

بررسی تاثیر تمرین هوازی و مصرف اسید اورسولیک بر بیان برخی از ژن‌های مسیریگنالینگ سارکوپنی و استئوپروز در موش‌های مسن مدل دیابت نوع دو

چکیده

محمدحسین ربانی^{۱*}، پروین فرزادنگی^۲، محمد علی آذربایجانی^۱

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۲ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳ آنلاین: ۱۴۰۳/۰۶/۰۱

زمینه و هدف: تمرینات هوازی و مصرف برخی مکمل‌ها مانند اسید اورسولیک ممکن است با فعال یا غیرفعال کردن برخی از ژن‌ها و مسیرهای سیگنالینگ، باعث کاهش سارکوپنی و کاهش استئوپروزیس شود. هدف از این پژوهش بررسی تاثیر تمرینات هوازی و مکمل اسید اورسولیک بر بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای التهابی و اتوفازی در دیابت نوع دو بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی در بازه زمانی اردیبهشت ۱۴۰۲ تا مهر ۱۴۰۲ در دانشگاه آزاد واحد ساری انجام شد. در این پژوهش، ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۱۲ ماهه، میانگین وزن ۳۹۰ g) به پنج گروه سالم، دیابتی، دیابتی + تمرین، دیابتی + مکمل، دیابتی + تمرین + مکمل تقسیم شدند. القای دیابت با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین (۵۰ mg/kg) وزن بدن) انجام شد. تمرین هوازی به مدت هشت هفته، پنج روز در هفته اجرا شد. گروه‌های مکمل، دوز ۲۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن اسید اورسولیک را روزانه دریافت کردند.

یافته‌ها: تحلیل داده‌ها نشان داد که بین گروه‌های مختلف پژوهش در سطوح بیان ژن‌های LC3، Becline-1، TNF α ، FOXO3، Akt، IL-1 β تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود داشت ($P < 0/05$). در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم، میزان بیان LC3، Becline-1، TNF α و IL-1 β افزایش ($P = 0/000$) و بیان Akt کاهش معناداری نشان داد ($P < 0/05$). بین گروه‌های مداخله نیز تفاوت‌های معناداری مشاهده شد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: تمرین هوازی و مصرف مکمل اسید اورسولیک بر مسیرهای التهابی و اتوفازی تاثیر گذاشته و باعث کاهش آتروفی سلولی در دیابت نوع دو می‌شود. این مداخلات می‌توانند در بهبود عملکرد عضلانی و پیشگیری از آسیب‌های سلولی مؤثر باشند.

کلمات کلیدی: دیابت، آتروفی سلول، مسیر سیگنالینگ، تمرینات ورزشی، اسید اورسولیک.

* نویسنده مسئول: تهران، انتهای بزرگراه امام علی (ع) شمال، بلوار ارتش شرق، محله سوهانک، بلوار شهید سوهانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده فیزیولوژی ورزشی.

تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۸۱۶۲۲

E-mail: ml.rabbani60@gmail.com

مقدمه

دیگر، تغییر تعادل انرژی بدن و تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی ناشی از افزایش بافت چربی، می‌تواند باعث بروز برخی بیماری‌های قلبی-عروقی مانند آترواسکلروز و پرفشارخونی و بیماری‌های متابولیکی نظیر سندروم متابولیکی و دیابت نوع دو شود.^۱ دیابت یک اختلال متابولیکی است که سرعت و توانایی بدن در استفاده و سوخت‌وسوز کامل قندها را کاهش داده و چاقی زمینه را برای دیابت

پیشرفت تکنولوژی و ماشینی شدن فعالیت‌ها، کم‌ تحرکی افراد جامعه را به همراه دارد که می‌تواند منجر به افزایش وزن، افزایش اندازه سلول‌های چربی و همچنین کاهش تدریجی و اجتناب‌ناپذیری در توده عضلانی (سارکوپنی) و توده استخوانی (استئوپروز) شود.^۱ از سوی

کمیته اخلاق کار با حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری با شناسه اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1403.074 تأیید شد.

پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه در قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات، دمای $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ، رطوبت $55 \pm 5\%$ و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ با تهویه مناسب قرار گرفتند. آزمودنی‌های دو گروه کنترل دیابتی و دیابتی + تمرین، به مدت شش هفته، تحت رژیم غذایی پر چرب به روش Zou و همکاران قرار گرفتند.^۵ این رژیم شامل امولسیون چربی بوده که هر روز صبح به میزان ۱۰ ml به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن از طریق گاواژ به رت‌ها داده شد. ترکیب رژیم پرچرب به‌صورت دستی در آزمایشگاه تهیه شد که شامل ۷۷٪ چربی (روغن ذرت)، ۱۰٪ کلاسترول و ۲٪ کولهت بود و برای القای دیابت نوع ۲ طراحی شده است. در تمام مراحل پژوهش، آب مورد نیاز حیوان به‌صورت آزاد در بطری ۵۰۰ ml ویژه حیوانات آزمایشگاهی در دسترس آنها قرار گرفت.^۶ پس از گروه‌بندی نمونه‌ها جهت دیابتی کردن رت‌ها از داروی استرپتوزوتوسین (STZ) با دوز ۵۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد. داروی استرپتوزوتوسین از شرکت‌های معتبر دارویی تهیه شد که به‌صورت پودر خشک در دمای منفی 20°C نگهداری می‌شد. قبل از استفاده، STZ با آب مقطر یا محلول نمکی فیزیولوژیک به‌دوز موردنظر رقیق شده و به‌صورت درون صفاقی به رت‌ها تزریق شد. به منظور تشخیص دیابتی بودن رت‌ها، از گوشه چشم آنها نمونه‌های خونی تهیه و میزان گلوکز خون با استفاده از دستگاه گلوکومتر مدل OneTouch آمریکایی اندازه‌گیری شد و میزان گلوکز بالاتر از 250 mg/dl به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شد. به‌منظور انجام تمرین‌های هوازی پیش از شروع پروتکل اصلی، برای آشنایی از فعالیت، رت‌ها به‌مدت یک هفته با تواتر پنج جلسه و به‌مدت پنج دقیقه با سرعت هشت تا ۱۰ متر بر دقیقه با شیب صفر از تردمیل استفاده کردند. برنامه تمرین هوازی هفته اول برای مدت زمان پنج دقیقه با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه شروع به دویدن روی تردمیل کردند. سپس هر هفته سرعت یک تا دو متر بر دقیقه افزایش می‌یافت و مدت زمان دویدن نیز به‌تدریج یک تا دو دقیقه افزوده می‌شد. تعداد جلسات تمرین تداومی پنج مرتبه در هر هفته انجام شد.^۷ پروتکل تمرین در جدول ۱ نشان داده شده است.

