

تأثیر شش هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط بر میزان سرمی Klotho و بیان ژن FGF23 در قلب موش‌های صحرایی دیابتی شده: یک مطالعه تجربی

لطفعلی بلبلی^۱، مؤده خواجه لندی^۲

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۱/۰۸ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۰/۰۲/۰۴ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۲/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: بیماران دیابتی مستعد درگیری‌های قلبی-عروقی هستند. از این‌رو هدف از مطالعه حاضر تعیین تأثیر شش هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط بر میزان سرمی کلوئو (Klotho) و بیان ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی-۲۳ (Fibroblast-23 growth factor; FGF23) در قلب موش‌های صحرایی دیابتی شده بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ، به‌طور تصادفی در سه گروه هفت‌تایی قرار گرفتند: گروه دیابت تمرین (DT)، گروه دیابت کنترل (DC) و گروه سالم کنترل (HC). حیوانات از طریق تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین (Streptozotocin: STZ) دیابتی شدند. موش‌ها شش هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط به صورت فزاینده انجام دادند. بررسی میزان سرمی Klotho به‌روش روش الایزا بود و بیان ژن FGF23 در بافت قلب با استفاده از روش آزمایشگاهی Real-time PCR صورت پذیرفت. داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Scheffe آنالیز شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پس از شش هفته تمرین استقامتی، غلظت گلوکز خون (میلی گرم بر دسی لیتر) در گروه DT نسبت به گروه DC به صورت معنی‌داری پایین‌تر است ($p=0/001$) و میزان سرمی Klotho (نانوگرم بر میلی لیتر) این گروه در مقایسه با گروه DC افزایش معنی‌دار یافته است ($p=0/032$)، اما میزان بیان ژن FGF23 به‌طور نسبی در گروه DT در مقایسه با گروه DC تفاوت معنی‌داری نداشت ($p=0/171$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد تمرینات استقامتی با شدت متوسط بر میزان سرمی Klotho و کنترل قند خون موش‌های دیابتی تأثیر مثبتی دارد و به‌نظر می‌رسد تا حدودی محافظ عملکرد قلبی باشد.

واژه‌های کلیدی: Klotho، FGF23، تمرین استقامتی، دیابت، قلب، موش صحرایی

۱- (نویسنده مسئول) دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تلفن: ۰۴۵-۳۳۵۲۰۴۵۷، دورنگار: ۰۴۵-۳۳۵۲۰۴۵۷، پست الکترونیکی: l_bolboli@uma.ac.ir

۲- دانشجوی دکترا، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

مقدمه

دیابت شیرین (Diabetes Mellitus) از جمله بیماری‌های متابولیک می‌باشد که مشخصه اصلی آن افزایش مزمن در میزان سطوح قند خون و در نتیجه آن، ایجاد اختلال در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین می‌باشد [۱-۲]. بدین ترتیب بیماران دیابتی در معرض خطر فشارخون بالا، آتروژنز، استرس اکسیداتیو، بیماری عروق کرونری و انفارکتوس قلبی قرار می‌گیرند [۳-۵]. در نتیجه با افزایش استرس اکسیداتیو، تغییرات هورمونی، میزان فعالیت آنزیم‌ها، ساختار و عملکرد اندام‌ها و پروتئین‌های بافت‌های مختلف از جمله بافت قلب دیده می‌شود [۴]. از جمله پروتئین‌هایی که تحت تأثیر بیماری دیابت و عوارض ناشی از آن قرار می‌گیرند کلوتو (Klotho) و فاکتور رشدی فیبروبلاستی ۲۳ (Fibroblast growth factor 23; FGF23) است. براساس نتایج مطالعات حذف این ژن در موش‌ها، باعث ایجاد تظاهرات مشابه فرایند افزایش سن مانند: تغییرات متابولیسم کلسیم-فسفات، کلسیفیکاسیون عروق و همچنین کاهش طول زندگی آن‌ها شده است [۶].

