه تغییرات میزان بیان FOXO-3α را بعد از هشت هفته تمرین ترکیبی نشان می‌دهد. نتایج آزمون واریانس یک طرفه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها در بیان پروتئین FOXO-3α بود (P=۰/۰۰۱). با بررسی آزمون توکی، تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کنترل و کنترل دیابتی (P=۰/۰۱۸)، کنترل دیابتی و تمرین + مکمل (P=۰/۰۰۱)، تمرین + مکمل و تمرین (P=۰/۰۳۵) وجود داشت؛ اما بین دیگر گروه ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. با توجه به شکل (۲) که تغییرات بافتی پروتئین FOXO-3α در روش وسترن بلات را نشان می‌دهد تغییرات ایجاد شده حاکی از تغییرات معنی‌دار در گروه‌ها بعد از هشت هفته تمرین ترکیبی است.



شکل۲ . تصاویر وسترن بلات پروتئین *FOXO-3α* و بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی در بافت عضله ی قلب

بحث و نتیجه‌گیری

هدف پژوهش حاضر بررسی اثر تمرینات ترکیبی و مصرف مکمل تورین بر شاخص های آتروفی قلب در رت های دیابتی شده بود. نتایج نشان داد که بیان پروتئین FOXO3a تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های کنترل دیابتی و گروه‌های تمرین + مکمل و تمرین بدون مکمل، وجود

داشت؛ نتایج پژوهش حاضر با مطالعه اسماعیلی و همکاران (۲۳) همسو بود؛ اما تمرین و مکمل هر کدام به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر روی این متغیر نداشت؛ که این نتایج با مطالعه شیبانی و همکاران غیر همسو بود. یکی از دلایل اختلاف نتایج مطالعه حاضر با مطالعه شیبانی و همکاران می‌تواند ماهیت تمرینی متفاوت دو مطالعه باشد. در مطالعه مذکور از تمرینات HIIT استفاده شده اما در مطالعه حاضر از تمرینات ترکیبی با شدت متوسط استفاده شده است (۳۱،۲۳). به نظر می‌رسد که ترکیب تمرین و مکمل دهی تورین باعث ایجاد اثر مضاعف بر روی FOXO3a شده است. تورین ممکن است با تنظیم مسیرهای کاتابولیکی، بر کاتابولیسم پروتئین تاثیر بگذارد. در واقع تورین از طریق مسیر PI3K، AKT باعث سرکوب فعالسازی NFkB و در نهایت سرکوب مسیر FOXO می‌گردد و در مسیر دیگر از طریق mTOR باعث سرکوب FOXO شده که به نظر می‌رسد تجویز تورین در این مسیر باعث تنظیم بیان آتروژن و افزایش تجمع پروتئین، سنتز می گردد (۱۹). همچنین نتایج نشان داد که مکمل تورین، تمرین ترکیبی، و تمرین ترکیبی + مکمل تورین تغییرات معنی‌داری در میزان بیان پروتئین MURF-1 ایجاد نکرد. نتایج مطالعه حاضر با مطالعه ماسچر و همکاران (۲۴) همسو و با نتایج مطالعات هالووی و همکاران (۲۵)، اسماعیلی و همکاران (۲۳) غیر همسو بود. یکی از دلایل تفاوت مطالعه حاضر با این مطالعات می تواند ماهیت متفاوت تمرینی باشد. در مطالعات مذکور از تمرینات هوازی استفاده شده است حال آنکه در مطالعه حاضر از تمرینات ترکیبی استفاده شده است. در مطالعه ماسچر و همکاران که اثر تمرینات مقاومتی بر بیان ژن‌های MURF-1 و MAfbx ۸ مرد سالم مورد بررسی قرار گرفت منجر به افزایش سطوح پروتئینی MURF-1 شد با اینکه تمرین ماسچر و همکاران مرحله حاد ارزیابی شده بود. بنابراین تمرین مقاومتی استفاده شده در تحقیق حاضر می‌تواند منجر به جلوگیری از کاهش بیان پروتئین MURF-1 شود ولی در تحقیق حاضر معنادار نبود. از طرفی آزمودنی های متفاوت در مطالعه حاضر با مطالعات مذکور می‌تواند دلیل دیگری برای غیر همخوانی نتایج باشد. در مطالعه‌ی هالووی و همکاران (۱۸،۲۵) از رت‌های دچار فشار خون استفاده شد اما در مطالعه حاضر از رت‌های دیابتی شده استفاده شد. یافته‌ها نشان می‌دهند که افزایش در فعالیت Nf- κB برای افزایش ناشی از IKKß در رونویسی MURF-1 ضروری است (۲۶) و حداقل ۵۰ درصد از تغییرات توده عضلانی ناشی از فعال شدن MURF-1، به فعال شدنNf- κB نسبت داده شده است. و احتمالاً مسیر Nf- κB یکی از مسیرهای اصلی کنترل MURF-1 باشد (۲۷). تحقیقات نشان داده است که تمرینات مقاومتی اثر کمتری بر روی میزان بیان پروتئین MURF-1 دارد (۲۵). با وجود تغییرات معنی‌دار FOXO3a در گروه ترکیبی؛ این تغییرات اثر معنی داری بر روی MURF-1 نشان نداد. شیبانی و همکاران (۲۹،۲۸) در بررسی خود بیان کردند که تمرین با شدت بالا قادر به کنترل آتروفی عضلانی در دوره بی‌تمرینی نیست و این آتروفی در مسیر FOXO3a/ MAfbx و نه مسیر FOXO3a/ MURF-1 ایجاد می‌گردد؛ که این امر نشان می‌دهد MURF-1 همیشه نمی‌تواند به عنوان نشانگر آتروفی شناخته شود بلکه در موقعیت‌های آتروفی پاتوفیزیولوژیک نقش‌های مهم‌تری بر عهده دارد (۳۰). همچنین مکمل تورین چه به تنهایی و چه در ترکیب با تمرین ورزشی منجر به تغییرات معنی دار در بیان پروتئین MURF-1 نشد. نتایج مطالعه حاضر با مطالعات وانگ و همکاران (۳۱)، و خلیل و همکاران (۳۲) غیر همسو بود. یکی از دلایل احتمالی این اختلاف می-تواند نحوه تجویز و همچنین میزان دوز این مکمل باشد. در مطالعه حاضر مکمل به صورت محلول ۱ درصد در آب