نحوه جداسازی نمونه‌های بافتی: در این پژوهش بافت عضله نعلی به‌عنوان نمونه بافتی انتخاب شد، زیرا این بافت نقش مهمی در

افزایش می‌دهد. در بافت چربی افراد چاق به‌دلیل تجمع چربی، مهاجرت سلول‌های ایمنی خصوصاً ماکروفاژها افزایش می‌یابد. فاکتور نکروز توموری آلفا $\text{TNF-}\alpha$ به‌عنوان یک سایتوکین پیش‌تهابی مهم از این سلول‌های ایمنی ترشح می‌شود که این سایتوکین خود سبب ترشح دیگر سایتوکین‌ها از جمله $\text{IL-1}\beta$ و IL-6 می‌شود.^۳ اورسولیک اسید می‌تواند یک کاندیدای بالقوه‌ای جهت پیشگیری از طیف وسیعی از اختلالات و بیماری‌هایی نظیر آرایمر، آرترواسکلروزیس، آتروفی، التهاب ریوی، چاقی، انواع سرطان (کبد، معده، روده، پانکراس، پوست و غیره)، دیابت نوع ۲، Human immunodeficiency virus (HIV) و غیره همچنین پیری و بیماری‌های مرتبط با آن باشد.^۴ با توجه به اثرات مثبت فیزیولوژیکی تمرینات ورزشی، تاثیر احتمالی اسید اورسولیک و همچنین نقش احتمالی این مداخلات در بهبود محور استئوسارکوپینی مبنی بر تحریک بیان ژن‌های این مسیر، به‌نظر می‌رسد ترکیب مداخلات تمرین هوازی + مکمل می‌تواند نقش موثرتری را در بهبود بیان این ژن‌ها در رت‌های مسن نر دیابتی نوع دو داشته باشند. بنابراین پژوهش حاضر از لحاظ بررسی تاثیر تمرین و مصرف مکمل اسید اورسولیک بر وضعیت محور استئوسارکوپینی رت نژاد ویستار نوآوری دارد و نتایج آن می‌تواند از لحاظ کاربردی حائز اهمیت باشد.

هدف از این پژوهش بررسی تاثیر تمرینات هوازی و مکمل اسید اورسولیک بر بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای التهابی و اتوفاژی در دیابت نوع دو است.

روش بررسی

پژوهش حاضر از نظر هدف، کاربردی و از نظر روش اجرا، یک مطالعه تجربی با طراحی گروه‌های کنترل و آزمون است که در محیط آزمایشگاهی انجام شده است. در این پژوهش تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۱۲ ماه و وزن 390 g (دامنه وزنی: 380 g تا 400 g)، $5 \pm$ گرم انحراف معیار) از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انتخاب شدند. سپس نمونه‌ها در پنج گروه شش‌تایی که شامل ۱) کنترل سالم، ۲) کنترل دیابتی، ۳) دیابتی + تمرین (تمرین)، ۴) دیابتی + مکمل (مکمل)، ۵) دیابتی + تمرین + مکمل تقسیم شدند. این مطالعه توسط

جدول ۱: پروتکل تمرین هوازی طراحی شده برای رت‌های گروه دیابت + تمرین در طول هشت هفته

هفته	مدت زمان دویدن (دقیقه)	سرعت دویدن (متر بر دقیقه)	تعداد جلسات در هفته
۱	۵	۱۵	۵
۲	۷	۱۷	۵
۳	۹	۱۹	۵
۴	۱۱	۲۱	۵
۵	۱۳	۲۳	۵
۶	۱۵	۲۵	۵
۷	۱۷	۲۷	۵
۸	۱۹	۲۹	۵

بدون ورتکس کردن به آرامی مخلوط کرده و سپس با برنامه‌ریز در دستگاه ترموسایکر مدل Thermo Fisher Scientific ساخت آمریکا انکوبه شد. پنج دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد، ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ °C، ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ °C، پنج دقیقه در دمای ۹۵ °C. پس از اتمام مراحل ترموسایکلر ۲۸۰ μl آب تزریقی اضافه شده و برای استفاده در QPCR در دمای ۲۰ °C - نگهداری شد. برای هر نمونه cDNA نیز، یک نمونه کنترل مثبت با پرایمر b2m به عنوان کنترل داخلی، برای آزمون حضور cDNA تهیه شد. نمونه‌ها به آرامی و بدون ورتکس مخلوط شده و در دستگاه PCR-RT مدل Applied Biosystems 7500 ساخت آمریکا با برنامه‌ریز PCR قرار گرفت. ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ °C، ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ °C، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ °C، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ °C، واکنش از مرحله دوم به بعد، برای ۴۰ سیکل تکرار می‌شود. Cts مربوط به واکنش‌ها توسط نرم‌افزار دستگاه PCR-RT استخراج و در نهایت CT Mean سه مرتبه ثبت شد. کمی‌سازی مقادیر بیان ژن هدف مورد نظر از فرمول ۲ به توان منفی CTΔΔ استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از SPSS software, version 18 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) جهت طبقه‌بندی داده‌های حاصل از این پژوهش، از آمار توصیفی استفاده خواهد شد. جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده خواهد شد. جهت تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیرها و

