

## The effect of aerobic exercise along with resveratrol supplementation on myocardial AMPK and MAFbx gene expression of diabetic rats

Bentollhoda Esmailee<sup>1</sup>, Ahmad Abdi<sup>2</sup>, Asieh Abbassi Daloii<sup>3</sup>, Parvin Farzanegi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Ph.D. Candidate in Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, I. R. Iran.

<sup>2</sup> Corresponding author; Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

Tel: +981143217126 Fax: +981143217009 Email: a.abdi58@gmail.com

<sup>3</sup> Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

<sup>4</sup> Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.



**Citation:** Esmailee B, Abdi A, Abbassi Daloii A, Farzanegi P. [The effect of aerobic exercise along with resveratrol supplementation on AMPK and MAFbx gene expression of myocardial diabetic rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2020; 27(2): 150-60. [Persian]

**DOI:** <http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.2.103>

**Received:** December 9, 2019

**Accepted:** January 25, 2020

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Diabetes is a metabolic disease that is associated with heart injury. It has been shown that exercise training and resveratrol can improve the cardiac structure and function of diabetic subjects. The aim of the present study was to examine the effect of aerobic training along with resveratrol on gene expression of AMPK and MAFbx on myocardial AMPK and MAFbx gene expression of diabetic rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 40 males Wistar rats were randomly divided into 5 groups: control (CN), diabetes (DM), diabetes-Resveratrol (RDM), diabetes-aerobic exercise (TDM), diabetes-aerobic exercise-Resveratrol (RTDM). Training groups have performed a running program on the treadmill for 8 weeks. Resveratrol (20 mg/kg) was injected subcutaneously 8 weeks for RDM and TRDM groups. 48 hours after the last training session, rats were anesthetized. Changes in the expression of AMPK and MAFbx myocardial genes were quantified using real-time PCR methods.

**Results:** The results of the present study showed a reduction in AMPK expression ( $P < 0.001$ ) and an increase in MAFbx ( $P < 0.001$ ) in cardiomyocytes in DM groups compared to CN group.

AMPK expression was significantly increased in TRDM group compared to DM ( $p=0.009$ ), RDM ( $p=0.011$ ) and TDM ( $p=0.043$ ) groups. MAFbx expression of cardiomyocytes in RDM ( $p=0.012$ ), TDM ( $p<0.001$ ) and TRDM ( $p<0.001$ ) groups had significantly reduction compared to DM group. Also, MAFbx expression was significantly reduction in TRDM groups compared to RDM ( $p=0.041$ ) groups.

**Conclusion:** Long-term aerobic exercise, with and without resveratrol consumption it may cause to reduce the genomic indicators of atrophy and increase myocardial hypertrophy in diabetic rats.

**Key Words:** AMPK; Diabetic Rats; Exercise; MAFbx; Resveratrol

## اثر تمرین هوایی همراه با مکمل رزوراترول بر بیان ژن‌های MAFbx و AMPK میوکارد موش‌های صحرایی دیابتی

بنت‌الهدی اسماعیلی<sup>۱</sup>, احمد عبدی<sup>۲</sup>, آسیه عباسی دلویی<sup>۳</sup>, پروین فرزانگی<sup>۴</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** دیابت یکی از بیماری‌های متابولیکی است که با آسیب قلبی همراه است. نشان داده شده است که فعالیت ورزشی و رزوراترول باعث بهبود ساختار و عملکرد قلب آزمودنی‌های دیابتی می‌شود. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تمرین هوایی همراه با مصرف رزوراترول بر بیان ژن‌های MAFbx و AMPK بافت قلب مدل تجربی دیابت بود.

**روش تحقیق:** در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار، به طور تصادفی به ۵ گروه کنترل (CN)، دیابت (DM)، دیابت-رزوراترول (RDM)، دیابت-تمرین هوایی (TDM)، دیابت-تمرین هوایی-رزوراترول (RTDM) تقسیم شدند. گروه‌های TRDM و RDM به مدت ۸ هفته، برنامه تمرینی دویلن را روی ترمیمی انجام دادند. رزوراترول (۲۰ mg/kg) برای گروه‌های DM و RDM به مدت ۸ هفته به طور زیر جلدی تزریق شد. پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها بیهود و تغییرات کمی بیان ژن‌های MAFbx و AMPK میوکارد به روش Real Time PCR بررسی گردید.

**یافته‌ها:** نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده کاهش بیان AMPK (P<0.001) MAFbx (P<0.001) و افزایش (P=0.001) کاردیومیوسیت‌ها در گروه‌های DM نسبت به گروه CN بود. بیان AMPK در گروه TRDM نسبت به گروه‌های DM (P=0.009)، RDM (P=0.011) و TDM (P=0.043) افزایش معنی‌داری داشت. بیان MAFbx کاردیومیوسیت‌ها در گروه‌های RDM (P=0.012)، TRDM (P<0.001) و DM (P<0.001) نسبت به گروه TRDM کاهش معنی‌داری داشت؛ همچنین بیان MAFbx در گروه‌های DM نسبت به گروه RDM (P=0.041) نیز کاهش معنی‌داری داشت.

**نتیجه‌گیری:** تمرین طولانی مدت هوایی، با و بدون مصرف رزوراترول احتمالاً می‌تواند سبب کاهش شاخص‌های ژنومی آتروفی و افزایش هیپرتروفی میوکارد موش‌های صحرایی دیابتی شود.

واژه‌های کلیدی: AMPK؛ موس‌های صحرایی دیابتی؛ تمرین؛ رزوراترول؛ MAFbx.

محله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۹: ۲۷: ۱۵۰-۱۶۰.

پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۰۵

دراخیافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۸

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

<sup>۲</sup> نویسنده مسؤول؛ گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

آدرس پست: آمل- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد آیت الله آملی- گروه فیزیولوژی ورزشی  
تلفن: +۹۸۱۱۴۳۲۱۷۱۲۶ نمبر: +۹۸۱۱۴۳۲۱۷۰۰۹ پست الکترونیکی: a.abdi58@gmail.com

<sup>۳</sup> گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

<sup>۴</sup> گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

## مقدمه

پروتئین MuRF1<sup>۶</sup> که در آتروفی عضلانی اسکلتی نقش دارند، در افراد دیابتی افزایش می‌یابد. پروتئین آتروفی عضلانی MAFbx/Atrogin-1 مسئول تخریب پروتئین‌های تعديل‌کننده یوبیکوتین می‌باشد (۷). بیان بیش از حد فیزیولوژیک در شرایط *in vivo* می‌شود (۸). مطالعات نشان داده است موش‌های فاقد MAFbx/Atrogin-1 در برابر آتروفی مقاوم هستند، در حالی که بیان بیش از حد MAFbx/Atrogin-1 در میوتوبول‌ها منجر به آتروفی می‌شود (۶). افزایش رونویسی MAFbx/Atrogin-1 در مدل‌های مختلف آتروفی از قبیل بی‌تحرکی، دیابت، روزه‌داری و نارسایی‌های کلیوی مشاهده شده است (۶).

در حال حاضر روش‌های درمان آتروفی عضلانی ناشی از دیابت، استفاده از داروهای استاندارد دیابتی، رژیم غذایی، فعالیت‌های ورزشی و داروهای هورمونی است. اثر فعالیت‌های ورزشی هوایی بر کاهش توده عضلانی ناشی از سن به خوبی شناخته شده است. مطالعات محدودی به بررسی اثر تمرین هوایی بر سلامت عضلات بهویژه تجزیه پروتئین عضلانی بافت قلب در مدل‌های دیابتی پرداخته‌اند. Liu و همکاران نشان دادند که فعالیت ورزشی باشد متوجه اثرات SIRT1-AMPKα-PGC1α<sup>۷</sup>، آتروفی ناشی از دیابت SIRT1 را در موش‌های db/db کاهش می‌دهد (۹). اثرات SIRT1 بر نقش مهمی در هموستاز گلوکز و حساسیت به انسولین در کبد و عضلات دارد. به نظر می‌رسد اثرات SIRT1 بر سازگاری‌های متابولیکی از طریق PGC1α تعديل می‌شود (۱۰). همچنین فعال شدن AMPK منجر به افزایش بیان PGC-1α MAFbx می‌شود. AMPK به فعالیت PGC-1α نیاز دارد تا بتواند بیان چند عامل کلیدی را در متابولیسم گلوکز کنترل کند (۱۰). تمرین هوایی باعث تنظیم کاهشی بیان MuRF1 می‌شود؛ با این حال، مکانیزم تمرین ورزشی بر مسیرهای

کاردیومیوپاتی دیابتی (DCM)<sup>۱</sup>، یک آسیب جدی بطن قلبی ناشی از دیابت<sup>۲</sup> (DM) است، که مستقل از سایر بیماری‌ها مانند بیماری‌های قلبی-عروقی و فشار خون بالا می‌باشد. ویژگی این بیماری اختلال در عملکرد سیستولی و دیاستولی بطن چپ است (۱)، و در صورتی که درمان نشود منجر به نارسایی قلبی (HF<sup>۳</sup>) می‌شود. طیف گسترده‌ای از عوامل در پیشرفت DCM درگیر می‌باشد که شامل: مقاومت به انسولین، هیپرگلیسمی (که منجر به اختلالات در تجزیه اسیدهای چرب آزاد و تنظیم کلسیم می‌شود)، هیپرتروفی و فیبروز است (۱). اختلال در متابولیسم قلبی، از عوامل مهم تأثیرگذار بر پاسخ هیپرتروفی است و در واقع اختلال متابولیک، عامل اصلی اختلالات ساختاری و عملکرد عضلات قلب است (۲) که AMPK<sup>۴</sup> نقش مهمی در این فرآیند پیچیده ایفا می‌کند. گفته شده است که AMPK نقش مهمی در هیپرتروفی قلبی دارد (۳). پیش‌نیازهای اصلی برای شروع و گسترش هیپرتروفی قلبی؛ رشد سلول، سنتز پروتئین، رونویسی از ژن‌های مربوط به هیپرتروفی، تقویت اسکلت سلولی و گسترش سارکومر است، و برای این فرآیندهای آنابولیک انرژی زیادی لازم است که همه این عوامل با AMPK در ارتباط می‌باشد (۴). Daniels و همکاران نشان دادند که بین فعالیت پایین AMPK، کارآیی پایین متابولیسم قلبی و کاهش قدرت انقباضی قلب در موش‌های db/db (یک مدل 2 DM)، ارتباط وجود دارد (۵). محققین معتقدند که دیابت بر فعل شدن AMPK تأثیر گذاشته، که به نوبه خود بر ظرفیت تولید انرژی قلب اثر منفی داشته و منجر به کاهش عملکرد انقباضی می‌شود. همچنین پروتئین آتروفیک Atrogin-1<sup>۶</sup> که به عنوان MAFbx نیز شناخته می‌شود و

