



اثر تعاملی تمرین هوازی و مصرف بربرین کلراید بر بیان TGF- β و Smad4 بافت قلب موش‌های

صحرائی دیابتی شده با STZ

قاسم ترابی پلت کله^۱، مصطفی کاظمی^{۱*}، ثریا سعیدی^۱

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۵/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۱۰

چکیده

هدف: دیابت منجر به فیبروز قلبی شده که با پیشرفت بیماری بدتر می‌شود و به کاردیومیوپاتی دیابتی منجر می‌شود. در این مطالعه اثر فعالیت ورزشی هوازی (AT) همراه با بربرین کلراید (BR) بر بیان TGF- β و Smad4 بافت قلب موش‌های صحرائی دیابتی بررسی شد.

روش شناسی: تعداد ۳۲ موش صحرائی نر ویستار ($276/09 \pm 17/03$ گرم، ۱۰ هفته‌ای) به طور تصادفی به چهار گروه (n=۸): دیابت (DM)، دیابت - بربرین (BRDM)، دیابت-تمرین هوازی (ATDM)، دیابت-تمرین هوازی-بربرین (ATBRDM)، تقسیم شدند. دیابت با تزریق استرپتوزوتوسین القا شد. گروه‌های تمرین به مدت شش هفته برنامه تمرین هوازی فزاینده (۱۸-۱۰ متر در دقیقه، ۴۰-۱۰ دقیقه در روز، پنج روز در هفته) را روی تردمیل انجام دادند. بربرین کلراید (30 mg/kg/day) یک بار در روز به صورت خوراکی با گاوآذ خورانده شد. در پایان هفته ششم نمونه بافت قلب جمع‌آوری شد. سطوح بیان ژنی TGF- β و TGF- β به روش real-time PCR اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA در سطح معنی‌داری $p < 0/05$ آزمون شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که AT، BR و ترکیب BR-AT در موش‌های دیابتی باعث کاهش معنی‌دار در میزان TGF- $\beta 1$ ($p=0/001$) و Smad4 ($p=0/001$) بافت قلب شد. همچنین کاهش معنی‌داری در میزان این شاخص‌ها در گروه ATBRDM نسبت به BRDM و ATDM مشاهده شد ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: AT و BR با بهبود نشانگرهای فیبروز بافت قلب، یک استراتژی موثر برای بهبود فیبروز قلبی در موش‌های دیابتی STZ می‌باشد. علاوه بر این، AT و BR اثر هم‌افزایی محافظتی قلبی را برای کاهش نشانگرهای فیبروز قلبی نشان داد.

واژگان کلیدی: فعالیت ورزشی، بربرین کلراید، دیابت، فیبروز قلبی

۱. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

* نشانی الکترونیکی نویسنده مسئول: sport.tmr@gmail.com

مقدمه

بوده که به دنبال نارسایی قلبی در میوکارد بیان شده و همچنین باعث فعال شدن فیبروبلاست‌ها برای القای رسوب کلاژن می‌شود (۱۴). این مسیر شامل فسفوریلاسیون Smad2/3 و Smad4 بوده که با هم باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با فیبروز می‌شود (۱۴). در نتیجه TGF- β منجر به سفتی میوکارد، اختلال عملکرد دیاستول و نارسایی قلب می‌شود (۱۲). مطالعات نشان داده که مسیر سیگنالینگ TGF- β /Smad4 در بروز آپوپتوز نیز نقش دارد. بیان شده که Smad4 با تنظیم c-fos و c-JUN باعث القای آپوپتوز می‌شود (۵).

بار مالی و تهدیدات سلامتی ناشی از عوارض قلبی دیابت، نیازمند درمان فوری و یافتن استراتژی مناسب برای پیشگیری و جلوگیری از پیشرفت این عوارض است. به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی می‌تواند فیبروز قلبی را از طریق تاثیر بر مسیر TGF- β /Smad کاهش دهد (۱۶). تمرینات ورزشی باعث بهبود کسر تخلیه، کسر کوتاه شدن (۸) شده و همچنین باعث جلوگیری از پیشرفت فیبروز قلبی می‌شود (۲۹). در موش‌های دیابتی نشان داده شده که فعالیت ورزشی هوازی یک استراتژی درمانی برای کاهش آپوپتوز مرتبط با دیابت

دیابت ملیتوس (DM¹) به عنوان یکی از اختلالات متابولیکی با هیپرگلیسمی پایدار شناخته شده و یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان است. انجمن بین‌المللی دیابت پیش‌بینی کرده که تا سال ۲۰۴۰ تعداد افراد مبتلا به این بیماری به ۶۴۲ میلیون نفر (۱۰/۴٪) برسد (۱۹). بیماری قلبی عروقی به عنوان عامل اصلی مرگ و میر در افراد مبتلا به دیابت شناسایی شده است. علیرغم این که تغییرات عروق بزرگ نقش اصلی را در عوارض قلبی ناشی از دیابت ایفا می‌کند، نارسایی قلبی نیز به دنبال دیابت بوجود آمده که به آن کاردیومیوپاتی دیابتی (DCM²) گفته می‌شود (۱۳). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که هیپرگلیسمی و اختلالات متابولیکی در دیابت منجر به آپوپتوز میوکارد، اختلال عملکرد اندوتلیال و استرس اکسیداتیو بافت قلب شده و در نهایت منجر به DCM می‌شود (۱۱، ۲۳). علاوه بر این قرار گرفتن در معرض طولانی مدت فشار اکسایشی منجر به التهاب مزمن و فیبروز قلبی می‌شود (۲۶). به نظر می‌رسد مسیر سیگنالینگ TGF- β /Smad نقش حیاتی در پاتوژنز فیبرز قلبی ایفا می‌کند. TGF- β ³ یکی از فاکتورهای رشدی