در پژوهش‌های مختلف صورت گرفته بر روی Klotho، کاهش آن با افزایش سن و در بیماری‌های دیابت، بیماری پرفشاری خون، نارسایی مزمن کلیوی، ایسکمی کلیه و بیماری گلو مرونفریت دیده شده است که با مهار نمودن رسوب مواد معدنی، جذب فسفات و تمایز سلول‌های دیواره عروق ایفای عمل می‌کند [۷-۸]. با کاهش Klotho، اختلالات عروقی تسریع می‌شود و حاصل آن کلسیمی شدن عروق در

بیماران مبتلا به بیمار مزمن کلیوی و دیابت است که یکی از عوامل اصلی مرگ و میر بر اثر اختلالات قلبی-عروقی زودرس می‌باشد [۱۰]. لذا، کلسیمی شدن عروق در مرحله‌ی اول، به علت اختلال در روند هوموستاز ویتامین D و فسفات ناشی از کمبود Klotho بوده است [۱۰]. پروتئین Klotho گیرنده مشترک و اجباری FGF23 بوده و کمبود کلوتوی عروقی به توسعه بیشتر کلسیمی شدن عروق انسان منجر می‌شود و مقاومت به FGF23 را میانجی‌گری می‌کند [۱۱]. خود پروتئین FGF23 یکی از اعضای خانواده FGFها است که سطوح کلسیم و فسفات سرمی را کاهش می‌دهد و به‌طور منفی ساختار و عملکرد قلب را تحت تأثیر قرار می‌دهد و منجر به القای کانسنتریک هایپرتروفیک می‌گردد. در واقع افزایش در غلظت FGF23 از طریق تأثیر مستقیم بر دهلیز میوکارد باعث فیبریلاسیون دهلیزی می‌شود که عامل قوی و تعیین کننده آن مقدار سطوح فسفات سرمی است [۱۲-۱۳]. در مجموع باید بیان نمود که سطوح کلسیم و فسفات با FGF23 تنظیم می‌شود [۱۴]. میزان FGF23 در بیماری دیابت افزایش پیدا می‌کند و افزایش هایپرتروفی و تغییر در اندازه قلب در پاسخ به FGF23 باعث بالارفتن فشارهای بالای بطن چپ می‌گردد. از طرفی اختلال در عملکرد بطن چپ نیز خود می‌تواند منجر به افزایش سایز دهلیز چپ گردد که این خود عامل اصلی آریتمی بطنی است [۱۵-۱۷].

امروزه با توجه به ممنوعیت مصرف انواع داروها، عوارض جبران‌ناپذیر آن در افراد دیابتی و همچنین هزینه زیاد درمان این بیماران، فعالیت ورزشی به‌عنوان یک ابزار راهبردی، کم

هزینه و بدون عوارض جانبی جهت جلوگیری و کنترل بیماری‌ها به خصوص بیماری دیابت توصیه شده است [۱۸]. براساس برخی از تحقیقات صورت گرفته این گونه به نظر می رسد که با اجرای فعالیت ورزشی بتوان میزان Klotho را کنترل کرد. چنانچه نتایج پژوهش Najafipour و همکاران در مطالعه‌ای روی رت‌های دچار سکتة قلبی شده نشان داد که اجرای فعالیت ورزشی با شدت متوسط باعث متعادل شدن سطوح Klotho گردیده است [۱۹]. با این حال، در گزارش‌های ناموفقی نیز، وجود هرگونه رابطه مستقیمی بین فعالیت ورزشی و سطح کلوتوی سرمی رد شده است [۲۰]. برای پروتئین FGF23 نیز نتایج متناقضی در دسترس است، به طوری که در تحقیقی که به بررسی هشت هفته تمرین هوازی بر میزان Klotho، FGF23 و کلسیم سرمی در زنان دیابتی بایسده صورت پذیرفت، تفاوت معنی داری در میزان FGF23 بین گروه کنترل و تمرین مشاهده نگردید [۶]. این درحالی است که در مطالعات دیگری افزایش FGF23 متعاقب تمرین ورزشی نشان داده شده است [۲۱].

