

## اثر ترکیبی تمرینات استقامتی-مقاومتی و مکمل سازی با عصاره سویا بر بیان Mir-133 در قلب رت‌های اواریکتومی شده

مرتضی جورکش<sup>۱</sup>، سیروس چوبینه<sup>۲\*</sup>، رحمان سوری<sup>۲</sup>، علی اصغر رواسی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی قلب و عروق و تنفس، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، پردیس بین‌المللی ارس، تهران، ایران

۲- دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.  
Choobineh@ut.ac.ir\*

۳- دکتری فیزیولوژی ورزشی، استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** یائسگی یک ریسک فاکتور مهم برای بیماری‌های قلبی عروقی در زنان است. پیشنهاد شده است که تمرین ورزشی و رژیم ایزوفلاون سویا ریسک بیماری قلبی عروقی در زنان یائسه را کاهش می‌دهد. در این مطالعه اثر ترکیبی تمرینات استقامتی-مقاومتی و مکمل سازی با عصاره سویا بر بیان Mir-133 در قلب رت‌های اواریکتومی شده مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش کار:** بدین منظور ۵۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار تحت شرایط کنترل شده (دما، چرخه روشنایی و تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذا) نگهداری شدند و بعد از آشناسازی با پروتکل تمرینی، به صورت تصادفی به ۵ گروه ۱۰ تایی شامل: گروه شم (Sham)، گروه اواریکتومی (OVX)، گروه اواریکتومی شده و مکمل سازی با عصاره سویا (OVX+SOY)، گروه اواریکتومی شده و ترکیب تمرینات استقامتی-مقاومتی (OVX+EN-RE)، گروه اواریکتومی شده و ترکیب تمرینات استقامتی-مقاومتی و مکمل سازی با عصاره سویا (OVX+EN+RE+SOY) تقسیم شدند. ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی حیوانات بیهوش و تشریح شدند و بافت قلب برای بررسی بیان ژن مربوطه از بدن جدا شد. با استفاده از روش Real-Time PCR، میزان بیان Mir-133 اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** اواریکتومی باعث کاهش بیان Mir-133 شد ( $p \leq 0/05$ ) و این کاهش در رت‌های گروه OVX بیشتر بود ( $p \leq 0/05$ ). شش هفته مکمل سازی با عصاره سویا و ترکیب تمرینات استقامتی-مقاومتی به تنهایی توانست بیان Mir-133 را بخوبی بهبود بخشد ( $p \leq 0/05$ ) ولی اثر ترکیبی این دو مداخله قویتر بود ( $p \leq 0/05$ ).  
**نتیجه‌گیری:** نتایج ما پیشنهاد می‌کند که ترکیب مکمل سازی با عصاره سویا و تمرینات استقامتی-مقاومتی دارای قدرت محافظت بیشتری نسبت به استفاده تنها از آنها در تغییرات در ارتباط با یائسگی در بافت قلبی است. بنابراین احتمالاً بهبود روش زندگی از طریق تمرین ورزشی مناسب و گنجاندن مواد غذایی مناسب از جمله ایزوفلاون سویا می‌تواند از بروز خیلی اختلالات احتمالی در دوران یائسگی جلوگیری نماید.

**واژه‌های کلیدی:** اواریکتومی، ایزوفلاون، تمرین ورزشی، عصاره سویا، Mir-133

## مقدمه

یائسگی پیش از موعد یکی از خطراتی است که گاهی به علل مختلف از جمله جراحی‌های تخمدانی، زن‌ها را تهدید می‌کند. یکی از مهمترین علل مرگ و میر در زنانی که قبل از رسیدن به سن طبیعی یائسگی تحت عمل جراحی اواریکتومی دو طرفه قرار می‌گیرند بیماری‌های قلبی عروقی است (۱). با حذف استروژن در دوران یائسگی اثرات محافظتی استروژن بر روی سیستم قلبی-عروقی کاهش می‌یابد به طوری که در زنان در مقایسه با مردان، سگته در سنین پیری رخ می‌دهد زیرا در دوران قبل از یائسگی غلظت‌های بالای استروژن اثرات محافظتی دارد (۲).

استروژن از طریق دو مسیر ژنومیک و غیر ژنومیک و از طریق گیرنده‌های الفا و بتا اثرات خود را اعمال می‌کند. مسیر سیگنالینگ  $AKT/PI3K$  یکی از مسیرهای مهم در گیر در اعمال فوق است (۳،۴). مانوز کاستاندا و همکاران نشان دادند که حذف هورمون استروژن به شیوه اواریکتومی یا در اثریائسگی با افزایش شاخص‌های استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی در بافت قلب باعث القاء اختلالات قلبی-عروقی می‌شود (۵).

