

تمرین هوازی تناوبی و ماده مؤثر کرواتین مسبب بهبود مسیر سیگنالینگ آتوفازی بافت قلب موش‌های پیش‌دیابتی و دیابتی سالمند: یک مطالعه تجربی

ابوالحسن شریفی ریگی^۱، خسرو جلالی دهکردی^۲، محسن اکبرپور^۳، فرزانه تقیان^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: دیابت نوع دو با افزایش گلوکز سرم و اختلال در عملکرد انسولین همراه است. تمرینات ورزشی و مکمل کرواتین به عنوان دو عامل مؤثر در پیشگیری از عوارض دیابت نوع دو شناخته شده‌اند. هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تمرین هوازی و ماده مؤثر کرواتین بر مسیر سیگنالینگ آتوفازی بافت قلب موش‌های پیش‌دیابتی و دیابتی سالمند بود.

مواد و روش‌ها: در این کارآزمایی تجربی، ۴۵ سر موش نر c57bl6 سالمند دیابتی [تحت تزریق صفافی ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استروپتوزوتوسین (STZ یا Streptozotocin)] با سن ۱۴ تا ۱۶ هفته و وزن ۳۰ تا ۳۵ گرم به ۹ گروه شاهد سالم، پیش‌دیابتی، پیش‌دیابتی + تمرین هوازی، پیش‌دیابتی + کرواتین، پیش‌دیابتی + تمرین هوازی + کرواتین، دیابتی، دیابتی + تمرین هوازی، دیابتی + کرواتین، دیابتی + تمرین هوازی + کرواتین تقسیم شدند. تمرین هوازی تناوبی به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته اجرا گردید. موش‌ها ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز کرواتین به صورت تزریق صفافی دریافت کردند. میزان بیان Foxo3 و MuRF1 به روش Real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR) اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های تعقیبی Tukey و One Way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت ($P \leq 0/05$).

یافته‌ها: بیان ژن (ATG5) Autophagy-Related Gene 5 در گروه پیش‌دیابتی + تمرین هوازی + کرواتین و گروه دیابتی + تمرین هوازی + کرواتین به طور معنی‌داری بالاتر از سایر گروه‌ها بود ($P = 0/01$)؛ بیان ژن LC1 Light chain 1 در گروه پیش‌دیابتی + تمرین هوازی + کرواتین و گروه دیابتی + تمرین هوازی + کرواتین به طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر گروه‌ها گزارش گردید ($P = 0/01$). همچنین، انسولین و گلوکز در گروه پیش‌دیابتی + تمرین هوازی + کرواتین و گروه دیابتی + تمرین هوازی + کرواتین به طور معنی‌داری پایین‌تر از سایر گروه‌ها بود ($P = 0/05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرین هوازی تناوبی و کرواتین هم به تنهایی و هم به طور هم‌زمان، منجر به بهبود آتوفازی در بافت قلب موش‌های پیش‌دیابتی و دیابتی می‌شود. بنابراین، استفاده از تمرین هوازی تناوبی و کرواتین در شرایط پیش‌دیابت و دیابت سالمندی توصیه می‌شود.

کلید واژه‌ها: تمرین هوازی؛ کرواتین؛ آتوفازی؛ قلب؛ سالمند؛ پیش‌دیابت؛ دیابت

ارجاع: شریفی ریگی ابوالحسن، جلالی دهکردی خسرو، اکبرپور محسن، تقیان فرزانه. تمرین هوازی تناوبی و ماده مؤثر کرواتین مسبب بهبود مسیر سیگنالینگ آتوفازی بافت قلب موش‌های پیش‌دیابتی و دیابتی سالمند: یک مطالعه تجربی. پژوهش در علوم توانبخشی ۱۴۰۱؛ ۱۸: ۱۰۵۵-۱۰۶۸.

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۱

پروتئین‌ها و اندامک‌های آسیب دیده را برای تخریب به لیزوزوم انتقال دهند و انرژی تولید کنند (۲). آتوفازی پاسخی به فرایند آنابولیسی ساختن ماکرومولکول می‌باشد و به منظور حفظ هموستاز انرژی، تأمین‌کننده انرژی است. همچنین، یک فرایند کاتابولیک درون سلولی است که مواد سیتوپلاسمی به عنوان مثال مولکول‌های استفاده نشده و پاتوژن مهاجم را به صورت وابسته در لیزوزوم تخریب می‌کند. یکی از مسیرهای مهم در کاردیومیوپاتی قلبی، مسیر

مقدمه

کاردیومیوپاتی دیابتی (Cardiomyopathy) نوعی پدیده متمایز در ارتباط با اختلال عملکرد قلبی است که منجر به از دست دادن سلول‌های قلب و بیماری‌هایی مانند آترواسکلروز و پرفشاری خون می‌شود. با این حال، ساز و کار دقیق مرگ سلولی در کاردیومیوپاتی دیابتی هنوز مشخص نیست (۱). آتوفازی (Autophagy) فرایندی است که در آن وزیکول‌های با غشای دو لایه می‌توانند

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه قم، قم، ایران

نویسنده مسؤول: خسرو جلالی دهکردی؛ دانشیار، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

Email: khosrojalali@khuif.ac.ir

ابزاری نیرومند در درمان ناهنجاری‌های مرتبط با قلب در شرایط بالینی و تجربی گزارش شده است. همچنین، با توجه به ماهیت تمرینات ورزشی و چالش‌برانگیز بودن تأثیر آن در آتوفازی، به نظر می‌رسد استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در کنار تمرینات ورزشی، بتواند اثر مطلوب‌تری بر سلامت این افراد داشته باشد (۱۲). در این میان، زعفران (Saffron) و ترکیبات آن فعالیت‌های پزشکی-بیولوژیکی قابل توجهی را نشان داده‌اند؛ به طوری که گزارش شده است که ترکیبات مشتق شده از زعفران مانند کروستین (Crocetin)، با خاصیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی قوی و مهار اکسیداسیون لیپوپروتئین، اثرات قابل توجهی بر بیماری عروق کرونر قلب، کاهش فشار خون و بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی و سرطان دارد (۱۳). مشخص شده است که کروستین در هیپرتروفی قلبی القا شده با نوراپی‌نفرین، با مهار پراکسیداسیون چربی‌ها و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (Catalase)، سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase یا SOD) و گلوکاتاتیون پراکسیداز (GPx) یا (Glutathione peroxidase) اثر حفاظتی ایجاد می‌نماید (۱۴). بنابراین، با توجه به شیوع روزافزون بیماری دیابت و اثرات مضر آن بر سلامتی و بروز عوارض ناشی از آن و تأثیر مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی و نوع خاص فعالیت بدنی بر کنترل آن و با توجه به این که احتمالاً تحقیقات کافی در رابطه با اثر نوع تمرین و مصرف مکمل کروستین بر وضعیت آتوفازی کاردیومیوسیت موش‌های پیش‌دیابتی و دیابتی انجام نشده است، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی هوازی همراه با مصرف عصاره کروستین بر عوامل آتوفازی بافت قلب موش‌های پیش‌دیابتی و دیابتی سالمند انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نگهداری حیوانات آزمایشگاهی: در این کارآزمایی تجربی، ۴۸ سر موش نر c57b16 با محدوده سنی ۱۴ تا ۱۶ هفته و محدوده وزنی ۳۵-۳۰ گرم از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی مرکز رویان اصفهان تهیه گردید و پس از انتقال به آزمایشگاه تخصصی، به مدت یک هفته جهت سازگاری در این محیط نگهداری شدند. نکته قابل توجه این که در تمام دوره تحقیق، حیوانات در شرایط استاندارد شامل چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته، دمای محیط ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رصوبت نسبی ۵۵ درصد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند (۱۱). همچنین، تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات بر اساس معاهده Helsinki انجام شد و کد اخلاق IR.IAU.KHUISF.REC.1401.390 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خورسگان) اخذ گردید.