3 Transforming Growth Factor- β

1 Diabetes mellitus

2 Diabetic cardiomyopathy

وجود پیشرفت‌های که در زمینه مداخله‌های درمانی برای جلوگیری و درمان بیماری دیابت وجود دارد، روش‌های درمانی غیر دارویی از قبیل فعالیت ورزشی و همچنین استفاده از داروهای گیاهی که نسبت به داروهای شیمیایی اثرات جانبی کمتری دارد، مورد توجه قرار گرفته است. در پژوهشی نشان داده شده که بربرین توانست اثر فعالیت ورزشی را بر ساختار قلب افزایش دهد (۱). لذا فرض محقق این است که بربرین بتواند اثر فعالیت ورزشی را بر قلب بهبود بخشد. بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر AT همراه با مکمل BR بر بیان $TGF-\beta$ و Smad4 بافت قلب موش‌های صحرایی دیابتی با STZ می‌باشد.

روش‌شناسی

این پژوهش از نوع تجربی بوده و همه آزمایش‌های مربوط به حیوانات با توجه به سیاست‌های مربوط به حمایت از حیوانات (بر اساس خط مشی‌های قرارداد هلسینگی) انجام شد و قوانین راهنمای انستیتوی ملی سلامت در نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر ۱۰ هفته ای با نژاد ویستار و میانگین وزن $276/09 \pm 17/03$ گرم از انستیتو پاستور تهیه شد و به آزمایشگاه جانورشناسی پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی یزد منتقل شدند.

در کاردیومیوسیت‌ها می‌باشد (۲۲). علاوه بر فعالیت ورزشی به نظر برخی گیاهان نیز در کنترل دیابت و عوارض قلبی ناشی از آن نقش داشته باشند. بربرین کلراید (BR^۱) به عنوان یک مکمل گیاهی از گیاه زرشک به دست می‌آید (۴). استفاده از BR اثر مفیدی بر بسیاری از بیماری‌ها دارد. بربرین با بهبود مقاومت به انسولین، تعدیل متابولیسم چربی، مهار فعالیت الف-آمیلاز و الف-گلوکوزیداز باعث محافظت در برابر دیابت می‌شود. همچنین می‌تواند از عوارض قلبی عروقی ناشی از دیابت مانند کاردیومیوپاتی دیابتی، فیبروز قلبی، آسیب اندوتلیال، اختلال عملکرد سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال و انقباض عروق جلوگیری کند (۷). نشان داده که BR باعث کاهش رسوب کلژن و نظم بهتر هسته‌ها در کاردیومیوسیت‌ها در موش‌های دیابتی با STZ می‌شود (۱). چانگ^۲ و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که دو هفته مصرف BR در موش‌ها باعث محافظت قلب در برابر آسیب اسکیمی/پرفشار خونی (I/R) می‌شود (۳). علاوه بر این نشان داده شد که BR می‌تواند باعث بهبود آپوپتوز در قلب موش‌های دیابتی شود (۱). به نظر می‌رسد BR عملکرد میتوکندری را در شرایط پاتولوژیک بهتر کرده (۹) و همچنین با سرکوب اتوفازای ناشی از I/R و یا مرگ سلولی، اثر محافظتی بر سلول دارد (۳۱). با

صحرايي، ۷۲ 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 شد که قند خون 250 میلی گرم بر دسی لیتر، حاکی از دیابتی شدن آنها بوده است (۱۰).

روش محاسبه BMI: بعد از وزن‌کشی موش‌ها در هر مرحله، اندازه قد هر یک از آنها بر حسب میلی‌متر در فاصله دهان تا آنوس به وسیله خط کش فلزی اندازه‌گیری شده و مقدار BMI هر کدام ثبت شد (۱۷).

پروتکل تمرینی AT: قبل از اجرای پروتکل تمرینی، تمامی حیوانات به مدت یک هفته با نحوه انجام فعالیت روی نوارگردان آشنا شدند، برنامه آشنایی شامل ۵ جلسه راه رفتن و دویدن با سرعت ۵ تا ۸ متر در دقیقه و شیب صفر درصد و به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه بود. شدت تمرین از طریق سرعت تردمیل کنترل گردید. گروه‌ها به لحاظ آمادگی اولیه ($\dot{V}O_{2max}$) همگن شدند. یعنی میانگین $\dot{V}O_{2max}$ اولیه گروه‌ها تقریباً یکسان بود. برنامه فعالیت‌بدنی استقامتی با افزایش تدریجی سرعت و زمان آغاز شد، به طوری که در هفته اول با سرعت 10 m/min به مدت ۱۰ دقیقه، در هفته دوم با سرعت 10 m/min و به

حیوانات مورد آزمایش در گروه‌های ۴ تایی در قفس‌های پلی‌کربنات نگهداری شدند. دمای محیط $22 \pm 1/4$ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت $55/6 \pm 4$ درصد بود. تمامی حیوانات به آب و غذای ویژه موش دسترسی آزاد داشتند (۲). پس از انتقال رت‌ها به آزمایشگاه، القای دیابت و آشنایی با فعالیت ورزشی روی تردمیل مخصوص جوندگان، به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. گروه‌های مورد مطالعه در این پژوهش شامل: دیابت (DM)، دیابت-بربرین (BRDM)، دیابت-تمرین هوازی (ATDM)، دیابت-تمرین هوازی-بربرین (ATBRDM)، بودند. موش صحرايي گروه‌های تمرین، یک برنامه هشت هفته‌ای (۵ روز هفته) تمرین هوازی را اجرا کردند، در حالی که دیگر گروه‌ها در هیچ برنامه تمرینی شرکت داده نشدند.