$IGF1$  یکی از محرک‌های اصلی مسیر  $AKT/PI3K$  می‌باشد. این پروتئین می‌تواند از طریق مسیرهای سیگنالینگ متفاوت از جمله مسیر  $AKT/PI3K$ ، اثرات مثبت خود را اعمال نماید. مطالعات نشان داده‌اند که  $IGF1$  در قلب باعث افزایش ورود گلوکز بداخل سلولها، بهبود قدرت انقباضی قلب، مهار آپوپتوزیس و تولید  $NO$  و در نتیجه موجب بهبود فعالیت قلب می‌گردد (۶،۷). بنابراین تجویز  $IGF1$  و یا تحریک تولید این فاکتور می‌تواند احتمالاً از بروز برخی عوارض یائسگی زودرس جلوگیری نماید (۸). فیتواستروژن‌ها گروه دیگری از گیاهان هستند که با

داشتن ترکیبات استروئیدی مشابه استروژن توصیه شده که در دوران یائسگی استفاده گردد (۲،۹). مطالعات نشان داده‌اند است که فیتواستروژن‌ها از طریق فعال کردن مسیریهای سیگنالینگ متفاوت از جمله مسیریهای  $Erk1/2$ ,  $JNK$ ,  $NF\kappa B$ ,  $AKT$  اثرات مثبت خود را در راستای افزایش طول عمر سلول و جلوگیری از آپوپتوزیس اعمال می‌نمایند (۱۰-۱۲). همچنین نشان داده شده است که ایزوفلاون‌های سویا اثرات آنژیوپروتکتور دارد (۱۳). در مطالعه دیگری نشان داده شده است که سویا پاسخ‌گشادکنندگی به استیل کولین را به هنگام تجمع پلاک‌ها در داخل شریان‌های خون در زنهای یائسه بهبود می‌بخشد هر چند مکانیسم اثر آن گزارش نشده است (۱۴). النقاش و همکارانش نشان داده‌اند که درمان دو روزه موش‌های صحرایی اواریکتومی شده با جنیستین باعث بهبودی معنی‌داری در فعالیت مکانیکی قلب نمی‌شود (۱۵).  $miRs$  یا  $microRNAs$ ،  $RNA$  کوچکی هستند، که در بسیاری از فرآیندهای سلولی مانند رشد، تکامل، تکثیر، تمایز و همچنین بیماری‌ها (۱۶) از زمان آغاز حیات تا مرگ (۱۷) درگیرند برخی از این  $miRs$  خاص عضله هستند و در بافت‌های دیگر بیان نمی‌شوند؛ بنابراین آن‌ها را  $myomiR$  می‌گویند (۱۸). اهمیت  $microRNA$  ها در رشد جنینی، تکثیر سلول‌های جدید، بهبود انقباض-پذیری میوکارد، بهبود عملکرد اندوتلیومی و جلوگیری از آترواسکلروزیس عروقی نشان داده شده است (۱۹).  $microRNAs$  نقش مهمی در جنبه‌های مختلف بیولوژی یک ارگان و تکامل، هومئوستاز انرژی و التهاب دارند. عدم تنظیم یا انحراف بیان  $microRNAs$  در ارتباط با آرایش عظیم پروسه‌های پاتولوژیکی شامل اختلالات نورولوژیک و بیماری‌های قلبی عروقی می‌باشد. اگرچه پتانسیل تنظیمی  $RNAs$  بسیار زیاد است ولی تقریباً حدود ۵۰٪ ژنوم بوسیله  $microRNAs$  تنظیم

درگیر در این مسیر، هدف از این مطالعه بررسی امکان استفاده منظم و ترکیبی تمرینات استقامتی - مقاومتی و مکمل سازی با عصاره سویا به عنوان جایگزین تجویز استروژن دریائسگی زودرس می باشد. لذا سوال پژوهش این است که آیا تمرینات ترکیبی ( استقامتی - مقاومتی) و مکمل سازی با عصاره سویا به تنهایی و بطور توأم به عنوان راههای جایگزین تجویز استروژن دریائسگی پیشرس تاثیر دارد یا خیر؟

### مواد و روش کار

در این مطالعه ۵۰ سررت صحرایی ماده نژاد ویستار باسیزده هفته سن با میانگین وزنی (۲۵±۲۰) گرم خریداری شد. برای همه آنها شرایط مناسب آزمایشگاهی (دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص رت، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و میانگین دما ۲۳±۲۲ درجه سانتیگراد) در آزمایشگاه حیوانات فراهم شد و در ۵ گروه ۱۰ تایی به شرح ذیل تقسیم شدند:

در گروه اواریکتومی (OVX) حیوانات اواریکتومی دو طرفه شدند. در گروه (sham) حیوانات تحت عمل جراحی قرار گرفتند بدون اینکه اواریکتومی شوند. در گروه (OVX+SOY) حیوانات اواریکتومی شده به مدت شش هفته عصاره سویا را روزانه به میزان ۶۰ mg/kg به صورت محلول در آب و از طریق گاوآژ دریافت کردند. در گروه (OVX+EN+RE) حیوانات اواریکتومی شده به مدت شش هفته ترکیب تمرینات استقامتی و مقاومتی را انجام دادند و در گروه (OVX+EN-RE+SOY) حیوانات اواریکتومی شده به مدت شش هفته همراه با دریافت عصاره سویا، ترکیب تمرینات قدرتی و استقامتی را انجام دادند.

حیوانات با استفاده از مخلوط کتامین و رامپون بیهوش شدند (۱۵). دو هفته پس از عمل جراحی و پس

