مجله دیابت و متابولیسم ایران. مهر- آبان ۱۳۹۸؛ دوره ۱۹ (شماره ۱) ۳۵-۲۶

مقاله پژوهشی

تأثیر ۴ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا بر محتوای پروتئین‌های هدف میکانیکی راپامایسین در پستانداران (mTOR) و عامل رونویسی استرول تنظیم‌کننده پروتئین-۱ (SREBP1) در بافت چربی موش‌های صحرایی چاق مبتلا به دیابت نوع دو

فاطمه زارعی[۱]، محمد شرافتی مقدم[۲]، مریم شعبانی*[۲]، مسعود جوکار[۳]

چکیده

مقدمه: چاقی و دیابت نوع دو می‌تواند در عملکرد مسیرهای مهم سلولی اختلال ایجاد کند. فعال شدن مسیر mTOR منجر به تنظیم پروتئین SREBP1 برای متابولیسم و تنظیم بافت چربی می‌شود. هدف از تحقیق حاضر، بررسی تأثیر ٤ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا بر محتوای پروتئین‌های mTOR و SREBP1 در بافت چربی موش‌های صحرایی چاق مبتلا به دیابت نوع دو است.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۱۲ سر موش صحرایی نر ۲ ماهه از نژاد اسپراگوداولی با میانگین وزن ۲۰±۳۰۰ گرم انتخاب و پس از دیابتی شدن از طریق القاء STZ و نیکوتین‌آمید به روش تصادفی به ۲ گروه، تمرین دیابتی (٦ سر) و کنترل دیابتی (٦ سر) تقسیم شدند؛ گروه تمرینی ٤ روز در هفته مطابق با برنامه‌ی تمرینی به‌مدت ٤ هفته به تمرین ورزشی HIIT پرداختند؛ در حالی که گروه کنترل هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از آزمون t-مستقل و t-وابسته استفاده شد.

یافته‌ها: تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین mTOR (P<۰/۱۲) مشاهده نشد؛ اما محتوای پروتئین SREBP1 (P<۰/۰۰۱) افزایش معنی‌دار یافت. وزن گروه کنترل (P=۰/۰۰۰۱) و گروه HIIT (P=۰/۰۱۰) افزایش معنی‌داری را نشان داد. قند خون گروه کنترل نیز افزایش معنی‌داری داشت (P=۰/۰۰۰۱)؛ اما، قند خون موش‌های گروه HIIT، تغییر معنی‌داری را نشان نداد (P=۰/۱٤).

نتیجه‌گیری: ٤ هفته تمرین HIIT نتوانست وزن، میزان قند خون و محتوای پروتئین‌های mTOR را تغییر معنی‌داری دهد. اما منجر به افزایش محتوای SREBP1 شد؛ بنابراین در تجویز تمرین HIIT باید عواملی مانند مدت زمان و شدت تمرین به گونه‌ای تنظیم شود که بهترین نتیجه حاصل شود.

واژگان کلیدی: بافت چربی، تمرین تناوبی با شدت بالا، پروتئین mTOR، پروتئین SREBP1، دیابت نوع دو

۱- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده‌ی علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد هشتگرد، البرز، ایران

۳- دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

***نشانی:** استان البرز، هشتگرد، پایین‌تر از میدان صنعت، خیابان شهید صدوقی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد هشتگرد، کد پستی: ۳۳٦۱٦۵۹۹۱۳

تلفن: ۰۲٦۳۳۳۰۸۵۲۳، پست الکترونیک: maryam.shabani@hiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۲۵ **تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹/۰۸/۱۷** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۲۱**

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-15]

مقدمه

افزایش وزن و درصد چربی بدن رابطه‌ی مستقیم با افزایش مقاومت به انسولین دارد [۱]. وجود این دو عامل درصد ابتلا به دیابت نوع دو را افزایش می‌دهد [۲]. براساس آمار جهانی تخمین زده می‌شود ۸۰ درصد افراد مبتلا به دیابت نوع دو قبل از ابتلا به دیابت، اضافه وزن داشته یا چاق و بی‌تحرک بوده‌اند. یکی از دلایل اصلی بروز دیابت نوع دو، اختلال در عمل انسولین در بافت‌های اصلی مصرف‌کننده گلوکز است [۳]. زمانی که ترشح انسولین نتواند برداشت گلوکز در این بافت‌ها را تضمین کند، مقاومت به انسولین و به‌دنبال آن هایپرگلیسمی[1] اتفاق می‌افتد [٤]. همچنین مشخص شده است که نقص در متابولیسم چربی منجر به بیماری‌های متعددی از جمله چاقی، مقاومت به انسولین، بیماری کبد چرب غیر الکلی، آترواسکلروز و سرطان می‌شود. عوامل زیادی در القای مقاومت به انسولین نقش دارند که از جمله این عوامل می‌توان به پروتئین‌های سلولی (mTOR و SREBP1) اشاره کرد [۵].

مسیر هدف مکانیکی راپامایسین در پستانداران (mTOR)[2] یکی از مهم‌ترین مسیرهای داخل سلولی است که وضعیت انرژی سیستمیک را در سطح ارگانیسم و سلولی هماهنگ می‌کند. مشخص شده است که سیگنالینگ mTOR با بیماری‌های مختلفی از جمله چاقی، دیابت نوع دو، سرطان و بیماری‌های عصبی در ارتباط است [٦]. Porstmann و همکاران (۲۰۰۸) اولین کسانی بودند که نشان دادند مسیر mTORC1 با فعال‌کردن SREBP1 لیپوژنز را تنظیم می‌کند. آنها با استفاده از سلول‌های اپیتلیال[3] مشاهده کردند که راپامایسین بیان SREBP-1[4] ناشی از فعال‌شدن پروتئین AKT و تجمع هسته‌ای، بیان چندین ژن لیپوژنیک و سنتز کلاس‌های مختلف لیپیدها را مسدود می‌کند [۷].