<sup>1</sup> Diabetic cardiomyopathy

<sup>2</sup> Diabetes mellitus

<sup>3</sup> Heart failure

<sup>4</sup> AMP-activated protein kinase

<sup>5</sup> muscle atrophy F-box

<sup>6</sup> Muscle RING-finger protein 1

<sup>7</sup> Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

ساری (کد IR.IAU.SARI.REC.1397.011) رعایت و تأیید شد. پس از انتقال موش‌های صحرایی به آزمایشگاه، القای دیابت و آشنایی با فعالیت ورزشی روی تردمیل مخصوص جوندگان، موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. گروه‌های مورد مطالعه در این پژوهش شامل: کنترل- سالم (CN)، دیابت (DM)، دیابت-رزوراترول (RDM)، دیابت-تمرين هوازی (TDM)، دیابت-تمرين هوازی-رزوراترول (RTDM) بودند. موش‌های گروه تمرين، یک برنامه هشت‌هفت‌های (۵ روز هفته) تمرين هوازی را اجرا کردند، در حالی که دیگر موش‌ها در هیچ برنامه تمرينی شرکت نداده نشدند.

#### روش القای دیابت:

در این مطالعه، موش‌ها با استفاده از داروی استرپتوزتوسین<sup>۳</sup> (شرکت سیگما آلمان) دیابتی شدند. القای دیابت، با تزریق تک دوز ۵۰ ml/kg استرپتوزتوسین حل شده در بافر سدیم‌سیترات ۱٪ مولار با pH ۴/۵ برابر با ۰/۱ مولار با خصائص دیابتی بودن موش‌ها، ۵ روز پس از تزریق با ایجاد جراحت کوچک توسط لانست در دم حیوان، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و مقدار قند خون اندازه‌گیری گردید که قند خون ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، حاکی از دیابتی شدن آنها بود. در ضمن میانگین قند خون به دست‌آمده در گروه دیابتی ۱۵/۱۹ ± ۰/۲۴ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود.

#### پروتکل تمرين:

در جدول شماره ۱ پروتکل تمرين هوازی برای موش‌های صحرایی دیابتی نشان داده شده است. قبلاً از شروع تمرين اصلی و به منظور آشنایی با چگونگی فعالیت توسط تردمیل (شرکت تجهیز گستر امید ایرانیان، مدل ۲۰۱۶، ساخت ایران)، موش‌های صحرایی گروه‌های تمرين و گروه مکمل-تمرين در یک هفته طی پنج جلسه، به مدت پنج

سیگنانالینگ آتروفی در دیابت همچنان ناشناخته است. علاوه بر این، رزوراترول اثرات محافظتی بر تحلیل عضلات در شرایط کاتابولیک دارد (۱۱). مطالعات نشان داده‌اند که رزوراترول اثرات خود را با مهار بیان<sup>۱</sup> NF-κB<sup>۲</sup> و MuRF1<sup>۳</sup> (یکی دیگر از پروتئین آتروفی عضلانی) انجام می‌دهد (۱۲). همچنین رزوراترول باعث تنظیم شاخص‌های التهابی و آتروفی می‌شود (۱۱). در موش‌های دیابتی، رزوراترول باعث افزایش حساسیت به انسولین، افزایش AMPK و فعالیت SIRT1 شده و سیتوکین‌های التهابی را کاهش می‌دهد (۱۲). در این پژوهش سعی شد تا به طور همزمان، اثر تمرين هوازی همراه با مکمل رزوراترول بر بیان AMPK و MAFbx کار迪ومیوسیت‌های موش‌های صحرایی دیابتی بررسی گردد.

## روش تحقیق

#### نمونه‌ها:

در این پژوهش تجربی، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر هشت هفته‌ای از نژاد ویستار به عنوان نمونه انتخاب و به مرکز پژوهش منتقل شدند. حجم نمونه مطالعه حاضر بر اساس نتایج تحقیقات پیشین (۳)، در سطح معنی‌داری ۵ درصد (خطای نوع اول) و توان آماری ۹۵ درصد (خطای نوع دوم) و با استفاده از نرم‌افزار Medcalc 18.2.1 (۸ سر موش در هر گروه) تعیین شد. معیار خروج از مطالعه، عدم اجرای پروتکل تمرينی، مصرف نکردن مکمل، و آسیب حین اجرای تمرين بود.

حیوانات در دمای ۲۲ ± ۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ ± ۵ درصد و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲: ۱۲ ساعته نگهداری شدند و در تمام مدت، آب و غذا (به صورت پلت) به اندازه کافی و آزادانه دریافت کردند. موازین اخلاقی کار با حیوانات مطابق دستورالعمل کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی واحد

<sup>1</sup> Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

<sup>2</sup> Muscle RING-finger protein-1

<sup>3</sup> Streptozotocin

مشابه و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتابی) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین (Ketamine) (۶۰ mg/kg) و زایلازین (Xylazine) (۵ mg/kg) بیهوش شدند. بافت مورد نظر بالافاصله پس از جداسازی و شست و شو با سالین فوراً در تیوب‌های حاوی RNA later برای جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شد و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری گردید. برای جلوگیری از تأثیر آهنگ شبانه‌روزی، نمونه‌گیری از ساعت ۸ آغاز و ۱۱:۳۰ به اتمام رسید. برای بررسی بیان AMPK و MAFbx در هر گروه، از تکنیک Real Time PCR استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج و به cDNA تبدیل گردید؛ در نهایت cDNA به روش PCR تکثیر شد و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت.

**روش اندازه‌گیری بیان AMPK و MAFbx:**  
طراحی و آماده‌سازی پرایمر: جدول ۲ الگوی پرایمر را نمایش می‌دهد. پرایمرهای ژن‌ها به همراه یک ژن کنترل یا glyceraldehyde 3-phosphate (GAPDH) رفرانس (dehydrogenase سیناکلون (Sinaclon) (Sequence) سفارش داده شد.

