

تأثیر تمرینات ترکیبی بر هموستاز گلوکز و سطوح پلاسمایی سیرتوئین ۱ و FOXO1 در مردان سالمند چاق

مریم صفری^۱، رامین شعبانی^{*}، محمدرضا فدایی^۱

مقاله پژوهشی

مقدمه: پیری و چاقی علائم مشترکی از جمله تغییر در متابولیسم گلوکز و لیپید دارند. فعال‌سازی سیرتوئین ۱ و FOXO1 (Forkhead Box Protein O1) می‌تواند بر اختلالات متابولیک مرتبط با افزایش سن و چاقی تأثیر مثبت بگذارد. هدف از تحقیق حاضر بررسی ۱۶ هفته تمرین ترکیبی بر سطوح پلاسمایی سیرتوئین ۱، FOXO1 و هموستاز گلوکز در سالمندان چاق است.

روش بررسی: تعداد ۴۰ نفر از مردان سالمند چاق با میانگین سن $61/90 \pm 2/84$ انتخاب و به صورت تصادفی در دو گروه تجربی و کنترل تقسیم شدند. آزمودنی‌ها هفته‌ای سه روز (هر جلسه ۹۰ دقیقه) به مدت ۱۶ هفته تمرین کردند. ۴۸ ساعت قبل و بعد از تمرین مشخصات آنترپومتریک و مقادیر پلاسمایی سیرتوئین ۱، FOXO1، قند خون ناشتا، انسولین، HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance) و HOMA-B (Homeostasis Model Assessment of β -Cell) از نمونه‌ها اخذ و به روش الیزا اندازه‌گیری شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS version ۱۶ و آزمون آماری تی مستقل و وابسته در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ انجام شد.

نتایج: مقادیر قند خون ناشتا ($P=0.04$)، انسولین ($P=0.008$) در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت در حالیکه سطوح سرمی سیرتوئین ۱ ($P = 0.0001$) و FOXO1 ($P = 0.0001$) افزایش معنی‌داری داشت. نتایج t همبسته در گروه تجربی نیز کاهش معنی‌دار در انسولین، HOMA-IR و HOMA-B ($P = 0.001$) و افزایش معنی‌دار در سطوح سرمی سیرتوئین ۱ و FOXO1 ($P = 0.0001$) را نشان داد ($P < 0.05$).
نتیجه‌گیری: براساس نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که ۱۶ هفته تمرین ترکیبی اثر مطلوبی بر بهبود هموستاز گلوکز، افزایش سطوح سیرتوئین ۱ و FOXO1 مردان چاق سالمند دارد.

واژه‌های کلیدی: هموستاز گلوکز، سیرتوئین ۱، FOXO1، سالمندان چاق، تمرین ترکیبی

IRCT20230810059112N1

ارجاع: صفری مریم، شعبانی رامین، فدایی محمدرضا. تأثیر تمرینات ترکیبی بر هموستاز گلوکز و سطوح پلاسمایی سیرتوئین ۱ و FOXO1 در مردان سالمند چاق. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۳؛ ۳۲ (۴): ۶۴-۷۷۵۴.

۱- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۱۲۳۲۴۷۹۶، پست الکترونیکی: dr.ramin.shabani@gmail.com، صندوق پستی: ۴۱۴۷۶۵۴۹۱۹

مختلف مانند متابولیسم سلولی ترمیم DNA عملکرد میتوکندری و رشد سلولی دارند (۸). سیرتوئین ۱ یک داستیلاز وابسته به NAD^+ است که با محدودیت کالری بیان آن افزایش می‌یابد. اخیراً سیرتوئین‌ها به عنوان تنظیم کننده‌های احتمالی اپی‌ژنتیکی ضد پیری و نقش محافظتی در برابر پاتوژن بیماری‌های مختلفی مانند سرطان، اختلالات متابولیک، تخریب عصبی و بیماری‌های وابسته به سالمندی با هدف دارویی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفتند (۹، ۱۰). ورزش منظم به‌طور گسترده‌ای برای پیشگیری و مدیریت بیماری‌های متابولیکی چون چاقی و دیابت، توصیه شده است (۱۱). یکی از سوبستراهای سیرتوئین ۱، فاکتور رونویسی FOXO1 (Forkhead Box O1) است که به عنوان واسطه فرآیندهای سلولی مختلف مانند توقف و تکثیر چرخه سلولی، ترمیم DNA و متابولیسم توجه زیادی را به خود جلب کرده است. گزارش شده است که سیرتوئین ۱ فعالیت FOXO را تنظیم می‌کند (۱۲). بی‌نظمی مسیر FOXO1 منجر به اختلالات متابولیک، به‌ویژه چاقی می‌شود (۱۳). دو ژن سیرتوئین ۱ و پروتئین سر چنگالی (FOXO1) نقش عمده‌ای در متابولیسم بدن مصرف‌کننده گلوکز متابولیسم لیپیدها، مقاومت به انسولین پاسخ به کالری محدود و مصرف مواد غذایی دارند (۱۴). سیرتوئین ۱ نیز باعث افزایش ترشح انسولین از سلول‌های بتا پانکراس می‌شود هم‌چنین التهاب و استرس اکسیداتیو آسیب پانکراس را کاهش می‌دهد (۱۵). کاهش FOXO1 به اختلال سلول‌های بتا و دیابت نوع ۲ کمک می‌کند. از طرفی FOXO1 نقش دوگانه‌ای در تنظیم مقاومت به انسولین دارد و علاوه بر تنظیم توده سلول‌های β ، عملکرد سلول‌های β را نیز تنظیم می‌کند و سطح FOXO1 برای حساسیت بافت به انسولین مهم است. هورمون انسولین مهم‌ترین تنظیم‌کننده گلوکز خون در بدن شناخته می‌شود. نفوذپذیری گلوکز در سلول‌های بدن به کمک گیرنده‌هایی در سطح سلول پس از اتصال به انسولین انجام می‌شود (۱۶). FOXO1 با تنظیم مثبت فسفوانول‌پروات کربوکسی‌کیناز و بیان گلوکز ۶-فسفاتاز باعث افزایش مقاومت به انسولین می‌شود. FOXO1 با کاهش سطح