روش القای دیابت: در این مطالعه موش‌های صحرايي با استفاده از داروی استرپتوزوسین^۱ (ساخت شرکت سیگما با کد: S0130)، دیابتی شدند. القای دیابت با تزریق تک دوز mg/kg ۶۰ استرپتوزوسین حل شده در بافر سیترات القا بصورت داخل صفاقی صورت گرفت. برای تشخیص دیابتی بودن موش‌های

1 Strptozotosin

2 Maximal Oxygen Consumption

موش‌ها وجود دارد ($r = 0/98$, $p < 0/05$). از این رو می‌توان با توجه به سرعت بیشینه دویدن، میزان VO_{2max} (vVO_{2max}) موش‌ها را بدست آورد. شدت‌ها با توجه به این سرعت بدست آمده، تنظیم شد (۲۸).

نحوه تهیه و مصرف BR: مکمل مورد استفاده، پودر BR (شرکت سیگما با کد: 14050)، از گیاه زرشک با درجه خلوص ۹۰٪ بود. این پودر در هر جلسه به اندازه‌ی مورد نیاز در محلول سالین حل می‌شد. سپس محلول آماده شده با دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و در تمام روزهای هفته و به مدت شش هفته به صورت خوراکی (گاواژ)، یک ساعت قبل از تمرین به گروه‌های مورد نظر خورانده می‌شد (۱۵).

روش نمونه‌گیری از بافت قلب: پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین^۱ (۶۰ mg/kg) و زایلازین^۲ (۵ mg/kg) بی‌هوش شدند. بافت مورد نظر بلافاصله پس از جداسازی و شست و شو با سالین فورا در تیوب‌های حاوی RNA later جهت جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شده و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد.

مدت ۲۰ دقیقه، در هفته سوم با سرعت ۱۴-۱۵ m/min به مدت ۲۰ دقیقه، در هفته چهارم با سرعت ۱۴-۱۵ m/min به مدت ۳۰ دقیقه، در هفته پنجم با سرعت ۱۸-۱۷ m/min به مدت ۳۰ دقیقه و در هفته ششم با سرعت ۱۷-۱۸ m/min و به مدت ۴۰ دقیقه بود. فعالیت بدنی به مدت ۵ روز در هفته بوده و در ابتدا و انتهای هر جلسه تمرین، ۳ دقیقه گرم کردن و سرد کردن با سرعت ۴-۵ m/min انجام گرفت. به منظور تحریک موش‌ها برای دویدن، از محرک صوتی (ضربه به دیواره نوارگردان)، استفاده شد؛ بدین صورت که در جلسات اول، از محرک الکتریکی با ولتاژ کم، همراه با محرک صوتی استفاده شد و پس از شرطی نمودن موش‌ها به همراه بودن دو محرک، در سایر جلسات به منظور رعایت نکات اخلاقی کار با حیوان آزمایشگاهی، فقط از محرک صوتی استفاده شد.

پروتکل ویژه ارزیابی توان استقامتی موش‌ها: بعد از ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۳۰/۰ m/s (۱/۸ m/min)، سرعت نوارگردان هر سه دقیقه یک بار به میزان ۱/۸ m/min افزایش یافت، سرعت بیشینه زمانی بود که موش‌ها حداقل ۱/۳ دقیقه نتوانند با یک سرعت ثابت بدونند و بلافاصله پس از آن با افزایش سرعت قادر به دویدن نباشند (شیب نوارگردان صفر درجه است). پژوهش‌ها نشان می‌دهند، ارتباط بالایی بین سرعت نوارگردان و VO_{2max}

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,) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت 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 این منظور ابتدا با استفاده از محلول کیزول، RNA کل سلول‌ها استخراج شد. سپس کیفیت RNA های استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتری (DPI-1, Kiagen) مورد ارزیابی قرار گرفت. cDNA تک رشته‌ای از پرایمر Oligo dt (MWG-Biotech, Germany) و آنزیم نسخه برداری معکوس (Fermentas) بر اساس پروتکل مربوطه تهیه شد. هر واکنش PCR با استفاده از Applied PCR master mix (Applied Biosystems) و SYBER Green در دستگاه ABI Step One Sequences Detection Systems. Focter (City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دمای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰

برای جلوگیری از تاثیر آهنگ شبانه روزی، نمونه‌گیری از ساعت ۸ آغاز و ۱۱:۳۰ به اتمام رسید. برای بررسی بیان ژن‌ها در هر گروه از تکنیک Real Time PCR استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. روش اندازه‌گیری بیان ژن‌ها: طراحی، آماده سازی پرایمر: جدول ۱ الگوی پرایمر را نمایش می‌دهد. پرایمرهای ژن‌ها به همراه یک ژن کنترل یا رفرانس GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) طراحی شد و برای سنتز به شرکت سیناکلون (Sinaclon) سفارش داده شد (جدول ۲).