جدول ۱- پروتکل تمرینی هوایی برای موش‌های صحرایی

دقیقه با سرعت ۸-۱۰ متر بر دقیقه با شبیه صفر فعالیت داشتند. برنامه تمرین اصلی که هشت هفته به طول انجامید، بدین صورت انجام شد که در هفته آغازین با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه، زمان ۵ دقیقه شروع و هر جلسه به سرعت، ۱-۲ متر بر دقیقه و به زمان نیز ۲-۴ دقیقه افزوده می‌شد، به طوری که در هفته چهارم سرعت به ۲۰ متر بر دقیقه و زمان ۶۰ دقیقه رسید. شدت و زمان تمرین تا هفته آخر ثابت ماند (۱۳). همچنین پنج دقیقه قبل و بعد از تمرین، برای گرم و سرد کردن حیوانات در نظر گرفته شد.

#### نحوه مصرف رزوراترول:

میزان یک گرم پودر رزوراترول (شرکت Nutrabio آمریکا، با درجه فارماکولوژی و خلوص ۹۹/۸۷ درصد) با غلظت ۱۰ mg/ml به عنوان استوک ساخته شد. برای هر بار تجویز رزوراترول، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷ درصد یا ۱۰ درصد در آب بهازای هر موش صحرایی تهیه و رزوراترول را در آن معلق نموده و تجویز شد. برای کاهش درصد خطای کلیه آزمودنی‌ها محلول به صورت یک جا تهیه شد و در گروه‌های RDM و TRDM با دوز ۲۰ mg/kg (رأس ساعت ۹ صبح) به صورت درون‌صفاقی به مدت ۵ روز در هفته به طول ۸ هفته تزریق شد (۱۴).

#### روش نمونه‌گیری از بافت قلب:

پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً

جدول ۲- الگوی پرایمر AMPK و MAFbx و ژن کنترل داخلی

Genes	Sequence (5' → 3')
F AMPK	TGT GTT CAA AGT CTG CTG CC
R AMPK	ACG CTG TAA GGT CTG GTC AA
F MAFbx	AGGGCAGGTGGATTGGAAGAAGA
R MAFbx	GTTGGGTGAAAGTGAGACGGAG
F GAPDH	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG
R GAPDH	CATACTCAGCACCAGCATCACC

محاسبه تغییرات بیان ژن‌ها با  $\Delta\text{ct}$ ، برای کمی‌کردن نتیجه حاصل از تغییرات  $\text{ct}$  نمونه‌ها، این عدد در فرمول  $2^{-\Delta\text{ct}}$  وارد و نتایج حاصل بین گروه‌ها مقایسه گردید. پس از تأیید توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون لون، برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه گردید. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش ۲۱) انجام شد و سطح معنی‌داری آزمون‌ها  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان AMPK کاردیومیوسیت‌ها بین گروه‌های مختلف وجود داشت ( $P < 0.001$ ) (جدول ۳). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد بین گروه‌های کنترل-سالم با دیابت تعقیبی رزوراترول-دیابت ( $P = 0.20$ ) و تمرين-دیابت ( $P = 0.001$ )، رزوراترول-دیابت ( $P = 0.001$ ) و تمرين-رزو-رزوراترول-دیابت با دیابت ( $P = 0.009$ )، رزوراترول-رزو-رزوراترول-دیابت با دیابت ( $P = 0.043$ )، رزوراترول-دیابت ( $P = 0.11$ )، تمرين-دیابت ( $P = 0.043$ ) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (نمودار ۱).

از دیگر نتایج پژوهش حاضر، تفاوت معنی‌دار میزان تغییرات بیان MAFbx کاردیومیوسیت‌ها بین گروه‌های مختلف بود ( $P < 0.001$ ) (جدول ۳). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد بین گروه‌های کنترل-سالم با دیابت ( $P < 0.001$ ) و رزوراترول-دیابت ( $P = 0.042$ ) تفاوت معنی‌داری وجود داشت. همچنین بین گروه دیابت با رزوراترول-دیابت ( $P = 0.012$ )، تمرين-رزو-رزوراترول-دیابت ( $P = 0.001$ ) و تمرين-رزوراترول-دیابت ( $P < 0.001$ ) در نهایت بین گروه رزوراترول-دیابت با تمرين-رزوراترول-دیابت ( $P = 0.041$ ) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (نمودار ۲).

**استخراج RNA:** RNA با استفاده از کیت Kiagen (آلمان) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد.  
**انجام Real time-PCR:** پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده برای انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کلیه پرایمرهای طراحی شده مربوط به تمامی ژن‌ها، مورد بررسی قرار گرفت و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی RT-qPCR انجام گرفت.

برای انجام RT-qPCR، ابتدا با استفاده از محلول کیازول، RNA کل سلول‌ها استخراج شد؛ سپس کیفیت RNA‌های استخراج شده با دستگاه اسپکتروفوتومتری (DPI-1) (Kiagen) مورد ارزیابی قرار گرفت. cDNA تکرشته‌ای از پرایمر dt Oligo dt (MWG-Biotech, Germany) و آنزیم PCR (Fermentas) بر اساس پروتکل نسخه‌برداری معکوس (SYBER Green master mix Applied ) (Applied Biosystems) در دستگاه ABI Step One در دستگاه Green Biosystems، Sequences Detection Systems. (Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. تعداد ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دمای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۵۸-۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم گردید. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Thereshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفت.