پیشرفت سلامت باعث افزایش امید به زندگی در سالمندان شده است. پیری یک بیماری یا تغییر ناگهانی در فیزیولوژی نیست بلکه یک فرآیند تدریجی است که با کاهش کارایی عملکردی و هومئوستاز سلول‌ها و بافت‌ها همراه است (۱). چاقی و پیری طیف مشابهی از فنوتیپ‌ها مانند به خطر افتادن یکپارچگی ژنومی، اختلال در عملکرد میتوکندری، تجمع ماکرومولکول‌های درون سلولی، اختلال در سیستم ایمنی، تغییر در ترکیب بدن و متابولیسم گلوکز و لیپید، افزایش التهاب سیستمیک و استرس اکسیداتیو دارند (۲). نقص در عملکرد میتوکندری یکی از علل اصلی است که با فرآیند فرسایشی و پیشرونده سالمندی همراه است. در واقع کاهش بیوژنز منجر به اختلال در بازسازی اجزای میتوکندری می‌شود بنابراین با از بین رفتن این اندامک، مقادیر و عملکرد آنزیم‌های زنجیره تنفسی میتوکندری کاهش و به دنبال آن استرس اکسایشی در سلول افزایش می‌یابد (۳، ۴). با فروپاشی میتوکندری ناشی از استرس اکسیداتیو از عوامل مهم مقاومت به انسولین است. از طرفی کاهش حساسیت به انسولین در کنار ترشح ناکافی آن از پانکراس ابتلا به دیابت نوع ۲ را افزایش می‌دهد (۵). مسیرهای بیوشیمیایی که مرتبط با افزایش سطح گلوکز است شامل: اتوکسیداسیون گلوکز، سنتز پروستاگلندین، گلیکاسیون پروتئین باعث از کاهش میتوکندری و افزایش ROS (گونه فعال اکسیژن) می‌شوند. با تولید بیش از حد ROS چندین مکانیسم سلولی از جمله مسیر پروتئین‌کینازهای فعال شده با میتوژن (MAPKs)، پروتئین‌کینازهای فعال شده با آدنوزین - منو فسفات (AMPKs)، مسیر سیگنالینگ NF- κ B و عوامل رونویسی مانند فاکتورهای سیرتوئین ۱ برای ایجاد التهاب و از بین بردن مسیرهای سیگنالینگ انسولین تحریک می‌شوند (۶). بیوژنز میتوکندری به‌طور قابل‌توجهی توسط AMPK افزایش می‌یابد (۷). AMPK واسطه سلولی اصلی استرس متابولیک است و با محرومیت از گلوکز فعال می‌شود. نکته مهم این است که AMPK و سیرتوئین ۱ هر دو یکدیگر را تنظیم می‌کنند و اثرات مشابهی بر فرآیندهای سلولی

مطالعات بیان کردند که تمرین ترکیبی نسبت به تمرینات هوازی یا مقاومتی به تنهایی در بهبود متابولیسم گلوکز و لیپید پلاسما در بیماران مسن مبتلا به سندرم متابولیک مؤثرتر است (۳۱). از این رو با توجه به عملکرد مهم پروتئین‌های سیرتوئین ۱ و FOXO1 و نقش محافظتی آنها از بافت‌های مختلف بدن، هموستاز گلوکز و نیز اهمیت حفظ عملکرد اندام‌های بدن در دوره سالمندی که با کاهش سطوح این پروتئین‌ها نیز همراه است (۳۲). لذا با توجه به اختلاف در یافته‌های تحقیقات و نیز ضرورت انجام پژوهش‌های بیشتر در خصوص اثر تمرینات ورزشی ترکیبی بر هموستاز گلوکز و سطوح پلاسمایی سیرتوئین ۱ و FOXO1 در مردان سالمند چاق هدف اصلی این تحقیق بود.

روش بررسی

پژوهش حاضر با طرح نیمه‌تجربی به روش پیش‌آزمون و پس‌آزمون بر روی مردان چاق ۶۰ تا ۷۰ ساله در باشگاه کوهنوردی لاهیجان انجام شد. آزمودنی‌ها پس از اطلاعیه‌ای جهت ثبت نام به‌صورت داوطلبانه به این باشگاه مراجعه کرده و قبل از هر گونه تمرین، پرسشنامه بالینی ویژه سلامت و فرم رضایت‌نامه کتبی را امضا کردند. علت انجام این پژوهش در مردان، عدم مراجعه و حضور زنان سالمند چاق بود. تعداد افراد دارای محدوده سنی در تحقیق (۶۰ تا ۷۰ سال) ۱۱۰ نفر بود. از میان این افراد ۴۶ نفر واجد شرایط براساس معیارهای ورود به تحقیق انتخاب شدند که با استفاده از پرسش‌نامه‌های مذکور و بررسی آخرین آزمایشات بیوشیمیایی خونی، اطلاعات بررسی گردید. معیارهای ورود به مطالعه نداشتن سابقه بیماری‌های ارتوپدی، بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت نوع یک و دو، نارسایی کلیه و کبد، بیماری خودایمنی در پنج سال گذشته، مشکلات بینایی و رژیم غذایی عادی بود. معیارهای خروج شامل غیبت بیش از سه جلسه از تمرین، آسیب‌دیدگی و ناتوانی در انجام تمرین بود. حجم نمونه بر اساس نرم‌افزار G power برای آزمون t-test مستقل با توان ۰/۳۷، اندازه اثر ۰/۵ و سطح خطای آلفا ۰/۰۵، ۴۶ بود که به‌طور تصادفی با استفاده از جدول اعداد تصادفی به دو گروه ۲۳ نفره تقسیم شدند. در