علاوه بر این، نشان داده شده است که مسیر mTORC1 برای لیپوژنز در موش‌ها و شرایط کشت سلولی آزمایشگاهی مورد نیاز است. مسیر mTORC1 لیپوژنز را در مسیر وابسته به SREBP1 یا از طریق فسفوریلاسیون پروتئین S6K1[5] با تعدیل محلی‌سازی لیپین-۱[6] و بیان SREBP1 ترویج می‌کند [۸، ۹]. پروتئین SREBP1 جزء خانواده‌ی مهم از فاکتورهای رونویسی به‌نام پروتئین‌های تنظیمی اتصال‌دهنده استرول (SREBPs) هستند که در سنتز لیپیدها نقش دارند. SREBPs فاکتورهای رونویسی زیپ لوسین مارپیچ-حلقه-مارپیچ هستند که با کنترل بیان چندین ژن لیپوژنیک، هموستاز لیپید را تنظیم می‌کنند [۱۰]. تاکنون سه ایزوفرم (SREBP-1a، SREBP-1c و SREBP-2) از این خانواده کشف شده است. SREBP-1a و SREBP-1c (به آن SREBP1 نیز گفته می‌شود) که توسط یک ژن مشابه (SREBF1) رمزگذاری شده‌اند و در اولین اگزون آن‌ها با SREBP2 متفاوت هستند. SREBP1 یک تنظیم کننده‌ی رونویسی اصلی از سنتز اسیدهای چرب با واسطه‌ی انسولین است [۱۱]. بیان ژن SREBP1 به سرعت در پاسخ به مصرف مواد غذایی در بافت‌ها ایجاد می‌شود. نشان داده شد انسولین یک تنظیم کننده مهم مثبت بیان SREBP1 است [۵].

چاقی و تغذیه بیش از حد باعث افزایش بیش فعالی مزمن فعالیت mTOR در بافت‌های متعدد می‌شود [۱۲]. بنابراین، اختلال در تنظیم سیگنال mTOR ممکن است توسعه‌ی دیابت نوع دو یا مقاومت به انسولین را تسهیل کند [۱۳]. سیگنالینگ mTORC1 در جنبه‌های مختلف در زیست‌شناسی بافت چربی نقش داشته است. mTOR برای چربی‌زدایی و نگه‌داری بافت‌های چربی بسیار مهم است [١٤]. در موش‌هایی که پروتئین mTOR آن‌ها حذف شده بود، توده‌ی بافت چربی آن‌ها کاهش و منجر به مقاومت به انسولین و کبد چرب شده بود که این نقش اساسی این پروتئین در چربی و سوخت و ساز انرژی سیستمیک را نشان می‌دهد [۱۵].

در سال‌های اخیر، تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT)[7] به‌عنوان یک مداخله ورزشی موثر شناخته شده است که می‌تواند منافع مشابه و یا بیشتری از تمرینات تداومی با شدت‌های متفاوت به

[1] Hyperglycemia
[2] Mechanistic Target Of Rapamycin
[3] Epithelial Cell
[4] Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1
[5] Ribosomal Protein S6 Kinase Beta-1
[6] Lipin-1
[7] High-intensity interval training

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-15]

همراه داشته باشد [۱۶]. تمرینات HIIT منجر به اثرات مشابه با تمرینات دیگر در سازگاری‌های متابولیکی عضله‌ی اسکلتی، آمادگی قلبی عروقی و ترکیب بدن را نشان داده است. همچنین مشخص شده است که HIIT می‌تواند آثار مفیدتری برای بهبود کنترل گلیسمی داشته باشد [۱۷]. به غیر از حجم ورزش، شدت و نوع ورزش یک عامل مهم است که باید در درمان چاقی مورد توجه قرار گیرد. تمرینات ورزشی احتمالاً یکی از محبوب‌ترین و مؤثرترین روش‌های درمانی برای کاهش وزن بدن هستند [۱۸]. در تحقیقی Symonds و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که تمرینات استقامتی منجر به افزایش معنی‌داری در محتوای پروتئین‌های mTOR و SREBP در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل می‌شود [۱۹]. در تحقیقی دیگر Ebrahimi و همکاران (۱۳۹۶) به بررسی بیان ژن SREBP1 در متابولیسم لیپید به‌دنبال تمرین هوازی در کبد موش‌های صحرایی پرداختند. مصرف غذای پرچرب بیان ژن SREBP1 را افزایش داده بود و بیان SREBP1 در گروه با تغذیه طبیعی با تمرین شدید کاهش پیدا کرده بود [۲۰].

کشف ارتباط بین mTORC1 و SREBP1 فصل جدیدی از درک ما از سازوکارهای مولکولی تنظیم لیپوژنز باز می‌کند. درک بهتر این سازوکارها برای توسعه‌ی ابزارهای جدید برای درمان بیماری‌هایی مانند چاقی و دیابت و عوارض آن مهم است. یافته‌های اخیر درباره‌ی مسیر mTORC1 نشان می‌دهد که سنتز لیپیدها را با فعال‌کردن عامل SREBP1 تقویت می‌کند. برای به‌دست آوردن اطلاعات بیشتر در زمینه‌ی کنترل تعادل متابولیسم لیپید، به‌ویژه به‌دنبال تمرینات ورزشی گوناگون که اطلاعات کمی در این رابطه در دست است، نیاز به مطالعه‌ی ژن‌ها و مسیرهای متابولیک در شرایط مختلف وجود دارد؛ بنابراین، شناخت عوامل تأثیرگذار به‌خصوص فعالیت ورزشی بر روی پروتئین‌های mTOR و SREBP1 می‌تواند به بیماری چاقی و دیابت نوع دو کمک شایانی کند؛ بنابراین هدف از پژوهش حاضر، تأثیر ٤ هفته تمرین HIIT بر محتوای پروتئین‌های mTOR و SREBP1 بافت چربی موش‌های صحرایی نر اسپراگوداولی چاق مبتلا به دیابت نوع دو است.

روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی-بنیادی است که به‌صورت گروه آزمایش و کنترل انجام گرفت؛ در این پژوهش، ۱۲ سر موش صحرایی نر ۲ ماهه از نژاد اسپراگوداولی از حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری شدند. موش‌های صحرایی به‌مدت ٤ هفته تحت غذای کنترل‌شده پرچرب به‌صورت پلت (خریداری شده از شرکت به‌پرور؛ ترکیبی از پودر غذای استاندارد موش (۳٦٥ گرم/کیلوگرم)، چربی گوسفندی (۳۱۰ گرم/کیلوگرم)، مخلوط ویتامین‌ها و مواد معدنی (٦۰ گرم/کیلوگرم)، DL میتونین (۳ گرم/کیلوگرم)، پودر مخمر (۱ گرم/کیلوگرم) و کلریدسدیم (۱ گرم/کیلوگرم)) جهت اضافه وزن به میانگین وزن ۲۰±۳۰۰ گرم رسیدند [۲۱]. پس از القای دیابت موش‌های صحرایی به روش تصادفی به ۲ گروه: گروه تمرین دیابتی (٦ سر) و کنترل دیابتی (٦ سر) تقسیم شدند. موش‌های صحرایی در حیوان خانه دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی با دمای ۲±۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ٤۰-۵۰ درصد و چرخه‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲-۱۲ نگه‌داری می‌شدند. غذای حیوانات به‌صورت آزادانه و استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد. همچنین آب مورد نیاز حیوانات به‌صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه‌ی حیوانات آزمایشگاهی، در اختیار آن‌ها قرار داده شد. اصول اخلاقی (کد اخلاقی IR.IAU.SHK.REC.1398.023) مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد مورد توجه قرار گرفت.

روش القاء دیابت

در هفته‌ی دهم بعد از به وزن رسیدن موش‌ها برای ایجاد دیابت در موش‌های صحرایی، محلول استرپتوزوتوسین (STZ)[1] (حل‌شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با pH=٤/۵) به‌صورت داخل صفاقی و فقط یک مرتبه با دوز ٦۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن بعد از ۱۵ دقیقه تزریق

[1] Streptozotocin

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-15]

نیکوتین‌آمید با دوز ۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق گردید [۲۲]. جهت اطمینان از دیابتی شدن حیوان‌ها، قند خون آن‌ها ۷۲ ساعت پس از تزریق با کمک گلوکومتر و نمونه‌ی خونی گرفته شده از سیاهرگ دمی موش‌ها قند خون اندازه‌گیری شد؛ قند خون بالای ۱۳۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته شد [۲۳].

پروتکل تمرینی

موش‌های گروه‌های تمرین برای آشنایی با نوارگردان به‌مدت یک هفته با سرعت ۵ تا ۱۰ متر بر دقیقه، روی نوارگردان دویدند. برنامه‌ی گروه تمرینی به‌مدت ٤ هفته و هر هفته ٤ جلسه بود. موش‌های تمرینی در شروع هر جلسه با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه گرم می‌کردند. سپس برنامه‌ی تمرینی شامل ۵ وهله ٤ دقیقه‌ای با شدت معادل ۸۵ تا ۹۵ درصد حداکثر سرعت و دوره‌های استراحت فعال ۳ دقیقه‌ای با شدت معادل ۵۰ تا ٦۰ درصد حداکثر سرعت انجام شد. در پایان هر جلسه نیز موش‌ها با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه سرد می‌کردند. کل مدت‌زمان دویدن موش‌های صحرایی در هر جلسه بر روی نوارگردان ٤٤ دقیقه بود. شیب نوارگردان صفر درجه و در ٤ هفته تغییری نداشت (جدول ۱) [٢٤].

جدول ۱- پروتکل تمرینی

مراحل تمرین / مؤلفه تمرین	گرم کردن	بدنه اصلی تمرین		سرد کردن
		تناوب شدید (۵ دوره)	تناوب کم شدت (٤ دوره)	
زمان تمرین (دقیقه)	٦ دقیقه	٤ دقیقه	۳ دقیقه	٦ دقیقه
درصد سرعت دویدن بر اساس حداکثر سرعت	۳۰ تا ۵۰ درصد حداکثر سرعت	۸۵ تا ۹۵ درصد حداکثر سرعت	۵۰ تا ٦۰ درصد حداکثر سرعت	۳۰ تا ۵۰ درصد حداکثر سرعت
سرعت دویدن (متر بر دقیقه)	۱۰ تا ۱۲	۲۰ تا ۳۰	۱۲ تا ۱۵	۱۰ تا ۱۲
شیب نوارگردان (درجه)	صفر	صفر		صفر

آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت با سرعت ۵ متر در دقیقه شروع و هر ۳ دقیقه سرعت تردمیل ۵ متر در دقیقه افزایش یافت تا موش‌های صحرایی به خستگی (چسبیدن موش‌ها به انتهای تردمیل) برسند. سرعتی که در آن موش‌های صحرایی به خستگی رسیدند، به‌عنوان حداکثر سرعت در نظر گرفته شد [۲۵]. در این مدت، گروه کنترل هیچ‌گونه برنامه‌ی تمرینی نداشتند. همچنین موش‌های صحرایی هیچ‌گونه درمانی با انسولین را در طول دوره پژوهش نداشتند.

روش بافت‌برداری

برای از بین بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای غیرقابل کنترل استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه‌ی تمرینی، بعد از ٢٤ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین، موش‌ها با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۳ تا ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، بی‌هوش شدند. سپس بافت چربی زیر جلدی از مکان لایه‌ی چربی اپیدیدیمال[1] بدن حیوان برداشته شد و در سرم فیزیولوژیک شستشو داده و سپس بلافاصله با استفاده از مایع ازت منجمد (از بخش فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد) و برای سنجش‌های بعدی با دمای ۸۰- در فریزر (مدل AFR-80، شرکت آرمینکو، ساخت ایران) گذاشته شد.

