مقاله پژوهشی

اثر تمرین هوازی میان‌مدت بر نشانگرهای آپوپتوز در سلول‌های عضلانی قلب موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

سعید تنورساز، ناصر بهپور*، وحید تادیبی

دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۶/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۷/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: آپوپتوز نقش عمده‌ای در فرآیند بیماری‌های قلبی ناشی از دیابت دارد، اما اثرات انجام تمرینات میان‌مدت بر آپوپتوز سلول‌های قلب افراد دیابتی مشخص نیست. هدف این پژوهش بررسی تمرینات میان‌مدت بر نشانگرهای آپوپتوز سلول‌های عضلانی قلب موش‌های صحرایی دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین بود.

مواد و روش‌ها: ۴۰ سر موش، به‌طور تصادفی به ۴ گروه کنترل، دیابتی، تمرین و تمرین+دیابت تقسیم شدند. جهت القای دیابت، از تزریق استرپتوزوتوسین-(۵۵mg/kg) استفاده شد. ۱۴ روز پس از تزریق، توسط گلوکومتر سطح قندخون ناشتا اندازه‌گیری شد و پس از تائید القای دیابت، پروتکل به مدت ۴ هفته اجرا گردید. گروه‌های تمرینی به مدت ۴ هفته (۵جلسه در هفته) با سرعت ۱۸-۱۵ متر در دقیقه و مدت ۴۴-۲۵ دقیقه دویدند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، پس از بی‌هوشی، عضله قلب برداشته شد. سطوح Fas محلول (sFas)، لیگاند Fas (FasL) و Bcl-2 توسط الایزا مورداندازه‌گیری قرار گرفت.

نتایج: القای دیابت در گروه کنترل موجب افزایش معنادار سطوح sFas و FasL (p<۰/۰۵) و عدم‌تغییر sFas/FasL و سطوح Bcl-2 شد. در گروه‌های غیردیابتی، اجرای ۴ هفته تمرین موجب کاهش معنادار sFas/FasL (p<۰/۰۵)، عدم‌تغییر sFas،FasL و Bcl-2 شد. ۴ هفته تمرین در گروه‌های دیابتی نیز موجب کاهش معنادار FasL (p<۰/۰۵)، عدم‌تغییر sFas و sFas/FasL و Bcl-2 شد.

نتیجه‌گیری: داده‌ها اثر پیش‌رونده آپوپتوز ناشی از دیابت بر بافت قلب را تائید می‌کند و نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً با تمرینات منظم هوازی می‌توان به‌عنوان یک روش غیردارویی برای کاهش عوارض آپوپتوز ناشی از دیابت در بافت قلب افراد دیابتی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: Fas محلول، لیگاند Fas، تردمیل جوندگان، عوارض دیابت

مقدمه

در بیماران مبتلا به دیابت تغییر در متابولیسم گلوکز، چربی و پروتئین نشان داده شده است. این اختلالات سوخت‌وساز بدن منجر به طیف وسیعی از اثرات طولانی‌مدت با عنوان «عوارض ناشی از دیابت بر بدن» می‌شوند. مطالعات متعددی اثر منفی دیابت شیرین را مستقیماً بر عضله قلب (میوکارد) نشان داده‌اند (۱، ۲). بیماری‌های قلبی و عروقی نه‌تنها به دلیل بیماری عروق کرونر و پر فشار خونی، بلکه به دلیل عوارض جانبی دیابت مستقیماً بر قلب و مستقل از سایر عوامل پاتولوژیک علت اصلی مرگ‌ومیر در بیماران مبتلا به دیابت هستند (۳). اخیراً نشان داده شده که آپوپتوز نقش عمده‌ای در فرآیند بیماری‌های قلبی ایفا می‌کند (۴). القای آپوپتوز به‌عنوان یکی از آسیب‌های دیابت بر میوکارد توسط فعال‌سازی اجزای مسیر آپوپتوز و فعالیت کاسپاز نشان داده شده و مرگ سلول‌های میوکاردی به‌عنوان یک اتفاق مهم در پیشرفت آسیب قلبی ناشی از دیابت شناخته شده است (۵ و ۸). درواقع، مطالعات مختلف نشان دادند که دیابت میزان آپوپتوز را در سلول‌های قلبی به میزان چشمگیری افزایش می‌دهد (۹ و ۱۰) بسیاری از مسیرهای فعال سیگنالینگ ازجمله تحریک پروتئین کیناز *B* (*AKT*) و عوامل آدرنرژیکی با افزایش کشش سلول عضله قلبی در تنظیم آپوپتوز نقش دارند. چندین گروه در مطالعات مختلف نشان داده‌اند که بیش فعالی مسیرهای سیگنال‌دهی بتا آدرنرژیکی و انتشار سیتوکروم *C* از میتوکندری با افزایش آپوپتوز و فیبروز همراه است (۱۱ و ۱۴). به‌علاوه،

*نویسنده مسئول: **ناصر بهپور**، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
Email: n_behpoor@yahoo.com