متابولیسم انرژی و کنترل گلوکز خون دارد. عضلات اسکلتی به‌ویژه در دیابت نوع ۲ تأثیرات تمرین‌های هوازی را به‌خوبی نشان می‌دهند. همچنین، این بافت به دلیل نقش آن در فرآیندهای اتوفازی و التهاب انتخاب مناسبی برای بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی به ورزش است. پس از اتمام یک دوره تمرینی به مدت هشت هفته، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی با ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین و زایلازین رت‌ها بی‌هوش و نمونه‌گیری بافتی انجام شد. بدین ترتیب بافت عضله جدا و در محیط ۸۰ °C - نگهداری و سپس به آزمایشگاه برای اندازه‌گیری متغیرها ارسال شد. بافت‌ها با استفاده از یک میلی مول محلول تریزول لیز و با دستگاه همگن کننده بافت، هموژن شدند.

در مرحله بعد، جداسازی از فاز آبی به کمک ۰/۲۵ ml کلروفرم صورت گرفت. RNA استخراج شده با یک میلی‌لیتر اتانول سرد ۷۰٪ شستشو و خشک شد. سپس به آن آب استریل (۱/۵ μl/mg بافت) اضافه شد. برای سنج کمی RNA استخراج شده از دستگاه بایوفتومر با طول موج ۲۶۰ nm استفاده شد. میانگین OD خوانده شده ۱/۷۷ بود که نشانگر کارایی مناسب RNA استخراج شده می‌باشد. استخراج cDNA برای هر نمونه در سه مرحله ساخت cDNA انجام گرفت. بدین ترتیب که در ابتدا ۸ μg RNA استخراج شده را با ۰/۸ μl از آنزیم Dnase I و ۲ μl از بافر ۱۰x آن و آب DEPC خورده مخلوط کرده و حجم نمونه به ۲۰ μl رسانده شد. محصول ایجاد شده را

پژوهش در سطوح بیان ژن Akt تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود دارد (P=۰/۰۰۰) میزان بیان ژن‌های Akt در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم کاهش معناداری داشت (P=۰/۰۰۰). گروه‌های مکمل (P=۰/۰۳۸)، تمرین (P=۰/۰۴۴) و تمرین-مکمل (P=۰/۰۰۲) نسبت به گروه دیابتی دیابت افزایش معناداری یافتند. بین گروه‌های مداخله تفاوت معناداری نبود (P>۰/۰۵).

تحلیل داده‌ها نشان داد که بین گروه‌های مختلف پژوهش در سطوح بیان ژن FOXO3 تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود دارد (P=۰/۰۰۰).

میزان بیان ژن FOXO3 در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم کاهش معناداری داشت (P=۰/۰۰۰). گروه‌های مکمل (P=۰/۰۰۱)، تمرین (P=۰/۰۰۰) و تمرین-مکمل (P=۰/۰۰۰) نسبت به گروه دیابتی دیابت افزایش معناداری یافتند. گروه تمرین-مکمل نسبت

تعامل بین آنها از تحلیل واریانس یک‌طرفه و در صورت معنادار بودن داده‌ها برای تعیین محل تفاوت از آزمون Tukey's HSD استفاده شود، P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تمام متغیرها در گروه‌های مختلف پژوهش دارای توزیع نرمال بودند. بنابراین از مسیر پارامتریک و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون Tukey's HSD برای بررسی تفاوت معنادار بین گروه‌ها استفاده شد. میانگین و انحراف معیار متغیرهای پژوهش به تفکیک گروه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۳ اثرات تمرین و مکمل را بر متغیرهای پژوهش نشان می‌دهد. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بین گروه‌های مختلف

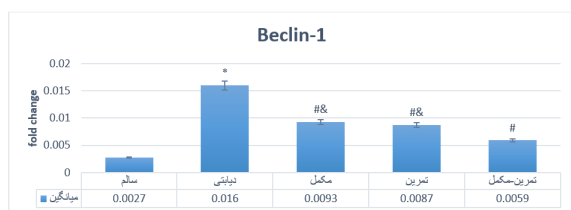
جدول ۲: شاخص‌های مرکزی و پراکندگی متغیرهای پژوهش