بنابراین از آنجایی که براساس مطالعات مختلف نشان داده شده است تمرین استقامتی منظم به منظور درمان نسبی بیماران دیابتی استفاده می شود [۲۲]، بافت قلبی نیز با قرارگیری طولانی مدت در برابر یک محرک ویژه مانند کاهش تغذیه، فعالیت بدنی و غیره می تواند سازگاری پیدا کند و ظاهراً تمرینات طولانی مدت بر عوامل بیوشیمیایی Klotho، FGF23، کلسیم و نیز تعدیل غلظت محور Klotho-FGF23 مرتبط با سختی شریانی تأثیرگذار است [۶]، به علاوه وجود نتایج

محدود و متناقض در ارتباط با انواع مختلف پروتکل‌های ورزشی در رابطه با اثرگذاری یا عدم اثرگذاری بر Klotho و FGF23، هدف از مطالعه حاضر تعیین تأثیر شش هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط بر میزان سرمی Klotho و بیان ژن FGF23 در قلب موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار تجربی بود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع تجربی است و دارای کد کمیته اخلاق پژوهش بر حیوانات به شماره IR.ARUMS.REC.1398.251 است. تعداد ۲۱ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد Wistar به عنوان نمونه در نظر گرفته شدند. کلیه حیوانات در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای 22 ± 3 درجه سانتی گراد، رطوبت 50 ± 5 درصد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در مرکز نگهداری از حیوانات دانشکده علوم پایه دانشگاه شهید چمران اهواز در سال ۱۳۹۸ نگهداری گردیدند و دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش داشتند.

القاء دیابت پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، در ۱۴ سر از موش‌های صحرایی نر با یکبار تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین (Streptozotocin; STZ) با دوز ۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم محلول STZ Sigma, St. Louis MO, STZ (USA) تهیه شده در بافر سیترات تازه ۰/۵ مولار با pH=۴/۵ صورت پذیرفت. به موش‌های صحرایی غیر دیابتی نیز معادل حجمی STZ بافر سیترات تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحی کوچک توسط لانسست روی ورید آن‌ها، یک قطره خون روی نوار گلوکومتر قرار داده شد و قند خون

با استفاده از دستگاه گلوکومتری (روشه دیاگنوستیک ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد. موش‌هایی که قند خون آن‌ها بالاتر از ۲۴۰ میلی‌گرم بر دسی‌گرم بود، به‌عنوان موش‌های دیابتی در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفتند [۲۳]. پس از آن حیوانات به‌روش تصادفی به سه گروه مساوی هفت‌تایی تقسیم شدند: (۱) گروه دیابت تمرین (DT): این گروه شامل هفت سر موش صحرایی بود که از طریق تزریق درون صفاقی STZ دیابتی شدند و شش هفته فعالیت ورزشی روی نوارگردان داشتند، (۲) گروه دیابت کنترل (DC): این گروه شامل هفت سر موش صحرایی بود که از طریق تزریق درون صفاقی STZ دیابتی شده و در هیچ‌گونه برنامه تمرینی شرکت داده نشدند، (۳) گروه سالم کنترل (HC): این گروه شامل هفت سر موش صحرایی سالم بود که درگیر هیچ فعالیتی نبودند. در طول مرحله آشناسازی، موش‌های گروه DT به مدت دو هفته با شرایط آزمایشگاه و نوارگردان مخصوص جوندگان آشنا شدند و پنج روز در هفته به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوار گردان به منظور آشنا شدن با شرایط آزمایشگاه، راه رفتند [۲۴].