شواهد نشان می‌دهند که افزایش سیگنالینگ از طریق تنظیم مثبت فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF) در نارسایی قلبی شایع بوده و تخریب مهارکننده‌های سیگنال گیرنده Fas مانند cFlip مکانیسم دیگری برای رخ دادن آپوپتوز است (۱۵ و ۱۶). مطالعات از نمونه قلب انسان نشان می‌دهد که در مراحل اولیه آسیب قلبی، مقدار بیشتری سلول از بین می‌رود که بیانگر آغاز شدن تنظیم مثبت مسیرهای ضد آپوپتوزی بعد از کاهش سلول‌ها است (۵). این موضوع نشان‌دهنده این است که تنظیمات آپوپتوز برای سازگار شدن مناسب قلب موردنیاز است و اختلال در این مسیر می‌تواند عواقب غیرقابل‌برگشت در قلب داشته باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که سایتوکاین‌های پیش التهابی نقش پررنگی در اختلال عملکرد قلب در اختلالات قلبی و عروقی متعدد دارند (۱۷ و ۱۸). مشاهدات اخیر نشان داده‌اند نقش پاتوژنز سایتوکاین‌ها در بیماری‌های قلبی باقابلیت آن‌ها در تلفیق (القا و یا مهار) روند آپوپتوز سلول‌های عضله قلب مرتبط است (۱۹). مسیرهای TNF و Fas در آپوپتوز از قبل نشان داده شده که در پاتوژنز انفارکتوس عضله قلب، آسیب ایسکمی- برقراری مجدد جریان خون، آسیب عضله قلبی و نارسایی احتقانی قلبی درگیر هستند (۱۹ و ۲۳). تعامل بین لیگاند Fas (FasL) و Fas نیز احتمالاً واسطه مرگ آپوپتوتیک سلول قلبی تحت شرایط خاص پاتوفیزیولوژیک است، درحالی‌که قلب و سلول عضله قلبی طبیعی، در برابر سمیت سلولی ناشی از Fas برخی مقاومت‌ها را ارائه می‌کنند (۲۱، ۲۴ و ۲۵). Fas یک مولکول گیرنده مشخصه آپوپتوز است که در تعدادی از انواع سلول‌ها، شامل سلول‌های قلبی وجود دارد (۲۶). آنتی‌ژن Fas در بافت‌های مختلف بیان می‌شود و فرم محلول آن sFas فاقد غشای انتقالی است. تحقیقات نشان داده‌اند که سطوح پلاسمایی sFasL در افراد دارای آسیب قلبی به میزان قابل‌توجهی در مقایسه با افراد سالم پایین‌تر است (۲۷). درحالی‌که، sFas به‌طور معناداری در افراد دارای آسیب قلبی در مقایسه با افراد سالم بیشتر است (۲۷). بنابراین محققان اعلام کردند که سطوح پلاسمایی و بافتی sFas به‌طور بالقوه می‌تواند یک پیش‌بین قوی تشخیص آسیب عضله قلبی باشد.

فرآیند آپوپتوز سلولی توسط برخی پروتئین‌های میتوکندریایی شامل پروتئین‌های خانواده B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) که به دو بخش پروتئین‌های ضدآپوپتوتیک مثل (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W، Bfl-1 و Mcl-1) و پروتئین‌های پیش آپوپتوتیک مثل (Bax, Bak, BadBcl-Xs, Bid, Bik, Bim وHrk) تقسیم می‌شوند، تنظیم می‌گردد که در تسریع شروع یا ممانعت از ایجاد آن نقش اصلی را دارند (۲۸). درحالی‌که پروتئین‌های ضدآپوپتوتیک، آپوپتوز را با جلوگیری از رهاسازی سیتوکروم c از میتوکندری، تنظیم می‌کنند، پروتئین‌های پیش آپوپتوتیک موجب تسریع رهاسازی آن می‌شوند (۲۸). Bcl-2 باعث جلوگیری از تخریب اکسیداتیو سلول می‌گردد و به‌عنوان یکی از معروف‌ترین پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز شناخته می‌شود که علاوه بر جلوگیری از آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری، از طریق حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری با خارج ساختن یون‌های H^+ به عامل فعال‌سازی پروتئاز آپوپتوز (apaf-1) متصل می‌شود و فعال‌سازی کاسپاز-۹ را مهار می‌کند (۲۸ و ۳۰). محققان همواره در تحقیقات خود به نقش تمرینات ورزشی در پیشگیری و درمان چاقی و دیابت نوع دوم تأکید داشته و تأکید می‌کنند که تمرین ورزشی یکی از استراتژی‌های مؤثر برای کاهش توسعه آسیب قلبی و کاهش بروز عوارض و مرگ‌ومیر قلبی عروقی در طول دیابت است (۳۱ و ۳۲). محققان معتقدند که ورزش علاوه بر اثرات مفید در تغییرات سیستمی مرتبط با چاقی و دیابت نوع دوم، بسیاری از اختلالات متابولیکی قلب در افراد دیابتی را نیز اصلاح می‌کند (۳۳ و ۳۴). این تغییرات ناشی از اثرات غیرمستقیم تغییرات سیستمی براثر ورزش و اثرات مستقیم نشات گرفته از فعالیت انقباضی بالای قلب در طول تمرینات ورزشی هستند(۳۳و۳۵). تمرینات ورزشی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در سلول‌های قلبی نقش حفاظتی از قلب را در برابر عوارض دیابت ایفا می‌کنند (۳۶). بااین‌حال، با توجه به اینکه تاکنون مطالعه کافی در رابطه با اثرات تمرین ورزشی در برابر عوارض آسیب قلبی و آپوپتوز ناشی از دیابت انجام نشده است، تحقیق حاضر برای نخستین بار به بررسی اثرات دوره میان‌مدت تمرین هوازی فزاینده بر نشانگرهای آپوپتوز شامل Fas محلول (sFas)، لیگاند Fas (FasL) و نسبت sFas/FasL و همچنین Bcl-2 به‌عنوان مسیرهای اصلی آپوپتوز و ضدآپوپتوز قلبی ناشی از دیابت در موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت پرداخت.

مواد و روش ها

طرح پژوهش حاضر از نوع تجربی بود که در آن ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار و محدوده وزنی ۲۲۰-۱۶۰ گرم از بخش پرورش حیوانات مرکز تحقیقات انستیتو پاستور ایران-

تهران تهیه گردید و به آزمایشگاه جانوری دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه مازندران-بابلسر منتقل شد. کلیه موش‌ها در شرایط کنترل‌شده محیطی با میانگین دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش (تهیه‌شده به‌صورت پلت از شرکت بهپرور-ایران) نگهداری شدند.