[1] Epididymal Fat Pad

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-15]

اندازه‌گیری متغیرهای بیوشیمیایی

با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن-بلات متغیرهای پژوهش اندازه‌گیری شد. برای استخراج پروتئین‌های بافت چربی زیر جلدی‌از بافر RIPA حاوی ۰/۰۵ میلی مولار بافر تریس (pH برابر ۸)، ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد EGTA، یک درصد سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate; SDS) به اضافه ۰/۱ درصد آنتی‌پروتئاز کوکتیل (sigma) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌گرم بافت در ۵۰۰ میکرولیتر بافر حاوی آنتی پروتئاز توسط یک هموژنایزر دستی هموژن شد و نیم ساعت در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شد و سپس در یک سانتریفوژ یخچال‌دار (bo, sw14rfroil) در دور ۱۲۰۰۰ و ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد؛ سپس مایع رویی جمع‌آوری شده و غلظت پروتئین آن با کیت تعیین کننده‌ی پروتئین (Bio-Rad) اندازه‌گیری گردید (در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد).

در نهایت در ۲۰ درجه زیر صفر نگه‌داری شد، سپس هموژن به‌دست آمده به نسبت ۱:۱ با نمونه‌ی لودینگ بافر (mM50 تریس-کلرید هیدروژن، ۲ درصد سدیم دو دسیل سولفات، ۱۰ درصد گلیسرول، ۵ درصد بتا-مرکاپتواتانول و ۰/۰۰۵ درصد برموفنول آبی) مخلوط گردید. در ادامه، نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه جوشانده شد تا تمام پروتئین‌ها کاملاً دناتوره شوند. پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل SDS-Polyacrylamide جدا شده و به غشای نیترو سلولز منتقل شدند. غشاء به‌مدت ۱ ساعت در ۵ درصد BSA در Tris-Buffered Saline و ۰/۱ درصد (Tween 20 TBST) مسدود شد و در آنتی‌بادی اولیه (۵۰۰:۱) انکوبه شد. انکوباسیون در آنتی‌بادی ثانویه روز بعد به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق در ٤ درصد TBST انجام شد. پروتئین‌ها با یک واکنش شیمیایی لومینسانس (ECL) و با تجزیه و تحلیل densitometry با نرم‌افزار نرم افزار Image J (نسخه ۱/۸/۰/۱۱۲) اندازه‌گیری شد. آنتی‌بادی اولیه و ثانویه anti-SREBP1 (SC-13551) و anti-mTOR (SC-293133) شرکت سانتاکروز ساخت کشور آمریکا مورد استفاده قرار گرفتند [۲٦].

ابتدا از آزمون کالموگروف اسمیرنوف (KS) برای تعیین نرمالیتی توزیع داده‌های پژوهش استفاده شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها در متغیرها، از آزمون پارامتریک t-وابسته و t-مستقل برای مقایسه گروه‌ها استفاده شده است. اطلاعات در قالب جدول مربوطه ارائه شده است. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، با استفاده از نرم افزار SPSS.19 انجام گرفته است. سطح معنی‌داری تجزیه و تحلیل آماری تحقیق حاضر، P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

در پایان پژوهش، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که وزن (گرم) موش‌های صحرایی گروه کنترل در هفته چهارم نسبت به هفته اول افزایش معنی‌داری دارد (P=۰/۰۰۰۱)؛ همچنین، وزن موش‌های گروه تمرین به‌دنبال ٤ هفته تمرین HIIT، نسبت به هفته‌ی اول افزایش معنی‌داری را نشان داد (P=۰/۰۱۰). از طرفی قند خون (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) موش‌های صحرایی گروه کنترل در هفته چهارم نسبت به هفته اول افزایش معنی‌داری داشت (P=۰/۰۰۰۱)؛ اما، قند خون موش‌های گروه تمرین به‌دنبال ٤ هفته تمرین HIIT، نسبت به هفته اول تغییر معنی‌داری را نشان نداد (P=۰/۱٤) (جدول ۲).

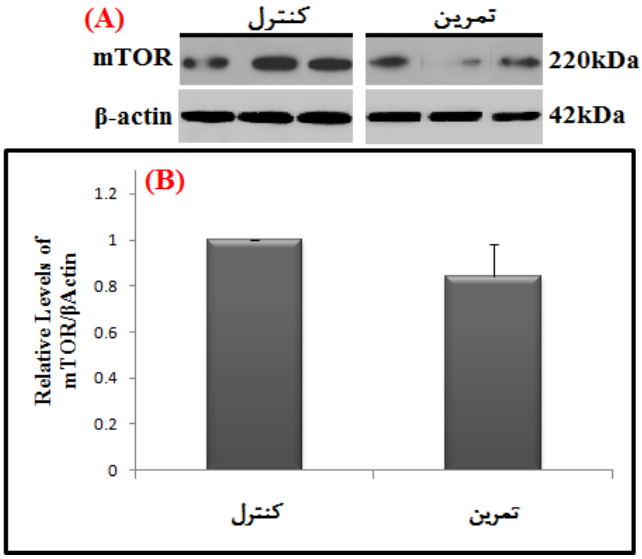
[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-15]

جدول ۲- نتایج آماری t-وابسته برای متغیرهای وزن (گرم) و قند خون (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)

متغیر	گروه	میانگین	انحراف استاندارد	مقدار t
وزن (گرم)	کنترل (هفته اول)	۳۱۶/۵۰	٤/۷۲	*۹/۰۰
	کنترل (هفته چهارم)	۳۵۸/۳۳	۱۲/۰٤	
	تمرین (هفته اول)	۳۱۸/۸۳	۵/۵٦	*٤/۰٦
	تمرین (هفته چهارم)	۳۲٦/۸۳	٤/۰۲	
قند خون (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	کنترل (هفته اول)	۲۲٤/۱۷	۲۱/۳٦	*۱۳/۷۱
	کنترل (هفته چهارم)	۳۲۸/۵۰	۱۹/۷۵	
	تمرین (هفته اول)	۲۳۵/۵۰	۱۹/۸۵	۱/۷۱
	تمرین (هفته چهارم)	۲٤٤/۱۷	۱٦/٤۳	