در تحقیق حاضر تمرین استقامتی با شدت متوسط روی نوارگردان انجام گردید [۲۴]. به‌طوری‌که گروه تمرین

استقامتی در معرض تمرین نوار گردان پنج جلسه در هفته و به‌مدت زمان شش هفته تمرین قرار گرفتند. پروتکل به‌صورتی بود که سرعت نوارگردان و مدت تمرین به‌تدریج افزایش می‌یافت این درحالی بود که شیب آن در کل پژوهش صفر در نظر گرفته‌شد. روند افزایش یافتن سرعت و مدت درطول پژوهش بدین شرح بود: از ۱۰ متر در دقیقه برای ۱۰ دقیقه در هفته اول، ۱۰ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته دوم، ۱۵ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم، به ۱۷-۱۸ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت. جهت رسیدن به سازگاری‌های به‌دست آمده در حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه‌داشته شدند. اندازه‌گیری سطوح گلوکز قبل از شروع انجام پروتکل، در طول دوره تمرینی و پس از اتمام آن از انتها دم هر یک از حیوانات پس از ۱۲ ساعت ناشتا توسط گلوکومتر گرفته شد. لازم به ذکر است که تعداد موش‌های دیابتی ۱۰ سر بود که سه سر از آن در حین پژوهش تلف گردید [۲۴]. پروتکل تمرینی در جدول ۱ به نمایش گذاشته شده است.

جدول ۱- پروتکل تمرینی در طول شش هفته بر روی موش‌های صحرایی دیابتی

متغیرهای پروتکل	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم
مدت تمرین (دقیقه)	۱۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۳۰
سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)	۱۰	۱۰	۱۵	۱۵	۱۷-۱۸	۱۷-۱۸
شیب (درجه)	۰	۰	۰	۰	۰	۰
تکرار (روز در هفته)	۵	۵	۵	۵	۵	۵

۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین استقامتی حیوانات توسط تزریق درون صفاقی ترکیبی از ۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم کتامین و پنج میلی گرم بر کیلوگرم زایلازین بیهوش شدند. به منظور جمع آوری خون سرخرگی، با ثابت کردن حیوان روی تخته جراحی جوندگان خون‌گیری مستقیم از بطن چپ حیوانات صورت پذیرفت، سپس خون گرفته شده در لوله‌های آزمایش حاوی آپروتینین ریخته شد تا از تجزیه پروتئینی در آن جلوگیری شود. پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در محیط آزمایشگاه به کمک سانتریفیوژ (۲۸ کاناله مدل روتین ۲۸، شرکت تولیدی تجهیزات پزشکی بهداد) سرم‌ها جدا شد و بلافاصله در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بررسی سطوح سرمی کلسیم توسط تست بیوشیمی اسپکتروفتومتریک با استفاده از کیت زیست شیمی صورت پذیرفت، برای اندازه‌گیری سطوح سرمی Klotho از کیت آلمانی زلبایو و تست الایزا استفاده شد [۲۵].

بیان ژن FGF23 نیز به روش آزمایشگاهی Real-time PCR انجام گردید. تحت شرایط استریل بافت قلب توسط متخصص بافت برداری جدا شد و تا زمان انجام بررسی‌های آزمایشگاهی در دمای منفی ۷۰ نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری TRIZOL و مطابق با روش ارائه شده توسط