می شود (۳۹). با اینکه انواع microRNA در فیزیوپاتولوژی قلب نقش دارند ولی بر نقش Mir-133 در سلامتی قلب تاکید شده است. بطوریکه کاهش تنظیمی این microRNA به روشهای متفاوت از جمله کاهش اپوپتوزیس، تولید فاکتورهای رشد، افزایش بیان IGF1، فعال نمودن مسیر PI3/AKT، و افزایش بیان eNOS موجب بهبود کار قلب می گردند (۲۰). تمرینات ورزشی با افزایش بیان Mir-133 موجب پیشگیری از بیماری های قلبی و یا رفع برخی عوارض ایجاد شده در قلب می گردد و باعث کاهش آپوپتوزیس، ایجاد هیپرتروفی فیزیولوژیک، جلوگیری از فیروز بافتی، تحریک آنژیوژنز، و بهبود عملکرد عروقی از طریق تحریک بیان فاکتورهای رشد مثل VEGF، EGF2، IGF1، تحریک فعالیت مسیر PI3k/AKT، افزایش بیان eNOS می گردد (۲۱). همچنین حیوی و همکارانش (۲۰۱۶) نشان دادند که افزایش بیان Mir-133 باعث افزایش پروتئین های ضد آپوپتوزیس و در نتیجه سرکوب آپوپتوزیس می گردد (۲۲). از طرفی، در پاسخ به تحریک خارجی مانند تمرین ورزشی، بیان ژنی به وسیله سازوکارهای متفاوتی نظیر، خاموش شدن بیان ژن توسط، microRNA می تواند تنظیم شود (۲۳-۲۵). همچنین سویا و همکارانش (۲۰۱۵) نشان دادند که Mir-133 از جمله ژن های هدفی هست که در تنظیم تکثیر و مرگ سلولی نقش اساسی را بر عهده دارد (۲۶). فراورده های غذایی سویا و مکمل های آن بیشترین مصرف انسانی را دارند چون دارای بیشترین غلظت های فیتواستروژن ها هستند و توسط زنان یائسه بطور گسترده ای بعنوان جایگزین هورمون درمانی بکار می روند. بنابراین با در نظر گرفتن پاتوژنز یائسگی زودرس، نقش تمرینات ورزشی و فیتواستروژن ها در راستای بهبود مسیر سیگنالینگ مشترک با اختلالات فوق و بیان Mir-133

گرفت. این برنامه تمرینی با توجه به هزینه اکسیژن طراحی شد که با شدت ۵۰ تا ۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی به اجرا درآمد (۳۱). بر اساس نتایج تحقیقات قبلی، برنامه تمرینی مورد استفاده در تحقیق حاضر از نوع هوازی بود و اثربخشی آن قبلاً به کرات گزارش شده است (۳ و ۱۶ و ۳۵). پروتکل بین ساعات ۵ تا ۷ بعد از ظهر هر روز اعمال می شد. ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی رتها با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین، بیهوش شدند و بافت قلب برای بررسی بیان ژن مربوطه از بدن جدا شد.

برای استخراج mRNA از کیت Gene all با Cat #۳۰۵۰۱۰۱ و استخراج microRNA از کیت Exiqon با Cat # ۲۰۳۳۰۱۱ استفاده گردید. میزان بیان Mir-133 و ژن U6 به عنوان کنترل داخلی با استفاده از دستگاه (Light Cycler 96) و رنگ سایبرگرین I تعیین شد. برای ارزیابی کارایی هر ژن از شیب منحنی استاندارد استفاده شد. در مرحله بعد جهت آنالیز داده‌ها ابتدا دلتا Ct ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و ابتدا Ct ژن U6 به عنوان ژن مرجع محاسبه شد و بیان ژنها در حالت پایه نسبت به ژنهای مرجع با فرمول  $2^{-\Delta CT}$  محاسبه گردید. سپس نتایج نهایی بیان هر ژن (expression ratio)، توسط نرم افزار آنالیز گردید. مشخصات پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده است. پرایمرهای Mir-133 و مرجع آن U6 از شرکت اگزیکون تهیه شد.

از بهبودی کامل حیوانات تجویز عصاره آغاز گردید. حیوانات تیمار به صورت روزانه ۶۰ mg عصاره متانولی سویا به مدت ۶ هفته و به صورت محلول در آب از طریق گاوآژ دریافت نمودند (۴۱، ۴۸). حیوانات تحت تیمار ۶ هفته و براساس پروتکل‌های تمرین استقامتی ۵ روز در هفته تمرین استقامتی انجام می‌دادند و بعد از تمرین استقامتی در قفسه‌های توری قرار می‌گرفتند و براساس پروتکل مقاومتی، تمرین مقاومتی را نیز انجام دادند. تمرین مقاومتی مورد استفاده در این پژوهش شامل یک ست ۱۰ تکراری با تناوب استراحت ۹۰ ثانیه، صعود از نردبان فعالیت ورزشی مقاومتی به ارتفاع ۱ متر و شیب ۸۵ درجه با وزنه متصل به قاعده دم بود. این پروتکل با توجه به مطالعات پیشین (۴۹ و ۵۰) و توانایی موشها با توجه به مطالعه پایلوت (و نیز خطوط راهنمای انجمن قلب آمریکا در باره اصول تمرین مقاومتی تعدیل شد (۵۲، ۵۱). برنامه تمرینی استقامتی، شامل دویدن روی نوارگردان ویژه جوندگان بود که در آن تمرین با رعایت اصل اضافه بار به صورت پیشرونده بین ۲۵-۶۴ دقیقه و با سرعت بین ۱۵-۲۲ متر در دقیقه به مدت ۶ هفته و هر هفته ۵ جلسه اجرا شد اجرا شد. این برنامه سرعت برنامه تمرینی از ۱۵ متر در دقیقه و مدت ۲۵ دقیقه در روز اول آغاز شد و سرعت هر هفته ۱ متر در دقیقه افزایش داشت. مدت تمرین نیز هر جلسه ۱ دقیقه نسبت به جلسه قبل افزایش داشت (۳). کل برنامه تمرینی روی نوارگردان بدون شیب انجام

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در Real-time

نام ژن	مشخصات
U6	EXIQON,U6 snRNA (hsa, mmu, rno) PCR primer set, UniRT. Universal RT microRNA PCR, reference gene miRCURY LNA™ primer set. NCBI Symbol U6snRNA,NCBI Accesion: 203907