رت‌ها و به صورت دسترسی آزاد وجود داشت اما در مطالعه وانگ و همکاران دوز مکمل بطور ثابت برای هر موش ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن و در مطالعه خلیل و همکاران ۲۵۶ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن مورد استفاده قرار گرفت. بعضی از محدودیت های تحقیق شامل عدم اندازه گیری غلظت تورین در بافت قلب بود و همچنین عدم اندازه گیری آتروفی با استفاده از روش های رنگ آمیزی بافتی و ابزار دقیق تر مانند هماتوکسلین-ائوزوفیلین یا ماسون تریکرم که برای بررسی دقیق تر در هایپرتروفی و آتروفی مد نظر است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد هشت هفته تمرین ترکیبی همراه با مصرف مکمل تورین بر شاخص‌های آتروفی قلب رت-های دیابتی شده تاثیر معنی‌داری دارد و سبب کاهش سطوح پروتئین FOXO3a می‌شود، که عامل مهمی برای سلامتی بیماران مبتلا به دیابت نوع۲ است. بنابراین با احتیاط می‌توان پیشنهاد کرد برای جلوگیری از آتروفی عضله قلب بیماران مبتلا به دیابت نوع۲ با واسطه‌گری FOXO3a از ترکیب تمرین و مکمل استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله استخراج از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی در دانشگاه تهران است. از تمامی افراد کمک کننده در به نتیجه رسیدن این کار پژوهشی بویژه کارکنان و پرسنل دانشگاه مقدس اردبیلی تشکر می‌کنیم.