جدول ۱. الگوی پرایمر TGF- β و Smad4

Genes	Sequence (5' → 3')
Forward TGF- β	5'-TAC CTG AAC CCG TGT TG-3'
Reverse TGF- β	5'-GTT GCT GAG GTA TCG CC-3'
Forward Smad4	5'-CGC TTT TGT TTG GGT CAA CT-3'
Reverse Smad4	5'-CCC AAA CAT CAC CTT CAC CT-3'

استخراج RNA: RNA با استفاده از کیت کیزان (آلمان) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد.

TGF- β بافت قلب موش‌های دیابتی شد. ترکیب AT با BR، نسبت به AT و یا BR به تنهایی بر بیان TGF- β بافت قلب موش‌های دیابتی برتری معنی‌داری داشت (جدول ۳، نمودار ۱).

علاوه بر این نتایج تحلیل واریانس دو راهه نشان داد که AT ($F=۰/۴۶۲$ ، $P=۰/۰۰۰۱$ ، $\eta^2=۰/۳۳۰$) و BR ($F=۲۴/۰۹۰$ ، $P=۰/۰۰۱$ ، $\eta^2=۰/۳۳۰$) باعث کاهش معنی‌دار در بیان Smad4 بافت قلب موش‌های دیابتی شد. ترکیب AT با BR، نسبت به AT و یا BR به تنهایی بر بیان TGF- β بافت قلب موش‌های دیابتی برتری معنی‌داری داشت (جدول ۳، نمودار ۲).

ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری: از آمار توصیفی برای دسته بندی داده‌ها و برای نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری پیش و پس‌آزمون شاخص‌های وزن، شاخص توده بدنی (BMI)، VO₂max و گلوکز از آزمون t زوجی و برای مقایسه اختلاف بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه و آزمون تعقیبی بنفرونی استفاده شد. داده‌ها به صورت انحراف معیار \pm میانگین بیان شده است. محاسبه با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ انجام شد و سطح معنی‌داری آزمون‌ها $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. یافته‌ها

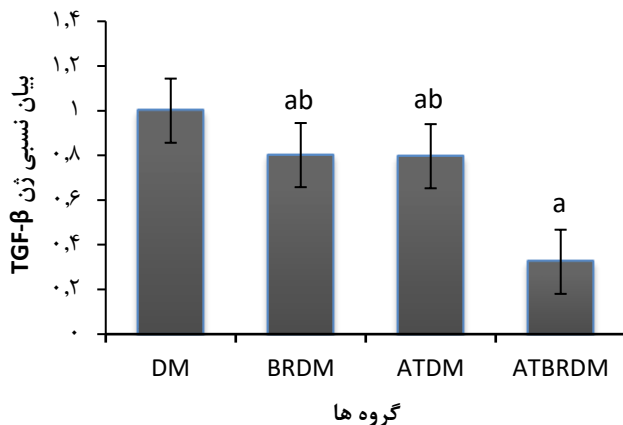
در جدول شماره ۲ میانگین و نتایج آزمون درون‌گروهی و بین‌گروهی مربوط به متغیرهای پژوهش در گروه‌های مختلف ارائه شده است.

نتایج تحلیل واریانس دو راهه نشان داد که AT ($F=۳۰/۴۹۵$ ، $P=۰/۰۰۰۱$ ، $\eta^2=۰/۵۲۱$) و BR ($F=۲۹/۶۰۶$ ، $P=۰/۰۰۰۱$ ، $\eta^2=۰/۵۱۴$) باعث کاهش معنی‌دار در بیان

جدول ۲. نتایج آمار توصیفی و استنباطی مربوط به متغیرهای پژوهش

گروه متغیر	دیابت (DM)	دیابت-بربرین (BRDM)	دیابت-تمرین (ATDM)	دیابت-تمرین-بربرین (ATBRDM)	p بین گروهی
وزن (گرم)	پیش‌آزمون	۲۸۱/۵۷ ± ۱۴/۰۴	۲۶۲/۳۸ ± ۱۲/۱۴	۲۸۲/۷۸ ± ۱/۰۵	
	پس‌آزمون	۲۸۳/۸۸ ± ۳۳/۰۵	۲۱۸/۵۸ ± ۳۳/۰۵	۲۳۱/۷۴ ± ۲۱/۰۶	۰/۴۴۳
	p درون‌گروهی	۰/۰۰۱ *	۰/۰۳۱ *	۰/۰۴۷ *	۰/۰۰۲ *
* BMI (kg/m2)	پیش‌آزمون	۰/۶۲۰ ± ۰/۰۳۳	۰/۵۷۶ ± ۰/۰۴۸	۰/۶۱۶ ± ۰/۰۴۷	
	پس‌آزمون	۰/۴۶۶ ± ۰/۰۳۳	۰/۴۸۳ ± ۰/۰۸۱	۰/۴۶۰ ± ۰/۰۳۵	۰/۱۴۰
	p درون‌گروهی	۰/۰۰۱ *	۰/۰۰۲ *	۰/۱۳۷	۰/۰۰۱ *
VO2max (ml.kg-1.min-1)	پیش‌آزمون	۲۱/۳۳ ± ۱/۹۶	۲۰ ± ۳/۲۰	۲۰/۱۴ ± ۱/۹۵	
	پس‌آزمون	۲۳/۳۳ ± ۳/۸۸	۲۴ ± ۲/۶۱	۲۶/۲۰ ± ۱/۷۸	β ۰/۰۰۱
	p درون‌گروهی	۰/۰۰۱ *	۰/۰۰۱ *	۰/۰۰۱ *	
گلوکز (mg.dl)	پیش‌آزمون	۵۴۰/۱۲ ± ۱۱۱/۰	۵۲۱/۶۲ ± ۱۱۰	۵۱۷ ± ۹۵/۵۶	
	پس‌آزمون	۵۷۲/۰۰ ± ۵۲/۷۳	۴۰۲/۶۲ ± ۵۶/۲۸	۳۸۴/۵۰ ± ۸۳/۶۷	β ۰/۰۰۲
	p درون‌گروهی	۰/۰۶۱	۰/۰۱۱ *	۰/۰۲۵ *	۰/۰۰۸ *