EXIQON, LNA Fwd Primer, Fwd hsa-miR-133b, 204162-02 Batch 126426, 100 rnx	Mir-133
LAN Rev Primer, Rev hsa-miR-133b, 204162-02 Batch 126425, 100 rnx	

**یافته‌ها**

در پایان مرحله نگهداری رتها، اورایکتومی موجب افزایش معنی‌دار وزن بدن در مقایسه با دیگر گروه‌ها گردید ( $p \leq 0/05$ ). همچنین پس از شش هفته افزایش معنی‌داری در وزن بدن گروه‌های تحت درمان و تمرین در مقایسه با گروه شم مشاهده گردید که این افزایش در گروه OVX بیشتر بود. ( $p \leq 0/05$ ) (جدول ۲). میانگین غذای مصرفی گروه‌های مورد مطالعه در مقایسه با گروه شم تفاوت معنی‌دار نشان نداد. ( $p \leq 0/05$ ) (جدول ۲).

همه داده‌های تحقیق بصورت میانگین  $\pm$  خطای معیار بیان شده‌اند. برای محاسبات آماری از نرم افزار SPSS استفاده شد. اطلاعات گروهها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و استفاده از آزمون توکی مقایسه شد. معنی‌دار بودن نتایج با  $p \leq 0/05$  مورد پذیرش قرار گرفت. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro- Wilk ارزیابی شد و مشخص شد که داده‌ها دارای توزیع طبیعی.

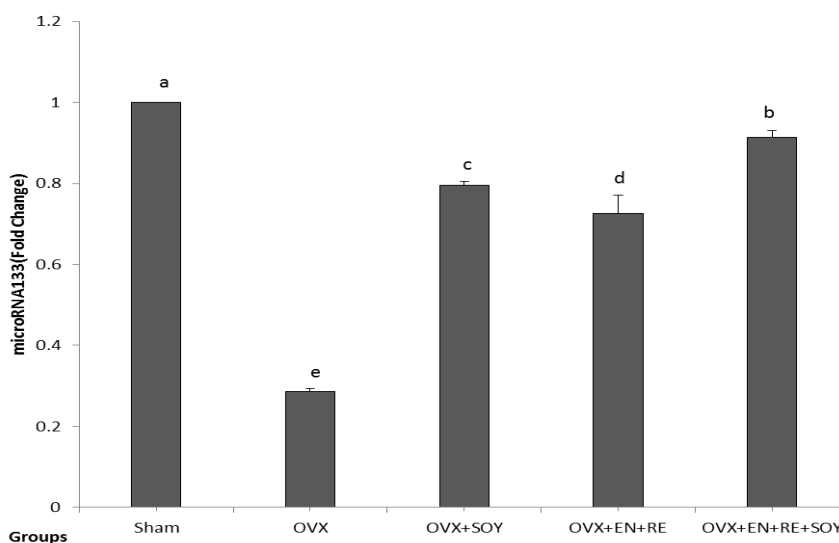
**جدول ۲: میانگین وزن بدن، غذای مصرفی در گروه‌های مورد مطالعه**

گروه‌ها	Sham	OVX	OVX+SOY	OVX+RE+EN	OVX+RE+EN+SOY
تعداد	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
وزن پس از ۶ هفته	۲۵۴.۱ $\pm$ ۲.۶	۲۸۳.۲ $\pm$ ۴.۲*	۲۶۵.۴ $\pm$ ۵.۳	۲۶۳.۷ $\pm$ ۳.۵	۲۶۴.۲ $\pm$ ۴.۲
میانگین غذای مصرفی (g/day)	۱۶.۴۳ $\pm$ ۲.۱۶	۱۶.۱۳ $\pm$ ۳.۶۲	۱۵.۹۳ $\pm$ ۳.۶۲	۱۵.۸۴ $\pm$ ۲.۱۲	۱۶.۰۳ $\pm$ ۳.۲۱

بیان Mir-133 در رتهای اورایکتومی شده نسبت به گروه شم دارای کاهش معنی‌داری بود ( $p \leq 0/05$ ). شش هفته تمرین مقاومتی-استقامتی و مکمل سازی با عصاره سویا و ترکیب این دو در رتهای اورایکتومی شده، موجب افزایش قابل توجه در میزان بیان Mir-133 نسبت به گروه رتهای اورایکتومی شده گردید که از نظر آماری معنی‌دار بود ( $p \leq 0/05$ ). همچنین میزان افزایش بیان Mir-133 در گروههای اورایکتومی شده با شش هفته تمرین مقاومتی-استقامتی و مکمل سازی با

مقادیر بصورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد بیان شده‌اند ( $p \leq 0/05$ ). Sham: گروه شم، OVX: گروه اورایکتومی، OVX+SOY: گروه اورایکتومی شده و مکمل سازی با عصاره سویا، OVX+EN+RE: گروه اورایکتومی شده و ترکیب تمرینات استقامتی-مقاومتی، OVX+EN-RE+SOY: گروه اورایکتومی شده و ترکیب تمرینات استقامتی-مقاومتی و مکمل سازی با عصاره سویا. \*تفاوت معنی‌دار با بقیه گروهها. **میزان بیان Mir-133 در قلب رتهای اورایکتومی شده** میزان بیان Mir-133 در قلب تمامی گروه‌های تحت مطالعه در نمودار ۱ نشان داده شده است. میزان

عصاره سویا و ترکیب این دو نسبت به گروه شم از نظر آماری معنی دار بود ( $p \leq 0.05$ ).