شرکت انجام شد. به منظور حذف DNA، تمام نمونه‌های RNA به مدت یک ساعت با آنزیم Dnase و مطابق روش ارائه شده توسط شرکت تیمار شدند. غلظت و میزان خلوص نمونه‌های RNA پس از قرائت جذب آن‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر و نیز محاسبه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ با استفاده از اسپکتروفتومتر بیوفتومتر (مدل دی تری، اپندورف آلمان) تعیین گردید. نمونه‌هایی که نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ آن‌ها بیش از ۱/۸ بود. جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. سنتز cDNA با استفاده از کیت تجاری AmpliSence صورت پذیرفت. پرایمرهای تصادفی هگزامر در واکنش‌هایی با حجم ۲۰ میکرومول در لیتر مطابق دستورالعمل شرکت انجام شد. به منظور تأیید بیان ژن‌های مورد نظر، ابتداء واکنش روی بافت‌های مورد نظر انجام گردید و در صورت تأیید بیان ژن‌های مورد نظر به منظور بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها از آزمون PCR در زمان حقیقی استفاده گردید. برای طراحی پروب و پرایمر از نرم افزار Beacon designer TM7/01 استفاده شد. واکنش‌های PCR با استفاده از آنزیم Taq polymerase در واکنش‌هایی با حجم ۲۵ میکرومول در لیتر انجام شد. نمونه cDNA بافت قلب به عنوان کنترل مثبت و یک نمونه واکنش فاقد cDNA به عنوان کنترل منفی در هر واکنش

PCR در نظر گرفته شد. به منظور مشاهده محصول PCR از ژل آگاروز دو درصد تهیه شده در محلول بافر TAE استفاده شد. برای ارزیابی تغییرات در بیان ژن‌ها روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و دستگاه Mini Option Tm محصول شرکت بیوراد و کیت تجاری qPCR Probe Master Bioneer استفاده شد.

مقادیر مقایسه‌ای بیان ژن‌های مورد نظر در مقایسه با بیان GAPDH در هر بافت توسط نرم افزار ژن ارزیابی و بر اساس رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ گزارش گردید [۲۶]. توالی پرایمرها در جدول ۲ به نمایش گذاشته شده است.

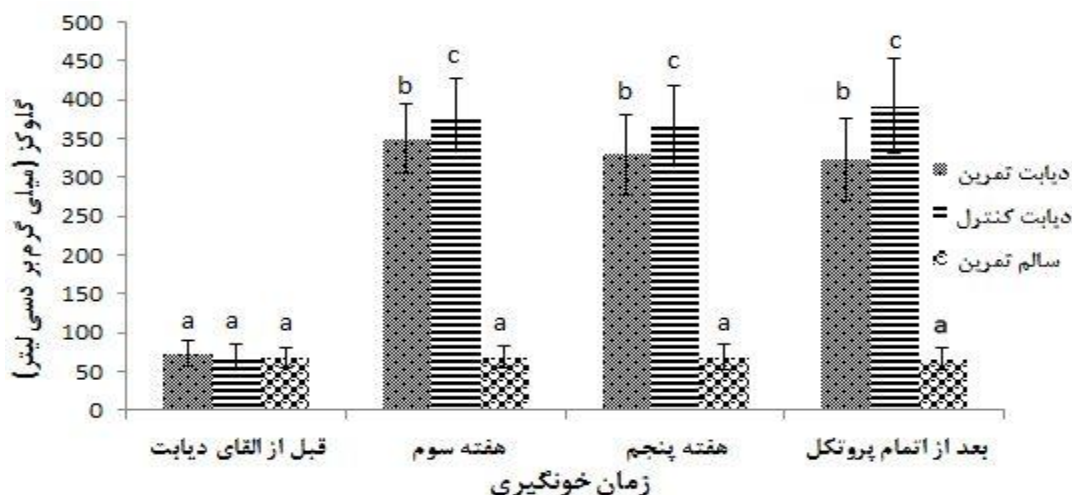
جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

برگشت	رفت	ژن‌ها
CATACTCAGCACCAGCATCACC	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	GAPDH
GAGCAGTTTGGGTTTTTTGTAG	GGAATGGATTGAGGGATGTGA	FGF-23

برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل (مایکروسافت آفیس ۲۰۱۰) استفاده و داده‌ها به صورت انحراف استاندارد $\pm$ میانگین گزارش شده است. داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ آنالیز شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها به ترتیب از آمار توصیفی و آزمون استنباطی استفاده گردید به صورتی که از آزمون Shapiro-Wilk برای طبیعی بودن توزیع داده‌ها و از آزمون Levene برای همگنی واریانس گروه‌ها استفاده شد. از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Scheffe برای بررسی تغییرات قند خون، کلسیم، Klotho و FGF-23 در گروه‌های مورد مطالعه استفاده گردید. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج آزمون Shapiro-Wilk و Levene نشان داد که تمام متغیرهای تحقیق دارای توزیع نرمال بوده و واریانس گروه‌ها نیز همگن می‌باشند ($P > 0/05$). در شروع پروتکل تمرینی سطح گلوکز خون پس از القاء دیابت توسط STZ در موش‌های گروه‌های دیابتی به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($p = 0/001$) و پس از شش هفته تمرین استقامتی در مقایسه با گروه سالم همچنان از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود ($p = 0/001$) و این افزایش در مدت زمان دوره تمرینی نیز ادامه داشت، اما باید بیان نمود که در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) در گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت کنترل به صورت معنی‌داری پایین‌تر بود ($p = 0/001$) (نمودار ۱).

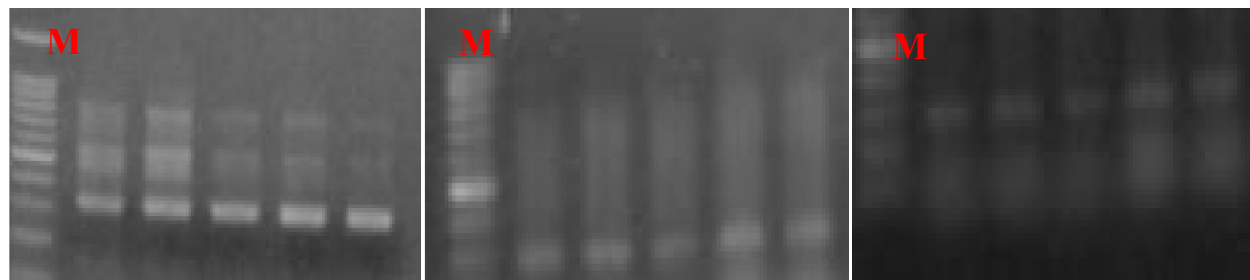
نتایج



نمودار ۱- نمایش سطوح سرمی گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر) ناشتا بر اساس میانگین و انحراف استاندارد در موش‌های صحرایی گروه‌های مختلف قبل از القاء دیابت، هفته سوم، هفته پنجم و بعد از اتمام پروتکل. حروف نامتشابه بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار در بین گروه‌ها می‌باشد ($p < 0.05$)

در شکل ۳ زیر، باندهای بررسی بیان ژن‌های FGF23 در

۵ نمونه از گروه‌های DT، DC و HC با روش RT-PCR به



شکل ۱- باند بررسی بیان ژن FGF-23 در ۵ نمونه از گروه دیابت تمرین با روش RT-PCR. شکل ۲- باند بررسی بیان ژن FGF-23 در ۵ نمونه از گروه دیابت کنترل با روش RT-PCR. شکل ۳- باند بررسی بیان ژن FGF-23 در ۵ نمونه از گروه سالم کنترل با روش RT-PCR. M: مارکر (100bp)

DC نسبت به HC گردیده است، اما پس از شش هفته تمرین استقامتی میزان Klotho در گروه DT نسبت به DC افزایش معنی‌دار ($p = 0.017$) داشته است، اما برای میزان بیان ژن FGF-23 تفاوت معنی‌دار ($p = 0.171$) در گروه DT نسبت به DC مشاهده نشد و سطوح آن در هر دو گروه دیابتی نسبت به گروه HC کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$).