تمامی حیوانات به‌طور تصادفی به چهار گروه ده‌تایی شامل گروه‌های کنترل (سالم و بی تمرین)، دیابتی (دیابتی شده و بدون تمرین)، تمرین (سالم و تمرین کرده) و تمرین+دیابت (دیابتی شده و تمرین کرده) تقسیم شدند. قبل از اجرای پروتکل تمرینی، تمامی حیوانات به مدت ۱ 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. برنامه‌ی تمرینی شامل دویدن روی نوار گردان بدون شیب ویژه جوندگان با رعایت اصل اضافه‌بار به‌صورت پیش‌رونده بین ۴۴-۲۵ دقیقه و با سرعت بین ۱۸-۱۵ متر در دقیقه و به‌صورت ۵ جلسه در هفته و به مدت ۴ هفته اجرا شد. برای گرم کردن نیز حیوانات در ابتدای هر جلسه تمرینی به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۷ متر در دقیقه دویده و سپس برای رسیدن به‌سرعت موردنظر به ازای هر دقیقه، ۲ متر در دقیقه به‌سرعت نوار گردان افزوده شد. برای سرد کردن بدن در انتهای هر جلسه تمرینی نیز سرعت نوارگردان به‌طور معکوس کاهش یافت تا اینکه به‌سرعت اولیه برسد. جدول۱ جزئیات برنامه تمرینی استقامتی پژوهش حاضر را نشان می‌دهد.

القای دیابت با یک‌بار تزریق درون صفاقی محلول استرپتو-زتوسین (STZ) تهیه‌شده از شرکت Sigma-Aldrich کشور آلمان حل‌شده در بافر سیترات (pH= ۴/۵ و غلظت ۰/۱ مولار) و به میزان ۵۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوان انجام شد. ۱۴ روز پس از تزریق STZ، غلظت گلوکز خون در نمونه‌های خونی جمع‌آوری‌شده از دم حیوانات و با استفاده از گلوکومتر (ساخت شرکت Medisign کره جنوبی) اندازه‌گیری شد. ملاک دیابتی بودن، غلظت گلوکز خون ناشتایی بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی لیتر (mg/dl) بود. برای گروه کنترل نیز به‌منظور یکسان‌سازی اثر تزریق بافر سیترات ۰/۱ مولار با همان حجم مشابه به‌صورت درون صفاقی تزریق شد (۳۷). تمام گروه‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی در شرایط کاملاً مشابه و در حالت ناشتایی حیوانات با تزریق درون صفاقی کتامین (۵۰-۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۵-۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند و قفسه سینه شکافته شد و بافت قلب جمع‌آوری شد. برای اندازه‌گیری شاخص‌های موردنظر ابتدا بافت قلب با استفاده از مایع نیتروژن پودر شد و سپس ۰/۱ گرم (۱۰۰ میلی‌گرم) از پودر ساخته شده با ۱ میلی‌لیتر بافر (PBS) هموژنیزه شد و آنگاه محلول استخراج‌شده از آن به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و از سوپرناتانت (محلول رویی) آن برای سنجش شاخص‌های موردنظر استفاده شد (۳۸). برای ردیابی شاخص مقادیر قلبی لیگاند Fas و Fas محلول از کیت الایزا ساخت شرکت Abcam آمریکا و به روش کمی ساندویچی با حساسیت کمتر از ۹۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (۳۸). اندازه‌گیری سطوح قلبی Bcl-2 نیز توسط کیت الایزا ساخت شرکت Mybiosource

جدول۱- جزییات پروتکل تمرینی

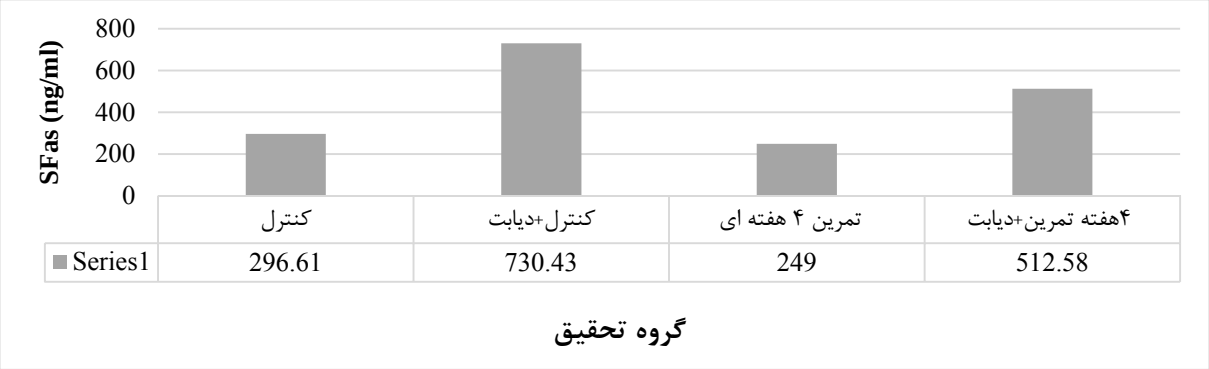
جلسات تمرین	عوامل تمرینی	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم
اول	سرعت (متر در دقیقه)	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
	مدت (دقیقه)	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰
دوم	سرعت (متر در دقیقه)	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
	مدت (دقیقه)	۲۶	۳۱	۳۶	۴۱
سوم	سرعت (متر در دقیقه)	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
	مدت (دقیقه)	۲۷	۳۲	۳۷	۴۲
چهارم	سرعت (متر در دقیقه)	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
	مدت (دقیقه)	۲۸	۳۳	۳۸	۴۳
پنجم	سرعت (متر در دقیقه)	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
	مدت (دقیقه)	۲۹	۳۴	۳۹	۴۴

آمریکا و به روش کمی ساندویچی با حساسیت کمتر از ۶۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد (۳۹ و ۴۰). تمام مراحل فوق در آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه مازندران-بابلسر انجام گرفت. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از آمار توصیفی و استنباطی استفاده شد. از آزمون شاپیرو-ویلک برای سنجش نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. با توجه به طبیعی بودن نحوه توزیع داده‌ها، برای مقایسه گروه‌ها در متغیرهای موردمطالعه از تحلیل واریانس دوطرفه استفاده شد. جهت انجام آزمون‌های تکمیلی، آزمون پیگیر توکی به عمل آمد. سطح معناداری نیز P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تمامی بررسی-های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ انجام گرفت.