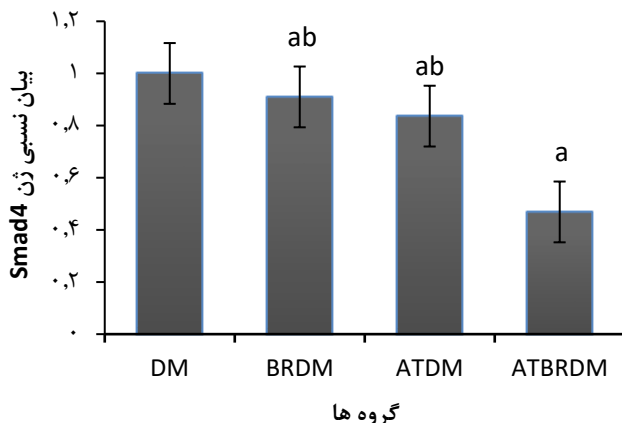
BMI (Body Mass Index) شاخص توده بدنی، * تفاوت درون گروهی، β تفاوت بین گروهی



نمودار ۱. تغییرات بیان TGF-β بافت قلب در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس دوطرفه (در سطح $P < 0.05$).
 a تفاوت با DM، b تفاوت با گروه ATBRDM.

جدول ۳. نتایج آزمون بونفرونی برای مقایسات دوگانه بیان ژن TGF-β و Smad4 بافت قلب

متغیر	گروه های ۱	گروه های ۲	تفاوت میانگین	خطای استاندارد	p-value
TGF-β	عامل AT	بدون AT	-۰/۳۴۱	۰/۰۶۲	۰/۰۰۰۱
	عامل BR	بدون RJ	-۰/۳۳۶	۰/۰۶۲	۰/۰۰۰۱
Smad4	عامل AT	بدون AT	-۰/۳۰۳	۰/۰۶۲	۰/۰۰۰۱
	عامل BR	بدون RJ	۰/۲۲۹	۰/۰۶۲	۰/۰۰۰۱



نمودار ۲. تغییرات بیان Smad4 بافت قلب در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس دوطرفه (در سطح $P < 0.05$). تفاوت با DM، b تفاوت با گروه ATBRDM.

(۲۷). همراستا با پژوهش حاضر ژائو^۱ و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی نشان دادند که ده هفته تمرین شنا سطوح TGF- β 1 mRNA و بیان و پروتئین Smad4 را در بافت قلب موش‌های دیابتی کاهش معنی‌داری دارد. این محققین بیان کردند که AT می‌تواند فیبروز میوکارد را از طریق مسیر TGF- β /Smad4 در بیماری دیابت بهبود دهد (۳۳). همچنین در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که هشت هفته تمرین شنا در موش‌های دیابتی باعث کاهش کلژن بطن چپ شد (۲۴). ران^۲ و همکاران (۲۰۱۸) نیز روی موش‌های دیابتی نشان دادند که پنج

بحث و نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که AT به طور معنی‌داری باعث کاهش TGF- β و Smad4 بافت قلب موش‌های دیابتی با STZ شد. به نظر می‌رسد AT اثر نامطلوب TGF- β و Smad4 را بر بافت قلب موش‌های دیابتی معکوس کرد. دیابت می‌تواند منجر به اختلالات ساختاری و کاهش عملکرد، ایسکمی میوکارد، فیبروز، نارسایی قلبی شود. فیبروز میوکارد یکی از آسیب‌های اصلی این بیماری است و فعالیت ورزشی هوازی می‌تواند فیبروز میوکارد ناشی از دیابت را بهبود بخشد