تری‌گلیسیرید و کلسترول ناشتا، و سرکوب سنتزاسید چرب/هیدروکسیل متیل ژرمانیوم رودامین و بیان mRNA Trib3، مقاومت به انسولین را مهار می‌کند، در حالی که بیان آدیپونکتین و UCP-1 را تنظیم می‌کند (۱۷). مطالعات بیان کردند که نوع، شدت و مدت فعالیت ورزشی همبستگی مثبتی با بیان پروتئین‌های بیوژنز میتوکندریایی دارند (۱۸). گائینی و همکاران نشان دادند ۱۲ هفته تمرین مقاومتی بر افزایش سطح سیرتوئین ۱ در مردان سالمند می‌تواند مؤثر باشد (۱۹). در مطالعه تایرو و همکاران در تمرینات هوازی و مقاومتی در سالمندان بیان سیرتوئین ۱ افزایش یافت (۲۰). از طرفی در پژوهشی تمرینات با شدت کم و با شدت بالا به مدت چهار هفته باعث افزایش توان هوازی شده اما سطوح سرمی سیرتوئین ۱ تغییر معنی‌داری ایجاد نکرده است (۲۱). مطالعات نشان داده‌اند که ورزش استقامتی می‌تواند FOXO1 را افزایش دهد (۲۲). در مطالعه وانگ و همکاران تمرین ورزشی منجر به افزایش FOXO1 شد (۲۳). از طرفی هشت هفته تمرینات ورزشی مقادیر پروتئین‌های FOXO1 و FOXO3a را در عضلات اسکلتی انسان نسبت به قبل از تمرین کاهش داد (۲۴). مطالعه مارگولیس و همکاران نشان داد که ورزش هوازی در مردان جوان دارای اضافه وزن منجر به مهار FOXO1 شد (۲۵). همچنین در مطالعه دیفئو و همکاران تمرین ترکیبی بر افراد دیابتی منجر به کاهش قند خون ناشتا می‌شود اما در بیان FOXO1 تفاوت معنی‌دار نبود (۲۶). کرونی و همکاران مشاهده کردند که ۸ هفته تمرین ترکیبی در زنان مبتلا به سندرم متابولیک منجر به کاهش درصد چربی و مقاومت به انسولین می‌شود (۲۷). در مطالعه‌ای ۱۲ هفته تمرین ترکیبی در بزرگسالان دیابتی باعث کاهش معنی‌دار در انسولین، قند خون ناشتا و شاخص Homa-IR نشد (۲۸). لاینسکاک و همکاران بیان کردند که ۱۲ هفته تمرین ترکیبی بر متابولیسم گلوکز ناشتا، لیپیدهای خون و ترکیب بدن مردان سالمند مبتلا به بیماری قلبی نداشت (۲۹). از طرفی در تحقیق شعبانی و همکاران هشت هفته تمرین ترکیبی هوازی مقاومتی منجر به بهبود معنی‌دار هموستاز گلوکز در زنان یائسه شد (۳۰).

تمرینات بر اساس توصیه‌های کالج پزشکی ورزشی آمریکا (ACSM) American College of Sports Medicine (برای افراد چاق انتخاب شدند (۳۶). در پایان هر جلسه تمرینی به مدت ۱۰ دقیقه بازگشت بدن به حالت اولیه و سرد کردن (دویدن آهسته، راه رفتن و حرکات کششی) انجام شد. این تمرینات تا ۱۶ هفته ادامه داشت و در این مدت گروه کنترل تمرین انجام ندادند. آزمون‌های آنتروپومتریک ۴۸ ساعت قبل و تست‌های آزمایشگاهی قبل از اولین جلسه تمرین انجام شد و پس از ۱۶ هفته تمرین، آزمون‌ها برای هر دو گروه تکرار شد. اندازه‌گیری شاخص‌های تحقیق: به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی پس از ۱۰ ساعت ناشتایی شبانه از آزمودنی‌ها در بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح ۴۸ ساعت قبل از اولین جلسه تمرینی و پس از آخرین جلسه تمرین نمونه خونی به میزان ۵ میلی‌متر از ورید کوبیتال در آزمایشگاه گرفته شد. نمونه‌های خونی سانتریفیوژ شده و نمونه سرمی آنها جدا و در دمای ۸۰- نگهداری شد، و به آزمایشگاه هیستوژنوتک تهران منتقل شدند.

غلظت سیرتوئین ۱ بر اساس نانوگرم/ میلی‌لیتر با استفاده از کیت Human Sirtuin1 (SIRT1) ELISA Kit شرکت MyBioSource ساخت کشور آمریکا با حساسیت ۰/۰۳۱ ng/ml و با روش الیزا اندازه‌گیری شد. همچنین مقادیر FOXO بر اساس نانوگرم/ میلی‌لیتر با استفاده از کیت Human FOXO1 (Forkhead Box Protein O1) ELISA Kit شرکت mbs ساخت کشور آمریکا با حساسیت ۰/۰۳۱۲ ng/ml با روش الیزا اندازه‌گیری شد. علت اندازه‌گیری این پروتئین‌ها در پلاسما این است که مطالعه حاضر بر روی نمونه‌های انسانی انجام شد و امکان نمونه‌برداری بافتی وجود نداشت (۳۷). برای گلوکز خون ناشتا از کیت شرکت پارس آزمون با حساسیت ۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و متغیر انسولین با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Fax 303 plus ELISA,) Awarss Stat, USA اندازه‌گیری شد. ارزیابی مدل هموستاتیک روشی برای ارزیابی عملکرد سلول‌های بتا پانکراس و مقاومت به انسولین است که با توجه به قند خون ناشتا و

ادامه ۳ نفر از گروه تجربی به دلیل عدم شرکت منظم در تمرینات و ۳ نفر از گروه کنترل از ادامه تحقیق انصراف دادند. در جدول ۱ ویژگی‌های فردی آزمودنی‌ها ارائه شده است. شرکت‌کنندگان یک هفته قبل از شروع برنامه طی چندین جلسه با پروتکل تمرینی آشنا شدند. جلسه اول شامل آشنایی با تجهیزات ورزشی، تکنیک‌های ورزشی، خطرات و اشتباهاتی بود که باید از آنها اجتناب کرد. سپس اندازه‌گیری‌های اولیه انجام شد.