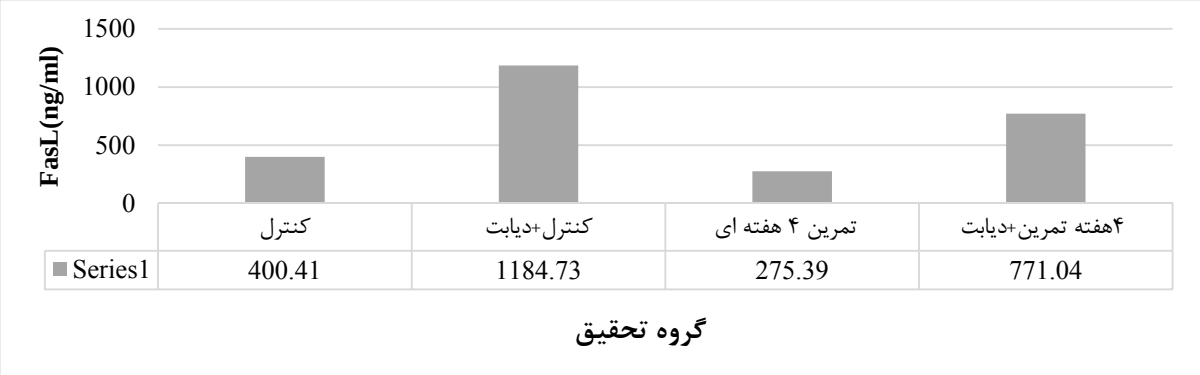
نتایج

نمودار ۱ میانگین و انحراف استاندارد سطوح Fas محلول بافت قلب گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. همان‌طور که درحالی‌که در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل، سطوح Fas محلول ۱۶٪ کاهش نشان داد (p=۰/۹۹۱). همچنین مشاهده شد که سطوح Fas محلول بافت قلب گروه تمرین + دیابت در مقایسه با گروه کنترل ۷۳٪ افزایش یافت (p=۰/۱۰۷). از سوی دیگر نتایج نشان داد که سطوح Fas محلول در گروه تمرین و تمرین + دیابت نسبت به گروه دیابتی به ترتیب ۶۶٪ و ۳۰٪ کمتر بود (p=۰/۰۰۱ و p=۰/۱۰۱). همچنین نتایج افزایش ۱۰۵٪ در سطوح Fas محلول در گروه تمرین + دیابت نسبت به گروه تمرین نشان داد (p=۰/۰۲۰).

نمودار ۲ نشان‌دهنده میانگین و انحراف استاندارد سطوح لیگاند Fas بافت قلب گروه‌های مختلف در پژوهش حاضر است. بررسی‌های انجام‌شده نشان داد که سطوح لیگاند Fas در گروه-های دیابتی و تمرین + دیابت نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۱۹۶٪ و ۹۳٪ افزایش داشت (p=۰/۰۰۱ و p=۰/۰۳۸) درحالی‌که در گروه تمرین با کاهش ۳۱٪ همراه بود (p=۰/۸۹۵). همچنین



نمودار ۱- میانگین و انحراف استاندارد Fas محلول را نشان می‌دهد



نمودار ۲- میانگین و انحراف استاندارد لیگاند Fas را نشان می‌دهد

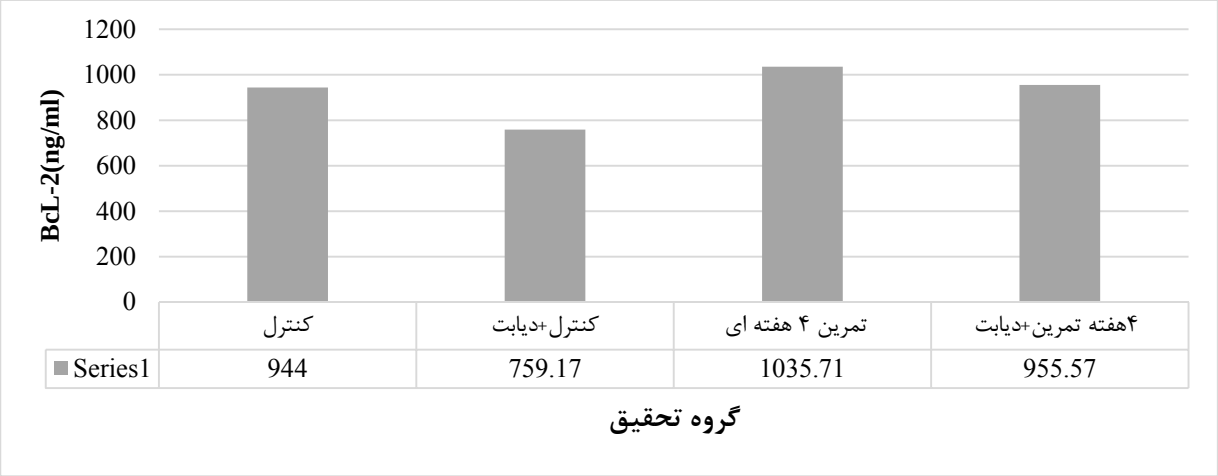
قابل‌مشاهده است، در موش‌های دیابتی سطوح Fas محلول به مقدار ۱۴۶٪ نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (p=۰/۰۰۱). مشخص شد که سطوح Fas محلول در گروه‌های تمرین و تمرین + دیابت نسبت به گروه دیابتی به ترتیب ۷۷٪ و ۳۵٪ کاهش

یافت (p=۰/۰۰۱ و p=۰/۰۱۶). علاوه بر این، مشاهده شد که Fas محلول در گروه تمرین + دیابت نسبت به گروه تمرین ۱۸۰٪ بالاتر بود (p=۰/۰۰۱).

نمودار ۳ میانگین و انحراف استاندارد نسبت Fas محلول به لیگاند Fas بافت قلب گروه‌های مختلف در پژوهش حاضر را ارائه می‌کند. نتایج نشان داد که این نسبت در گروه‌های دیابتی و تمرین + دیابت نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۲۰٪ و ۱۱٪ شد (p=۰/۰۰۱ و p=۰/۷۲۵). تغییرات در نسبت Fas محلول به لیگاند Fas در گروه تمرین + دیابت نیز نسبت به گروه تمرین به‌صورت ۳۷٪ افزایش دیده شد (p=۰/۰۰۱).