نتایج توصیفی و استنباطی این تحقیق درمورد فاکتورهای Klotho و FGF-23 در جداول ۳ و ۴ آورده شده است و مشخص گردیده است که بیماری دیابت تأثیر منفی بر هر دو فاکتور داشته است و باعث کاهش معنی‌دار ($p = 0.039$) میزان سرمی Klotho (نانوگرم بر میلی‌لیتر) و افزایش معنی‌دار ($P = 0.001$) میزان بیان ژن (بیان نسبی) FGF-23 در گروه

جدول ۳- میانگین و انحراف استاندارد برای سطوح سرمی Klotho و بیان ژن FGF-23 در موش‌های صحرایی

متغیر	گروه‌ها (n=۷)	میانگین	انحراف استاندارد
Klotho (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	دیابت تمرین	۵/۰۹	۰/۱۵
	دیابت کنترل	۳/۲۵	۰/۲۰
	سالم کنترل	۵/۳۶	۰/۵۲
FGF-23 (بیان نسبی)	دیابت تمرین	۱/۰۹	۰/۰۵
	دیابت کنترل	۱/۱۶	۰/۰۴
	سالم کنترل	۰/۶۶	۰/۸۸

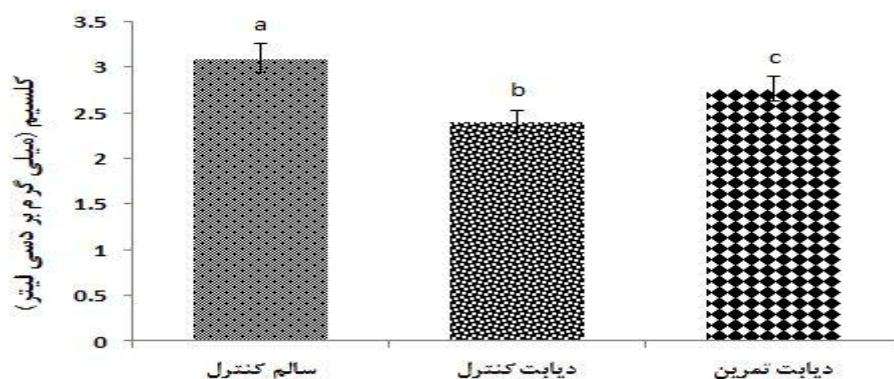
جدول ۴- نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Scheffe برای سطوح سرمی Klotho بیان ژن FGF-23

فاکتورها	تحلیل واریانس یک‌طرفه	آزمون تعقیبی	Klotho	مقدار p <۰/۰۵	آزمون تعقیبی	FGF23	مقدار p <۰/۰۵
Klotho (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	*۰/۰۱۷	HC	DC	#۰/۰۳۹	HC	DC	#۰/۰۰۱
		DT	DT	۰/۷۹۶	DT	DT	#۰/۰۰۳
		DC	HC	#۰/۰۳۹	DC	HC	#۰/۰۰۱
FGF-23 (بیان نسبی)	*۰/۰۰۱	DT	DT	#۰/۰۳۲	DT	DT	۰/۱۷۱
		DT	HC	۰/۷۹۶	DT	HC	#۰/۰۰۳
		DC	DC	#۰/۰۳۲	DC	DC	۰/۱۷۱

*تفاوت معنی‌دار بین گروه DC و با HC در نتیجه آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و # تفاوت معنی‌دار متغیرها به صورت دو به دو بین گروه‌ها بر اساس آزمون تعقیبی Scheffe HC سالم کنترل، DC دیابت سالم و DT دیابت کنترل می‌باشد.

کاهش سطوح سرمی آن گردیده است که در نمودار ۲ به نمایش گذاشته شده است ($p < 0.05$).