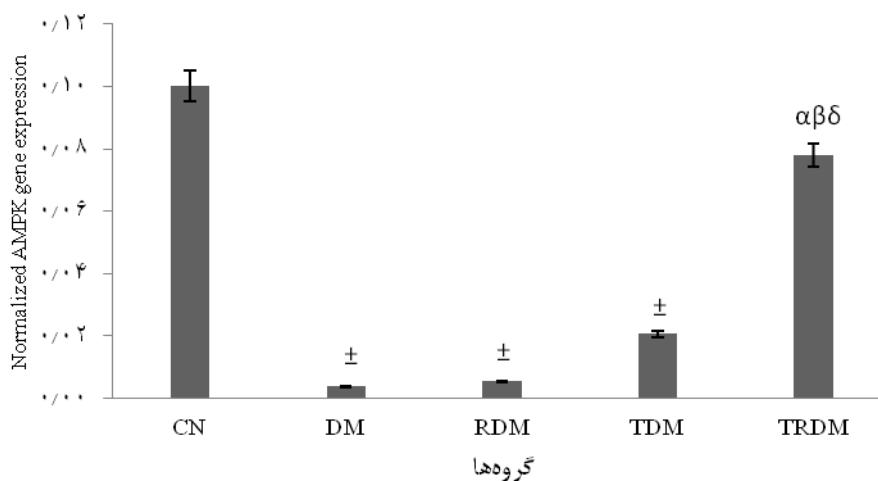
### تجزیه و تحلیل آماری:

برای نرمال‌سازی بیان ژن‌ها از فرمول (کنترل)  $\text{ct} - \text{ct}_{\text{هدف}} = \Delta\text{ct}$  استفاده گردید. پس از

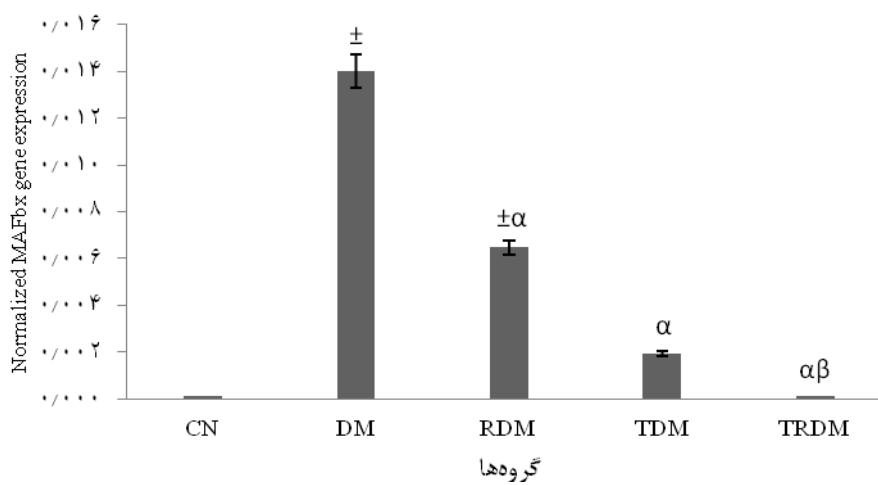
جدول ۳- مقایسه متغیرها در پس‌آزمون بین گروه‌ها

Sig	F	نسبت	df	متغیر
.000*	10/317		4 20	بين گروه‌ها درون گروه
.000*	16/425		4 20	بين گروه‌ها درون گروه

\*: معنی‌داری آماری در آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه



نمودار ۱- تغییرات بیان AMPK کاردیومیوسیت‌ها در گروه‌های مختلف. ±: تفاوت با کنترل-سالم (CN)، α: تفاوت با دیابت (DM)، β: تفاوت با رزوراترول-دیابت (RDM)، δ: تفاوت با گروه تمرین-دیابت (TDM). در سطح  $P \leq 0.05$ .



نمودار ۲- تغییرات بیان MAFbx کاردیومیوسیت‌ها در گروه‌های مختلف: ±: تفاوت با کنترل-سالم (CN)، α: تفاوت با دیابت (DM)، β: تفاوت با رزوراترول-دیابت (RDM). در سطح  $p \leq 0.05$ .

## بحث

پاسخ سازگارانه برای افزایش نیاز به انرژی، باعث فعال شدن فرآیندهای آنابولیک درگیر در هیپرتروفی می‌شود (۴). با تغییر در سطح انرژی درون‌سلولی، AMPK به افزایش نسبت AMP به ATP پاسخ می‌دهد، که این تغییرات ممکن است ناشی از گرسنگی، فعالیت ورزشی و یا انقباض عضلانی باشد (۱۷). ارتباط بین فعالیت AMPK و آتروفی قلب به طور گستردگی مورد مطالعه قرار گرفته و مکانیزم‌های مختلفی پیشنهاد شده است. در سطح سلولی، هیپرتروفی قلب با تعادل مثبت پروتئین افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد تغییر در این روند از طریق برخی مکانیزم‌ها باعث تخریب پروتئین می‌شود. مهمترین مسیر تخریب پروتئین، سیستم یوبیکویتین پروتازوم (UPS) می‌باشد (۱۸). مطالعات زیادی نشان می‌دهد که کاتالیز لیگاز یوبیکویتین E3 توسط پروتئین MAFbx، باعث شکاف در پروتئین‌های ساختاری قلب شده و نقش مهمی در آتروفی قلب دارد. مطالعات نشان داده که AMPK باعث تنظیم رونویسی MAFbx شده و باعث کاهش تخریب پروتئین قلب از مسیر UPS می‌شود. MAFbx نه تنها کاهش پروتئین را تنظیم می‌کند، بلکه سنتز پروتئین را نیز کاهش داده و نقش مهمی در کنترل توده قلب دارد (۱۹). همچنین MAFbx اخیراً گزارش شده است که میوکارد فاقد بیان MAFbx دارای هیپرتروفی بیش از حد قلب در پاسخ به تحیریکات است (۸). به نظر می‌رسد فعالیت‌های ورزشی با افزایش بیان AMPK باعث مهار بیان MAFbx در کاردیومیوسیت‌ها شده و از این طریق از آتروفی قلب جلوگیری می‌کند. در این راستا برخی مطالعات کاهش بیان  $\tau$  و پروتئین MAFbx را به دنبال تمرین در انسان‌ها و حیوان‌ها گزارش کرده‌اند (۲۰). علاوه بر این نشان داده شده است که فعالیت‌های ورزشی باعث افزایش PGC1 $\alpha$  عضلات می‌شود (۲۱). مشخص شده که پروتئین تجزیه‌کننده بافت عضلانی FoxO، با کوفاکتور حیاتی در بیوژن میتوکندری یعنی PGC1 $\alpha$  اثر متقابلی داشته و سطوح بالای PGC1 $\alpha$  می‌تواند سبب مهار این فاکتور تخریب‌کننده پروتئین عضلانی شود (۲۲). FoxO3a واسطه