گروه کنترل (٦سر موش)، گروه تمرین (٦سر موش)، آزمون آماری t-وابسته، *وجود سطح معناداری

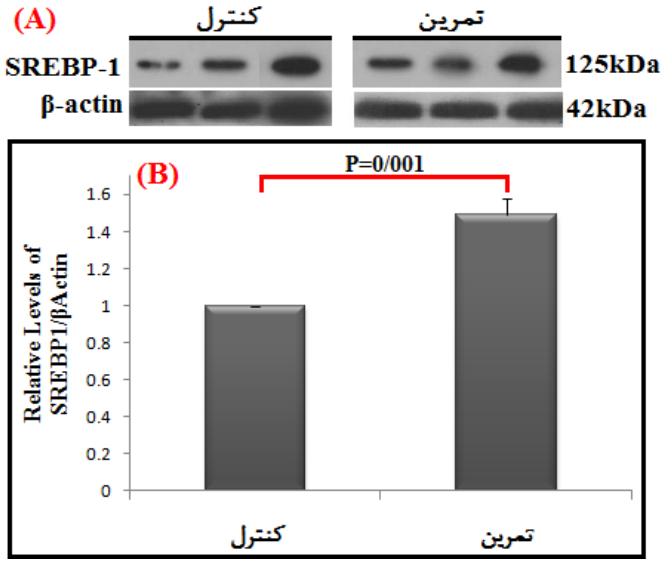
در پایان پژوهش، نتایج نشان دادند که به‌دنبال چهار هفته تمرین HIIT، تغییر معنی‌داری میان محتوای پروتئین mTOR در بین گروه‌های تمرین دیابتی و کنترل دیابتی وجود ندارد (P=۰/۱۲) (شکل ۱). اما، چهار هفته HIIT منجر به تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین SREBP1، بین گروه‌های تمرین دیابتی و کنترل دیابتی شد (P=۰/۰۰۱) (شکل ۲).



شکل ۱- مقایسه محتوای پروتئین mTOR در گروه‌های مورد مطالعه.

A، تصاویر ایمونوبلاتینگ پروتئین mTOR و β-actin به عنوان لودینگ کنترل در بافت چربی زیر جلدی. B، نمودار ستونی نشان دهنده‌ی مقادیرکمی شده باندهای پروتئین mTOR در مقابل لودینگ کنترل که به‌صورت چند برابر از گروه کنترل ارائه شده است.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-15]



شکل ۲- مقایسه محتوای پروتئین SREBP1 در گروه‌های مورد مطالعه.

A، تصاویر ایمونوبلاتینگ پروتئین SREBP1 و β-actin به‌عنوان لودینگ کنترل در بافت چربی زیر جلدی. B، نمودار ستونی نشان دهنده‌ی مقادیرکمی شده باندهای پروتئین SREBP1 در مقابل لودینگ کنترل که به‌صورت چند برابر از گروه کنترل ارائه شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر وزن موش‌هایی صحرایی در گروه کنترل و تمرین بعد از چهار هفته تمرین HIIT افزایش معنی‌داری را نشان داد. از طرفی، تمرین HIIT نتوانست قند خون موش‌های صحرایی را در گروه‌های تمرین و کنترل کاهش معنی‌داری دهد.

در تمرینات HIIT عامل شدت می‌تواند بسیار مهم و قابل توجه باشد و در افراد دارای اضافه وزن یا چاق، شواهد قطعی برای اثرات مطلوب‌تر تمرین تناوبی با شدت بالا، متوسط و کم برای کنترل وزن بدن یا کاهش توده‌ی چربی وجود دارد [۲۷]. در تحقیق حاضر وزن موش‌های صحرایی در گروه کنترل که هیچ‌گونه فعالیتی نداشتند در پایان هفته چهارم نسبت به هفته اول حدود ٤٢ گرم افزایش داشته است؛ اما در گروه تمرین حدود ۸ گرم افزایش داشته است. این نشان دهنده‌ی این مطلب است که تمرینات HIIT منجر به تنظیم قابل‌توجهی در وزن آزمودنی‌های دیابتی نوع دو می‌شود. از آنجا که تمرین تناوبی با شدت‌های مختلف برای کاهش وزن بدن مفید نشان داده شده است، شدت فعالیت ورزشی را باید به نسخه‌ی منحصر به فرد و براساس نتایج مختلف بر بافت چربی یا کاهش وزن تبدیل کرد. بنابراین، تجویز ورزش‌های هوازی با شدت بالا مانند HIIT برای افراد چاق می‌تواند عاملی برای کنترل وزن و چاقی باشد [۲۸]. نشان داده شده است که تمرین HIIT باعث تنظیم وزن بدن می‌شود [۲۹]؛ همچنین تمرینات HIIT با شدتی بالایی که انجام می‌شود می‌تواند منجر به هیپرتروفی عضلانی شود؛ بنابراین، این تنظیم وزن ممکن است براساس تغییر بافت چربی به بافت عضلانی باشد [۳۰]. در کل به‌نظر می‌رسد که تمرین HIIT در افراد چاق، حتی در صورت عدم تغییر در وزن بدن، می‌تواند در کاهش چربی بدن مؤثر باشد، با وجود این واقعیت که HIIT تقریباً ٤٠ درصد به زمان کمتری نیاز دارد [۳۱].