نمودار ۴ سطوح Bcl-2 گروه‌های مختلف پژوهش را به‌صورت میانگین و انحراف استاندارد نشان داده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود سطوح قلبی Bcl-2 در گروه‌های تمرین و تمرین + دیابت به ترتیب ۱۰٪ و ۵٪ نسبت به گروه کنترل بالاتر بود

نمودار ۳- میانگین و انحراف استاندارد نسبت Fas محلول به لیگاند Fas را نشان می‌دهد



نمودار ۴- میانگین و انحراف استاندارد Bcl-2 را نشان می‌دهد

بالاتر بود (p=۰/۰۵۶ و p=۰/۵۵۷)؛ اما نسبت Fas محلول به لیگاند Fas در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل ۱۹٪ کاهش نشان داد (p=۰/۰۴۶). همچنین مشاهده شد که نسبت Fas محلول نسبت به لیگاند Fas در گروه‌های تمرین و تمرین + دیابت نسبت به گروه دیابتی به ترتیب با ۳۳٪ و ۷٪ کاهش همراه (p=۰/۹۴۲ و p=۰/۹۹۵)، درحالی‌که سطوح Bcl-2 در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل ۲۰٪ پایین‌تر بود (p=۰/۵۰۲). همچنین نتایج بیانگر افزایش ۳۶٪ و ۳۱٪ سطوح Bcl-2 به ترتیب در گروه‌های تمرین و تمرین + دیابت نسبت به گروه دیابتی بود (p=۰/۰۹۴ و p=۰/۲۰۶). همچنین نتایج نشان‌دهنده

۴٪ کاهش در سطوح Bcl-2 در گروه تمرین + دیابت نسبت به گروه تمرین بود (p=۰/۹۹۸).

بحث و نتیجه گیری

هدف از این پژوهش، تعیین اثر چهار هفته تمرین هوازی با شدت فزاینده بر سطوح Fas محلول، لیگاند Fas و نسبت Fas محلول به لیگاند Fas به‌عنوان نشانگرهای پیش برنده و سطوح Bcl-2 به‌عنوان عامل مهارکننده آپوپتوز سلول‌های عضلانی قلب موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بود. نتایج نشان داد که با القای دیابت با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین با دوز ۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، سطوح Fas محلول و لیگاند Fas به‌طور معناداری افزایش و سطوح Bcl-2 تغییری نداشت یافتند. این نتایج با تحقیقات یوسن و همکاران (۲۰۰۲)، کندر و همکاران (۲۰۱۲)، شبراوی و همکاران (۲۰۱۰)، شیرپور و همکاران (۲۰۰۸) و دوستار و همکاران (۲۰۱۱) همسو بود (۴۵-۴۱). در مقابل، این نتایج با یافته‌های مایر و همکاران (۲۰۱۰)، ناهم‌سو بود. دلیل این ناهم‌سویی را احتمالاً باید در تفاوت بافت هدف پژوهش آن‌ها با پژوهش حاضر دانست، چراکه قلب جزء اولین بافت‌هایی است که به محرک‌های القای آپوپتوزیس پاسخ می‌دهد، درحالی‌که بافت شبکیه چشم تحت تأثیر عوارض دیرظهور دیابت قرار می‌گیرد (۴۶ و ۴۷). دیابت سریع‌ترین بیماری متابولیکی در حال رشد در دنیا است و مطالعات بر روی این بیماری جهت یافتن روش‌های درمانی مناسب‌تر نیز رو به افزایش است (۴۸). نشان داده شده که افزایش استرس اکسیداتیو متعاقب بیماری دیابت باعث افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژنی و کاهش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی شده و درنتیجه مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌های قلبی یا الگوی آپوپتوز رخ می‌دهد (۴۹، ۵۰). تحقیقات گزارش کردند که علت وقوع آپوپتوز سلول‌های قلبی در اثر دیابت علاوه برافزایش استرس‌های اکسیداتیو، وقوع فرآیند التهابی و حضور سایتوکاین‌هایی نظیر TNF.α، IL-1β و IFN.γ است. همچنین تأثیر آن‌ها در تولید اکسید نیتریک باعث افزایش Fas لیگاند به‌وسیله سلول‌های التهابی و قلبی می‌شود و درنهایت مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در سلول‌های قلبی به وقوع می‌پیوندد (۵۱). بااین‌حال تاکنون سازوکارهای دقیق مولکولی آپوپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز مشخص نشده است. محققان اعلام کردند که سازوکارهای آپوپتوز که گلوکز به‌واسطه آن‌ها موجب القای مرگ برنامه‌ریزی سلول می‌شود، بسته به نوع سلول و بافت موردمطالعه متفاوت است (۵۲). در پژوهش حاضر مشاهده شد که اجرای ۴ هفته تمرین هوازی دویدن موجب کاهش معنادار سطوح لیگاند Fas و عدم‌تغییر Fas محلول و نسبت Fas محلول به لیگاند Fas و عدم‌تغییر سطوح Bcl-2 در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین شد. این نتایج با تحقیقات کراگر و همکاران (۲۰۰۹)، پریرا و همکاران (۲۰۱۲) و آداماپولوس و همکاران (۲۰۰۲) همسو بود (۵۵-۵۳). همچنین همسو با یافته‌های ما تحقیقات قبلی نشان دادند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و کاهش سطح پروکسیداسیون لیپیدی که به دنبال فعالیت ورزشی پدید می‌آید، دارای تأثیرات مهمی در جلوگیری از عوارض آپوپتوز ناشی از دیابت و آسیب‌های بافتی ایجادشده ناشی از استرس اکسیداتیو است (۵۶). نشان داده شده است که فعالیت ورزشی منظم باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو و درنتیجه کاهش آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود (۵۷). علاوه بر این مشخص‌شده که فعالیت ورزشی منظم در پیشگیری و به تأخیر انداختن دیابت، افزایش حساسیت به انسولین و بهبود متابولیسم گلوکز مؤثر است (۵۸). همچنین نشان داده شده است که تمرین ورزشی قبل از وقوع ایسکمی موجب کاهش نسبت بین پروتئین‌های پیش آپوپتوز و پروتئین‌های ضدآپوپتوز مانند Bcl-2 و کاهش سیگنالینگ فعال‌سازی کاسپاز-۳ (کاسپاز نهایی مسیر آپوپتوز) می‌شود (۵۹). یکی از مکانیسم‌های مهم احتمالی درزمینه قابلیت محافظت سلولی ناشی از تمرین ورزشی می‌تواند ظرفیت مسدود کردن تشکیل رادیکال‌های آزاد باشد. گونه‌های فعال اکسیژنی در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری به‌عنوان یک محصول طبیعی تولید می‌شوند، اما زمانی که سطوح آن‌ها بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی سلول باشد می‌توانند منجر به مرگ سلول شوند. استرس اکسایشی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژنی به‌شدت با دیابت و عوارض آن در ارتباط است و می‌تواند مرگ سلولی را از طریق مسیرهای مختلف راه‌اندازی کند (۶۰). عوامل سلولی و مولکولی از طریق سیگنالینگ آبشاری باهم در ارتباط هستند. در پاسخ به محرک و استرس بیرونی سیگنالینگ آبشاری بین سلولی رخ می‌دهد. یکی از عواملی که در سیگنالینگ عوامل استرسی و تحریک‌کننده نقش دارد، پروتئین کیناز B است. پروتئین کیناز B عمل‌کننده اصلی در مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول-۳ کیناز است که در بسیاری از فرآیندهای سلولی، ازجمله بقای سلولی، متابولیسم، رشد و تکثیر سلول نقش