در جلوگیری از بروز فیبروز قلبی نقش داشته باشد. با این وجود مقدم و همکاران (۱۳۹۶) روی موش‌های مبتلا به سرطان نشان دادند که بیان $TGF-\beta$ و Smad3 بافت تومور افزایش معنی‌دار داشت (۱۸). تفاوت در یافته‌ها احتمالاً ناشی از تفاوت در نوع بافت (بافت تومور در مقابل بافت قلب) و همچنین نوع نمونه‌های مورد پژوهش (موش‌های سرطانی در مقابل موش‌های دیابتی) باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که درمان با BR به طور معنی‌داری باعث کاهش $TGF-\beta$ و Smad4 بافت قلب موش‌های دیابتی با STZ شد. در همین راستا یانگ و همکاران (۲۰۲۱) روی موش‌های I/R بیان کردند که استفاده از BR با کاهش سیگنالینگ $TGF-\beta$ / Smad4 و ROS میتوکندری و همچنین غیر فعال کردن کاسپاز-۳، باعث سرکوب آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها شد (۳۱). به نظر می‌رسد BR با بهبود عملکرد قلب و افزایش SIRT1^۳ می‌تواند از قلب محافظت کند. همچنین نشان داده شده که BR با افزایش SOD^۴، GPX^۵ و همچنین کاهش MAD^۶ بافت قلب باعث کاهش فشار اکسایشی کاردیومیوسیت‌ها شده و اثر مثبتی بر قلب دارد (۲۱). میتوکندری‌ها جایگاه اصلی تولید ROS^۷ هستند و تولید ROS ارتباط

هفته تمرین روی تردمیل باعث کاهش معنی‌دار در $TGF-\beta$ ، Smad3 و α -SMA بافت کلیه شد (۲۰). $TGF-\beta$ دارای اثرات پلیوتروپیک^۱ بوده که در تنظیم چندین عملکرد بدنی رشد سلولی، تمایز سلولی، آپوپتوز، رگزایی و پاسخ ایمنی نقش دارد (۳۰). $TGF-\beta$ یک واسطه مهم فیبروز می‌باشد و به همین دلیل مسیر سیگنالینگ آن در درمان بسیاری از بیماری‌ها مهم می‌باشد. مهار مسیر سیگنالینگ $TGF-\beta$ توسط استراتژی‌های مختلف اثربخشی بالقوه‌ای را برای درمان فیبروز قلبی دارد. مسیر سیگنال دهی $TGF-\beta$ بعد از اتصال به گیرنده‌های خود فعال می‌شود. اتصال $TGF-\beta$ به گیرنده خود باعث فسفریله شدن پروتئین‌های سیگنال‌دهنده پایین‌دست Smad2 یا Smad3 شده که این دو پروتئین با Smad4 کمپلکس می‌شوند. این کمپلکس درون سلولی بین Smad2/4 یا Smad3/4 از سیتوپلاسم به داخل هسته حرکت می‌کند، جایی که به نواحی پر موتور ژن‌های درگیر در فرآیند فیزیولوژیکی القای بیان ژن خاص متصل می‌شود (۶). برای مثال، می‌تواند در فیبروز و تشکیل کلژن نقش داشته باشد. به نظر در پژوهش حاضر AT با تنظیم کاهشی بیان $TGF-\beta$ و به دنبال آن Smad4 می‌تواند

5 Glutathione Peroxidase
6 Malondialdehyde
7 Reactive Oxygen Species

1 Pleiotropic
2 Caspase-3
3 Sirtuin 1
4 Superoxide Dismutase

همکاران (۲۰۲۱) نیز بیان کردند که تمرین ترکیب تمرین هوازی و مقاومتی همراه با مکمل ویتامین D تاثیر بیشتری نسبت به اثر هر کدام به تنهایی بر کاهش سیگنال‌های TGF- β 1، Smad2/3 و همچنین تنظیم بیان کلاژن I و III داشته و فیبروز قلبی را کاهش داد (۱۶). محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم بررسی تغییرات ROS بافت قلب اشاره کرد که می‌تواند درک دقیقی از مسیر تاثیر گذاری تمرین و مکمل ارائه دهد. همچنین بررسی دیگر پروتئین‌ها و مسیرهای سیگنالینگ موثر بر فیبروز و استرس میتوکندری می‌تواند دید روشن‌تری از مسیرهای سیگنالینگ موثر بر فیبروز ارائه دهد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد AT و BR باعث بهبود نشانگرهای فیبروز در بافت قلب موش‌های دیابتی شده است. بنابراین، می‌توان از AT و مکمل BR یک استراتژی موثر برای بهبود فیبروز قلبی در موش‌های دیابتی با STZ باشد. علاوه بر این، یافته یک اثر هم‌افزایی محافظتی قلبی AT و مکمل BR را برای کاهش فیبروز قلبی نشان می‌دهد که احتمالاً با سیگنال‌دهی TGF- β 1/Smad4 واسطه می‌شود.

تنگ‌انگهی با اختلال میتوکندری و فعال کردن مسیرهای آپوپتوز دارد. مطالعات قبلی دیگری نیز اثر سرکوب BR را بر تولید ROS سلولی و میتوکندری بافت قلب نشان دادند (۳۱). در این مطالعه نیز بیان شده که اثرات سرکوب‌کننده BR بر تولید ROS ممکن است با مسیر سیگنالینگ TGF- β /Smad4 مرتبط باشد. Smad4 نیز یک فعال‌کننده سیگنالینگ TGF- β است. پروتئین Smad4 می‌تواند توسط گیرنده‌های TGF- β فعال شده و سپس به هسته منتقل شده و رونویسی ژن را تعدیل کند (۲۵). مطالعات قبلی نشان داده که تنظیم افزایشی بیان Smad4 باعث افزایش آپوپتوز سلول‌های سرطانی شده که بین معنی است که Smad4 ممکن است باعث ایجاد آپوپتوز شود (۳۲). همچنین بیان شده که Smad4 قادر است آپوپتوز کاردیومیوسیت‌های آسیب دیده را تسهیل کند (۵). در مطالعه حاضر بیان Smad4 بافت قلب موش‌های دیابت با STZ به دنبال درمان با BR کاهش یافت. به نظر می‌رسد Smad4 نیز تحت تاثیر BR از طریق تعدیل ROS و القای آپوپتوز، بر بافت قلب تاثیر دارد. در پژوهش حاضر اثر هم‌زمان AT و BR بیشتر از اثر هر کدام به تنهایی بود. به نظر می‌رسد ترکیب AT و BR دارای اثر هم‌افزایی داشته و باعث این نتایج شده است. مهدی پور و