متغیر	گروه	سالم	دیابتی	مکمل	تمرین	تمرین-مکمل
AKT	۰/۰۱۳۷±۰/۰۰۸۲	۰/۰۳۰۳±۰/۰۰۰۳۴	۰/۰۰۷۷±۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۷۰۴±۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۹۱±۰/۰۰۰۶۵	
FOXO3	۰/۰۰۲±۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۳۳±۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۶۴±۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۷۳±۰/۰۰۰۱۸	۰/۰۰۱۰۸±۰/۰۰۰۱۳	
LC3	۰/۰۱۴۰۲۲±۰/۰۰۲۱۷	۰/۰۲۹±۰/۰۰۰۹	۰/۰۱۷۷±۰/۰۰۱	۰/۰۱۷۴۲±۰/۰۰۰۲	۰/۰۱۵۹±۰/۰۰۱۴	
BECLIN-1	۰/۰۰۲۷±۰/۰۰۰۸۷	۰/۰۱۶±۰/۰۰۰۴۱	۰/۰۰۹۳±۰/۰۰۱۵۳	۰/۰۰۸۷±۰/۰۰۱۷	۰/۰۰۵۹±۰/۰۰۰۴۶	
TNF-α	۰/۰۰۷۴±۰/۰۰۶۷	۰/۰۳۷۶±۰/۰۰۷۲	۰/۰۳۱۲±۰/۰۰۲۵۸	۰/۰۲۰۳±۰/۰۰۸۴	۰/۱۴۴۳±۰/۰۰۰۷۹	
IL-1β	۰/۰۶۳±۰/۰۰۲۸	۰/۰۷۸±۰/۰۰۱۳۹	۰/۰۲۶۳±۰/۰۰۳۹۳	۰/۰۳۶±۰/۰۰۱۹	۰/۰۲۰۸±۰/۰۰۱۶۷	

جدول ۳: اثرات تمرین و مکمل برای متغیرهای مختلف پژوهش

متغیر	AKT	FOXO3	LC3	BECLIN-1	TNF-α	IL-1β
عوامل اثرگذار	P*	اندازه اثر	P	اندازه اثر	P	اندازه اثر
تمرین	۰/۰۳۶	۰/۱۵۸	۰/۰۷۷۲	۰/۸۰۴	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲
مکمل	۰/۰۳۵۱	۰/۰۳۳	۰/۰۶۰۷	۰/۰۵۴۶	۰/۰۱۴	۰/۰۵۴۶
تمرین+مکمل	۰/۰۳۷۹	۰/۰۳۰	۰/۰۶۴۹	۰/۰۱۹۶	۰/۰۶۳	۰/۰۱۵

* آزمون آماری: Tukey's HSD, P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.



نمودار ۴: میانگین Fold change مربوط به ژن Beclin-1 در بین گروه‌های

مختلف پژوهش

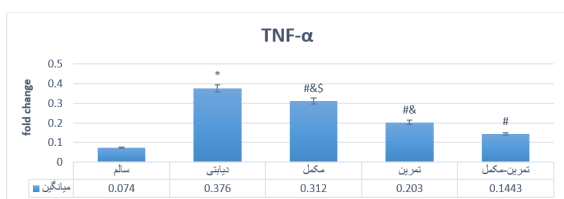
*: نشانه معناداری نسبت به گروه سالم، # نشانه معناداری نسبت به گروه دیابتی، ⚠ نشانه معناداری نسبت به گروه تمرین-مکمل



نمودار ۱: میانگین Fold change مربوط به ژن AKT در بین گروه‌های مختلف

پژوهش

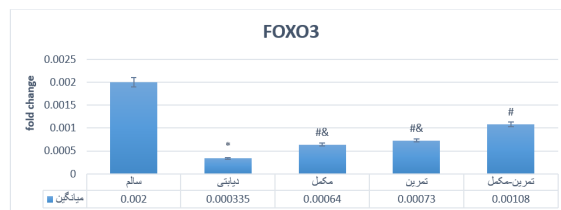
*: نشانه معناداری نسبت به گروه سالم، # نشانه معناداری نسبت به گروه دیابتی



نمودار ۵: میانگین Fold change مربوط به ژن TNF- α در بین گروه‌های مختلف

پژوهش

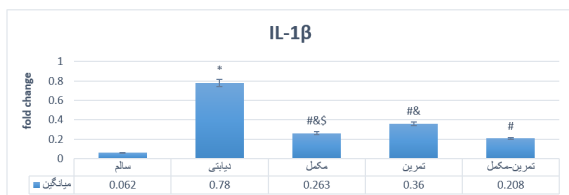
*: نشانه معناداری نسبت به گروه سالم، # نشانه معناداری نسبت به گروه دیابتی، ⚠ نشانه معناداری نسبت به گروه تمرین-مکمل، ⚡ نشانه معناداری نسبت به گروه تمرین



نمودار ۲: میانگین Fold change مربوط به ژن FOXO3 در بین گروه‌های مختلف

پژوهش

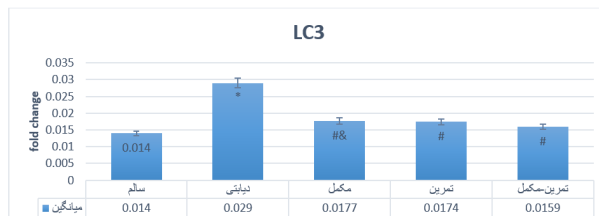
*: نشانه معناداری نسبت به گروه سالم، # نشانه معناداری نسبت به گروه دیابتی، ⚠ نشانه معناداری نسبت به گروه تمرین-مکمل



نمودار ۶: میانگین Fold change مربوط به ژن IL-1 β در بین گروه‌های مختلف

پژوهش

*: نشانه معناداری نسبت به گروه سالم، # نشانه معناداری نسبت به گروه دیابتی، ⚠ نشانه معناداری نسبت به گروه تمرین-مکمل، ⚡ نشانه معناداری نسبت به گروه تمرین



نمودار ۳: میانگین Fold change مربوط به ژن LC3 در بین گروه‌های مختلف

پژوهش

*: نشانه معناداری نسبت به گروه سالم، # نشانه معناداری نسبت به گروه دیابتی، ⚠ نشانه معناداری نسبت به گروه تمرین-مکمل

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمرینات هوازی و مصرف مکمل (اسید اورسولیک) منجر به افزایش بیان ژن Akt و کاهش Foxo3 می‌شود.