روش القای دیابت: موش‌های c57b16 سالمند پیش‌دیابتی در حالت ۱۲ ساعت ناشتا تحت تزریق صفاقی تک دز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استروپتوزوتوسین (Streptozotocin یا STZ) حل شده در بافر سیترات و موش‌های c57b16 سالمند دیابتی در حالت ۱۲ ساعت ناشتا تحت تزریق صفاقی تک دز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم STZ حل شده در بافر سیترات قرار گرفتند و چهار روز پس از تزریق، گلوکز خون موش‌ها با استفاده از گلوکومتر اندازه‌گیری شد. در مطالعه حاضر، موش‌های صحرایی با گلوکز خون بالای ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان موش‌های دیابتی شناخته خواهند شد (۱۵). لازم به ذکر است که ۳ سر موش صحرایی پس از القای دیابت به دلیل واکنش فردی به STZ تلف شدند و در نهایت، ۴۵ سر موش صحرایی وارد گروه‌های تحقیق شدند. ۴۵ سر موش صحرایی مبتلا به دیابت به طور تصادفی به گروه‌های پیش‌دیابتی،

LC3-1/ATG5 می‌باشد (۳). بیماری دیابت می‌تواند از طریق این مسیر، منجر به آتوفازی سلولی در سلول‌های قلب شود. یکی از پروتئین‌های کلیدی در بحث آتوفازی، پروتئین 5 Autophagy-Related Gene (ATG5) است (۴). این پروتئین در هسته‌سازی فاگوفر نقش دارد و یک پیش‌ساز غشایی فنجانی کوچک که با القای آتوفازی به عنوان بخشی از یک مجموعه غشایی پیچیده که ساختار پیش اتوفازوزومی (Pre-autophagosome یا PAS) نامیده می‌شود، تشکیل می‌دهد. PAS از پروتئین‌های آتوفازی فعال مرتبط با غشا از جمله بکلین (Beclin) تشکیل شده است (۵). ATG5 با ATG12 و ATG16 کمپلکسی را برای کاتالیز بستن 3-1 Light chain (LC3-I) و فسفوتیدیل اتانول آمین (Phosphatidylethanolamine) بر روی فاگوفر تشکیل می‌دهد و LC3-I را به LC3-II روی غشای فاگوفر تبدیل می‌کند. شواهد نشان می‌دهد که ATG5 در چندین بیماری انسانی از جمله کاردیومیوپاتی نقش دارد (۶). تغییر بیان ATG5 در بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی و دیابت نوع II یافت شده است و پلی‌مورفیسم‌های ATG5 با ایجاد بیماری عروق کرونر و انفارکتوس حاد میوکارد، بیماری‌های خودایمنی از جمله لوپوس و سرطان مرتبط است (۷). بیان بیش از حد ATG5 در موش‌ها، باعث فعال شدن آتوفازی، افزایش حساسیت به انسولین و در نهایت، افزایش طول عمر می‌شود. سرکوب قلبی ATG5، منجر به ایجاد یک کاردیومیوپاتی می‌شود که با فروپاشی میتوکندری، ساختار سارکومر بهم ریخته، افزایش ابعاد بطن چپ، و کاهش عملکرد قلب و مرگ زودرس مشخص می‌شود (۸). در واقع، آتوفازی شامل تشکیل وزیکول دو غشایی است که سیتوپلاسم و ارگانل‌ها را احاطه می‌کند و سپس با لیزوزوم ادغام می‌شود. بنابراین، محتوای لیزوزوم را تخریب می‌کند. حدود ۳۰ ژن ویژه آتوفازی را تنظیم می‌کنند که از بین این ژن‌ها، LC-1 نقش مهمی در آتوفازی پستانداران ایفا می‌کند و اغلب به عنوان نشانگر تشکیل اتوفازوزوم مورد استفاده قرار می‌گیرد که تعداد اتوفازوزوم‌های مشاهده شده در بافت به نوبه خود می‌تواند به عنوان مقیاس فعالیت اتوفازیک در نظر گرفته شود (۹).

Microtubule-associated proteins 1B (MAP1B-LC1) نقش محوری در تنظیم عملکرد Stx17 (Syntaxin 17) ایفا می‌کند و پیوندی بین Stx17 و میکروتوبول‌ها برای جلوگیری از ارتباط آن با ATG14L و تشکیل اتوفازوزوم در سلول‌های تغذیه شده فراهم می‌نماید. پلی‌پروتئین MAP1B نه تنها در سلول‌های عصبی، بلکه در سلول‌های غیر عصبی نیز بیان می‌شود (۱۰). Jafari و همکاران در پژوهش خود به بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید با و بدون تجویز کافئین بر بیان پروتئین‌های مرتبط با آتوفازی در موش‌های دیابتی پرداختند و به این نتیجه رسیدند که تمرین تناوبی می‌تواند به عنوان یک راهکار پیشگیرانه، باعث تعدیل آتوفازی میوکاردی ناشی از دیابت شود (۱۱). فعالیت بدنی که در مقابل بیماری‌های قلبی-عروقی راهحل کاربردی مناسبی به شمار می‌رود، باعث کاهش عوامل خطرزای قلبی، جلوگیری از تخریب میوکارد و افزایش عملکرد قلب می‌شود. در سال‌های اخیر، تمرینات ورزشی به عنوان یک مداخله ورزشی مؤثر شناخته شده است که می‌تواند منافع مشابه و بیشتری با شدت‌های متفاوت به همراه داشته باشد. همچنین، به عنوان محرکی قوی برای سازگاری‌های قلبی-عروقی محسوب می‌شود. فواید تمرین بر عوامل متابولیک، قلبی-عروقی، ضد التهابی و... موجب شده است که بسیاری از محققان، تمرین ورزشی را به عنوان ابزار غیر دارویی بسیار مهمی در پیشگیری و درمان بیماری‌های قلبی-عروقی پیشنهاد کنند. اثربخشی تمرینات ورزشی به عنوان