تشکر و قدردانی

این تحقیق با تایید کمیته اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت با کد IR.IAU.M.REC.1401.011 و در قالب رساله دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی انجام شد. بدین وسیله، نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحد دانشگاهی اعلام می دارند.

تعارض منافع

در این پژوهش هیچ گونه تضاد منافی برای نویسندگان وجود ندارد.

منابع مالی

منابع مالی در این پژوهش توسط نویسندگان تهیه شد.

منابع

1. Afshar bakeshlou H, Abdi A, Azarbayjani M A, Barari A. Effect of aerobic exercise combined with berberine chloride hydrate on cardiac tissue of streptozotocin-diabetic rats. *Iran J Diabet Met.* 2020;19(2):81-92. [Full text in Persian]
2. Abdi A, sheykholeslami z, Ghorbani hasan saraee A, abaszadeh h, farzanegi p, sheykholeslami z. Effects of aerobic training with coriander seed extract on serum paraoxonase-1, TNF- α , and CRP in diabetic rats. *J Neyshabur Uni Med Sci.* 2018;6(1):70-80. [Full text in Persian]
3. Chang W, Zhang M, Li J, Meng Z, Xiao D, Wei S, et al. Berberine attenuates ischemia-reperfusion injury via regulation of adenosine-5'-monophosphate kinase activity in both non-ischemic and ischemic areas of the rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2012;26(6):467-78.
4. Che Y, Shen D-F, Wang Z-P, Jin Y-G, Wu Q-Q, Wang S-S, et al. Protective role of berberine in isoprenaline-induced cardiac fibrosis in rats. *BMC Cardiovasc Disord.* 2019;19(1):1-11.
5. Di Y-F, Li D-C, Shen Y-Q, Wang C-L, Zhang D-Y, Shang A-Q, et al. MiR-146b protects cardiomyocytes injury in myocardial ischemia/reperfusion by targeting Smad4. *Am J Transl Res.* 2017;9(2):656.
6. Euler-Taimor G, Heger J. The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 2006;69(1):15-25.
7. Feng X, Sureda A, Jafari S, Memariani Z, Tewari D, Annunziata G, et al. Berberine in cardiovascular and metabolic diseases: from mechanisms to therapeutics. *Theranostics.* 2019;9(7):1923.

8. Giallauria F, Galizia G, Lucci R, D'Agostino M, Vitelli A, Maresca L, et al. Favourable effects of exercise-based Cardiac Rehabilitation after acute myocardial infarction on left atrial remodeling. *Int J Cardiol.* 2009;136(3):300-6.
9. Gomes AP, Duarte FV, Nunes P, Hubbard BP, Teodoro JS, Varela AT, et al. Berberine protects against high fat diet-induced dysfunction in muscle mitochondria by inducing SIRT1-dependent mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2012;1822(2):185-95.
10. Hosseini SE, Karimzadeh K. Anti-diabetic effects of hydroalcoholic juglans regia male flower extract on blood glucose level and on liver enzymes activity in intact and diabetogenized adult male rat. *J Birjand Uni Med Sci.* 2012;19(2):165-72. [Full text in Persian]
11. Hu X, Bai T, Xu Z, Liu Q, Zheng Y, Cai L. Pathophysiological fundamentals of diabetic cardiomyopathy. *Compr Physiol.* 2011;7(2):693-711.
12. Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, Matsusaka H, Matsushima S, Wen J, et al. Inhibition of TGF- β signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc Res.* 2004;64(3):526-35.
13. Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: an update of mechanisms contributing to this clinical entity. *Circ Res.* 2018;122(4):624-38.
14. Li X, Zhang Z-L, Wang H-F. Fusaric acid (FA) protects heart failure induced by isoproterenol (ISP) in mice through fibrosis prevention via TGF- β 1/SMADs and PI3K/AKT signaling pathways. *Biomed Pharmacother.* 2017;93:130-45.
15. Mahmoud AM, Abdel-Rahman MM, Bastawy NA, Eissa HM. Modulatory effect of berberine on adipose tissue PPAR γ , adipocytokines and oxidative stress in high fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *J Applied Pharm Sci.* 2017;7(04):001-10.
16. Mehdipoor M, Damirchi A, Razavi Tousi SMT, Babaei P. Concurrent vitamin D supplementation and exercise training improve cardiac fibrosis via TGF- β /Smad signaling in myocardial infarction model of rats. *J Physiol Biochem.* 2021;77(1):75-84.
17. MM HT, Hassanpour Fard M, Abolghasemi A, Ahmadi N, Hosseini M. Effect of Fitana Herbal Compound on Weight and Blood Lipid Profile of Male Wistar Rats. *Horizon Med Sci.* 2013;19(2):77-82.
18. Moghadam V, Piri M, Azarbayjani MA, Matin Homae H. The protective effect of aerobic exercise on breast cancer by TGF β protein and Smad-3 and MMP2 gene in female mice. *Sci J Kurdistan uni med sci.* 2017;22(3):60-73. [Full text in Persian]
19. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes J, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017;128:40-50.
20. Ren L, Sen U, Pushpakumar S. Exercise training reduces TGF- β mediated epithelial mesenchymal transition in diabetic kidney. *FASEB J.* 2017;31:1086.5-5.
21. Sadighi A, Abdi A, Azarbayjani MA, Barari A. Effect of Aerobic Training and Berberine Chloride Supplementation on Oxidative Stress Indices in the Heart