Kunkel و همکاران در یک مطالعه به بررسی اثر مصرف اسید اورسولیک بر فعالیت Akt عضلات اسکلتی پرداختند. بدین منظور رت‌ها تحت رژیم غذایی پرچرب فاقد یا حاوی اسید اورسولیک قرار گرفتند. نتایج نشان داد در عضلات اسکلتی، اسید اورسولیک فعالیت Akt و همچنین mRNA های پایین دستی را به‌طور معناداری افزایش داده است ($P < 0/05$)^۸. مطالعه کانکل با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد و گروه مصرف‌کننده اسید اورسولیک افزایش بیان ژن Akt را نشان داده است. در واقع استفاده از اسید اورسولیک با افزایش گلوکز (هگزوکیناز-II)، جذب عروق خونی و سیگنال‌دهی IGF-I اتوکراین‌پاراکرین باعث افزایش بیان پروتئین Akt می‌شود.^۹

مسیر سیگنالینگ سنتز پروتئین در فعالیت‌های ورزشی باعث ترشح IGF-1 و به دنبال آن فعال شدن مسیرهای مولکولی و برقراری تعادل بین اجزای درون سلول جهت تجزیه و سنتز پروتئین است. در این میان FOXO3 به‌عنوان یک عامل رونویسی از طریق Atrogin 1 باعث آتروفی عضلات می‌شود.^{۱۱} در مطالعه حاضر میزان بیان ژن FOXO3 در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم کاهش معناداری نشان داد.

Gholipour و همکاران مطالعه‌ای با عنوان مقایسه اثرات تمریناتی استقامتی و مقاومتی بر بیان ژن‌های در گیر در مسیرهای سیگنالینگ سنتز و تجزیه پروتئین عضله نعلی رت نژاد ویستار انجام دادند. نتایج نشان داد بیان ژن mTOR3 در گروه ورزش‌های مقاومتی به‌طور معناداری کاهش یافته بود ($P = 0/022$). در مسیر تجزیه پروتئین بیان ژن FOXO3 در بین گروه‌ها تغییر معناداری نداشت، ولی به‌صورت غیرمعنادار کاهش یافته بود ($P = 0/0463$). مطالعه Gholipour با مطالعه کنونی همسو نبوده و علت آن را شاید بتوان به نوع تمرینات ورزشی نسبت داد. در مطالعه Gholipour تمرینات به‌صورت مقاومتی و بی‌هوازی انجام شده بود.^{۱۲} Jolar و همکاران در مطالعه خود دریافتند که هشت هفته تمرین تناوبی شدید با کاهش معنادار محتوای FOXO3 ($P = 0/008$) در گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه کنترل

به گروه‌های تمرین ($P = 0/009$) و مکمل ($P = 0/014$) افزایش معناداری داشت. تحلیل داده‌ها نشان داد که بین گروه‌های مختلف پژوهش در سطوح بیان ژن LC3 تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود دارد ($P = 0/000$). میزان بیان ژن‌های LC3 در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم افزایش معناداری داشت ($P = 0/000$). در مقابل گروه‌های مکمل ($P = 0/008$)، تمرین ($P = 0/005$) و تمرین-مکمل ($P = 0/000$) نسبت به گروه دیابتی کاهش معناداری داشتند. گروه تمرین-مکمل نسبت به گروه مکمل ($P = 0/035$) کاهش معناداری داشت. تحلیل داده‌ها نشان داد که بین گروه‌های مختلف پژوهش در سطوح بیان ژن Beclin-1 تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود دارد ($P = 0/001$). میزان بیان ژن‌های Beclin-1 در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم افزایش معناداری داشت ($P = 0/000$). گروه‌های مکمل ($P = 0/012$)، تمرین ($P = 0/009$) و تمرین-مکمل ($P = 0/004$) نسبت به گروه دیابتی کاهش معناداری داشتند. گروه تمرین-مکمل نسبت به گروه‌های مکمل ($P = 0/038$) و تمرین ($P = 0/042$) کاهش معناداری داشت.

تحلیل داده‌ها نشان داد که بین گروه‌های مختلف پژوهش در سطوح بیان ژن TNF- α تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود دارد ($P = 0/009$). میزان بیان ژن‌های TNF- α در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم افزایش معناداری داشت ($P = 0/024$). گروه‌های مکمل ($P = 0/007$)، تمرین ($P = 0/003$) و تمرین + مکمل ($P = 0/000$) نسبت به گروه دیابتی کاهش معناداری داشتند. گروه تمرین ($P = 0/007$) نسبت به مکمل کاهش معناداری داشت. گروه تمرین-مکمل نسبت به گروه‌های مکمل ($P = 0/001$) و تمرین ($P = 0/008$) کاهش معناداری داشت.

تحلیل داده‌ها نشان داد که بین گروه‌های مختلف پژوهش در سطوح بیان ژن IL-1 β تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود دارد ($P = 0/000$). میزان بیان ژن‌های IL-1 β در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم افزایش معناداری داشت ($P = 0/000$). گروه‌های مکمل ($P = 0/000$)، تمرین ($P = 0/000$) و تمرین-مکمل ($P = 0/000$) نسبت به گروه دیابتی کاهش معناداری داشتند. گروه تمرین-مکمل نسبت به گروه‌های تمرین ($P = 0/000$) و مکمل ($P = 0/050$) کاهش معناداری داشت. گروه مکمل هم نسبت به تمرین ($P = 0/000$) کاهش معناداری داشت.