روش اندازه‌گیری مقادیر بیان *LC1* و *ATG5*: جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژنی *LC1* و *ATG5*، از روش Real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR) استفاده گردید (۴). بدین منظور، ابتدا ۵۰ میلی‌گرم بافت از قلب جدا و استخراج RNA از بافت‌ها در همه گروه‌های مورد بررسی طبق پروتکل شرکت سازنده (Qiagen، آلمان) انجام شد. برای اطمینان از کیفیت RNA، با استفاده از ژل آگارز الکتروفورز و با استفاده از خاصیت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه پیکو دراپ شرکت Sigma-Aldrich (آمریکا) صورت گرفت. علاوه بر این، برای بررسی کیفیت RNA، از فرمول $[C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \varepsilon \times d/1000]$ استفاده گردید. پس از سنتز cDNA با استفاده از پروتکل شرکت سازنده در کیت فرمنتاز (K1621) و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (جدول ۲) بر اساس راهنمای ژن‌های *LC1* و *ATG5* در سایت PubMed، واکنش رونویسی معکوس انجام گردید. به منظور تعیین کارایی و اختصاصی بودن پرایمرها، از پیش‌پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار موجود در سایت PubMed استفاده گردید. همچنین، جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژنی متغیرهای تحقیق با استفاده از ژن کنترل داخلی، TBP استفاده شد و پس از اطمینان از اتمام کار دستگاه Real-time PCR و پس از رسیدن نمونه‌ها به آستانه بیان (Cycle Threshold) جهت کمی‌سازی نسبت ژن مورد نظر به ژن مرجع، از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده گردید.

جدول ۱. برنامه تمرینات تناوبی هوازی

هفته	سرعت (متر در دقیقه)	مدت زمان (دقیقه)	تعداد روز
سازگاری	۷-۱۰	۱۰	۵
اول	۷، ۱۰، ۱۳، ۱۵، ۱۷	۱۰، ۳، ۱۹، ۳، ۱۰	۵
دوم	۷، ۱۰، ۱۲، ۱۵، ۱۳، ۱۰، ۷	۵، ۳، ۳، ۲۳، ۳، ۳، ۵	۵
سوم	۱۰، ۱۳، ۱۶، ۱۷، ۱۶، ۱۳، ۱۰	۵، ۳، ۳، ۲۳، ۳، ۳، ۵	۵
چهارم	۱۰، ۱۳، ۱۶، ۱۸، ۱۶، ۱۳، ۱۰	۵، ۳، ۳، ۲۳، ۳، ۳، ۵	۵
پنجم	۱۰، ۱۳، ۱۶، ۱۹، ۱۶، ۱۳، ۱۰	۵، ۳، ۳، ۲۳، ۳، ۳، ۵	۵
ششم	۱۰، ۱۳، ۱۶، ۲۰، ۱۶، ۱۳، ۱۰	۵، ۳، ۳، ۲۳، ۳، ۳، ۵	۵
هفتم	۱۰، ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۱، ۱۶، ۱۳، ۱۰	۵، ۳، ۳، ۲۰، ۳، ۳، ۵	۵
هشتم	۱۰، ۱۳، ۱۶، ۱۹، ۲۵، ۱۶، ۱۳، ۱۰	۵، ۳، ۳، ۲۰، ۳، ۳، ۵	۵

روش اندازه‌گیری انسولین و گلوکز سرمی: میزان غلظت انسولین (ab277390) به روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Abcam) به وسیله کیت Abcam و میزان غلظت گلوکز با استفاده از دستگاه گلوکومتر (Alpha TRAK، Zoetis) اندازه‌گیری شد.

پیش‌دیابتی + تمرین هوازی، پیش‌دیابتی + کروسستین، پیش‌دیابتی + تمرین هوازی + کروسستین، دیابتی + تمرین هوازی، دیابتی + کروسستین، دیابتی + تمرین هوازی + کروسستین تقسیم شدند. این نکته قابل ذکر است که جهت بررسی اثر القای پیش‌دیابت و دیابت، ۵ سر موش صحرایی سالم در گروه شاهد سالم قرار گرفتند (۱۱، ۶).

پروتکل تمرین تناوبی هوازی: گروه‌های تمرین پس از یک هفته آشناسازی با نوار گردان با سرعت ۷ تا ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، به منظور اندازه‌گیری حداکثر سرعت دویدن برای طراحی تمرین، یک آزمون وامانده‌ساز انجام دادند. برای به دست آوردن حداکثر سرعت دویدن موش‌های صحرایی، ابتدا به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵ متر بر دقیقه گرم کردند و در ادامه، به ازای هر سه دقیقه، یک متر بر دقیقه به سرعت آن‌ها افزوده شد تا به واماندگی برسند. واماندگی به حالتی اطلاق گردید که موش صحرایی دیگر قادر به دویدن بر نوار گردان نباشد و یا در یک دقیقه سه بار متوالی به انتهای نوار گردان برخورد نماید. هفته اول سازگاری تمرینی با سرعت ۷ تا ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه اجرا گردید. سپس در ادامه جهت انجام تمرین تناوبی هوازی شامل دویدن با تناوب سرعت متفاوت ۷، ۱۰، ۱۳، ۱۰، ۷ متر بر دقیقه در هفته اول و سرعت‌های ۱۰، ۱۳، ۱۶، ۱۹، ۲۵، ۱۶، ۱۳، ۱۰ متر بر دقیقه در هفته هشتم روی تردمیل بود. سرعت در طول تناوبی هوازی به تدریج از ۷ به ۲۵ متر در دقیقه طی هشت هفته افزایش یافت. تمرینات تناوبی هوازی برای هشت هفته به مدت پنج جلسه در هفته انجام گرفت و ۵ دقیقه در ابتدای تمرین برای گرم کردن و ۵ دقیقه در انتهای تمرین برای سرد کردن در نظر گرفته شد. شدت تمرین برای گرم کردن و سرد کردن معادل ۵۰ درصد حداکثر سرعت دویدن در نظر گرفته شد (جدول ۱) (۱۶).

مصرف کروسستین: مکمل کروسستین (شماره محصول: ۸۸۱-۶-۲۵۵) از شرکت Sigma-Aldrich (آمریکا) خریداری شد و روزانه ۳۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم به ازای وزن هر موش به صورت گاوآژ خورانه شد (۱۷).