نمودار ۱: میزان بیان Mir-133 در قلب رتهای گروه‌های مورد مطالعه

مقادیر بصورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد بیان شده‌اند ( $p \leq 0.05$ ). Sham: گروه شم، OVX: گروه اواریکتومی، OVX+SOY: گروه اواریکتومی شده و مکمل سازی با عصاره سویا، OVX+EN+RE: گروه اواریکتومی شده و ترکیب تمرینات استقامتی-مقاومتی، OVX+EN+RE+SOY: گروه اواریکتومی شده و ترکیب تمرینات استقامتی-مقاومتی و مکمل سازی با عصاره سویا. e بیانگر اختلاف معنی دار با گروه Sham، c بیانگر اختلاف معنی دار با هر دو گروه Sham و OVX، d بیانگر اختلاف معنی دار با هر سه گروه Sham، OVX و OVX+SOY، b بیانگر اختلاف معنی دار با هر چهار گروه Sham، OVX و OVX+SOY و OVX+EN+RE+SOY.

مقدار  $p \leq 0.05$  و این کاهش در در گروه OVX بیشتر بود (۲) تمرین مقاومتی-استقامتی و عصاره سویا به تنهایی و بصورت توأم از کاهش بیان Mir-133 توانستند جلوگیری نمایند. ( $p \leq 0.05$  و ۳) اثر ترکیبی تمرین مقاومتی-استقامتی و مکمل سازی با عصاره سویا در جلوگیری از کاهش بیان Mir-133 قویتر بود ( $p \leq 0.05$ ). تنظیم بیان microRNAs توسط استروژن و دیگر هورمونهای جنسی اثبات شده است (۱). در واقع microRNAs همانند miR-133 با مکانیزم‌های مختلفی در فرآیندهای فیروزتیک و آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها درگیر هستند (۳۱). در تحقیق حاضر، اواریکتومی موجب افزایش قابل توجه وزن بدن رت‌ها گردید که یکی از ریسک فاکتورهای بیماری قلبی-عروقی می‌باشد. در پژوهش حاضر میانگین وزن بدن رت‌ها در گروه OVX در مقایسه با گروه Sham به طور معنی داری افزایش یافت. این نتایج در توافق با پژوهش‌های قبلی بودند که نشان

مقدار  $p \leq 0.05$  و این کاهش در در گروه OVX بیشتر بود (۲) تمرین مقاومتی-استقامتی و عصاره سویا به تنهایی و بصورت توأم از کاهش بیان Mir-133 توانستند جلوگیری نمایند. ( $p \leq 0.05$  و ۳) اثر ترکیبی تمرین مقاومتی-استقامتی و مکمل سازی با عصاره سویا در جلوگیری از کاهش بیان Mir-133 قویتر بود ( $p \leq 0.05$ ). تنظیم بیان microRNAs توسط استروژن و دیگر هورمونهای جنسی اثبات شده است (۱). در واقع microRNAs همانند miR-133 با مکانیزم‌های مختلفی در فرآیندهای فیروزتیک و آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها درگیر هستند (۳۱). در تحقیق حاضر، اواریکتومی موجب افزایش قابل توجه وزن بدن رت‌ها گردید که یکی از ریسک فاکتورهای بیماری قلبی-عروقی می‌باشد. در پژوهش حاضر میانگین وزن بدن رت‌ها در گروه OVX در مقایسه با گروه Sham به طور معنی داری افزایش یافت. این نتایج در توافق با پژوهش‌های قبلی بودند که نشان

### بحث و نتیجه گیری

مهمترین یافته‌های این پژوهش نشان داد که (۱) بیان Mir-133 در رتهای اواریکتومی کاهش یافت

یافته‌های این مطالعه همسو با مطالعه انجام شده توسط حبیبی و همکارانش (۲۰۱۶) بود که دیده شد هشت هفته تمرین منظم شنا باعث افزایش Mir-133 و ژن هدف آن Bcl-2 می‌گردد (۲۲). یکی از اثرات مفید تمرین، نقش آن در بیان microRNAs و ژن‌های هدف آنها مثل IGF-1 و Bcl-2 می‌باشد. ووتن و همکارانش (۲۰۱۱) نشان داده‌اند که تمرین منظم در زنان در دوره بعد از یائسگی قدرت عضلانی را بطور معنی‌داری افزایش می‌دهد ولی تغییری در شاخص توده بدن ایجاد نمی‌کند (۲۷) و در برابر آپوپتوزیس نقش محافظتی ایفا می‌کند (۲۸). تاثیر تمرینات ورزشی به عنوان جایگزین فیزیکی در دوران یائسگی و یکی از مهمترین مداخلات کلینیکی در جلوگیری و یا درمان بیماریهای قلبی عروقی است و نیز پیشگیری از پیشرفت بیماری قلبی عروقی بصورت گسترده‌ای مطالعه شده است (۳۰)، اما مکانیزم‌های درگیر در این فرایند هنوز ناشناخته می‌باشد. در مطالعه حاضر، شش هفته تمرین مقاومتی-استقامتی اثرات مفیدی را باعث شد. کاهش وزن بدن تا حدی نزدیک به آنچه که در گروه شم دیده می‌شد از اثرات مفید تمرین مقاومتی-استقامتی در مطالعه ما بود. در این مطالعه، تمرین مقاومتی-استقامتی باعث افزایش بیان Mir-133 در رتهای اواریکتومی شده گردید. یافته‌های این مطالعه در موافقت با مطالعات پیشین بود که دیده شده است در زمان یائسگی و مدلهای حیوانی اواریکتومی شده، تمرینات ورزشی باعث کاهش وزن بدن و وزن چربی و همچنین باعث بهبود پروفایل لیپیدی می‌شود. لی و همکارانش (۲۰۱۱) نشان داده‌اند که فیتواستروژنها از طریق فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ اثرات مثبت خود را در راستای افزایش طول عمر سلول و جلوگیری از آپوپتوزیس اعمال می‌نمایند، در واقع فیتواستروژنها علائم عروقی را می‌توانند در زنهای یائسه