روش اجرای پروتکل: تمرینات ترکیبی شامل تمرینات مقاومتی و هوازی به صورت سه جلسه تمرین در هفته به مدت ۱۶ هفته بود. این تمرینات ساعت ۶ تا ۷/۳۰ صبح (۹۰ دقیقه) توسط گروه تجربی انجام شد (۳۳). ابتدا، گرم کردن عمومی به مدت ۱۰ دقیقه (راه رفتن، دویدن نرم، حرکات کششی و جنبش‌پذیری)، سپس اجرای تمرینات هوازی به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه با شدت ۵۰ تا ۷۰ درصد حداکثر ضربان قلب بود این مرحله تمرینی از ۳۰ دقیقه شروع شده و در پایان دوره به ۴۵ دقیقه افزایش یافت (۳۴). در واقع شدت و مدت تمرینات به صورت فزاینده و تدریجی، بر اساس توانایی‌های فردی افزایش یافت، به صورتی که در هشت الی ده جلسه آخر به ۷۰ درصد حداکثر ضربان قلب (HR max) رسید. ضربان قلب یک‌بار در زمان استراحت و بعد از تمرینات هوازی با استفاده از ضربان‌سنج پولار اندازه‌گیری شد. با افزایش شدت تمرین، ضربان قلب هدف هر هفته ۵ درصد افزایش یافت. برای محاسبه ضربان قلب هدف از فرمول کارون استفاده شد:

(ضربان قلب استراحت) + (درصد شدت تمرینات) × (ضربان قلب استراحت - ضربان قلب حداکثر) = ضربان قلب هدف

تمرینات مقاومتی به مدت ۲۰ تا ۳۵ دقیقه با تحمل وزن برای تقویت عضلات اندام‌های فوقانی، تحتانی و میانی با حرکاتی همچون اسکات، لانژ، دراز و نشست و پلانک و پلانک جانبی (هر دو طرف بدن)، دیپ سه سر بازو روی زمین، پوش آپ اصلاح شده، حرکت کبری انجام شد. که در هفته‌های نخست از ۲ ست ۱۰ تکرار شروع و به ۳ ست ۱۵ تکرار بر اساس اصل اضافه بار در هفته شانزدهم افزایش یافت (۳۵).

گروهی و تی وابسته برای بررسی تفاوت درون گروهی مورد استفاده قرار گرفت. سطح معنی‌داری ($P < 0/05$) در نظر گرفته شد و همه تجزیه تحلیل‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

نتایج

توصیف ویژگی‌های فردی آزمودنی‌ها در پیش‌آزمون و پس‌آزمون تمرین ترکیبی (انحراف معیار \pm میانگین) در جدول ۱ ارائه شد. نتایج تحلیل آماری بین گروهی و درون گروهی در جدول ۲ ارائه شده است. در مقایسه پیش و پس‌آزمون در گروه تجربی انسولین، نسبت HOMA-IR، نسبت Homa-B ($P=0/001$)، سیرتوئین ۱ و FOXO1 ($P=0/0001$) اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. در مقایسه داده‌های بین گروهی در پیش‌آزمون اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$). در حالیکه مقایسه داده‌های بین گروهی در متغیرهای انسولین ($P=0/008$)، قند خون ناشتا ($P=0/04$)، سیرتوئین ۱ و FOXO1 ($P=0/0001$) اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. در تغییرات درون گروهی در گروه تجربی نشانگر کاهش معنی‌دار در متغیرهای انسولین، HOMA-IR، Homa-B ($P=0/001$) و افزایش معنی‌دار در سیرتوئین ۱ و FOXO1 ($P=0/0001$) بود. در گروه کنترل در هیچ یک از داده‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

انسولین به دست آمد. دو معادله برای Homa-index مورد استفاده شامل:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{FBS (mmol/L)} \times \text{FBI (IU per ml)}) \div 405)$$

$$\text{HOMA-B} = (20 \times \text{insulin in mIU/mL}) / (\text{glucose in mmol/L} - 3.5)$$

معادله اول (HOMA-IR) برای ارزیابی مقاومت به انسولین و معادله دوم (HOMA-B) برای بررسی عملکرد سلول‌های بتا پانکراس است.

جهت اندازه‌گیری وزن افراد از ترازوی دیجیتال Beurer ساخت آلمان با دقت ۱ گرم؛ اندازه‌گیری قد با استفاده از قد سنج دیواری SOEHNLE با دقت نیم سانتی متر ساخت آلمان؛ اندازه‌گیری درصد چربی از کولیس SAEHAN ساخت کره جنوبی در سه نقطه بدن (سینه، شکم، ران) و برای تعیین درصد چربی بدن از فرمول جکسون پولاک استفاده شد. شاخص توده بدنی (BMI) از نسبت وزن بدن (کیلو گرم) به مجذور قد (متر) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در پژوهش حاضر، از آمار توصیفی برای توصیف داده‌ها از میانگین، انحراف معیار استفاده شد. در بخش آمار استنباطی ابتدا از آزمون کولموگراف اسمیرنوف، برای بررسی توزیع طبیعی داده‌ها استفاده شد. آزمون تی مستقل برای تعیین تفاوت بین

جدول ۱: ویژگی‌های فردی آزمودنی‌ها

متغیرها	گروه	پیش آزمون	پس آزمون	تفاوت‌های درون گروهی	تفاوت‌های بین گروهی
سن (سال)	تجربی	۶۱/۰۹ ± ۵	-	-	-
	کنترل	۶۲/۳ ± ۳/۴۵	-	-	-
وزن (کیلوگرم)	تجربی	۸۶/۰۸ ± ۹/۰۶	۸۵/۵۵ ± ۹/۳۳	۰/۲۰	۰/۵۸
	کنترل	۹۱/۴۷ ± ۸/۲۶	۹۱/۲۵ ± ۸/۲۱	۰/۵۷	-
درصد چربی بدن	تجربی	۳۰/۰۵ ± ۱/۲۵	۲۹/۴۸ ± ۵/۴۱	۰/۶۲	۰/۱۹
	کنترل	۳۲/۱۶ ± ۱/۰۵	۳۳/۴۸ ± ۴/۳۷	۰/۱۵	-
شاخص توده بدن (کیلوگرم بر متر مربع)	تجربی	۳۰/۱۲ ± ۱/۳۰	۲۹/۹۱ ± ۱/۲۴	۰/۱۶	۰/۵۳
	کنترل	۳۱/۹۱ ± ۱/۲۰	۳۱/۸۳ ± ۱/۱۹	۰/۵۸	-