تشریح و نمونه‌برداری: برای انجام تشریح و نمونه‌برداری، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و در حالت ۱۲ ساعت ناشتایی، موش‌های صحرایی با استفاده از ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کتامین و ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر زیلزین بیهوش شدند. جهت تشخیص بیهوشی، متخصصان آزمایشگاه از روش‌های آزمون درد استفاده نمودند و پس از اطمینان از بیهوشی کامل، حفره سینه‌ای موش‌ها شکافته شد و پس از کنار زدن سایر بافت‌ها و قطع شریان‌های ورودی و خروجی به قلب، بافت قلب موش‌ها به دقت استخراج و بلافاصله در تانک ازت غوطه‌ور گردید. در ادامه، بافت قلب تا زمان اندازه‌گیری متغیرها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول ۲. توالی پرایمر متغیرهای تحقیق

نام ژن	توالی پرایمر	دما (درجه سانتی‌گراد)
B2m	F: ACAGTTCCACCCGCCTCACATT R: TAGAAAGACCGAGTCCTTGCTGAAG	۶۰
Lc1	F: ATTGAGAAGTTGAAAGGAATCCATG R: GCCCAGTTCGTTTCAGTGCCA	۵۳
ATG5	F: CTTGCATCAAGTTCAGCTCTTCC R: AAGTGAGCCTCAACCGCATCCT	۵۸

مقدار در گروه‌های پیش‌دیابتی + تمرین هوازی ($P = 0/01$)، پیش‌دیابتی + کروستین ($P = 0/01$) و پیش‌دیابتی + تمرین هوازی + کروستین ($P = 0/01$) نسبت به گروه پیش‌دیابتی کاهش معنی‌داری را نشان داد. همچنین، افزایش معنی‌داری در مقادیر LC1 در گروه‌های دیابتی ($P = 0/01$) نسبت به گروه سالم مشاهده شد، اما در گروه‌های دیابتی + تمرین هوازی ($P = 0/01$)، دیابتی + کروستین ($P = 0/01$) و دیابتی + تمرین هوازی + کروستین ($P = 0/01$) نسبت به گروه دیابتی کاهش معنی‌داری وجود داشت (جدول ۴).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مصرف کروستین و تمرین هوازی، باعث کاهش معنی‌دار انسولین و گلوکز و کاهش بیان ژن‌های LC1 و ATG5 در گروه‌های پیش‌دیابتی و دیابتی شد و این کاهش در گروه مصرف هم‌زمان تمرین و مکمل کروستین، بیشتر بود. دیابت طیف دارایی وسیعی از عوارض است که مهم‌ترین آن‌ها، بیماری‌های قلبی-عروقی و کاردیومیوپاتی دیابتی (Diabetic cardiomyopathy) می‌باشد. نتایج مطالعات نشان داده است که برخی تغییرات مثبت در سبک زندگی مانند رژیم غذایی سالم و فعالیت ورزشی، می‌تواند ناهنجاری‌های وضعیت متابولیک مانند دیابت و عوارض آن را از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند آتوفاژی بهبود بخشد (۱۸). هدف از انجام تحقیق حاضر، تأثیر هشت هفته تمرین هوازی همراه با مصرف عصاره کروستین بر بر مسیرهای سیگنالینگ آتوفاژی بافت قلب موش‌های پیش‌دیابتی و دیابتی سالمند بود. با توجه به نتایج به دست آمده، دیابت ناشی از STZ، منجر به افزایش غلظت سرمی گلوکز و افزایش سطح انسولین شد. پس از هشت هفته درمان تمرین هوازی و کروستین، سطح گلوکز و انسولین در مقایسه با گروه سالم بهبود یافت. یکی از دلایل قابل قبول افزایش سطح گلوکز و انسولین در موش‌های دیابتی، می‌تواند مربوط به تخریب سلول‌های بتای پانکراس باشد. مکانیسم‌های ممکن برای کنترل گلوکز در پاسخ به تمرین هوازی شامل افزایش جذب گلوکز در عضلات اسکلتی به روش‌های وابسته به انسولین و مستقل از انسولین، افزایش تعداد ناقل گلوکز نوع ۴ (Glucose transporter type 4 یا GLUT-4) و افزایش فعالیت گلیکوزن سنتاز است (۱۹). علاوه بر این، نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که تمرین هوازی می‌تواند مقاومت به انسولین را در مدل‌های حیوانی کاهش دهد و متابولیسم گلوکز را در عضلات اسکلتی با کاهش توده چربی و افزایش فسفوریلاسیون پروتئین کیناز B (Protein kinase B یا AKT) بهبود بخشد (۲۰).

جهت بررسی طبیعی بودن توزیع یافته‌ها، از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد و در ادامه، با توجه به طبیعی بودن توزیع یافته‌ها، برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها، از آزمون One-Way ANOVA استفاده گردید. به منظور تعیین محل تفاوت بین گروه‌ها، از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. در نهایت، داده‌ها در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ (version 26, IBM Corporation, Armonk, NY) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج آزمون One-Way ANOVA نشان داد که تفاوت معنی‌داری در مقادیر گلوکز ($P = 0/01$)، انسولین ($P = 0/01$) و بیان ژن‌های ATG5 ($P = 0/01$) و LC1 ($P = 0/01$) در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت در گروه‌های مورد بررسی وجود داشت. بر اساس نتایج آزمون تعقیبی Tukey، مقادیر گلوکز و انسولین در گروه‌های پیش‌دیابتی ($P = 0/05$) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه سالم داشت، اما این مقادیر در گروه‌های پیش‌دیابتی + تمرین هوازی ($P = 0/05$)، پیش‌دیابتی + کروستین ($P = 0/05$) و پیش‌دیابتی + تمرین هوازی + کروستین ($P = 0/05$) نسبت به گروه پیش‌دیابتی کاهش معنی‌داری را گزارش کرد. همچنین، مقادیر گلوکز و انسولین در گروه‌های دیابتی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه سالم داشت ($P = 0/05$)، اما در گروه‌های دیابتی + تمرین هوازی ($P = 0/05$)، دیابتی + کروستین ($P = 0/05$) و دیابتی + تمرین هوازی + کروستین ($P = 0/05$) نسبت به گروه دیابتی کاهش معنی‌داری داشت (جدول ۳).

نتایج آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که مقدار ATG5 در گروه‌های پیش‌دیابتی ($P = 0/01$) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه سالم داشت، اما این میزان در گروه‌های پیش‌دیابتی + تمرین هوازی ($P = 0/01$)، پیش‌دیابتی + کروستین ($P = 0/01$) و پیش‌دیابتی + تمرین هوازی + کروستین ($P = 0/01$) نسبت به گروه پیش‌دیابتی افزایش معنی‌داری داشت. همچنین، مقدار ATG5 در گروه‌های دیابتی ($P = 0/01$) کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه سالم نشان داد، اما در گروه‌های دیابتی + تمرین هوازی ($P = 0/01$)، دیابتی + کروستین ($P = 0/01$) و دیابتی + تمرین هوازی + کروستین ($P = 0/01$) نسبت به گروه دیابتی افزایش معنی‌داری در میزان ATG5 مشاهده شد (جدول ۴).