دادند که افزایش وزن بدن رتها ناشی از کمبود هورمونی بود. به خوبی شناخته شده است که کمبود هورمون های زنانه مانند استروژن در زنان یائسه دیده می‌شود و به افزایش وزن به ویژه چربی اپیدیدیم (epididymal fat) مربوط است. اعتقاد بر این است که این فرایند از طریق دخالت در لپتین صورت می‌گیرد که به هورمون تولید سلول های چربی شناخته شده است و نقش مهمی در تنظیم وزن بدن و اشتها بر عهده دارد (۱۹۲). در این راستا مطالعات نشان دادند که مکمل سازی با استروژن باعث کاهش مصرف غذا و کاهش وزن بدن بعد از یائسگی می‌شود؛ تأثیری که پیشنهاد شده است توسط گیرنده استروژن آلفا تنظیم شود (۱۹۳).

هم چنین در رتهای اواریکتومی شده بیان قلبی Mir-133 که دارای اثرات ضد فیروزی و اثرات ضد آپوپتوزی هستند در مقایسه با رتهای گروه شم، کاهش معنی‌داری داشت و میزان این کاهش در رتهای گروه OVX بیشتر بود. یافته‌های این تحقیق در راستای مطالعات پیشین بود که دیده شده است یائسگی ریسک فاکتور مهم برای بیماریهای قلبی عروقی در زن‌ها بوده است (۳۲ و ۳۳). نتایج این تحقیق نشان داد که آپوپتوز قلب در گروه اواریکتومی بطور معنی‌داری افزایش یافت در حالی که رژیم عصاره سویا و تمرین مقاومتی-استقامتی و ترکیب این دو اثر محافظتی بر آپوپتوز قلب رتها داشت. نتایج بدست آمده در ارتباط با تغییرات Mir-133 که البته در دیگر مدل‌ها و نه در مدل یائسگی مشاهده شده است در موافقت با دیگر مطالعات قلبی بود و تجویز استروژن در دوران یائسگی با اثر حفاظتی آن باعث کاهش وقوع بیماری‌های قلبی عروقی می‌شود (۳۴). در تحقیق حاضر شش هفته تمرین ترکیبی مقاومتی-استقامتی توانست از کاهش بیان Mir-133 جلوگیری کند ( $p \leq 0.05$ ).

بهبود بخشد هر چند مکانیسم اثر آن گزارش نشده است (۳۶).

در تحقیق حاضر شش هفته مکمل سازی با عصاره سویا باعث افزایش معنی‌دار بیان Mir-133 در قلب رتهای اواریکتومی شده گردید. ایزوفلاونهای سویا بشدت باعث کاهش تری‌گلیسیرید، کلسترول و LDL سرم و همچنین باعث افزایش سطح HDL در زمان یائسگی می‌گردد. ولی اختلاف نظرهایی در این مورد وجود دارد بطوریکه در برخی مطالعات عدم تغییر پروفایل لیپیدی توسط ایزوفلاون سویا در زمان یائسگی گزارش شده است (۳۷). این اختلاف نتایج احتمالاً به علت تفاوت در پروتکل آزمایش، گونه یا سن حیوانات و یا دوز مورد استفاده ایزوفلاون بوده است. با وجود عدم اختلاف میان گروههای اواریکتومی، این مطالعه نشان داد که در این گروهها کاهش وزن بدن در مقایسه با گروه OVX نسبت به گروه شم وجود دارد. لازم به ذکر است که تجویز همزمان عصاره سویا و دریافت تمرین مقاومتی- استقامتی برای کنترل وزن بسیار موثرتر بود و توانست از افزایش وزن در گروههای اواریکتومی جلوگیری نماید. بعلاوه اینکه مداخله ترکیبی مکمل سازی با عصاره سویا و تمرین مقاومتی- استقامتی باعث بهبود ریسک فاکتورهای بیماری‌های قلبی از طریق افزایش بیان Mir-133 در قلب شد که این افزایش بیان، خود ممکن است در ارتباط با اثرات ضد آپوپتوزی و ضد فیروزی باشد. در