*معنی‌داری آماری ($P < 0/05$)

آزمون‌های آماری t مستقل و وابسته

جدول ۲: نتایج آماری آزمون های t مستقل و وابسته

متغیر	گروه	پیش آزمون		پس آزمون		t وابسته		t مستقل	
		انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	معنی داری	آماره	آماره	P
انسولین (میکرو واحد بین المللی بر میلی لیتر)	تجربی	۱۴/۰۵ ± ۵/۰۷	۹/۹۰ ± ۳/۲۵	۳/۸۳	*۰/۰۰۱	-۱/۸۳	*۰/۰۰۸		
	کنترل	۱۷/۱۰ ± ۵/۱۱	۱۷/۲۰ ± ۵/۲۰	-۰/۰۹	۰/۹۲	-۲/۷۹			
قند خون (میلی گرم بر دسی لیتر)	تجربی	۹۸/۶۵ ± ۱۱/۰۸	۹۶/۵۰ ± ۱۲/۵۰	۱/۴۳	۰/۱۶	-۰/۳۷	*۰/۰۴		
	کنترل	۱۰۰/۲۵ ± ۱۵/۲۹	۱۰۲/۱۵ ± ۱۳/۸۷	-۱/۶۱	۰/۱۲	۲/۱۲			
HOMA-IR	تجربی	۳/۴۱ ± ۱/۲۹	۲/۳۲ ± ۰/۸۱	۳/۸۱	*۰/۰۰۱	-۱/۹۵	۰/۳۱		
	کنترل	۴/۲۷ ± ۱/۴۵	۳/۶۲ ± ۱/۲۷	۱/۹۸	۰/۰۶	۱/۰۱			
HOMA-B	تجربی	۲/۹۸ ± ۱/۰۹	۲/۱۳ ± ۰/۷۷	۳/۷۸	*۰/۰۰۱	-۱/۶۴	۰/۴۳		
	کنترل	۳/۵۷ ± ۱/۱۶	۳/۰۱ ± ۱/۲۸	۲/۰۸	۰/۰۵	۰/۷۹			
سیرتوئین ۱ (نانوگرم بر میلی لیتر)	تجربی	۰/۵۸ ± ۰/۵۰	۴/۳۳ ± ۱/۴۵	-۱۳/۰۲	*۰/۰۰۰۱	-۱/۷۸	*۰/۰۰۰۱		
	کنترل	۰/۸۹ ± ۰/۵۹	۱/۳۷ ± ۱/۲۸	-۱/۷۱	۰/۱۰	-۸/۱۳			
FOXO1 (نانوگرم بر میلی لیتر)	تجربی	۰/۲۷ ± ۰/۲۱	۲/۷۳ ± ۱/۰۱	-۱۲/۲۷	*۰/۰۰۰۱	-۰/۱۰	*۰/۰۰۰۱		
	کنترل	۰/۲۷ ± ۰/۲۲	۰/۳۸ ± ۰/۵۰	-۰/۹۴	۰/۳۵	-۱۰/۳۵			

* تفاوت معنی دار بین پیش-پس آزمون، همچنین در گروه تجربی و کنترل

HOMA-IR : Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance

HOMA-B : Homeostasis Model Assessment of β-Cell

FOXO1 : Forkhead Box Protein O1

دیفئو و همکاران نشان دادند که تمرین ترکیبی به مدت یک سال در افراد دیابتی منجر به کاهش قند خون ناشتا می شود (۲۶). همچنین مطالعات نشان داد هشت هفته تمرین ترکیبی بر روی زنان یائسه و مبتلا به سندرم متابولیک منجر به بهبود هموستاز گلوکز می شود (۳۰، ۲۷). ناهمسو با مطالعه حاضر، تراوچی و همکاران و لاینساکاک و همکاران ۱۲ هفته تمرین ترکیبی منجر به کاهش در انسولین، قند خون ناشتا و شاخص Homa-IR نشد (۲۹، ۲۸). علت احتمالی آن می تواند ناشی از تفاوت در مقدار زمان تمرین و شدت آن باشد. هر چند که بیشتر مطالعات بر نقش بیشتر تمرینات هوازی بر ترکیب بدن و هموستاز گلوکز خون اتفاق نظر دارند، لیکن کاهش وزن در افراد مسن با اختلاف نظر مواجه است، دلیل اصلی آن نگرانی از دست دادن توده عضلانی و بروز سارکوپنی در سالمندی است. با این حال، بیان شده است که تمرین مقاومتی اثرات مطلوبی بر کنترل گلوکز خون و کمک به حفظ توده بدون چربی همراه با کاهش چربی احشایی دارد (۳۸). شانزده هفته تمرین ترکیبی منجر به افزایش سیرتوئین ۱ شد که همسو با مطالعات گائینی و همکاران و تایرو و همکاران است (۲۰، ۱۹). فعالیت آنزیمی

بحث

سالمندی یک فرآیند فیزیولوژیکی پیشرونده و چندوجهی است. کاهش بیوژنز میتوکندریایی یکی از عوامل اصلی در افزایش روند پیری می باشد که از طرق مختلف همانند سازگاری با تمرینات ورزشی و مصرف آنتی اکسیدان ها می توان با آن مقابله کرد، که در واقع این عوامل به واسطه افزایش مسیره های سیگنالینگ مختلف می توانند در افزایش فاکتورهای موثر بر بیوژنز میتوکندری همانند سیرتوئین ۱ و FOXO1 نقش داشته باشند (۸). از این رو مطالعه حاضر با هدف، تعیین اثر تمرین ترکیبی (هوازی و مقاومتی) بر هموستاز گلوکز و سطوح پلاسمایی سیرتوئین ۱ و FOXO1 در مردان سالمند چاق صورت گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که ۱۶ هفته تمرین ترکیبی هوازی و مقاومتی منجر به کاهش میزان انسولین، قند خون ناشتا، نسبت Homa-IR، نسبت Homa-B و افزایش سیرتوئین ۱ و FOXO1 در گروه تجربی نسبت به کنترل شد. شانزده هفته تمرین ترکیبی منجر به بهبود هموستاز گلوکز در مردان سالمند چاق شد که با مطالعات دیفئو و همکاران، کرونی و همکاران و شعبانی و همکاران همسو است (۳۰، ۲۷، ۲۶).