بر اساس نتایج آزمون تعقیبی Tukey، مقادیر LC1 در گروه‌های پیش‌دیابتی ($P = 0/01$) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه سالم داشت، اما این

جدول ۳. میانگین گلوکز و انسولین در گروه‌های مورد بررسی

گروه	گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر)	مقدار P	انسولین (واحد بین الملل در میلی لیتر)	مقدار P
سالم	$95/4 \pm 4/1$	$< 0/05$	$0/59 \pm 0/09$	$< 0/05$
پیش‌دیابتی	$142/2 \pm 2/5$	$< 0/05$	$1/70 \pm 0/02$	$< 0/05$
پیش‌دیابتی + تمرین هوازی	$117/2 \pm 3/5$	$< 0/05$	$1/20 \pm 0/04$	$< 0/05$
پیش‌دیابتی + کروستین	$111/0 \pm 1/4$	$< 0/05$	$0/84 \pm 0/04$	$< 0/05$
پیش‌دیابتی + تمرین هوازی + کروستین	$98/5 \pm 0/7$	$< 0/05$	$0/84 \pm 0/25$	$< 0/05$
دیابتی	$310/2 \pm 10/0$	$< 0/05$	$5/20 \pm 0/12$	$< 0/05$
دیابتی + تمرین هوازی	$290/0 \pm 0/2$	$< 0/05$	$4/10 \pm 0/05$	$< 0/05$
دیابتی + کروستین	$281/5 \pm 2/1$	$< 0/05$	$3/80 \pm 0/04$	$< 0/05$
دیابتی + تمرین هوازی + کروستین	$246/6 \pm 1/6$	$< 0/05$	$2/80 \pm 0/11$	$< 0/05$

*معنی‌داری گروه‌ها با گروه شاهد در سطح ۰/۰۵
داده‌ها بر اساس میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است.

جدول ۴. میانگین بیان ژن‌های Foxo3 و Murf1 در گروه‌های مورد بررسی

گروه	بیان ژن LC1 (میانگین $\pm$ انحراف معیار)	مقدار P	بیان ژن ATG5 (میانگین $\pm$ انحراف معیار)	مقدار P
سالم	0.98 ± 0.01	< 0.01	0.98 ± 0.02	< 0.01
پیش‌دیابتی	5.50 ± 0.01	< 0.01	0.31 ± 0.01	< 0.01
پیش‌دیابتی + تمرین هوازی	3.60 ± 0.02	< 0.01	0.45 ± 0.01	< 0.01
پیش‌دیابتی + کرواتین	2.70 ± 0.01	< 0.01	0.52 ± 0.01	< 0.01
پیش‌دیابتی + تمرین هوازی + کرواتین	2.80 ± 0.02	< 0.01	0.71 ± 0.01	< 0.01
دیابتی	8.80 ± 0.07	< 0.01	0.11 ± 0.01	< 0.01
دیابتی + تمرین هوازی	6.20 ± 0.21	< 0.01	0.33 ± 0.01	< 0.01
دیابتی + کرواتین	4.38 ± 0.21	< 0.01	0.40 ± 0.01	< 0.01
دیابتی + تمرین هوازی + کرواتین	3.70 ± 0.04	< 0.01	0.61 ± 0.01	< 0.01

* معنی‌داری گروه‌ها با گروه شاهد در سطح ۰/۰۵

تغییرات عملکردی سیتوپلاسمی و جابه‌جایی Ca^{2+} نوکلئوپلاسمی با افزایش فعالیت کلسیم کالمدولین ۲ (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II یا CaMKII) و تنظیم رونویسی با واسطه Ca^{2+} همراه بود و منجر به مختل شدن ظرفیت ذخیره عملکردی قلب شد که مقدم بر ایجاد نارسایی قلبی در موش و انسان است (۲۶). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دیابت و پیش‌دیابت باعث افزایش LC1 در بافت قلب موش سالمند شد. همچنین، تمرین و مصرف کرواتین، منجر به کاهش LC1 شد. Gao و همکاران در مطالعه‌ای با بررسی ۳۶ موش نر اسپرادوگاولی در دو گروه شاهد و دیابتی شده ناشی از رژیم غذایی با چربی بالا به مدت شش هفته و تزریق درون صفاقی STZ (۳ میلی‌لیتر در کیلوگرم وزن بدن)، اظهار داشتند که ابتدا به دیابت با افزایش در شاخص‌های آتوفاژی مانند نسبت LC3-II به LC3-I، بکلین-۱، کاهش در پروتئین P62 و افزایش در فیروز (تنظیم مثبت کلاژن نوع I و III) همراه می‌باشد (۲۷). در تحقیق دیگری، Eldesoqui و همکاران اظهار نمودند که دیابت ناشی از تزریق STZ، باعث کاهش عملکرد دیاستولی می‌گردد؛ هرچند فعالیت مسیر آتوفاژیک قلب موش‌ها از طریق افزایش نسبت LC3-II به LC3-I نسبت به SQSTM1 به P62 و کاتپسین D، افزایش در واکوئل‌های آتوفاژیک و لیزوزوم‌ها قابل اندازه‌گیری بود. در حمایت از این مفهوم، نشان داده شده است که ابتدا به بیماری دیابت از طریق مهار مسیر پیام‌رسانی PI3K-Akt، باعث افزایش در میزان آتوفاژی می‌گردد؛ در حالی که محققان اشاره کرده‌اند که مسیر PI3K-Akt خود می‌تواند به عنوان هدف درمانی برای دیابت باشد (۲). در تناقض با یافته‌های پژوهش حاضر، Möller و همکاران گزارش کردند که ژن‌های مرتبط با آتوفاژی (P62/SQSTM1 و ATG14) و بیان پروتئین‌های LC-II و LC-I به Tg5 و عضلات اسکلتی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو کاهش قابل توجهی داشت (۲۸). علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مداخله تمرینات تداومی در موش‌های دیابتی، توانست دارای اثرات محافظتی و تقابلی در مواجهه با آتوفاژی بیش‌فعال در مقایسه با گروه شاهد دیابتی داشته باشد؛ به طوری که Fritzen و همکاران به دنبال بررسی پاسخ آتوفاژی به انجام فعالیت حاد باز کردن زانو بر روی پای تمرین کرده به مدت ۶۰ دقیقه به مدت ۸۰ درصد بار کاری اوج به کاهش در میزان لیپیداسیون LC3 به میزان ۵۰ درصد و کاهش در نسبت LC3-II به LC3I با کاهش در مقادیر اتوفاگوزوم‌ها در عضله پهن جانبی مردان سالم اشاره نمودند (۲۹). بیان بیش از حد MAP1B-LC1 از تشکیل ساختارهای LC3 مثبت جلوگیری کرد. همچنین، تعامل بین MAP1B-LC1 و Stx17 توسط