References

1. Najafipour F, Zareizadeh M. Investigating the prevalence of diabetes, IFG and IGT in the first degree family members of a person with type 2 diabetes in Tabriz (people over 30 years old). I Journal of Diabetes and Met. 2014; 4(1): 51-7 (In Persion).
2. Phoenix D. Type II diabetes mellitus and cardiovascular risk factors: current therapeutic approaches. Experimental & Clin Card. 2007; 12(1): 9-17.
3. Hasandokht T, Salari A, Nikfargam S, Soltanipour S, Shalchizadeh M, Sadeghi AS. Assessment of cardiovascular risk in diabetes: Risk scores and provocative testing. World J of diabetes, 2022; 60(1): 56-61 (In Persion).
4. Munasinghe PE, Katare R, Maladaptive autophagy in diabetic heart disease. International J of Cli and Exp Physiology. 2016; 3(4):155-65.
5. Jia G, DeMarco V,Sowers J, Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. Nature Rev Endocrinology. 2016; 12(3): 136-44
6. Sandri M. Regulation of autophagy and the ubiquitin–proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. Nature com. 2016; 6(1): 7-14.
7. Martins R, Lithgow G, Link W, Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. Aging cell. 2016; 15(2): 25-34.
8. Skurk C, Matts H, Kim HS, Yang J, Abdi R, Arid WC, et al. The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. Journal of Bio Che, 2004; 279(2): 1513-25
9. Sengupta A, Molkentin D, Yutzey K. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. J of Biological Che. 2009; 284(41): 28319-31.
10. Kandula V. Forkhead box transcription factor 1: role in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. Card diabetology. 2016; 15(1): 1-12.
11. Hoppeler H, Baun O, Lurmann G, Mueller M. Molecular mechanisms of muscle plasticity with exercise. Com Physiology. 2014; 1(3): 1383-92.
12. Cohen S. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. J of Cell Biology. 2019; 185(6): 1083-95.
13. Schaffer SW. Physiological roles of taurine in heart and muscle. J of biomedical sci. 2010; 17(1):1-8.
14. Franconi F. Taurine supplementation and diabetes mellitus. Current Opinion in Clinical Nut & Metabolic Care. 2016; 9(1): 32-36.
15. De Luca A, Pierno DC. Camerino, Taurine: the appeal of a safe amino acid for skeletal muscle disorders. J of translational med. 2015; 13(1): 1-18.
16. Scicchitano BM, Sica G, The beneficial effects of taurine to counteract sarcopenia. Current Pro and PepSci. 2018. ;19(7): 673-80.
17. Ito T, Sanche F. Cardiac and skeletal muscle abnormality in taurine transporter-knockout mice. J of biomedical sci. 2019; 17(1): 1-5.