Jokar و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که چهار هفته تمرین تناوبی با کاهش معنادار محتوای پروتئین Beclin-1 ($P=0/0001$) در گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی بوده است.^{۱۸} مطالعه حاضر همسو با پژوهش جوکار می‌باشد. در مطالعه حاضر کاهش این پروتئین در دو گروه مداخله تمرین و تمرین + مکمل کاهش معناداری داشته است. Sun و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که هشت هفته تمرینات استقامتی باعث افزایش فعالیت‌های اتوفاژی و افزایش معنادار Beclin-1 می‌شود.^{۱۹} این پژوهش با مطالعه حاضر همخوانی ندارد. در واقع عواملی همچون نوع ورزش و شدت آن و همچنین فاکتورهای مختلفی از جمله مواد مغذی، هورمون‌ها، غلظت کلسیم داخل سلولی و غیره بر مسیرهای اتوفاژی تاثیر می‌گذارد.^{۲۰}

Li و همکاران در تحقیقی به بررسی تمرین‌های ورزشی بر محتوای Beclin-1 در قلب موش‌های صحرایی پرداختند پس از ۱۰ هفته تمرینات با شدت متوسط در محتوای پروتئین تغییر معنادار مشاهده نکردند، اما در تمرینات شدت بالا افزایش قابل توجهی داشته است.^{۲۱} این مطالعه با مطالعه حاضر همخوانی ندارد در مطالعه حاضر در گروه‌های تمرین و تمرین + مکمل کاهش در بیان ژن Beclin-1 داشتیم. در تمرینات ورزشی مطالعه حاضر از شدت کم شروع و به تدریج بر شدت آن افزوده شد. در صورتی که در مطالعه Li گروه تمرین با شدت متوسط و بالا از هم تفکیک شده‌اند. همچنین Li و همکاران در تحقیق خود از واژه کیتوفاژی به جای اتوفاژی استفاده کرده است که آن را اتوفاژی وابسته به فعالیت ورزشی تعریف کرده‌اند و متذکر شدند که کیتوفاژی با توجه به کاهش Beclin-1 که یکی از پروتئین‌های مهم در مسیر اتوفاژی است اتفاق می‌افتد.^{۲۲}

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بین گروه‌های مختلف پژوهش در سطوح بیان ژن $TNF-\alpha$ تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود دارد و میزان بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ در گروه‌های مکمل، تمرین و تمرین + مکمل نسبت به گروه دیابتی کاهش معناداری داشتند. گروه تمرین نسبت به مکمل کاهش معناداری داشت. گروه تمرین + مکمل نسبت به گروه‌های مکمل و تمرین کاهش معناداری داشت. همچنین بین گروه‌های مختلف پژوهش در سطوح بیان ژن $IL-1\beta$ (نماینده التهابی) تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود داشته است. در گروه‌های مکمل، تمرین و تمرین + مکمل نسبت به گروه دیابتی کاهش معناداری داشتند. گروه تمرین + مکمل نسبت به گروه‌های

دیابتی می‌شود.^{۱۳} Marfe و همکاران پس از یک جلسه تمرین تمرینات ورزشی طاقت فرسا در موش‌های نر، کاهش بیان ژن FOXO3 به‌طور معنادار را نسبت به گروه کنترل مشاهده کردند ($P<0/05$).^{۱۴} در این راستا Kavazis و همکاران دریافتند تمرین‌های هوازی در اثر وجود دوکسورویسین منجر به کاهش رونویسی FOXO3 در عضله قلبی و نعلی رت‌ها می‌شود ($P<0/05$).^{۱۵} سه مطالعه ذکر شده با پژوهش حاضر همسو می‌باشد. با توجه به مطالعات ذکر شده به نظر می‌رسد هر نوع تمرین و با شدت و تعداد جلسات مختلف می‌تواند با تاثیر بر پروتئین‌های بیان شده از آتروفی عضلات جلوگیری و میزان سارکوپنی را کاهش دهد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بین گروه‌های مختلف پژوهش در سطوح بیان ژن LC3 تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود داشته است و در گروه‌های مکمل، تمرین و تمرین + مکمل نسبت به گروه دیابتی کاهش معناداری داشتند. گروه تمرین + مکمل نسبت به گروه مکمل هم کاهش معناداری داشته است. در واقع تعادل بین اجزای درون‌سلولی مرتبط با سنتز و تجزیه پروتئین تعیین‌کننده توده عضلانی است. در شرایط بیماری، کهولت سن و بی‌حرکی جسمانی و شرایط استرس اکسیداتیو تجزیه پروتئین بیشتر از سنتز می‌شود. در این شرایط ژن‌های مانند LC3 باعث القای اتوفاژی می‌شوند.^{۱۶} اتوفاژی یک روش کاتابولیک بسیار حفاظت شده در سیتوپلاسم یوکاریوت‌ها است که از طریق آن اندامک‌های غیرعادی به لیزوزم‌ها منتقل می‌شوند تا برای انجام بازیافت و تجزیه اندامک‌ها تجزیه شوند. بنابراین اتوفاژی برای حفظ هموستاز سلولی ضروری است و یک نقش اساسی در متابولیسم، بازسازی ساختار، رشد و توسعه ایفا می‌کند.^۷

مطالعات پیشین ارتباط نزدیکی بین وضعیت عملکردی اتوفاژی و آتروفی عضلات اسکلتی را نشان داده است.^{۱۳} به‌طوری‌که هم اتوفاژی بیش از حد و هم اتوفاژی ناقص می‌تواند منجر به آتروفی عضلات شود.^{۱۷}

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بین گروه‌های مختلف پژوهش در سطوح بیان ژن Beclin-1 تفاوت معناداری به لحاظ آماری وجود داشته است. در گروه‌های مکمل و تمرین + مکمل نسبت به گروه دیابتی کاهش معناداری مشاهده شد و همچنین گروه تمرین + مکمل نسبت به گروه‌های مکمل و تمرین کاهش معناداری مشاهده شد.