Behaein و همکاران دریافتند که تمرینات هوازی اینتروال، باعث بهبود سطح گلکوز و انسولین در موش‌های دیابتی نوع دو شد (۱۹). آتوفاژی یک سیستم دفاعی است که باز یافت اندامک‌های آسیب‌دیده و توده‌های پروتئینی را کنترل و هموستاز سلولی را حفظ می‌کند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دیابت و پیش‌دیابت، باعث کاهش ATG5 در بافت قلب موش سالمند و تمرین و مصرف کرواتین، باعث افزایش ATG5 شد که در کاهش بیماری‌های قلبی-عروقی نقش بسزایی دارد. پروتئین ATG5 به صورت کمپلکس با ATG7 در لیپیدی شدن LC3 و تکامل غشای اتوفاگوزوم نقش دارد (۲۱). به عبارت دیگر، افزایش بیان این پروتئین، نشان دهنده افزایش آتوفاژی است. افزایش بیان این ژن‌ها می‌تواند نشان دهنده افزایش فرایند آتوفاژی در بافت قلب بیماران مبتلا به پیش‌دیابت و دیابت نوع دو باشد. Zhang و همکاران در تحقیق خود، کاهش سطح پروتئین‌های LC3-II، ATG-5 و ATG-7 را در گروه دیابتی در مقایسه با گروه شاهد گزارش کردند (۲۲). بر اساس موارد گفته شده، عدم وجود یا نقص در فرایند آتوفاژی چالش‌برانگیز خواهد بود. پیشنهاد شده است که القای آتوفاژی مناسب ممکن است مرگ سلولی کاردیومیوسیت و کاردیومیوپاتی را کاهش دهد (۲۳). چندین پژوهش به نقش آتوفاژی در پاتوژنز نارسایی قلبی در بیماران مبتلا به دیابت با استفاده از دستکاری ژن، مداخلات دارویی و تغییر در سبک زندگی (رژیم غذایی و ورزش) پرداخته‌اند (۲۴، ۲۳). در مطالعه حاضر، نقش تمرین هوازی و کرواتین به عنوان تنظیم‌کننده‌های قابل قبول آتوفاژی در سطوح رونویسی ژن‌های کلیدی در آتوفاژی مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های به دست آمده نشان داد که تمرینات هوازی اثرات محافظتی بر Dilated cardiomyopathy (DCM) در موش‌های دیابتی دارد و بیان ژن‌های مرتبط با آتوفاژی را در مقایسه با گروه DC بهبود می‌بخشد. علاوه بر این، ورزش می‌تواند عامل محافظتی مفیدی باشد که سعی در حفظ هموستاز سلولی طبیعی دارد. کرواتین، متغیر مستقل دیگری که در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفت، به طور قابل توجهی سطوح رونوشت ژن‌های Beclin-1 و ATG-5 را در مقایسه با گروه DC بهبود بخشید. Zhang و همکاران سلول‌های پادوسیت و بافت کلیه موش‌های در معرض کورکومین را به مدت هشت هفته آنالیز کردند و دریافتند که کورکومین به طور قابل توجهی سطوح پروتئین Beclin-1 و ATG-5 و آتوفاژی را در سلول‌های پادوسیت موش‌های دیابتی افزایش داد (۲۵). نتایج تحقیقات پیشین، کاهش فراوانی میتوکندری و توانایی حفظ تعادل اکسیداسیون و کاهش را در کاردیومیوسیت‌های فاقد ATG-5 تحت استرس نشان می‌دهد.

موش‌های پیش‌دیابتی و دیابتی شد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از رساله مقطع دکتری تخصصی با کد اخلاق IR.IAU.KHUISF.REC.1401.390، مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) می‌باشد. بدین وسیله از همه عزیزانی که در اجرای این مطالعه همکاری نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

نقش نویسندگان

طراحی و ایده‌پردازی پژوهش: خسرو جلالی دهکردی، ابوالحسن شریفی ریگی، فرزانه تقیان، محسن اکبرپور
جذب منابع مالی برای انجام پژوهش: ابوالحسن شریفی ریگی
خدمات پشتیبانی و اجرایی و علمی پژوهش: ابوالحسن شریفی ریگی، خسرو جلالی دهکردی، فرزانه تقیان، محسن اکبرپور
فراهم کردن تجهیزات و نمونه‌های پژوهش: خسرو جلالی دهکردی، فرزانه تقیان، محسن اکبرپور، ابوالحسن شریفی ریگی
جمع‌آوری داده‌ها: ابوالحسن شریفی ریگی، خسرو جلالی دهکردی، فرزانه تقیان، محسن اکبرپور

تحلیل و تفسیر نتایج: خسرو جلالی دهکردی، ابوالحسن شریفی ریگی
خدمات تخصصی آمار: خسرو جلالی دهکردی، ابوالحسن شریفی ریگی
تنظیم دست‌نوشته: خسرو جلالی دهکردی، فرزانه تقیان، ابوالحسن شریفی ریگی، محسن اکبرپور
ارزیابی تخصصی دست‌نوشته از نظر مفاهیم علمی: خسرو جلالی دهکردی، ابوالحسن شریفی ریگی، فرزانه تقیان، محسن اکبرپور
تأیید دست‌نوشته نهایی جهت ارسال به دفتر مجله: خسرو جلالی دهکردی، ابوالحسن شریفی ریگی، فرزانه تقیان، محسن اکبرپور
مسئولیت حفظ یکپارچگی فرایند انجام مطالعه از آغاز تا انتشار و پاسخگویی به نظرات داوران: خسرو جلالی دهکردی، فرزانه تقیان، محسن اکبرپور، ابوالحسن شریفی ریگی

منابع مالی

پژوهش حاضر برگرفته از رساله مقطع دکتری تخصصی با کد اخلاق IR.IAU.KHUISF.REC.1401.390، مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) می‌باشد که بدون حمایت مالی انجام شده است.

تعارض منافع

نویسندگان دارای تعارض منافع نمی‌باشند.

فسفوریل‌اسیون - دفسفوریل‌اسیون تنظیم می‌شود. دیابت باعث جدا شدن LC1 از Stx17 و افزایش سریع آتوفاژی می‌شود (۳۰). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین و مصرف مکمل کروسیتین، باعث کاهش LC1 میوکاردی ناشی از دیابت شد. جعفری و همکاران در پژوهش خود به بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید با و بدون تجویز کافئین بر بیان پروتئین‌های مرتبط با آتوفاژی در موش‌های دیابتی پرداختند و دریافتند که تمرین تناوبی می‌تواند به عنوان یک راهکار پیشگیرانه، باعث تعدیل آتوفاژی میوکاردی ناشی از دیابت شود (۳۱). نتایج تحقیقات اخیر نشان داده است که فعالیت بدنی منظم نه تنها به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن کمک می‌نماید، بلکه سبب کاهش سطح استرس اکسیداتیو می‌گردد و شاید با کاهش میزان آپوپتوز، کمک زیادی به کاهش شدت این بیماری کند. از طرف دیگر، فعالیت ورزشی نه تنها باپوزن میتوکندری‌ها، بلکه حذف میتوکندری‌های ناقص و قدیمی را از طریق پویایی میتوکندری و آتوفاژی تحریک می‌کند (۳۲). کروسیتین با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی بالای خود، شرایط استرس اکسیداتیو و التهاب را کاهش می‌دهد و با مهار آپوپتوز، سبب بهبود این بیماری می‌گردد. به نظر می‌رسد که مصرف هم‌زمان کروسیتین و تمرینات ورزشی منظم و تداومی از طریق کاهش پراکسیداسیون چربی و فعالسازی دفاع آنتی‌اکسیدانی، از قلب در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (۳۳).