سیرتوئین ۱ و FOXO1 مردان چاق سالمند دارد. البته نوع، شدت، مدت، حجم ورزش و دوره تمرینی در مقادیر این پروتئین‌ها متفاوت است اما تمرین ورزشی به عنوان عاملی در افزایش پروتئین‌های مرتبط با بیوزن میتوکندریایی (سیرتوئین ۱ و FOXO1) و نقش محافظتی آن‌ها در هموستاز گلوکز موثر است. این نوع تمرین برای سالمندان چاق و دارای اضافه وزن پیشنهاد می‌شود. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده از فعالیت‌هایی با شدت‌های متفاوت در هر دو جنس در سنین مختلف استفاده شود.

سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از رساله دکتری در رشته تربیت بدنی و گرایش فیزیولوژی ورزشی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت می‌باشد. هزینه اجرای آن توسط پژوهشگر تامین شد. از تمامی آزمودنی‌ها و افرادی که در انجام این مطالعه شرکت و همکاری داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد. کلیه مراحل مورد تایید مرکز ثبت کارآزمایی بالینی ایران IRCT20230810059112N1 قرار گرفته است.

حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر دارای تاییدیه کمیته اخلاق دانشگاه آزاد رشت (IR.IAU.RASHT.REC.1401.010) می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

رامین شعبانی در ارائه ایده، مریم صفری در طراحی مطالعه و جمع‌آوری داده‌ها، محمد رضا فدایی چافی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

سیرتوئین‌ها نیازمند NAD^+ به عنوان یک کوفاکتور می‌باشد و بنابراین در شرایط استرس مانند محدودیت کالری، گرسنگی و فعالیت بدنی میزان آن افزایش می‌یابد (۳۹). در حالیکه در مطالعه‌ای چهار ماه تمرینات ورزشی با شدت کم و زیاد در سطوح سرمی سیرتوئین ۱ تغییر معنی‌داری ایجاد نکرده است، لذا با نتایج مطالعه حاضر همسو نیست. علت این ناهمسویی را می‌توان مدت زمان کوتاه پژوهش مذکور بیان کرد (۲۱). سطوح پلاسمایی FOXO1 در تحقیق حاضر افزایش معنی‌دار یافت که همسو با نتایج تحقیقات گذشته است (۲۳، ۲۲). پائولی و همکاران بیان کردند که تمرین استقامتی FOXO1 را در افراد چاق افزایش می‌دهد (۲۲). مطالعه وانگ و همکاران نیز نشان داد که تمرین با شدت متوسط منجر به افزایش FOXO1 می‌شود (۲۳). از طرفی با پژوهش‌های استفانی و همکاران، مارگولیس و همکاران و دیفتو و همکاران ناهمسو است (۲۴-۲۶). مارگولیس و همکاران بیان کردند که تمرین هوازی در مردان جوان دارای اضافه وزن منجر به مهار FOXO1 شد (۲۵). هم‌چنین در مطالعه دیفتو و همکاران تمرین ترکیبی در بیان FOXO1 در افراد دیابتی تفاوت معنی‌دار را نشان نداد (۲۶). در مجموع، اختلاف نتایج در FOXO1 به تفاوت‌های احتمالی در سن، جنسیت، پروتکل تمرین و/یا ایزوفرم پروتئین FOXO اشاره دارد (۴۰). در واقع پروتئین FOXO1 از طریق فسفریلاسیون بر روی چندین ریشه خود تنظیم می‌شود و خواص رونویسی آن بستگی به وضعیت فسفریلاسیون آن دارد (۱۲). از محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم کنترل رژیم غذایی و کیفیت خواب آزمودنی‌ها بود که بر سطوح سیرتوئین ۱ و FOXO1 تأثیر دارد بنابراین در پژوهش‌های آینده بررسی این موارد توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که ۱۶ هفته تمرین ترکیبی اثر مطلوبی بر بهبود هموستاز گلوکز، افزایش سطوح

References:

- 1-Brunet A, Goodell MA, Rando TA. *Aging and Rejuvenation of Tissue Stem Cells and their Niches*. Nat Rev Mol Cell Biol 2023; 24(1): 45-62.
- 2-Tam BT, Morais JA, Santosa S. *Obesity and Aging: Two Sides of the Same Coin*. Obes Rev 2020; 21(4): e12991.
- 3-Khodabandeh M, Peeri M, Azarbayjani MA, Matinhomae H. *Effect of Resistance Exercise and Liposomal Vitamin C on Some Factors of Mitochondrial Dynamics and Biogenesis*. Complementary Medicine Journal 2021; 11(1): 82-97. [Persian]
- 4-Brenmoehl J, Hoeflich A. *Dual Control of Mitochondrial Biogenesis by Sirtuin 1 and Sirtuin 3*. Mitochondrion 2013; 13(6): 755-61.
- 5-Halim M, Halim A. *The Effects of Inflammation, Aging and Oxidative Stress on the Pathogenesis of Diabetes Mellitus (Type 2 Diabetes)*. Diabetes Metab Syndr 2019; 13(2): 1165-72
- 6-Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. *Cellular Death, Reactive Oxygen Species (ROS) and Diabetic Complications*. Cell Death Dis 2018; 9(2): 119.
- 7-Xiao J-B, Ma J-Q, Yakefu K, Tursun M. *Effect of the SIRT3-AMPK/PPAR Pathway on Invasion and Migration of Cervical Cancer Cells*. Int J Clin Exp Pathol 2020; 13(10): 2495-501.
- 8-Meng T, Qin W, Liu B. *SIRT1 Antagonizes Oxidative Stress in Diabetic Vascular Complication*. Front Endocrinol (Lausanne) 2020; 11: 568861.
- 9- Szegő ÉM, Outeiro TF, Kazantsev AG. *Sirtuins in Brain and Neurodegenerative Disease*. Introductory Review on Sirtuins in Biology, Aging, and Disease: Elsevier; 2018: 175-95.
- 10-Manna P, Achari AE, Jain SK. *Vitamin D Supplementation Inhibits Oxidative Stress and Upregulate SIRT1/AMPK/GLUT4 Cascade in High Glucose-Treated 3T3L1 Adipocytes and in Adipose Tissue of High Fat Diet-Fed Diabetic Mice*. Archives of Biochemistry and Biophysics 2017; 615: 22-34.
- 11-Saremi A, Shahrjerdi S, Kavyani A. *The Effect of Aerobic Training on Metabolic Parameters and Iserumlevel of Sirtuin1 in Women with Type 2 Diabetes*. J Arak Uni Med Sci 2016; 19(9): 88-97.
- 12-Jalgaonkar MP, Parmar UM, Kulkarni YA, Oza MJ. *SIRT1-Foxos Activity Regulates Diabetic Complications*. Pharmacological Research 2022; 175: 106014.
- 13-Menghini R, Casagrande V, Iuliani G, Rizza S, Mavilio M, Cardellini M, et al. *Metabolic Aspects of Cardiovascular Diseases: Is Foxo1 a Player or a Target?* Int J Biochem Cell Biol 2020; 118: 105659.
- 14-Sasaki T, Kitamura T. *Roles of Foxo1 and Sirt1 in the Central Regulation of Food Intake*. Endocr J 2010; 57(11): 939-46.
- 15-Pacifici F, Di Cola D, Pastore D, Abete P, Guadagni F, Donadel G, et al. *Proposed Tandem Effect of Physical Activity and Sirtuin 1 and 3 Activation in Regulating Glucose Homeostasis*. Int J Mol Sci 2019; 20(19): 4748.
- 16-Amendt T, Allies G, Nicolò A, El Ayoubi O, Young M, Röszer T, et al. *Autoreactive Antibodies Control Blood Glucose By Regulating Insulin Homeostasis*.

- Proc Natl Acad Sci U S A 2022; 119(6): e2115695119.
- 17-Li X, Wan T, Li Y. *Role of Foxo1 in Regulating Autophagy in Type 2 Diabetes Mellitus(Review)*. Exp Ther Med 2021; 22(1): 707.
- 18-Bakhtiyari A, Gaeni A, Chobineh S, Kordi MR, Hedayati M. *Effect of 12-Weeks High-Intensity Interval Training on SIRT1, PGC-1 α and Erra Protein Expression in Aged Rats*. Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology 2018; 5(2): 95-102. [Persian]
- 19-Hooshmand-Moghadam B, Eskandari M, Golestani F, Rezae S, Mahmoudi N, Gaeini AA. *The Effect of 12-Week Resistance Exercise Training on Serum Levels of Cellular Aging Process Parameters in Elderly Men*. Exp Gerontol 2020; 141: 111090.
- 20-Cho SY, Roh HT. *Effects of Exercise Training on Neurotrophic Factors and Blood-Brain Barrier Permeability in Young-Old and Old-Old Women*. Int J Environ Res Public Health 2022; 19(24): 16896.
- 21-Ma JK, Scribbans TD, Edgett BA, Boyd JC, Simpson CA, Little JP, et al. *Extremely Low-Volume, High-Intensity Interval Training Improves Exercise Capacity and Increases Mitochondrial Protein Content in Human Skeletal Muscle*. Open Journal of Molecular and Integrative Physiology 2013; 3(4): 202-10.
- 22-Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva ASR, Bertoli FC, et al. *Endurance Exercise Training Increases APPL1 Expression and Improves Insulin Signaling in the Hepatic Tissue of Diet-Induced Obese Mice, Independently of Weight Loss*. J Cell Physiol 2012; 227(7): 2917-26.
- 23-Lu ZM, Sun ZY, Zhang S, Jiang X, Ding L, Li CZ, et al. *Lipolysis Is Accompanied by Immune Microenvironment Remodeling in Adipose Tissue of Obesity with Different Exercise Intensity*. European Review for Medical & Pharmacological Sciences 2023; 27(3): 867-78.
- 24-Stefanetti RJ, Lamon S, Rahbek SK, Farup J, Zacharewicz E, Wallace MA, et al. *Influence of Divergent Exercise Contraction Mode and Whey Protein Supplementation on Atrogin-1, Murf1, and FOXO1/3A in Human Skeletal Muscle*. J Appl Physiol (1985) 2014; 116(11): 1491-502.
- 25-Margolis LM, Berryman CE, Murphy NE, Carrigan CT, Young AJ, Carbone JW, et al. *PI 3K-AKT-FOXO 1 Pathway Targeted by Skeletal Muscle Micro RNA to Suppress Proteolytic Gene Expression in Response to Carbohydrate Intake During Aerobic Exercise*. Physiol Rep 2018; 6(23): e13931.
- 26-Fatone C, Guescini M, Balducci S, Battistoni S, Settequattrini A, Pippi R, et al. *Two Weekly Sessions of Combined Aerobic and Resistance Exercise are Sufficient to Provide Beneficial Effects in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome*. Journal Of Endocrinological Investigation 2010; 33: 489-95.
- 27-Dianatinasab A, Koroni R, Bahramian M, Bagheri-Hosseinabadi Z, Vaismoradi M, Fararouei M, et al. *The Effects of Aerobic, Resistance, and Combined Exercises on the Plasma Irisin Levels, HOMA-IR, and Lipid Profiles in Women with Metabolic Syndrome: A Randomized Controlled Trial*. J Exerc Sci Fit 2020; 18(3): 168-76.
- 28-Terauchi Y, Takada T, Yoshida S. *A Randomized Controlled Trial of a Structured Program Combining Aerobic and Resistance Exercise for*