از طرفی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که انجام تمرین HIIT منجر به تنظیم قند خون نمی‌شود. در تحقیقی Karimi و همکاران (۱۳۹۸) به بررسی اثر تمرینات HIIT بر بیان قندخون رت‌های دیابتی پرداختند. سطوح گلوکز ناشتا در گروه HIIT نسبت به گروه کنترل کاهش یافت [۳۲]. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق حاضر در یک راستا نیست؛ زیرا تمرین HIIT در

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-15]

تحقیق حاضر نتوانست سطوح قند خون را تنظیم کند؛ زیرا در هر دو گروه کنترل و تمرین در پایان هفته‌ی چهارم نسبت به هفته‌ی اول افزایش مشاهده شد. در کل نشان داده شده است که در افراد مبتلا به دیابت نوع دو انجام فعالیت ورزشی منجر به تنظیم وزن، قند خون و افزایش مقاومت به انسولین می‌شود [۳۳]؛ اما تمرین HIIT علاوه بر داشتن مزیت‌های مهم در صورت تغییر در عواملی مانند شدت و مدت تمرین می‌تواند اثرات مختلفی بر روی وزن و قند خون داشته باشد که باید در این حین به عوامل دیگری زمان ریکاوری تمرین نیز دقت کرد. همچنین نتایج، تغییر معنی‌داری را بین گروه‌های تمرین و کنترل در محتوای پروتئین mTOR نشان نداد؛ از طرفی، تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین SREBP1 گروه تمرین نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در طی چند سال گذشته، مسیر mTORC1 را به‌عنوان تنظیم کننده‌ی مهم لیپوژنز شناسایی کرده‌اند. mTORC1، که انسولین و مواد مغذی را حس می‌کند، بیوسنتز لیپید را با تنظیم عملکرد SREBP1 در چند مرحله فعال می‌کند. اختلال در تنظیم سیگنالینگ mTORC1 منجر به چاقی/اضافه وزن می‌شود. اما، با توجه به نقش اصلی mTOR در رشد و تقسیم، احتمالاً مهار سیستمیک mTOR عوارض جانبی قابل توجهی خواهد داشت که ممکن است مزایای درمانی مرتبط با استفاده از مهار کننده‌های mTOR را کاهش دهد [۵]. در تحقیقی Bae و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که تمرین ورزشی و تغییر در رژیم غذایی منجر به بهبود چاقی و مقاومت به انسولین از طریق مسیر mTOR می‌شود [۳٤]. در تحقیق حاضر محتوای پروتئین mTOR تغییر معنی‌داری را نشان نداد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تمرین HIIT نمی‌تواند بر روی محتوای این پروتئین تاثیرگذار باشد. از عوامل تاثیرگذار می‌توان به‌مدت زمان فعالیت ورزشی اشاره کرد؛ زیرا به‌نظر می‌رسد که ٤ هفته تمرین ورزشی برای تغییر مثبت محتوای پروتئین mTOR کم است. همچنین شدت تمرین HIIT نیز می‌تواند عامل مهم دیگر باشد.

در کل مسیر احتمالی در تحقیق حاضر مسیر mTORC1 می‌باشد که ممکن است شبکه رونویسی SREBP را از طریق تنظیم منفی لیپین-۱ تنظیم کند [۳۵]. فسفریلاسیون لیپین-۱ توسط mTORC1 منجر به تنظیم موضع سلولی خود می‌شود، که شامل لیپین-۱ فسفریله‌شده ساکن در سیتوپلاسم و لیپین-۱ فسفریله شده مجتمع در هسته است. لیپین-۱ منجر به تنظیم پروتئین SREBP1 می‌شود [۳٦].

در تحقیقی دیگر Hedayati Katouli و همکاران (۱۳۸۹) به بررسی اثر تمرین استقامتی و HIIT بر بیان پروتئین SREBP1 در موش‌های صحرایی تغذیه شده با غذای پرچرب پرداختند. تمرین استقامتی و HIIT اثر معنی‌داری بر کاهش بیان ژن SREBP1 داشتند [۳۷]. در مقابل در تحقیقی Asano و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی اثرات رژیم غذایی ژاپنی در ترکیب با تمرین ورزشی بر تجمع چربی احشایی پرداختند. در این تحقیق محتوای پروتئین SREBP1 اندازه‌گیری شد. تفاوت معنی‌داری به‌دنبال تمرین ورزشی همراه با رژیم غذایی ژاپنی مشاهده نشد [۳۸]. از پروتئین‌های مهم و تاثیرگذار بر روی مسیر mTOR/SREBP1 پروتئین کلیدی AKT است. اهمیت پروتئین AKT در لیپوژنز در چندین مدل‌های تجربی نشان داده شده است. AKT منجر به ترویج لیپوژنز از طریق سازوکارهای مختلف می‌شود. هنگامی که توسط انسولین فعال می‌شود، AKT منجر به القاء و جذب گلوکز و گلیکولیز می‌شود که واسطه‌ی کربن مورد نیاز برای ترکیب لیپیدی را فراهم می‌کند. AKT همچنین با فعال کردن SREBP1 سبب ترویج رونویسی از ژن‌های کلیدی لیپوژنیک می‌شود. SREBP1 در سنتز اسید چرب با واسطه‌ی انسولین درگیر است [۳۹، ۵]. بیان ژن SREBP1 به سرعت در بافت در پاسخ به مصرف مواد غذایی فعال می‌شود. نشان داده شده است که انسولین عامل کلیدی در تنظیم مثبت SREBP1 می‌باشد. نکته‌ی مهم، مطالعات اخیر نشان می‌دهند که mTORC1 نقش کلیدی برای تنظیم SREBP1 است و القای واسطه انسولین رونویسی SREBP1 را افزایش می‌دهد [٤۰].