محدودیت‌ها

با توجه به نقش ایزوفرم‌های ATG5 و LC1 در آتوفاژی قلب و تأثیرپذیری آن‌ها در ورزش، می‌توان به عدم اندازه‌گیری ایزوفرم‌های مختلف و استفاده از روش‌های اندازه‌گیری متفاوت مانند Western blot و ELISA در مطالعات آینده اشاره کرد.

پیشنهادها

به منظور تکمیل پژوهش حاضر، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده آثار این دو مداخله بر بافت‌های دیگر موش همچون بافت‌های عضله، مغز و کبد بررسی شود. با توجه به این که نتایج تحقیق حاضر نشان داد تمرین تناوبی هوازی و کروسیتین موجب بهبود آتوفاژی در موش پیش‌دیابتی و دیابتی سالمند می‌شود، پیشنهاد می‌گردد جهت بهبود آتوفاژی قلب، از تمرین هوازی و مصرف کروسیتین هم به تنهایی و هم به طور هم‌زمان استفاده گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تجویز مکمل کروسیتین و تمرین تناوبی هوازی به مدت هشت هفته، باعث افزایش ATG5 و کاهش LC1 شد که تأییدی بر بهبود آتوفاژی قلب موش‌های پیش‌دیابتی و دیابتی سالمند می‌باشد. علاوه بر این، تجویز هم‌زمان تمرینات تناوبی هوازی و کروسیتین، بیشترین تأثیر را در کاهش آتوفاژی قلب داشت. در مجموع، مکمل کروسیتین با خواص آنتی‌اکسیدانی همراه با تمرین تناوبی هوازی، باعث بهبود آتوفاژی قلب در

References

- Jiang Y.J. Excessive ROS production and enhanced autophagy contribute to myocardial injury induced by branched-chain amino acids: Roles for the AMPK-ULK1 signaling pathway and $\alpha 7nAChR$. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 2020; 1867(1): 1-37.

2. Eldesoqui M, Eldken ZH, Mostafa SA, Al-Serwi RH, El-Sherbiny M, Elsherbiny N, Mohammedsahleh ZM, Sakr NH. Exercise augments the effect of SGLT2 inhibitor dapagliflozin on experimentally induced diabetic cardiomyopathy, possible underlying mechanisms. *Metabolites*. 2022; 12(7): 635.
3. Ljubojević-Holzer S, Kraler S, Djalalinac N, Abdellatif M, Voglhuber J, Schipke J, et al. Loss of autophagy protein ATG5 impairs cardiac capacity in mice and humans through diminishing mitochondrial abundance and disrupting Ca²⁺ cycling. *Cardiovascular Research*. 2022; 118(6): 1492-505.
4. Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015; 72(24): 4721-57.
5. Dong Y, Chen H, Gao J, Liu Y, Li J, Wang J. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2019; 136: 27-41.
6. Xu CN, Kong LH, Ding P, Liu Y, Fan ZG, Gao EH, Yang J, Yang LF. Melatonin ameliorates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by attenuating Atg5-dependent autophagy and activating the Akt/mTOR pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2020; 1866(10): 165848.
7. Xiao Y, Wu QQ, Duan MX, Liu C, Yuan Y, Yang Z, Liao HH, Fan D, Tang QZ. TAX1BP1 overexpression attenuates cardiac dysfunction and remodeling in STZ-induced diabetic cardiomyopathy in mice by regulating autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2018; 1864(5): 1728-43.
8. Pinto AP, da Rocha AL, Marafon BB, Rovina RL, Muñoz VR, da Silva LE, Pauli JR, de Moura LP, Cintra DE, Ropelle ER, da Silva AS. Impact of different physical exercises on the expression of autophagy markers in mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(5): 2635.
9. Wang L, Wang J, Cretoi D, Li G, Xiao J. Exercise-mediated regulation of autophagy in the cardiovascular system. *Journal of Sport and Health Science*. 2020; 9(3): 203-10.
10. Arasaki K, Nagashima H, Kurosawa Y, Kimura H, Nishida N, Dohmae N, Yamamoto A, Yanagi S, Wakana Y, Inoue H, Tagaya M. MAP1B-LC1 prevents autophagosome formation by linking syntaxin 17 to microtubules. *EMBO reports* 2018; 19(8): e45584.
11. Jafari A, Zarghami A, Nikokheslat S, Karimi P. Effect of eight-week high-intensity interval training (HIIT) along with caffeine injection on the levels of some myocardial autophagy-related proteins in diabetic rats. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*. 2020; 19(4): 183-94.
12. Wu NN, Tian H, Chen P, Wang D, Ren J, Zhang Y. Physical exercise and selective autophagy: benefit and risk on cardiovascular health. *Cells*. 2019; 8(11): 1436.
13. Su X, Yuan C, Wang L, Chen R, Li X, Zhang Y, et al. The beneficial effects of saffron extract on potential oxidative stress in cardiovascular diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021; 19: 1-14.
14. Guo ZL, Li MX, Li XL, Wang P, Wang WG, Du WZ, Yang ZQ, Chen SF, Wu D, Tian XY. Crocetin: a systematic review. *Frontiers in Pharmacology*. 2022; 12: 745683.
15. Hasanazadeh Dolatabadi F, Jalali Dehkordi KH, Taghian F, Hoseini SA. The effect of eight weeks of aerobic training with Propolis on some mitochondrial biogenesis markers in cardiac tissue of ovariectomized diabetic rats. *Armaghane Danesh*. 2022; 27(2): 155-69.
16. Haghparast Azad M, Niktab I, Dastjerdi S, Abedpoor N, Rahimi G, Safaiejad 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. *Nutrition & metabolism*. 2022; 19(1): 17.
17. Zhang J, Wang Y, Dong X, Liu J. Crocetin attenuates inflammation and amyloid- β accumulation in APPsw transgenic mice. *Immunity & Ageing*. 2018; 15(1): 1-8.
18. Lee Y, Kwon I, Jang Y, Song W, Cosio-Lima LM, Roltsch MH. Potential signaling pathways of acute endurance exercise-induced cardiac autophagy and mitophagy and its possible role in cardioprotection. *The Journal of Physiological Sciences*. 2017; 67(6): 639-54.
19. Behaein B, Abednatanzi H, Gholami M, Ghazalian F. Apoptotic changes of cardiac tissue after HIIT and thyme honey in type 2 diabetic rats. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2022; 9(2): 23-36. [In Persian].
20. Sherafati-Moghadam M, Pahlavani HA, Daryanoosh F, Salesi M. The effect of high-intensity interval training (HIIT) on protein expression in Flexor Hallucis Longus (FHL) and soleus (SOL) in rats with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2022; 21(2): 1499-508.
21. Forte M, Frati G, Sciarretta S. Regulation of calcium handling by autophagy: A novel mechanism limiting cardiac hypertrophy and dysfunction? *Cardiovascular Research*. 2022; 118(6): 1377-9.
22. Zhang L, Ding WY, Wang ZH, Tang MX, Wang F, Li Y, et al. Early administration of trimetazidine attenuates diabetic cardiomyopathy in rats by alleviating fibrosis, reducing apoptosis and enhancing autophagy. *Journal of Translational Medicine*. 2016; 14(1): 1-12.
23. Miyamoto S. Autophagy and cardiac aging. *Cell Death & Differentiation*. 2019; 26(4): 653-64.
24. Shi S, Jiang P. Therapeutic potentials of modulating autophagy in pathological cardiac hypertrophy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022; 156: 113967.
25. Zhang P, Fang J, Zhang J, Ding S, Gan D. Curcumin inhibited podocyte cell apoptosis and accelerated cell autophagy in diabetic nephropathy via regulating Beclin1/UVRAG/Bcl2. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2020; 13: 641