دارد. افزایش بیان و افزایش فعالیت پروتئین کیناز B، از طریق فسفوریلاسیون پروتئین‌های ضد آپوپتوز خانواده Bcl-2 و غیرفعال‌سازی پروتئین پیش‌برنده آپوپتوز مانند Bax و یا از طریق مهار مستقیم فعالیت کاسپازی باعث مسدود کردن مسیرهای آپوپتوز می‌گردد (۶۱). مطالعات گزارش کردند که سطوح پروتئین کیناز B در اثر دیابت در نمونه‌های جانوری کاهش می‌یابد (۶۱) و احتمالاً یکی دیگر از مکانیسم‌های محافظت سلولی ناشی از تمرینات منظم ورزشی در برابر آپوپتوز با اثرات مهم ورزش در افزایش بیان پروتئین کیناز B مرتبط است، چراکه نشان داده شده است که پروتئین کیناز B با فعالیت ورزشی هوازی با تنظیم افزایشی مواجه می‌شود (۶۲). پژوهش حاضر با محدودیت کم بودن پیشینه پژوهش‌های انجام شده درزمینه ورزش و شاخص‌های تحقیق مواجه بود که این موضوع علاوه بر اعلام داشتن محدودیت یک مزیت نیز محسوب می‌شود چراکه نو بودن موضوع تحقیق را می‌رساند. درنهایت نتیجه‌گیری می‌شود که احتمالاً اجرای ۴ هفته تمرین هوازی دویدن از شدت آپوپتوز ناشی از دیابت در سلول‌های عضلانی قلب می‌کاهد.

تشکر و قدردانی

از مساعدت و همکاری صمیمانه مسئولین دانشکده تربیت‌بدنی دانشگاه‌های رازی کرمانشاه و مازندران-بابلسر و تمام افرادی که موجب تسهیل اجرای پژوهش شدند، تقدیر و تشکر می‌گردد. پژوهش حاضر نتیجه پایان‌نامه دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی گرایش قلب، عروق و تنفس که کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق دانشگاه رازی-کرمانشاه موردبررسی و با کد ۳۹۶-۲-۰۲۴ تائید شد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. Circulation. 2007;115(25):3213-23.
2. Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 2010;11(1):31-9.
3. Ernande L, Derumeaux G. Diabetic cardiomyopathy: myth or reality? Archives of cardiovascular diseases. 2012;105(4):218-25.
4. Gill C, Mestril R, Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease—a novel therapeutic target? The FASEB Journal. 2002;16(2):135-46.
5. Akyürek Ö, Akyürek N, Sayin T, Dinçer I, Berkalp B, Akyol G, et al. Association between the severity of heart failure and the susceptibility of myocytes to apoptosis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. International journal of cardiology. 2001;836.29: (1).
6. Fuentes-Antras J, Picatoste B, Gomez-Hernandez A, Egido J, Tunon J, Lorenzo O. Updating experimental models of diabetic cardiomyopathy. Journal of diabetes research. 2015;2015.
7. Zorc M, Vraspir-Porenta O, Zorc-Pleskovič R, Radovanović N ,Petrovič D. Apoptosis of myocytes and proliferation markers as prognostic factors in end-stage dilated cardiomyopathy. Cardiovascular Pathology. 2003;12(1):36-9.
8. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. Journal of Clinical Investigation. 2003;111(10):1497.
9. Shen E, Li Y, Li Y, Shan L, Zhu H, Feng Q, et al. Rac1 is required for cardiomyocyte apoptosis during hyperglycemia. diabetes. 2009;58(10):2386-95.
10. Guleria RS, Choudhary R, Tanaka T, Baker KM, Pan J. Retinoic acid receptor-mediated signaling protects cardiomyocytes from hyperglycemia induced apoptosis: Role of the renin-angiotensin system. Journal of cellular physiology. 2011;226(5):1292-307.
11. Iwai-Kanai E, Hasegawa K, Araki M, Kakita T, Morimoto T, Sasayama S. α-and β-Adrenergic pathways differentially regulate cell type–specific apoptosis in rat cardiac myocytes. Circulation. 1999;100(3):305-11.
12. Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N ,Narula N, Kolodgie FD, et al. Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999;96(14):8144-9.
13. Shizukuda Y, Buttrick PM. Subtype specific roles of β-adrenergic receptors in apoptosis of adult rat ventricular myocytes. Journal of molecular and cellular cardiology. 2002;34(7):823-31.