تمرین و مکمل کاهش معناداری داشت. گروه مکمل هم نسبت به تمرین کاهش معناداری داشت (P=۰/۰۰۰) و Tian-Kui و همکاران پژوهشی با عنوان "درمان با اورسولیک اسید از طریق مسیرهای سیگنالیکی ATIR/ARAP نفروپاتی بیماران دیابتی را کاهش می‌دهد" گزارش کردند که درمان با اسید اورسولیک سطح بیان سایتوکین IL-1 β را به‌طور معنادار کاهش می‌دهد (P<۰/۰۰۰۱) و باعث کاهش وزن بدن و کاهش سطح گلوکز خون در بیماران دیابتیک می‌شود. در واقع IL-1 β یکی از شاخص‌های التهابی در بیماران نفروپاتی ناشی از دیابت می‌باشد که میزان بیان آن پس از درمان با اسید اورسولیک کاهش می‌یابد.^{۳۳} این پژوهش با مطالعه حاضر همسو می‌باشد. Tang در مطالعه خود گزارش کرد که اورسولیک اسید استرس اکسیداتیو بافت پانکراس را کاهش و باعث رژنراسیون سلول‌های بتای پانکراس شده و در نتیجه ترشح انسولین را افراد دیابتی بهبود می‌بخشد.^{۳۴}

تمرین استقامتی و مصرف ال-کارنیتین بر بیان ژن TNF- α و IL-1 β در بافت قلب رت‌های نروبیستار پس از مصرف استروئید آنابولیک (بولدنون) گزارش کردند که تمرینات استقامتی همراه ال‌کارنیتین باعث کاهش معنادار شاخص‌های التهابی TNF- α و IL-1 β می‌شود.

این پژوهش با مطالعه حاضر همسو می‌باشد. این تفاوت‌ها را می‌توان در نوع و مدت ورزش و نوع مکمل استفاده شده جستجو نمود. Khodadoust و همکاران در یک کارآزمایی بالینی در سال ۲۰۲۱ نشان دادند تمرینات منظم پیلاتس باعث کاهش سایتوکین‌های التهابی TNF- α و افزایش سایتوکین‌های (IL-1 β و IL-1 β) می‌شود.^{۳۵} در نهایت مطالعه حاضر نشان داد که انجام تمرین‌های هوازی منظم و مصرف مکمل اسید اورسولیک می‌تواند بر مسیرهای التهابی و اتوفازای تأثیر بگذارد. این تأثیرات از طریق تغییر در برخی سیگنال‌های بیولوژیک موجب کاهش آتروفی سلول‌ها می‌شود و به بهبود عملکرد عضلانی در بیماری دیابت نوع دو، کمک می‌کند. بنابراین، تمرین‌های هوازی و مصرف مکمل می‌تواند راه‌حلی موثر برای بهبود وضعیت متابولیکی و پیشگیری از آسیب‌های سلولی در این گروه از بیماران باشد.

References

- Lu X, Zhao CJ. Exercise and type 1 diabetes. 2020;107-121.
- Pouzesg Jadidi J, Pouzesg Jadidi R, Seifi-Skishahr F, Azadi B. Effect of Eight Weeks of Upper Body, Lower Body, and Concurrent Resistance Training on the Levels of Homocysteine, Adiponectin, and Insulin Resistance in Healthy Untrained Females. *The Scientific Journal of Rehabilitation Medicine* 2020;9(3):83-92.
- Nicholas DA, Andrieu G, Strissel KJ, Nikolajczyk BS, Denis GV. BET bromodomain proteins and epigenetic regulation of inflammation: implications for type 2 diabetes and breast cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2017; 74:231-43.
- Bakhtiari N, Hosseinkhani S, Soleimani M, Hemmati R, Noori-Zadeh A, Javan M, Tashakor A. Short-term ursolic acid promotes skeletal muscle rejuvenation through enhancing of SIRT1 expression and satellite cells proliferation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016; 78:185-96.
- Bang HS, Seo DY, Chung YM, Oh KM, Park JJ, Arturo F, Jeong SH, Kim N, Han J. Ursolic acid-induced elevation of serum irisin augments muscle strength during resistance training in men. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 2014;18(5):441.
- Bakhtiari N, Ahmadzadeh S. Ursolic acid: a 5-ring triterpenoid found in apple skin with a wide range of therapeutic effects. *Cell and Molecular Researches (Iranian Biology)* 2018;32(2):258-268.
- Laker RC, Drake JC, Wilson RJ, Lira VA, Lewellen BM, Ryall KA, Fisher CC, Zhang M, Saucerman JJ, Goodyear LJ, Kundu M. Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nature communications* 2017;8(1):548.
- Kunkel SD, Elmore CJ, Bongers KS, Ebert SM, Fox DK, Dyle MC, Bullard SA, Adams CM. Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. *PLoS one* 2012;7(6): e39332.
- Yu J, Hu Y, Li Y, Han T, Zhu R, Fu P. Resistance training relieves skeletal muscle atrophy induced by hypoxia via the Akt-FoxO1-MuRF1/Atrogin-1 signaling pathway. *Frontiers in Physiology* 2019;10:1029
- Lu X, et al. Ursolic acid attenuates diabetic mesangial cell injury through the up-regulation of autophagy via miRNA-21/PTEN/Akt/mTOR suppression. *PLOS ONE* 2014;DOI:10.1371/journal.pone.0117400:1-16.
- Wang X, et al. Phosphorylation and acetylation modifications of FOXO3a: independently or synergistically? *Oncol Lett* 2017;13(5):2867-2872.
- Gholipour M, et al. Comparing the effects of endurance and resistance training on gene expression involved in protein synthesis and degradation signaling pathways of Wistar rat soleus muscle. *Tehran Univ Med J (TUMJ)* 2020;77(11):668-677.
- Jokar M, Sherafati Moghadam M. High-intensity interval training inhibits autophagy in the heart tissue of type 2 diabetic rats by decreasing the content of FOXO3A and BECLIN-1 proteins. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism* 2019;18(6):292-299.