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دیابت ناشی از STZ به طور معنی‌داری باعث کاهش بیان AMPK و افزایش MAFbx کاردیومیوسیت‌ها شد. اختلال در متابولیسم قلبی از عوامل مهم تأثیرگذار بر پاسخ هیپرتروفی است. در واقع اختلال متابولیک، عامل اصلی اختلالات ساختاری و عملکرد عضله قلب می‌باشد (۲). Daniels و همکاران بیان کردند که دیابت نوع دو در حیوانات بر فعال شدن AMPK تأثیر منفی داشته، که به نوبه خود باعث کاهش ظرفیت تولید انرژی قلب شده و در نهایت منجر به کاهش عملکرد انقباضی می‌شود (۵). هم‌راستا با این پژوهش، مطالعه‌ای نشان داد که دیابت در موش‌ها باعث اختلال در عملکرد بطن چپ و سرکوب فعالیت AMPK می‌شود (۱۵). بیان شده است که افزایش انسولین ناشتاً ناشی از چاقی و دیابت نوع دو می‌تواند بر مهار AMPK مؤثر باشد. در این پژوهش کاهش AMPK با افزایش MAFbx کاردیومیوسیت‌ها در موش‌های صحرایی دیابتی همراه بود. پروتئین آتروفی عضلانی MAFbx مسئول تخریب پروتئین‌های تعدیل کننده یوبیکویتین می‌باشد (۷). فعالیت‌های MAFbx توسط عوامل رونویسی عامل فاکتور κB (NF-κB) و FoxO3a<sup>۱</sup> تنظیم می‌شود. به نظر می‌رسد فعال شدن FoxO3a سبب فعل کردن پروتئین تخریب‌کننده عضله یعنی MAFbx شده است. افزایش بیان MAFbx در برخی بیماری‌ها از قبیل دیابت نشان داده شده است (۶). مطالعات نشان داده‌اند که آتروفی ناشی از دیابت، از مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT مهار شده و از مسیر FoxO/MAFbx/MuRF1 سیگنالینگ مقابله آن یعنی FoxO/MAFbx/MuRF1 می‌باشد (۱۶).

از دیگر نتایج پژوهش حاضر، افزایش بیان AMPK و کاهش بیان MAFbx میوسیت‌های قلبی موش‌های صحرایی به دنبال فعالیت ورزشی هوازی بود. افزایش فعالیت AMPK به علت اختلالات در وضعیت انرژی قلب است. این

<sup>۱</sup> Forkhead box O3

درمان با رزوراترول در بیماران COPD<sup>۱</sup> سطح TNF-α را کاهش و بیان SIRT1 را افزایش می‌دهد که در نهایت AMPK را فعال کرده و تحلیل عضله را کنترل می‌کند (۲۸). مطالعات فارماکولوژی نشان داد که دوزهای بالای رزوراترول (۱۰۰ میلی گرم / کیلوگرم در روز تا ۷۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) در مosh صحرایی اثرات نامطلوب نشان نمی‌دهد (۲۹). به طور کلی استفاده از رزوراترول باعث کاهش از دست دادن توده عضلانی از طریق AMPK، AKT و SIRT1 در نمونه‌های دیابتی/COPD و آتروفی ناشی از دگزاماتازون می‌شود (۳۰). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ترکیب تمرین و مکمل باعث افزایش معنی‌داری در بیان AMPK و کاهش معنی‌داری در MAFbx نسبت به دیگر گروه‌های تجربی شد، و این افزایش به حدی بود که با گروه کنترل-سالم اختلاف معنی‌داری نداشت. به نظر می‌رسد در پژوهش حاضر تمرین هوایی همراه با رزوراترول، دارای اثرات سینergicیکی بر AMPK و MAFbx بوده و از این طریق می‌تواند در کنترل و بهبود دیابت ناشی از STZ در مosh‌های صحرایی مؤثر باشد.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر، استفاده از تکنیک‌های دیگر اندازه‌گیری آتروفی و هیپرتروفی قلب از جمله اکوکاردیوگرافی می‌باشد. شاید اندازه‌گیری ابعاد قلبی باعث درک بهتری از تغییرات ناشی از دیابت و اثر تمرین و مکمل بر ساختار قلب ارائه می‌کرد. طول دوره پژوهش در مطالعه حاضر از محدودیت‌های مهم دیگر برای بررسی دقیق اثرات این بیماری بر مسیر هایپرتروفی قلب بود؛ زیرا دیابت اثرات خود را در یک دوره طولانی بر جای می‌گذارد.