- Adults with Type 2 Diabetes in Japan.* Diabetol Int 2022;13(1):75-84.
- 29-Kambic T, Božič Mijovski M, Jug B, Hadžić V, Lainscak M. *Insulin Resistance, Lipids and Body Composition in Patients with Coronary Artery Disease after Combined Aerobic Training and Resistance Training: A Randomised, Controlled Trial.* Diabetol Metab Syndr 2023; 15(1): 47.
- 30-Shabani R. *The Effect of Concurrent Aerobic–Resistance Exercise Training on Estrogen Level and Glucose Homeostasis of Menopausal Females with Blood Glucose Impairment.* IJRN 2017; 3(3): 1-10. [Persian]
- 31-Zhou Y, Wu W, Zou Y, Huang W, Lin S, Ye J, et al. *Benefits of Different Combinations of Aerobic and Resistance Exercise for Improving Plasma Glucose and Lipid Metabolism and Sleep Quality among Elderly Patients with Metabolic Syndrome: A Randomized Controlled Trial.* Endocrine Journal 2022; 69(7): 819-30.
- 32-Radak Z, Suzuki K, Posa A, Petrovszky Z, Koltai E, Boldogh I. *The Systemic Role of SIRT1 in Exercise Mediated Adaptation.* Redox biology 2020; 35: 101467.
- 33-Schumacher LM, Thomas JG, Raynor HA, Rhodes RE, Bond DS. *Consistent Morning Exercise May Be Beneficial for Individuals with Obesity.* Exercise Sport Sci Rev 2020; 48(4): 201-8.
- 34-Hejazi K, Ghahremani Moghaddam M, Darzabi T. *Effects of an 8-Week Aerobic Exercise Program on Some Indicators of Oxidative Stress in Elderly Women.* Iranian Journal of Ageing 2019; 13(4): 506-17. [Persian]
- 35-Alabdulwahab SS, Ahmad F, Singh H. *Effects of Functional Limb Overloading on Symmetrical Weight Bearing, Walking Speed, Perceived Mobility, and Community Participation among Patients with Chronic Stroke.* Rehabil Res Prac 2015; 2015: 241519.
- 36-Ferguson B. *ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription 9th Ed. 2014.* The J Can Chiropr Assoc 2014; 58(3): 328.
- 37-Mariani S, Di Giorgio MR, Rossi E, Tozzi R, Contini S, Bauleo L, et al. *Blood SIRT1 Shows a Coherent Association with Leptin and Adiponectin in Relation to the Degree and Distribution of Adiposity: A Study in Obesity, Normal Weight and Anorexia Nervosa.* Nutrients 2020; 12(11): 3506.
- 38-Sigal RJ, Kenny GP, Boulé NG, Wells GA, Prud'homme D, Fortier M, et al. *Effects of Aerobic Training, Resistance Training, or Both on Glycemic Control in Type 2 Diabetes: A Randomized Trial.* Ann Intern Med 2007; 147(6): 357-69.
- 39-Kincaid B, Bossy-Wetzel E. *Forever Young: SIRT3 a Shield Against Mitochondrial Meltdown, Aging, and Neurodegeneration.* Frontiers in Aging Neuroscience 2013; 5: 48.
- 40-Léger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Dériaz O, Crettenand A, et al. *Akt Signalling through GSK-3 β , Mtor and Foxo1 is Involved in Human Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy.* J physiol 2006; 576(Pt3): 923-33.

Effect of Combined Exercises on Glucose Homeostasis and Plasma Levels of Sirtuin 1 and FOXO1 in Obese Elderly Men

Maryam Safari¹, Ramin Shabani^{*1}, Mohammad Reza Fadaei¹

Original Article

Introduction: Aging and obesity have common symptoms, including glucose and lipid metabolism changes. Activation of sirtuin 1 and FOXO1 (Forkhead Box Protein O1) can positively affect metabolic disorders associated with aging and obesity. This research aimed to investigate 16 weeks of combined exercise on the plasma levels of sirtuin 1, FOXO1, and glucose homeostasis in obese elderly.

Methods: 40 obese elderly men with an average age of 61.90 ± 2.84 were selected and randomly divided into two experimental and control groups. The participants trained three days a week (each session 90 minutes) for 16 weeks. 48 hours before and after exercise, anthropometric characteristics and plasma values of sirtuin 1, FOXO1, fasting blood sugar, insulin, HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance), and HOMA-B (Homeostasis Model Assessment of β -Cell) were taken from the samples and measured by ELISA method. Data analysis was done using SPSS 16 software, independent and dependent t-tests at a significance level of $P < 0.05$.

Results: Levels of fasting blood sugar ($P=0.04$), and insulin ($P=0.008$) in the experimental group decreased significantly compared to the control group, while the serum levels of sirtuin1 ($P=0.0001$) and FOXO1 ($P=0.0001$) had a significant increase. Correlated t results in the experimental group showed a significant decrease in insulin, HOMA-IR, and HOMA-B ($P = 0.001$) and a significant increase in the serum levels of sirtuin1 ($P = 0.0001$) and FOXO1 ($P = 0.0001$) ($P < 0.05$).

Conclusion: Based on the results of this study, it seems that 16 weeks of combined training has a favorable effect on improving glucose homeostasis, increasing sirtuin 1 and FOXO1 levels in elderly obese men.

Keywords: Glucose homeostasis, Sirtuin 1, FOXO1, Obese elderly, Combined exercise.

Citation: Safari M, Shabani R, Fadaei MR. Effect of Combined Exercises on Glucose Homeostasis and Plasma Levels of Sirtuin 1 and FOXO1 in Obese Elderly Men J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2024; 32(4): 7754-64.

¹Department of Physical Education and Sports Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09112324796, email: dr.ramin.shabani@gmail.com