واقع این نتایج در توافق با مطالعات قبلی بود که توسط مطالعات مختلفی بر روی مدل‌های حیوانی انجام شده و مشاهده گردیده که اثر ترکیبی ایزوفلاون سویا و همچنین تمرین ورزشی بهبود اثرات دفاعی بر بیماری‌های قلبی در رتهای اواریکتومی شده بوده است (۴۰). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ترکیب مداخله ایزوفلاون سویا و تمرین تجمع چربی بدن را با افزایش توده خالص بدن در رتهای اواریکتومی شده کاهش می‌دهد (۲۹). همچنین در مطالعه‌ای راموس و همکارانش (۲۰۱۲) گزارش کردند که ریسک فاکتورهای قلبی توسط تمرین و فیتواستروژن‌ها در رتهای اواریکتومی کمتر نگردیده است (۳۸). این تفاوت احتمالاً به علت تفاوت روش‌های آزمایش، نوع و سن متفاوت حیوانات آزمایش شده، مدت زمان و یا دوزهای متفاوت مداخلات بوده باشد. در واقع این نتایج نشان داد که در شرایط کمبود استروژن، تمرین مقاومتی- استقامتی منظم و عصاره سویا بصورت توأم در عملکرد قلبی و حفظ هومئوستازهای متابولیکی بسیار مفید می‌باشد و در نتیجه دارای اثر بسیار مهمی بر مهار پیشرفت ریسک فاکتورهای قلبی می‌باشد. بنابراین احتمالاً بهبود روش زندگی از طریق فعالیت‌های فیزیکی مناسب و گنجاندن مواد غذایی مناسب از جمله فیتواستروژن‌ها می‌تواند از بروز خیلی اختلالات احتمالی در دوران یائسگی جلوگیری نماید.

## References

1. Rivera CM, Grossardt BR, Rhodes DJ, Brown Jr RD, Roger VL, Melton III LJ, Rocca WA. Increased cardiovascular mortality following early bilateral oophorectomy. *Menopause* (New York, NY). 2009; 16(1): 15.
2. Billeci A M, Paciaroni M, Caso V, Agnelli G. Hormone replacement therapy and stroke. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008; 6: 112-23.
3. Sébastien L, François M, Fabrizio M. Role of Matrix Metalloproteinase-8 in Atherosclerosis. *Hindawi Publishing Corporation*. 2013; 6: 1-6.



4. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids*. 2004; 69(8): 537-42.
5. Muñoz-Castañeda JR, Muntané J, Herencia C, Muñoz M, Bujalance I, Montilla P. Ovariectomy exacerbates oxidative stress and cardiopathy induced by adriamycin. *Gynecol Endocrinol*. 2006; 22(2): 74-79.
6. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 2003; 111: 1497-504.
7. Foncea R, Andersson M, Ketterman A. Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1997; 272: 19115-24.
8. Davis PF, Helmke BP. Endothelial mechanotransduction. In: Mofrad MRK, Kamm RD, eds. *Cellular Mechanotransduction: Diverse Perspectives From Molecules to Tissue*. New York, NY: Cambridge University press; 2010:20-60.
9. Glover A, Assinder SJ. Acute exposure of adult male rats to dietary phytoestrogens reduces fecundity and alters epididymal steroid hormone receptor expression. *Endocrinol*. 2006; 189(3): 565-73.
10. Ahmad A, Biersack B, Li Y, Kong D, Bao B, Schobert R, Padhye SB, Sarkar H. Deregulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathways by isoflavones and its implication in cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013; 13(7): 1014-24.
11. Polivka J Jr, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther*. 2014; 142(2):164-75.
12. Perez – Martin M, Salazar V, Castillo C, Arizna varreta C, Azcoitia I, Garcia-Segura, L. Jesus AF. Tresguerres. Estradiol and soy extract increase the production of new cells in the dentate gyrus of old rats. *Exp Gerontol*. 2005 May; 40 (5): 450-453.
13. Lenka Varinska 1, Peter Gal 1,2,3,4, Gabriela Mojzisoava 5, Ladislav Mirossay 1 and Jan Mojzis. Soy and Breast Cancer: Focus on Angiogenesis. *Int. J Mol Sci*. 2015, 16, 11728-11749.
14. Honore EK, Williams JK, Anthony MS, Clarkson TB. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertil Steril*. 1997; 67:148–154.
15. Al-Nakkash L, Markus B, Bowden K, Batia LM, Prozialeck WC, Broderick TL. Effects of acute and 2-day genistein treatment on cardiac function and ischemic tolerance in ovariectomized rats. *Gender Med*. 2009; 6: 488-97.
16. Van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genet* 2008; 24(4):159-66.
17. Chen JF, Callis TE, Wang DZ. microRNAs and muscle disorders. *J Cell Sci*. 2008; 122(1):13-20.
18. McCarthy JJ. The MyomiR network in skeletal muscle plasticity. *Exerc Sport Sci Rev* 2011; 39(3):150-4.
19. Rakesh C. Kukreja, Chang Yin, and Fadi N. Salloum. MicroRNAs: New Players in Cardiac Injury and Protection. *Mol Pharmacol*. 2011; 80: 558-564.
20. Zhang J, Zhang Z, Zhang DY, Zhu J, Zhang T, Wang C. MicroRNA 126 Inhibits the Transition of Endothelial Progenitor Cells to Mesenchymal Cells via the PIK3R2-PI3K/Akt Signalling Pathway. *PLoS ONE*. 2013; 8(12): e83294. doi:10.1371/journal.pone.0083294.
21. Durrans A, Stuhlmann H. A role for Egf17 during endothelial organization in the embryoid body model system. *J Angiogenes Res*. 2010; 2: 4. doi:10.1186/2040-2384-2-4.
22. Habibi P, Alihemmati AR, NourAzar AR, Yousefi H, Mortazavi S, Ahmadiasl N. Expression of the Mir-133 and Bcl-2 could be affected by swimming training in the heart of ovariectomized rats. *Iran J Basic Med Sci* 2016; 19:381-387.