به‌طور کلی، براساس نتایج تحقیق حاضر، تمرین HIIT نتوانست وزن موش‌های صحرایی و همچنین میزان قند خون را تنظیم کند؛ این نشان دهنده‌ی این مطلب است که برای تجویز تمرینات HIIT برای افراد چاق مبتلا به دیابت نوع دو باید عوامل مهمی مانند شدت، مدت و زمان ریکاوری را به‌خوبی

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-15]

مورد بررسی قرار داد. چهار هفته تمرین HIIT منجر به تغییر در محتوای پروتئین‌های mTOR نشد؛ اما محتوای پروتئین SREBP1 به‌دنبال چهار هفته افزایش یافت. تنظیم متابولیسم لیپید در سطح سلولی برای حفظ هموستاز سلولی ضروری است. به همین دلیل، توسعه‌ی راهبرد به‌طور خاص تنظیم فعال‌سازی پروتئین SREBP1 در پایین‌دست مسیر mTORC1 بدون ایجاد اختلال در سایر فرآیندهای تنظیم‌شده ممکن است یک راه جالب برای درمان چاقی و دیابت نوع دو باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل تلاش نویسندگان مقاله پیش رو است که در دانشگاه علوم پزشکی شیراز و دانشگاه شیراز انجام گردیده است. از تمامی افرادی که در این امر مهم ما را یاری کردند، تشکر می‌شود.

مآخذ

1. Caprio S, Perry R, Kursawe R. Adolescent obesity and insulin resistance: roles of ectopic fat accumulation and adipose inflammation. *Gastroenterology* 2017; 152(7):1638-46.
2. Jayanthi R, Srinivasan AR, Hanifah M, Maran AL. Associations among Insulin resistance, triacylglycerol/high density lipoprotein (TAG/HDL ratio) and thyroid hormone levels—a study on type 2 diabetes mellitus in obese and overweight subjects. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 2017; 11:S121-6.
3. Czech MP. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature medicine* 2017; 23(7):804.
4. Umegaki H, Makino T, Uemura K, Shimada H, Hayashi T, Cheng XW, et al. The associations among insulin resistance, hyperglycemia, physical performance, diabetes mellitus, and cognitive function in relatively healthy older adults with subtle cognitive dysfunction. *Frontiers in aging neuroscience* 2017; 9(72):1-13.
5. Bakan I, Laplante M. Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. *Current opinion in lipidology* 2012; 23(3):226-34.
6. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. Cell 2017; 168(6):960-76.
7. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leevers S, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell metabolism* 2008; 8(3):224-36.
8. Daemen S, Kutmon M, Evelo CT. A pathway approach to investigate the function and regulation of SREBPs. *Genes & nutrition* 2013; 8(3):289-300.
9. Jeon TI, Osborne TF. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2012; 23(2):65-72.
10. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 2011; 146(3):408-20.
11. Caron A, Richard D, Laplante M. The roles of mTOR complexes in lipid metabolism. *Annual review of nutrition* 2015; 35:321-48.
12. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149(2):274-93.
13. Yuan T, Rafizadeh S, Gorrepati KD, Lupse B, Oberholzer J, Maedler K, et al. Reciprocal regulation of mTOR complexes in pancreatic islets from humans with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2017; 60(4):668-78.
14. Mao Z, Zhang W. Role of mTOR in glucose and lipid metabolism. *International journal of molecular sciences* 2018; 19(7):12-22.
15. Shan T, Zhang P, Jiang Q, Xiong Y, Wang Y, Kuang S. Adipocyte-specific deletion of mTOR inhibits adipose tissue development and causes insulin resistance in mice. *Diabetologia* 2016; 59(9):1995-2004.
16. Little JP, Jung ME, Wright AE, Wright W, Manders RJ. Effects of high-intensity interval exercise versus continuous moderate-intensity exercise on postprandial glycemic control assessed by continuous glucose monitoring in obese adults. *Applied physiology, nutrition, and* metabolism 2014; 39(7):835-41.
17. Hafstad AD, Lund J, Hadler-Olsen E, Höper AC, Larsen TS, Aasum E. High-and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* 2013; 62(7):2287-94.
18. Petridou A, Siopi A, Mougios V. Exercise in the management of obesity. *Metabolism* 2018; 163-169.
19. Symonds M, Bloor I, Galvez F, Domfeh E, Maicas B, Poston L, et al. Effect of a dietary and exercise intervention during pregnancy and lactation on white adipose tissue gene profiles and adiposity with maternal obesity. *The FASEB Journal* 2016; 30(1):1214-3.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-15]