14. Xia P, Liu Y, Cheng Z. Signaling pathways in cardiac myocyte apoptosis. BioMed research international. 2016;2016.
15. Wu C-K, Lee J-K, Chiang F-T, Yang C-H, Huang S-W, Hwang J-J, et al. Plasma levels of tumor necrosis factor-α and interleukin-6 are associated with diastolic heart failure through downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase. Critical care medicine. Journal of Critical care medicine 2011;39(5):984-92.
16. Chen Z, Jiang H, Wan Y, Bi C, Yuan Y. H2O2-induced secretion of tumor necrosis factor-α evokes apoptosis of cardiac myocytes through reactive oxygen species-dependent activation of p38 MAPK. Cytotechnology. 2012;64(1):65-73.
17. Mándi Y, Hőgye M, Talha EM, Skolák E, Csanády M. Cytokine production and antibodies against heat shock protein 60 in cardiomyopathies of different origins. Pathobiology. 2000;68(3):150-8.
18. Hedayat M, Mahmoudi MJ, Rose NR, Rezaei N. Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. Heart failure reviews. 2010;15(6):543-62.
19. Marshall D, Sack MN. Apoptosis: a pivotal event or an epiphenomenon in the pathophysiology of heart failure?BMJ Publishing Group Ltd ;2000.
20. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, et al. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97(10):5456-61.
21. Lee P, Sata M, Lefer DJ, Factor SM, Walsh K, Kitsis RN. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2003;284(2):H456-H63.
22. Zhang W, Chancey AL, Tzeng H-P, Zhou Z, Lavine KJ, Gao F, et al. The development of myocardial fibrosis in transgenic mice with targeted overexpression of tumor necrosis factor requires mast cell–fibroblast interactions. Circulation Journal. 2011:CIRCULATIONAHA. 111.052399.
23. Kinugawa T, Kato M, Yamamoto K, Hisatome I, Nohara R. Proinflammatory cytokine activation is linked to apoptotic mediator, soluble Fas level in patients with chronic heart failure. International heart journal. 2012;53(3):182-6.
24. Nishigaki K, Minatoguchi S, Seishima M, Asano K, Noda T, Yasuda N, et al. Plasma Fas ligand, an inducer of apoptosis, and plasma soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, in patients with chronic congestive heart failure. Journal of the American College of Cardiology. 1997;29(6):1214-20.
25. Wollert KC, Heineke J, Westermann J, Lüdde M, Fiedler B, Zierhut W, et al. The cardiac Fas (APO-1/CD95) receptor/Fas ligand system. Circulation. 2000;1018.1172:(10).
26. Ramaswamy M, Siegel RM. Autoimmunity: twenty years in the Fas lane. The Journal of Immunology. 2012;189(11):5097-100.
27. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, et al. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. The Journal of Immunology. 1992;148(4):1274-9.
28. Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. The Scientific World Journal. 2010;10:340-9.
29. Tamm I, Schriever F, Dörken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. The lancet oncology. 2001;2(1):33-42.
30. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature reviews Molecular cell biology. 2008;9(1):47.
31. Riddell M, Iscoe K. Physical activity, sport, and pediatric diabetes. Pediatric diabetes. 2006;7(1):60-70.
32. Powers SK, Lennon SL, Quindry J, Mehta JL. Exercise and cardioprotection. Current opinion in cardiology. 2002;17(5):495-502.
33. Hafstad AD, Boardman N, Aasum E. How exercise may amend metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. Antioxidants & redox signaling. 2015;22(17):1587-605.
34. Jonker JT, de Mol P, de Vries ST, Widya RL, Hammer S, van Schinkel LD, et al. Exercise and type 2 diabetes mellitus: changes in tissue-specific fat distribution and cardiac function. Radiology. 2013;269(2):434-42.
35. Wright KJ, Thomas MM, Betik AC, Belke D, Hepple RT. Exercise training initiated in late middle age attenuates cardiac fibrosis and advanced glycation end-product accumulation in senescent rats. Experimental gerontology. 2014;50:9-18.
36 Kanter M, Aksu F, Takir M, Kostek O, Kanter B, Oymagil A. Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat heart. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. 2016.
37. Bugger H, Abel ED. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. Disease Models & Mechanisms. 2009;2(9-10):454-66.
38. Buzás K, Megyeri K, Hõgye M, Csanády M, Bogáts G, Mándi Y. Comparative study of the roles of cytokines and apoptosis in dilated and hypertrophic cardiomyopathies. European cytokine network. 2004;15(1):53-9.
39. Kwak H-B, Lee Y, Kim J-H, Van Remmen H, Richardson AG, Lawler JM. MnSOD overexpression reduces fibrosis and pro-apoptotic signaling in the aging mouse heart. Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences. 2014;70(5):533-44.

40. Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 2012;287(13):9873-86.
41. Shiroo A, Salami S, Khadem Ansari M, Ghaderi Pakdel F, Khadem Vatani K, Saadatian R, et al. Protective Effect of Vitamin E on Diabetes Induced Apoptosis and Oxidative Stress in Rat Heart Tissue. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2008;10(1):67-74.
42. Doustar Y, mohajeri d, rezaei a. Effect of grape seed extract on cardiomyocyte apoptosis in streptozotocin induced diabetic rats. MEDICAL SCIENCES JOURNAL. 2011;21(3):168-74.
43. Al-Shabrawey M, Smith S. Prediction of diabetic retinopathy: role of oxidative stress and relevance of apoptotic biomarkers. EPMA Journal. 2010;1(1):56-72.
44. Kandhare AD, Raygude KS, Ghosh P, Ghule AE, Bodhankar SL. Neuroprotective effect of naringin by modulation of endogenous biomarkers in streptozotocin induced painful diabetic neuropathy. Fitoterapia. 2012;83(4):650-9.
45. Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Cai W-y, Suzuma I, Pak J, et al. Suppression of Fas-FasL-induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood–retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin-induced diabetes. The FASEB Journal. 2003;17(1):76-8.
46. Maier R, Weger M ,Haller-Schober E-M, Huppertz B, Maier L, El-Shabrawi Y, et al. Apoptotic death ligands and interleukins in the vitreous of diabetic patients. Spektrum der Augenheilkunde. 2010;24(6):305-10.
47. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. Clinical diabetes. 2008;26(2):77-82.
48. Baharvand-Ahmadi B, Bahmani M, Tajeddini P, Naghdi N, Rafieian-Kopaei M. An ethno-medicinal study of medicinal plants used for the treatment of diabetes. Journal of nephropathology. 2016;5(1):44.
49. Wang J, Song Y, Wang Q, Kralik PM, Epstein PN. Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. The Review of Diabetic Studies. 2006;3(3):108.
50. Podestà F, Romeo G, Liu W-H, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, et al. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. The American journal of pathology. 2000;156(3):1025-32.
51. Mauricio D MP, Orlinick JR, Vaishnam Ak. Role of Fas-FasL in insulitis in nonobes diabetic mouse. Diabetes.Chinese Medical Journal. 199843.1537:47.
52. Allen DA, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. The Journal of nutritional biochemistry. 2005;16(12):705-13.
53. Adamopoulos S, Parissis J, Karatzas D, Kroupis C, Georgiadis M, Karavolias G, et al. Physical training modulates proinflammatory cytokines and the soluble Fas/soluble Fasligand system in patients with chronic heart failure. Journal of the American College of Cardiology. 2002;39(4):653-63.
54. Pereira G, Prestes J, Tibana R, Shiguemoto G, Navalta J, Perez S. Acute resistance training affects cell surface markers for apoptosis and migration in CD4+ and CD8+ lymphocytes. Cellular Immunology. 2012;279(2):134-9.
55. Krüger K, Frost S, Most E, Völker K, Pallauf J, Mooren FC. Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and Fas-dependent signaling pathways. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2009;296(5):R1518-R27.
56. Mohammadi M, Salehi I ,Farajnia S. Effect of swimming exercise on oxidative stress in hippocampus of diabetic male rats. 2008.
57. Mazzola PN, Terra M, Rosa AP, Mescka CP, Moraes TB, Piccoli B, et al. Regular exercise prevents oxidative stress in the brain of hyperphenylalaninemic rats. Metabolic brain disease. 2011;26(4):291.
58. Derouich M, Boutayeb A. The effect of physical exercise on the dynamics of glucose and insulin. Journal of biomechanics. 2002;35(7):911-7.
59. Aboutaleb N, Shamsaei N, Khaksari M, Erfani S, Rajabi H ,Nikbakht F. Pre-ischemic exercise reduces apoptosis in hippocampal CA3 cells after cerebral ischemia by modulation of the Bax/Bcl-2 proteins ratio and prevention of caspase-3 activation. The Journal of Physiological Sciences. 2015;65(5):435-43.
60. Hong J-H, Kim M-J, Park M-R, Kwag O-G, Lee I-S, Byun BH, et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. Clinica chimica acta. 2004;340(1):107-15.
61. Kim DY, Jung SY, Kim CJ, Sung YH, Kim JD. Treadmill exercise ameliorates apoptotic cell death in the retinas of diabetic rats. Molecular medicine reports. 2013;7(6):1745-50.
62. Libonati JR. Cardiac effects of exercise training in hypertension. ISRN Hypertension. 2013;2013.

Original Article

Investigating the Effect of Mid-Term of Aerobic Exercise on Apoptosis Biomarkers in the Cardiomyocytes of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Tanoorsaz S, Behpour N*, Tadibi V

Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Razi University of Kermanshah, Kermanshah, Iran

Received: 04 Sep 2017 Accepted: 22 Oct 2017

Abstract

Background & Objective: Apoptosis plays a major role in the process of diabetes-induced heart disease, but the effects of aerobic intermediate exercises on the status of apoptosis in diabetics' cardiomyocytes are unclear. The aim of this study was to investigate the effect of 4-week aerobic exercise on apoptosis biomarkers in the cardiomyocytes of Streptozotocin-induced diabetic rats.

Material & Methods: 40 adult rats were randomly assigned to 4 groups, including: Control, Control¬+¬Diabetes, Exercise and Exercise + Diabetes. To induce diabetes intraperitoneal injection of Streptozotocin (STZ) solution (55mg/kg) was used. 14 days after STZ injection, the level of fasting blood glucose was measured by a glucometer. After confirming diabetes induction, the exercise protocol was performed for 4 weeks. The training groups ran for 4 weeks (5sessions/week) at a speed of 15-18 m/min and 25 to 44 minutes. 48 hours after the last training session, the subjects were anesthetized and the cardiac muscle was removed. The sFas, FasL and Bcl-2 were measured by ELISA.

Results: Induction of diabetes in the control group, resulted in a significant increase in sFas and FasL levels and insignificantly increase in sFas/FasL and also insignificantly decrease in Bcl-2 levels ($p<0.05$).In non-diabetic groups, the implementation of 4 weeks of exercise training resulted in a significant decrease in sFas, FasL and a significant reduction of sFas/FasL and a significant increase in Bcl-2($p<0.05$). Performing of 4 weeks of exercise training in diabetic groups also led to a nonsignificant decrease in sFas and sFas/FasL and a significant decrease in FasL and a nonsignificant increase in Bcl-2.

Conclusion: The present study confirms the progressive effect of diabetes-induced apoptosis on heart. The results suggest that regular aerobic exercises may be used as a non-pharmacological strategy to reduce the complications of diabetes-induced apoptosis in the heart tissue of diabetic people.

Key Words: Soluble Fas, Fas Ligand, Rodent Treadmill, Complications of Diabetes

***Corresponding Author: Naser Behpour,** Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Razi University of Kermanshah, Kermanshah, Iran.
Email: n_behpoor@yahoo.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences 7 (2018): 488-497