26. Ljubojević-Holzer S, Kraler S, Djalalinac N, Abdellatif M, Voglhuber J, Schipke J, Schmidt M, Kling KM, Franke GT, Herbst V, Zirlik A. Loss of autophagy protein ATG5 impairs cardiac capacity in mice and humans through diminishing mitochondrial abundance and disrupting Ca²⁺ cycling. *Cardiovascular Research* 2022; 118(6): 1492-505.
27. Gao H, Yang Q, Dong R, Hou F, Wu Y. Sequential changes in autophagy in diabetic cardiac fibrosis. *Molecular Medicine Reports* 2016; 1; 13(1): 327-32.
28. Møller AB, et al. Altered gene expression and repressed markers of autophagy in skeletal muscle of insulin resistant patients with type 2 diabetes. *Scientific reports*. 2017; 7: 43775.
29. Fritzen AM, et al. Regulation of autophagy in human skeletal muscle: effects of exercise, exercise training and insulin stimulation. *The Journal of Physiology*. 2016; 594(3): 745-61.
30. Arasaki K, Nagashima H, Kurosawa Y, Kimura H, Nishida N, Dohmae N, Yamamoto A, Yanagi S, Wakana Y, Inoue H, Tagaya M. MAP1B-LC1 prevents autophagosome formation by linking syntaxin 17 to microtubules. *EMBO Reports*. 2018; 19(8): e45584.
31. Jafari A, Zarghami A, Nikokheslat S, Karimi P. Effect of eight-week high-intensity interval training (HIIT) along with caffeine injection on the levels of some myocardial autophagy-related proteins in diabetic rats. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*. 2020; 19(4): 183-94.
32. Gharib MH, Samani KG, ZarrinĀbadi Z, Mokhtari M, Heydarian E. Effect of resveratrol supplementation on antioxidant parameters, lipids profile and several biochemical indices in type 2 diabetic patients: A double-blind randomized-controlled clinical trial. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2018; 12(4): 33-42.
33. Cerdá-Bernad D, Valero-Cases E, Pastor JJ, Frutos MJ. Saffron bioactives crocin, crocetin and safranal: Effect on oxidative stress and mechanisms of action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2022; 62(12):3232-49.

Periodic Aerobic Exercise and the Active Compound Crocetin Causing Improvement in Autophagy Signaling Pathways in Cardiac Tissue of Aged Pre-Diabetic and Diabetic Mice: An Experimental Study

Abolhasan Sharifi-Rigi¹, Khosro Jalali-Dehkordi², Mohsen Akbarpour-Beni³, Farzaneh Taghian²

Original Article

Abstract

Introduction: Type 2 diabetes is characterized by elevated serum glucose and impaired insulin function. Exercise and crocetin supplement are known as two effective factors in preventing the complications of type 2 diabetes. The present study investigated the effects of aerobic exercise and the effective compound crocetin on the autophagy signaling pathway in a heart tissue experimental model of elderly pre-diabetic and diabetic mice.

Materials and Methods: In this experimental study, 45 elderly male and female c57bl6 mice with diabetes [40 mg/kg peritoneal injection of streptozotocin (STZ)] aged 14-16 weeks and weighing 30-35 grams were randomly divided into 9 healthy control, pre-diabetic, pre-diabetic + aerobic exercise, pre-diabetic + crocetin, pre-diabetic + aerobic exercise + crocetin, diabetic, diabetic + aerobic exercise, diabetic + crocetin, and diabetic + aerobic exercise + crocetin groups. Interval aerobic training was performed for eight weeks, five sessions per week. Mice received crocetin 30 mg/kg/day by peritoneal injection. Autophagy-related gene 5 (ATG5) and light chain 1 (LC1) expression levels were measured by real-time polymerase chain reaction (PCR). To analyze the data, one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test were used ($P \leq 0.05$).

Results: The expression of ATG5 in the pre-diabetes group + aerobic exercise + crocetin supplement and the diabetes group + aerobic exercise + crocetin supplement was significantly higher than that in other groups ($P = 0.01$). LC1 gene expression in the pre-diabetes group + aerobic exercise + crocetin supplement and the diabetes group + aerobic exercise + crocetin supplement was significantly lower than that in other groups ($P = 0.01$). Moreover, the insulin and glucose levels in the pre-diabetes group + aerobic exercise + crocetin supplement and the diabetes group + aerobic exercise + crocetin supplement were significantly lower than those in the other groups ($P = 0.01$).

Conclusion: It seems that interval aerobics and crocetin are effective, alone and synergistically, in improving autophagy in heart tissue in pre-diabetic and diabetic mice. Therefore, the use of periodic aerobic exercise and crocetin is recommended in senile pre-diabetes and diabetes.

Keywords: Aerobic exercise; Crocetin; Autophagy; Heart; Elderly; Pre-diabetes; Diabetes

Citation: Sharifi-Rigi A, Jalali-Dehkordi K, Akbarpour-Beni M, Taghian F. **Periodic Aerobic Exercise and the Active Compound Crocetin Causing Improvement in Autophagy Signaling Pathways in Cardiac Tissue of Aged Pre-Diabetic and Diabetic Mice: An Experimental Study.** J Res Rehabil Sci 2022; 18.

Received date: 02.03.2022

Accept date: 02.06.2022

Published: 06.03.2023

1- PhD Student, School of Physical Education and Sport Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, School of Physical Education and Sport Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Sports Science, School of Literature and Humanitie, University of Qom, Qom, Iran

Corresponding Author: Khosro Jalali-Dehkordi; Associate Professor, School of Physical Education and Sport Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran; Email: khosrojaleali@khuif.ac.ir