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دیابت باعث افزایش آتروفی کاردیومیوسیت‌های مosh‌های صحرایی دیابتی می‌شود و تمرین هوایی همراه با رزوراترول تأثیر بیشتری بر

اصلی در فرایند آتروز نز است و در صورتی که فعال شود از سیتوزول به هسته جابه‌جا شده و سبب فعال کردن دو پروتئین MuRF1 و MAFbx می‌گردد و در نتیجه تخریب آغاز می‌گردد (۲۳).

از دیگر نتایج پژوهش حاضر افزایش بیان AMPK و کاهش بیان MAFbx در گروه رزوراترول - دیابت نسبت به گروه دیابت بود. همچنین بیان MAFbx و AMPK کاردیومیوسیت‌ها در گروه‌های ترکیبی نسبت به گروه دیابتی نیز به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری داشت. عملکرد بیولوژیکی فلاونوئیدها به عنوان ضد التهاب، ضد دیابت و ضد چاقی گزارش شده است (۲۴). Dolinsky و همکاران شواهد محکمی در خصوص اثرات محافظتی رزوراترول بر AMPK کاردیومیوسیت‌ها در جوندگان ارائه دادند (۲۵)، که توسط گروه‌های دیگر نیز تأیید شد. به نظر می‌رسد که رزوراترول باعث افزایش فسفوریلاسیون AMPK کاردیومیوسیت‌هایی که در معرض گلوکز بالا قرار گرفته‌اند می‌شود (۲۶). Liu و همکاران نیز در پژوهشی نشان دادند که الیگونول (فلاونوئید) با تنظیم کاهشی بیان MAFbx و MuRF1 باعث کاهش از دست دادن عضلات شده و تشکیل توبول‌ها را بهبود می‌بخشد (۲۷). رزوراترول اثرات محافظتی بر تحلیل عضلات در شرایط کاتابولیک از جمله سکته قلبی و عوارض ناشی از آن دارد (۱۱). علاوه بر این نشان داده شده که رزوراترول اثرات خود را با مهار بیان NF-Kb و MuRF1 انجام می‌دهد (۱۲). مطالعات نشان داده است که رزوراترول باعث تنظیم TNF-α و آتروفی از طریق تنظیم افزایشی AKT، p70S6K، mTOR و 4E-BP1 شده و اثر محافظتی بر آتروفی ناشی از دگزاماتازون با مهار بیان MAFbx و MuRF1 از مسیر SIRT1 و PGC-1α دارد (۱۱). در مدل مosh‌های دیابتی القاشه با استرپتوزوتوسین، تجویز رزوراترول باعث افزایش حساسیت به انسولین، افزایش فعالیت AMPK و فعالیت SIRT1 شده و همچنین بیان ژن سیتوکین‌های التهابی (IL-1 و IL-6) و NF-κB را کاهش می‌دهد (۱۲). علاوه بر این،

<sup>۱</sup> Chronic obstructive pulmonary disease

بهبود آتروفی ناشی از دیابت موش‌های صحرایی دیابتی دارد. شده است. بدین‌وسیله، نویسندها تشكر و قدردانی خود را از این واحد دانشگاهی اعلام می‌دارند.

### تقدیر و تشکر

**تضاد منافع**  
این پژوهش در قالب رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی با کد: ۲۳۹۲۱۴۰۴۹۷۲۰۰۵، در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی و با تأیید کمیته اخلاق این دانشگاه انجام نویسندها مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

### منابع:

- 1- Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF. Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment. *Heart Fail Rev.* 2012; 17(3): 325-44. doi: 10.1007/s10741-011-9257-z.
- 2- Kundu BK, Zhong M, Sen S, Davogustto G, Keller SR, Taegtmeyer H. Remodeling of glucose metabolism precedes pressure overload-induced left ventricular hypertrophy: review of a hypothesis. *Cardiology.* 2015; 130(4): 211-20. doi: 10.1159/000369782.
- 3- Tian R, Musi N, D'agostino J, Hirshman MF, Goodyear LJ. Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 2001; 104(14): 1664-9. doi: 10.1161/hc4001.097183
- 4- Horman S, Beauloye C, Vanoverschelde JL, Bertrand L. AMP-activated protein kinase in the control of cardiac metabolism and remodeling. *Curr Heart Fail Rep.* 2012; 9(3): 164-73. doi: 10.1007/s11897-012-0102-z
- 5- Daniels A, Van Bilsen M, Janssen BJ, Brouns AE, Cleutjens JP, Roemen TH, et al. Impaired cardiac functional reserve in type 2 diabetic db/db mice is associated with metabolic, but not structural, remodelling. *Acta Physiol (Oxf).* 2010; 200(1): 11-22. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02102.x.
- 6- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001; 294(5547): 1704-8. DOI: 10.1126/science.1065874
- 7- Hasselgren PO, Alabdari N, Aversa Z, Gonnella P, Smith IJ, Tizio S. Corticosteroids and muscle wasting role of transcription factors, nuclear cofactors, and hyperacetylation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010; 13(4): 423-8. doi: 10.1097/MCO.0b013e32833a5107.
- 8- Li HH, Willis MS, Lockyer P, Miller N, McDonough H, Glass DJ, et al. Atrogin-1 inhibits Akt-dependent cardiac hypertrophy in mice via ubiquitin-dependent coactivation of Forkhead proteins. *J Clin Invest.* 2007; 117(11): 3211-23. doi: 10.1172/JCI31757
- 9- Liu HW, Chang SJ. Moderate exercise suppresses NF-κB signaling and activates the SIRT1-AMPK-PGC1a axis to attenuate muscle loss in diabetic db/db mice. *Front Physiol.* 2018; 9: 636. doi: 10.3389/fphys.2018.00636
- 10- Cantó C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol.* 2009; 20(2): 98-105. doi: 10.1097/MOL.0b013e328328d0a4.
- 11- Wang DT, Yin Y, Yang YJ, Lv PJ, Shi Y, Lu L, et al. Resveratrol prevents TNF-α-induced muscle atrophy via regulation of Akt/mTOR/FoxO1 signaling in C2C12 myotubes. *Int Immunopharmacol.* 2014; 19(2): 206-13. doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.002.
- 12- Shadfar S, Couch ME, McKinney KA, Weinstein LJ, Yin X, Rodríguez JE, et al. Oral resveratrol therapy inhibits cancer-induced skeletal muscle and cardiac atrophy in vivo. *Nutr Cancer.* 2011; 63(5): 749-62. doi: 10.1080/01635581.2011.563032
- 13- Batacan RB Jr, Duncan MJ, Dalbo VJ, Connolly KJ, Fenning AS. Light-intensity and high-intensity interval training improve cardiometabolic health in rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2016; 41(9): 945-52. doi: 10.1139/apnm-2016-0037.