- Tissue of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J ilam uni med sci.* 2020;28(4):54-65. [Full text in Persian]
22. Sadighi A, Azarbayjani MA. Response of Some Apoptotic Indices to Six Weeks of Aerobic Training in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Med Lab J.* 2021;15(1):33-9.
 23. Shah MS, Brownlee M. Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular disorders in diabetes. *Circ Res.* 2016;118(11):1808-29.
 24. Silva E, Natali AJ, Silva MF, Gomes GJ, Cunha DN, Ramos RM, et al. Ventricular remodeling in growing rats with experimental diabetes: The impact of swimming training. *Pathol Res Pract.* 2013;209(10):618-26.
 25. Siraj AK, Pratheeshkumar P, Divya SP, Parvathareddy SK, Bu R, Masoodi T, et al. TGF β -induced SMAD4-dependent apoptosis proceeded by EMT in CRC. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(7):1312-22.
 26. Stratmann B, Tschoepe D. Heart in diabetes: not only a macrovascular disease. *Diabetes care.* 2011;34(Supplement_2):S138-S44.
 27. Wang H, Bei Y, Lu Y, Sun W, Liu Q, Wang Y, et al. Exercise prevents cardiac injury and improves mitochondrial biogenesis in advanced diabetic cardiomyopathy with PGC-1 α and Akt activation. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35(6):2159-68.
 28. Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Intensity-controlled treadmill running in rats: $\dot{V}o_2$ max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(3):H1301-H10.
 29. Xiao L, He H, Ma L, Da M, Cheng S, Duan Y, et al. Effects of miR-29a and miR-101a expression on myocardial interstitial collagen generation after aerobic exercise in myocardial-infarcted rats. *Arch Med Res.* 2017;48(1):27-34.
 30. Xie F, Ling L, van Dam H, Zhou F, Zhang L. TGF- β signaling in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2018;50(1):121-32.
 31. Yang H, Shang X, Zhong G, Hong L, Li Z, Zhuang W, et al. Berberine protects human and rat cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-triggered apoptosis. *Am J Transl Res.* 2021;13(2):659.
 32. Zhao M, Mishra L, Deng C-X. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci.* 2018;14(2):11.
 33. Zhu Q-e, editor. *The Role and Mechanism of Exercise for Prevention of Myocardial Fibrosis in Diabetes.* 2018 International Workshop on Bioinformatics, Biochemistry, Biomedical Sciences (BBBS 2018); 2018: Atlantis Press.

**Interaction effect of Aerobic Training and Berberine Chloride intake on the Expression of TGF- β and Smad4 of Heart Tissue in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats**Ghasem Torabi Palat Kaleh¹, Mostafa Kazemi^{1*}, Soraya Saeidi¹

Received: 30/4/2022

Accepted: 25/7/2022

Published: 1/8/2022

Abstract

Aim: Diabetes leads to extensive cardiac fibrosis, which worsens as disease progresses, culminating in diabetic cardiomyopathy. In this study, we investigated the effect of aerobic exercise (AT) and berberine chloride (BR) on the expression of TGF- β /Smad4 heart tissue in diabetic rats.

Methods: In this experimental study, 32 male Wistar rats (276/09 \pm 17.03, 10 weeks old) were randomly divided into four groups (n=8): Diabetes-Berberine (BRDM), Diabetes-Aerobic Training (ATDM), Diabetes-Aerobic Training-Berberine (ATBRDM). Diabetes was induced by injection of streptozotocin. Training groups have performed a progressive aerobic running program (at 10-18 m/min, 10-40 min/day, and 5 days/week) on a motor-driven treadmill for six weeks. Berberine chloride (30 mg/kg/day) were administered orally, by gavage, once a day. At the end of six weeks-- heart tissue samples were collected. TGF- β and Smad4 gene expression levels were measured by real-time PCR. Data were analyzed using ANOVA at p<0.05.

Results: The results showed that AT, BR and AT-BR combination in diabetic rats significantly decreased TGF- β (p = 0. 0001)) and Smad4 (p = 0. 0001) in heart tissue. Also, a significant decreased the amount of this index was observed in the ATBRDM compared to the BRDM and ATDM groups (p <0.05).

Conclusions: AT and BR by improving heart tissue fibrosis markers is an effective strategy to improve cardiac fibrosis in diabetic rats with STZ. In addition, AT and BR supplementation showed a protective cardioprotective effect of reducing cardiac fibrosis markers.

Keywords: Exercise, Berberine Chloride, Diabetes, Cardiac fibrosis.

1. Department of Physical Education and Sports Science, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran..

* Email: sport.tmr@gmail.com