23. Fernandes-Silva MM, Carvalho VO, Guimarães GV, Bacal F, Bocchi EA. Physical exercise and microRNAs: new frontiers in heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2012; 98(5): 459-66.
24. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004; 14(10a):1902-10.
25. Fernandes T, Soci UPR, Oliveira EM. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. *J Med Biologic Res.* 2011; 44: 836-47.
26. Ramasamy S, Velmurugan G, Rajan KS, Ramprasath T, Kalpana K. MiRNAs with apoptosis regulating potential are differentially expressed in chronic exercise-induced physiologically hypertrophied hearts. *PLoS one.* 2015; 10(3): e0121401.
27. Wooten JS, Phillips MD, Mitchell JB, Patrizi R, Pleasant RN, Hein RM, Menzies RD, Barbee JJ. Resistance exercise and lipoproteins in postmenopausal women. *International journal of sports medicine.* 2011; 32(01): 7-13.
28. Leaf DA. The effect of physical exercise on reverse cholesterol transport. *Metabolism.* 2003; 52(8): 950-7.
29. Wu J, Wang X, Chiba H, Higuchi M, Nakatani T, Ezaki O, Cui H, Yamada K, Ishimi Y. Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and bone loss in ovariectomized mice. *Metabolism.* 2004; 53(7): 942-8.
30. Haddock BL, Marshak HP, Mason JJ, Blix G. The effect of hormone replacement therapy and exercise on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *Sports Med.* 2000; 29(1): 39-49.
31. Skommer J, Rana I, Marques F, Zhu W, Du Z, Charchar F. Small molecules, big effects: the role of microRNAs in regulation of cardiomyocyte death. *Cell Death Dis.* 2014; 5(7): e1325.
32. Dosi R, Bhatt N, Shah P, Patell R. Cardiovascular disease and menopause. *Journal of clinical and diagnostic research: J Clin Diagn Res.* 2014;8(2):62.
33. Kim C, Edelstein SL, Crandall JP, Dabelea D, Kitabchi AE, Hamman RF. Menopause and risk of diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Menopause (New York, NY).* 2011; 18(8): 857.
34. Knowlton A, Lee A. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 2012; 135(1): 54-70.
35. Marques CM, Nascimento FA, Mandarin-de-Lacerda CA, Aguila MB. Exercise training attenuates cardiovascular adverse remodeling in adult ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Menopause.* 2006;13(1):87-95.
36. Li Y, Kong D, Bao B, Ahmad A, Sarkar FH. Induction of cancer cell death by isoflavone: the role of multiple signaling pathways. *Nutrients.* 2011; 3(10): 877-96.
37. Lee J, Cho H-S, Kim D-Y, Cho J-Y, Chung J-S, Lee H-K, Nak-Hun S f, Won K K. Combined effects of exercise and soy isoflavone diet on paraoxonase, nitric oxide and aortic apoptosis in ovariectomized rats. *Appetite.* 2012; 58(2): 462-9.
38. Ramos JE, Al-Nakkash L, Peterson A, Gump BS, Janjulia T, Moore MS, Broderick TL, Carroll CC. The soy isoflavone genistein inhibits the reduction in Achilles tendon collagen content induced by ovariectomy in rats. *Scand J Med Sci Sports.* 2012;22(5):e10-e14.
39. Abdellatif M. Differential expression of microRNAs in different disease states. *Circ Res.* 2012; 110(4): 638-50.
40. Oh HY, Lim S, Lee JM, Kim DY, Ann ES, Yoon S. A combination of soy isoflavone supplementation and exercise improves lipid profiles and protects antioxidant defense-systems against exercise-induced oxidative stress in ovariectomized rats. *BioFactors.* 2007, 29: 175-185.

## Original paper

## Combined effect of endurance- resistance training and Soybean isofelaven supplementation on expression of Mir-133 in the heart of ovariectomized rats

Morteza Jourkesh<sup>1</sup>, Siroos Choobineh<sup>2\*</sup>, Rahman soori<sup>2</sup>, Ali Asghar Ravasi<sup>2</sup>

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Aras International Campus, Tehran, Iran

2. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

\*E-mail:Choobineh@ut.ac.ir

### Abstract

**Backgrounds and Aim:** Menopause is one of the important risk factors of cardiovascular disease (CVD) in women. Exercise and soy isoflavone diets have been suggested to reduce the risk of CVD in postmenopausal women. In this study, we investigated the effects of combined Resistance-Endurance training and Soybean supplementation on expression of Mir-133 in the heart of ovariectomized (OVX) rats.

**Material and Methods:** Fifty wistar female rats under controlled conditions (temperature, light/dark (12:12) cycle, with ad Libitum access to food and water) were housed and after familiarization with protocol they were divided into five groups of ten: Sham, Ovariectomy (OVX), OVX with Soy (OVX+SOY), OVX with Resistance-Endurance training (OVX+RE+EN) and OVX+RE+EN with Soy (OVX+ RE+EN+SOY). Forty eight hours after the end of the last session rats were anesthetized and sacrificed. The effects of these treatments were evaluated by measuring cardiac Mir-133expression level by real time PCR method.

**Results:** Ovariectomy down-regulated Mir-133 gene expression ( $p \leq 0.05$ ); and this decrease was further in the OVX group ( $p \leq 0.05$ ). Six weeks of Soy treatment and/or Resistance-Endurance training improved expression of Mir-133 ( $p \leq 0.05$ ), but the combination effect was stronger ( $p \leq 0.05$ ).

**Conclusion:** Our results suggest that the combination of Soy extract supplementation and regular Resistance-Endurance training has greater cardiac protective effect on the menopause-induced changes than using each of them alone. Therefore, probably improved lifestyle through exercise training and the inclusion of the suitable diets such as soy isofeloven can prevent the onset of many possible disorders during menopause.

**Key words:** Exercise training, Ovariectomy, Isofeloven, Mir-133, Soy