18. Sak D. The relationship between plasma taurine levels and diabetic complications in patients with type 2 diabetes mellitus. Biomolecules. 2019; 9(3): 87- 96.
19. Wen C. Protective effects of taurine against muscle damage induced by diquat in 35 days weaned piglets. J of animal sci and bio. 2020; 11: 1-14.
20. Jokar M, Sherafati M. High Intensity Interval Training Inhibits Autophagy in the Heart Tissue of Type2 Diabetic Rats by Decreasing the Content of FOXO3a and Beclin-1 Proteins. Iranian J of Dia and Metabolism. 2019; 18(6): 292-99.
21. Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Opplider RA, Gicolfy CV. Maxymum oxygen consumption of rats and its chenges with various exoerimental prucedures. J Applied Physiology. 1979; 47(6): 78-83.
22. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhad DE, Castro R, Castro CB, Curi R, et al. A program of modrate physical training for wistar rats based on maximal oxygen consumption , J of Str& conditionong Research. 2020;21(3):751-56.
23. Esmailee B, Abdi A, Farzanegi P, Abbassi DA. Protective Effect of Aerobic Training along with Resveratrol on the Expression of some gen. J of Physiology. 2021;52-59 (In Persion).
24. Ahmadi S, Mordi H. Atrophic Biomarkers of Cardiomyocytes in Diabetic rats. J NeySci 2019;7(3):27-37.(In Persion).
25. Mascher H, Tannerstedt J, Elfegoun TB, Ekblom B, Gustafsson T, Blomstrand E. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA. J of Dia. 2020; 45(6): 61-69.
26. Mascher H, Tannersted J, Brink-ET, Ekblom B, Gustafsson T, Blomstrand E. expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2018; 294: 43–51.
27. Bander F. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal rat. Ame J of Phy-End and Met. 2018; 294 (1): 14- 21.
28. Holloway TM, High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. PloS one. 2015. 10(3):18-29.
29. Senf SM, Dodd SL, McClung JM, Judge AR. Hsp70 overexpression inhibits NF-κB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. FASEB J 2008; 22(11): 3836-45.
30. Kelleher AR, Fairchild TJ, Keslacy S. STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF-kappaB canonical cascade activation. Acta Dia. 2010; 47(4): 315-23.
31. Wang G. Taurine attenuates oxidative stress and alleviates cardiac failure in type I diabetic rats. Croatian med J. 2013; 54(2):171-79.
32. Khalil RM. Muscle proteolytic system modulation through the effect of taurine on mice bearing muscular atrophy. Mol& cellular bio. 2018; 44(1): 161-68.

The Effect of Eight Weeks of Combined Aerobic and Resistance Exercises with Taurine Supplement Consumption on Some Indices of Heart Atrophy in Diabetic Rats

Choobineh S[1], Hosseini SE[2*], Souri R[3], Pourrahim Ghorghchi A[4]

1. Associate Professor, Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

2. Ph.D. Candidate of Cardiopulmonary Physiology, Alborz Campus, University of Tehran, Tehran, Iran, Ehosseini128@gmail.com

3. Associate Professor of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

4. Assistant Professor, Department of Sports Physiology, Faculty of Educational Sciences and Psychology, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

Received: *2022/9/9* Accepted: *2023/2/28*

Abstract

Background: Lack of energy and insulin leads the body to catabolism. The present study aimed to investigate the effect of combined training with taurine supplement consumption on some indicators of heart atrophy in diabetic rats.

Materials and Methods: 40 male Wistar rats aged 10 weeks old and weighing between 200 and 250 grams were prepared. The animals were randomly divided into 5 groups of 8 including training (T), training and supplement (T+S), supplement (S), diabetes control (C), and healthy control (CH). The rats of the diabetic groups were considered diabetic by injecting a single dose of streptozotocin (35 mg/weight) and sugar levels higher than 250 mg/dL before the start of the exercise. The rats were anesthetized 24 hours after the last day of the training protocol (eight weeks of combined strength/endurance training) with an intraperitoneal injection of a combination of ketamine and xylazine. The Western blot laboratory method was used to check the changes, and the one-way analysis of variance was employed at significance level of 0.05.

Results: The results showed that the FOXO3a protein decreased in the T+S, group compared to the C and T groups ($P<0.001$). Moreover, taurine supplement, combined training, as well as combined training+taurine supplement led to a significant change in the level of MURF-1 protein expression ($P<0.001$).

Conclusion: It seems that the combination of taurine supplement with combined training can have effects on the indicators related to heart atrophy caused by diabetes by reducing FOXO3a. Accordingly, the consumption of taurine supplement along with exercise is recommended for diabetic people.

Keywords: Atrophy, Taurine Supplement, Diabetes, Combined Training, FOXO-α3.

Citation: Choobineh S, Hosseini SE, Souri R, Pourrahim Ghorghchi A. The Effect of Eight Weeks of Combined Aerobic and Resistance Exercises with Taurine Supplement Consumption on Some Indices of Heart Atrophy in Diabetic Rats. Yafte. 2023; 24(4):15-27.