- 14- Hajighasem A, Farzanegi P, Mazaheri Z. Effects of combined therapy with resveratrol, continuous and interval exercises on apoptosis, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in the liver of old rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Arch Physiol Biochem.*. 2019; 125(2): 142-9. doi: 10.1080/13813455.2018.1441872.
- 15- Xie Z, Lau K, Eby B, Lozano P, He C, Pennington B, et al. Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice. *Diabetes*. 2011; 60(6): 1770–8. doi: 10.2337/db10-0351
- 16- Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Léger B, Russell AP. The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch.* 2011; 461(3): 325-35. doi: 10.1007/s00424-010-0919-9.
- 17- Arad M, Seidman CE, Seidman JG. AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease. *Circ Res.* 2007; 100(4): 474-88. doi: 10.1161/01.RES.0000258446.23525.37
- 18- Willis MS, Patterson C. Into the heart: the emerging role of the ubiquitin–proteasome system. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 41(4): 567-79. DOI: 10.1016/j.jmcc.2006.07.015
- 19- Baskin KK, Rodriguez MR, Kansara S, Chen W, Carranza S, Frazier OH, et al. MAFbx/Atrogin-1 is required for atrophic remodeling of the unloaded heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 72: 168-76. doi: 10.1016/j.jmcc.2014.03.006
- 20- Zanchi NE, de Siqueira Filho MA, Lira FS, Rosa JC, Yamashita AS, de Oliveira Carvalho CR, et al. Chronic resistance training decreases MuRF-1 and Atrogin-1 gene expression but does not modify Akt, GSK-3 $\beta$  and p70S6K levels in rats. *Eur J Appl Physiol.* 2009; 106(3): 415-23. doi: 10.1007/s00421-009-1033-6
- 21- Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph AM. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol.* 2006; 209(Pt 12): 2265-75. doi: 10.1242/jeb.02182
- 22- Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Cliff Yoon J, OrienteF, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 $\alpha$  interaction. *Nature*. 2003; 423: 550-5. doi: 10.1038/nature01667
- 23- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004; 117(3): 399-412.
- 24- Liu HW, Wei CC, Chen YJ, Chen YA, Chang SJ. Flavanol-rich lychee fruit extract alleviates diet-induced insulin resistance via suppressing mTOR/SREBP-1 mediated lipogenesis in liver and restoring insulin signaling in skeletal muscle. *Mol Nutr Food Res.* 2016; 60(10): 2288-96. doi: 10.1002/mnfr.201501064. E
- 25- Dolinsky VW, Rogan KJ, Sung MM, Zordoky BN, Haykowsky MJ, Young ME, et al. Both aerobic exercise and resveratrol supplementation attenuate doxorubicin-induced cardiac injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305(2): E243-53. doi: 10.1152/ajpendo.00044.2013.
- 26- Guo S, Yao Q, Ke Z, Chen H, Wu J, Liu C. Resveratrol attenuates high glucose-induced oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis through AMPK. *Mol Cell Endocrinol.* 2015; 412: 85-94. doi: 10.1016/j.mce.2015.05.034.
- 27- Liu HW, Chen YJ, Chang YC, Chang SJ. Oligonol, a low-molecular weight polyphenol derived from lychee, alleviates muscle loss in diabetes by suppressing atrogin-1 and MuRF1. *Nutrients*. 2017; 9(9): pii: E1040. doi: 10.3390/nu9091040.
- 28- Qi Y, Shang JY, Ma LJ, Sun BB, Hu XG, Liu B, et al. Inhibition of AMPK expression in skeletal muscle by systemic inflammation in COPD rats. *Respir Res.* 2014; 15: 156. doi: 10.1186/s12931-014-0156-4
- 29- Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, Beck M, Bausch J. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47(9): 2170-82. doi: 10.1016/j.fct.2009.06.002.
- 30- Dutt V, Gupta S, Dabur R, Injeti E, Mittal A. Skeletal muscle atrophy: potential therapeutic agents and their mechanisms of action. *Pharmacol Res.* 2015; 99: 86-100. doi: 10.1016/j.phrs.2015.05.010.