20. Ebrahimi M, Fathi R, Ansari Pirsaraei Z, Talebi Garakani E. Relative Gene Expression of Key Genes Involved in Lipid Metabolism, Following High Fat Diet and Moderate and High Intensity Aerobic Training in Rat's Liver. *Sport Physiology* 2017; 9(34): 201-16.
21. Fathi R, Ebrahimi M, Sanami SK. Effects of High Fat Diet and High Intensity Aerobic Training on Interleukin 6 Plasma Levels in Rats. *Pathobiology Research* 2015; 18(3):109-16.
22. Safhi MM, Anwer T, Khan G, Siddiqui R, Moni Sivakumar S, Alam MF. The combination of canagliflozin and omega-3 fatty acid ameliorates insulin resistance and cardiac biomarkers via modulation of inflammatory cytokines in type 2 diabetic rats. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* 2018; 22(5):493-501.
23. Khalili A, Nekooeian AA, Khosravi MB. Oleuropein improves glucose tolerance and lipid profile in rats with simultaneous renovascular hypertension and type 2 diabetes. *Journal of Asian natural products research* 2017; 19(10):1011-21.
24. Sherafati Moghadam M, Salesi M, Daryanoosh F, Hemati Nafar M, Fallahi A. The Effect of 4 Weeks of High Intensity Interval Training on the Content of AKT1, mTOR, P70S6K1 and 4E-BP1 in Soleus Skeletal Muscle of Rats with Type 2 Diabetes: An Experimental Study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* 2018; 17 (9):843-854.
25. Garcia NF, Sponton AC, Delbin MA, Parente JM, Castro MM, Zanesco A, et al. Metabolic parameters and responsiveness of isolated iliac artery in LDLr-/-mice: role of aerobic exercise training. *American journal of cardiovascular disease* 2017; 7(2):64-71.
26. Shabani M, Daryanoosh F, Salesi M, Kooshki Jahromi M, Fallahi A A. Effect of continuous training on the level of PPAR-γ and PRDM16 proteins in adipose tissue in overweight diabetes rats. *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences* 2018; 22 (3):4-12.
27. De Feo P. Is high-intensity exercise better than moderate-intensity exercise for weight loss? *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2013; 23(11):1037-42.
28. Kokkinos P, Myers J, Nylen E, Panagiotakos DB, Manolis A, Pittaras A, et al. Exercise capacity and all-cause mortality in African American and Caucasian men with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32(4):623-8.
29. Jelleyman C, Yates T, O'Donovan G, Gray LJ, King JA, Khunti K, et al. The effects of high-intensity interval training on glucose regulation and insulin resistance: a meta-analysis. *Obesity reviews* 2015; 16(11):942-61.
30. Sherafati Moghadam M, Daryanoosh F, Salesi M, Fallahi A, Hemati Nafar M. The effect of high intensity interval training on complex mammalian target of Rapamycin 1 (mTORC1) pathway in Flexor hallucis longus muscle (FHL) of streptozotocin-induced diabetic rats. *Daneshvar Medicine* 2019; 27 (140) :1-10
31. Wewege M, Van Den Berg R, Ward RE, Keech A. The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews* 2017; 18(6):635-46.
32. Karimi M, Eizadi M. The effect of interval training on FOXO1 expression in pancreas tissue of diabetes rats with high fat diet and STZ. *Razi Journal of Medical Sciences* 2019; 26 (6) :95-104
33. Galbo H, Tobin L, van Loon LJ. Responses to acute exercise in type 2 diabetes, with an emphasis on metabolism and interaction with oral hypoglycemic agents and food intake. Applied Physiology, *Nutrition, and Metabolism* 2007; 32(3):567-75.
34. Bae JY, Shin KO, Woo J, Woo SH, Jang KS, Lee YH, et al. Exercise and dietary change ameliorate high fat diet induced obesity and insulin resistance via mTOR signaling pathway. *Journal of exercise nutrition & biochemistry* 2016; 20(2):28.
35. Lewis CA, Griffiths B, Santos CR, Pende M, Schulze A. Regulation of the SREBP transcription factors by mTORC1. *Biochemical Society Transactions* 2011; 495-499.
36. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 2011; 146(3):408-20.
37. Hedayati Katouli A, Azarbayjani M, Banaeifar A, Arshadi S. The Effect of Aerobic Training and Adenosine on the Expression of SREBP-1C and A1 Receptor in Hepatic Fat-fed Rats. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 2019; 14 (1) :1-9
38. Asano M, Iwagaki Y, Sugawara S, Kushida M, Okouchi R, Yamamoto K, et al. Effects of Japanese diet in combination with exercise on visceral fat accumulation. *Nutrition* 2019; 57:173-82.
39. Yecies JL, Zhang HH, Menon S, Liu S, Yecies D, Lipovsky AI, et al. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell metabolism* 2011; 14(1):21-32.
40. Li S, Ogawa W, Emi A, Hayashi K, Senga Y, Nomura K, et al. Role of S6K1 in regulation of SREBP1c expression in the liver. *Biochemical and biophysical research communications* 2011; 412(2):197-202.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-15]

THE EFFECTS OF 4 WEEKS HIGH INTENSITY INTERVAL TRAINING ON MAMMALIAN RAPAMYCIN TARGET PROTEIN (MTOR) AND STEROL TRANSCRIPTION FACTOR REGULATORY PROTEIN-1 (SREBP1) PROTEINS CONTENT IN DIABETICS OBESE RATS ADIPOSE TISSUE

Fatemeh Zarei[1], Mohammad Sherafati Moghadam[2], Maryam Shabani[*2], Masoud Jokar[3]

1. *Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Islamic Azad University Sharekord Branch, Sharekord, Iran*
2. *Islamic Azad University Hashtgerd Branch, Alborz, Iran*
3. *Kharazmi University, Tehran, Iran*

ABETRACT

Background: Obesity and type 2 diabetes can impair the function of important cellular pathways. Activation of the mTOR pathway results in regulation of the SREBP1 protein for metabolism and regulation of adipose tissue. The aim of this study was to investigate the effect of 4 weeks of high intensity interval training on the content of mTOR and SREBP1 in adipose tissue of type 2 diabetic rats.

Methods: In this experimental study, 12 to 2-month-old male Sprague-Dawley rats weighing 300 20± 20 g were selected and after being diabetic by induction of STZ and nicotine amide, randomly divided in two groups, diabetic training (6 rats) and diabetic control (6 rats). Exercise group training 4 days a week for 4 weeks according to the training HIIT; The control group had no exercise program. Independent t-test and dependent t-test were used for data analysis.

Results: There was no significant change in mTOR protein content (p=0.12); But the SREBP1 protein content (p=0.001) increased significantly. The weight of control group (P=0.0001) and HIIT group (P=0.010) showed a significant increase. Blood sugar in the control group also increased significantly (P=0.0001), but HIIT mice did not show a significant change (P = 0.14).

Conclusion: 4 weeks of HIIT training did not significantly change weight, blood glucose and mTOR protein content. But it did increase the SREBP1 content, so factors such as duration and intensity of training should be adjusted in order to achieve the best results when administering HIIT.

Keywords: Adipose Tissue, High Intensit Interval Training, Protein mTOR, Protein SREBP1, Type 2 Diabetes

*Alborz Province, Hashtgerd-Below Sanat Square, Islamic Azad University, Hashtgerd Branch, Shahid Sadoughi Street, Postal Code: 3361659913, TEL: 026 3330 8523, Emial: maryam.shabani@hiau.ac.ir

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2024-07-15]