14. Marfe G, et al. The modulation of sirtuins and apoptotic proteins in rats after exhaustive exercise. *Journal of Molecular and Integrative Physiology* 2012;2(3):65-74.
15. Kavazis AN, et al. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FOXO3 transcription in cardiac and skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 2014;117(3):223-230.
16. Bahrami SA, Bakhtiari N. Ursolic acid regulates aging process through enhancing of metabolic sensor proteins level. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2016; 82:8-14.
17. Gao Y, Arfat Y, Wang H, Goswami N. Muscle atrophy induced by mechanical unloading: mechanisms and potential countermeasures. *Frontiers in physiology* 2018; 9:235.
18. Jokar M, Sherafati-Moghadam M. The effect of 4 weeks high-intensity interval training (HIIT) on the content of FOXO3a Beclin-1 proteins in the left ventricular heart tissue with type 2 diabetic rats. Feyz, *Journal of Kashan University of Medical Sciences* 2020;24(2):160-169.
19. Sun M, et al. Ginsenoside Rg3 improves cardiac mitochondrial population quality: mimetic exercise training. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;441(1):169-174.
20. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009;122(20):3589-3594.
21. Li FH, et al. Cardiac basal autophagic activity and increased exercise capacity. *J Physiol Sci* 2018;68(6):729-742.
22. Lee Y, et al. Cardiac kintophagy coincides with activation of anabolic signaling. *Med Sci Sports Exerc* 2016;48(2):219-226.
23. Tian-Kui Ma, et al. Ursolic acid treatment alleviates diabetic kidney injury by regulating the ARAP1/AT1R signaling pathway. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2019;12:2597-2607.
24. Tang S, et al. Anti-obesity and anti-diabetic effect of ursolic acid against streptozotocin/high-fat-induced obese diabetic rats. *J Oleo Sci* 2022;71(2):289-300.
25. Abbassi-Daloui A. The effect of endurance training and L-Carnitine consumption on TNF-a and IL-1 β gene expression of heart tissue in wistar male rats following anabolic steroid consumption (Boldenone). *Journal of Advanced Biomedical Sciences* 2019;9(4):1903-12.
26. Khodadoust M, Habibian M. Investigating the changes of tumor necrosis factor-A and interleukin-10 after 8 weeks of regular Pilates exercise and vitamin D intake in overweight men: a randomized clinical trial. *Journal of Arak University of Medical Sciences* 2020;23(6):888-901.

Investigating the effect of aerobic training and Ursolic acid consumption on the expression of some genes of the sarcopenia and osteoporosis signaling pathways in type 2 diabetic model aged rats

Mohammad Hossein Rabbani
Ph.D. Student^{1*}
Parvin Farzanegi Ph.D.²
Mohammad Ali Azarbayjani
Ph.D.¹

1- Department of Sport Physiology,
Central Tehran Branch, Islamic
Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Sport Physiology,
Sari Branch, Islamic Azad
University, Sari, Iran.

* Corresponding author: Department of
Sport Physiology, Central Tehran
Branch, Islamic Azad University,
Tehran, Iran.
Tel: +98-21-22481622
E-mail: ml.rabbani60@gmail.com

Abstract

Received: 22 Jun. 2024 Revised: 05 Jul. 2024 Accepted: 13 Agu. 2024 Available online: 22 Agu. 2024

Background: Aerobic exercise and the consumption of certain supplements, such as ursolic acid, may reduce sarcopenia and osteoporosis by activating or inhibiting specific genes and signaling pathways. This study aimed to investigate the effects of aerobic exercise and ursolic acid supplementation on the expression of genes related to inflammatory and autophagy pathways in type 2 diabetes.

Methods: This experimental study was conducted from May 2023 to October 2023 at Islamic Azad University, Sari Branch. A total of 30 male Wistar rats (12 months old, mean weight 390 g) were randomly assigned to five groups: 1) healthy (normal), 2) diabetic, 3) diabetic+exercise, 4) diabetic+supplement, 5) diabetic+exercise+supplement. Diabetes was induced via intraperitoneal injection of streptozotocin (50 mg/kg body weight). The aerobic exercise protocol was performed five days a week for eight weeks. The supplement groups received a daily intraperitoneal injection of ursolic acid (250 mg/kg body weight).

Results: Data analysis showed that there was a statistically significant difference between the groups in the expression levels of LC3, Becline-1, TNF α , IL-1 β Akt, and FOXO3 genes ($P=0.000$). The results of the post hoc test also showed that the expression level of LC3, Becline-1, TNF α , IL-1 β genes in the model group increased significantly compared to the normal group ($P=0.000$). A significant difference was observed between intervention groups ($P<0.05$). The results of the follow-up test also showed that the level of expression of Akt genes in the model group was significantly decreased compared to the normal group ($P=0.000$). No significant difference was observed between intervention groups ($P<0.05$).

Conclusion: The results of the study showed that regular aerobic training and Ursolic acid consumption can affect inflammatory and autophagy pathways. These effects reduce cell atrophy through changes in some biological signals and help improve muscle function in type 2 diabetes. Therefore, aerobic training and Ursolic acid consumption can serve as an effective strategy for improving metabolic status and preventing cellular damage in this patient population.

Keywords: diabetes, cell atrophy, signaling pathway, sports training, ursolic acid.