نتایج نشان داد که برای متغیر بیوشیمیایی کلسیم (میلی گرم بر دسی‌لیتر) نیز تمرین هیچ‌گونه اثر معنی‌داری بر آن نداشته است ($p > 0.05$), در حالی که بیماری دیابت باعث



نمودار ۲- نمایش میزان سرمی کلسیم (میلی گرم بر دسی‌لیتر) بر اساس میانگین و انحراف استاندارد، پس از شش هفته تمرین استقامتی در موش‌های گروه‌های مختلف بر اساس آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه. حروف نامتشابه بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار در بین گروه‌ها می‌باشد ($p < 0.05$)

بحث

تحقیق حاضر با هدف تعیین تأثیر شش هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط بر میزان سرمی Klotho و بیان ژن FGF23 در قلب موش‌های صحرایی ویستار مبتلا به دیابت تجربی انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که بیماری دیابت باعث کاهش میزان سرمی Klotho در موش‌های دیابتی شده است [۹] و تمرین استقامتی با شدت متوسط می‌تواند باعث تغییر و تعادل سطوح آن گردد. کاهش Klotho در اثر بیماری دیابت می‌تواند باعث اختلال در عملکرد گره سینوسی دهلیزی و تغییر در میزان آرتریواسکلروتیک گردد که اینها خود عواملی برای ایجاد فیبریلاسیون دهلیزی است [۱۱]، چرا که براساس نتایج تحقیقات Klotho در فعالیت نرمال گره سینوسی و عملکرد کانال‌های یونی مسئول، عاملی ضروری است [۲۷]. بنابراین با اثرگذاری مثبت تمرین ورزشی با شدت متوسط بر سطوح آن در شرایط دیابت توجه به انجام فعالیت ورزشی بیشتر و شاید جدی‌تر مورد توجه قرار خواهد گرفت. در تحقیق حاضر نیز خوشبختانه شاهد اثر مثبت تمرین استقامتی با شدت متوسط بر میزان سرمی Klotho موش‌های دیابتی بوده ایم و پس از شش هفته تمرین استقامتی میزان سرمی آن افزایش یافته است که همراستا با نتایج بسیاری از نتایج مطالعات است. ازجمله این مطالعات، پژوهشی بود که به بررسی تأثیر تمرینات تناوبی پر شدت بر میزان فیبریلاسیون دهلیزی، FGF23 و پروتئین Klotho در رت‌های مبتلا به نارسایی کلیه پرداخته شد [۲۸] و نتایج نشان داد که تمرین باعث افزایش میزان پروتئین Klotho شده است که همراستا با نتیجه پژوهش حاضر است. در واقع فعالیت ورزشی اثر مثبت

خود را از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، تغییرات سازشی در میتوکندریایی قلبی، بهبود عملکرد کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP و افزایش بیان پروتئین‌های شوک گرمایی می‌گذارد [۳۰-۲۹] و اثرگذاری Klotho نیز از طریق افزایش نیتریک اکساید (NO) است و از عملکرد اندوتلیال محافظت می‌نماید که در نتیجه آن تنظیم ریتمیک عضلات اندوتلیال دیده می‌گردد [۳۱]. Klotho همچنین باعث کاهش استرس اکسیداتیو می‌گردد که از طریق تأثیر بر مسیر Transforming growth factor beta; TGF-B صورت می‌پذیرد [۳۳-۳۲]. شایان ذکر است که عامل TGF-B خود یک عامل پیش فیبروزی است که مانع فعالیت سلول‌های ماهواره-ای و تمایز میوبلاست نیز می‌گردد [۳۴] و Klotho می‌تواند مانع فعالیت آن شود.

بیماری دیابت با خطر کاهش مواد معدنی استخوان و دفع ادراری کلسیم و فسفات همراه است و افزایش تحلیل استخوانی در این بیماران گزارش شده است [۳۵]. اخیراً تحقیقات نشان داده‌اند که Klotho اثر محافظتی خود بر قلب را از طریق تنظیم کانال‌های TRPC6 اعمال می‌کند که با مهار این کانال‌ها از ورود کلسیم بالا به سلول‌ها ممانعت می‌کند و از این طریق از ایجاد فیبروز و اختلال در عملکرد قلبی محافظت می‌کند [۳۶]. همان‌گونه که مشاهده گردید در تحقیق حاضر بر اثر بیماری دیابت سطوح سرمی کلسیم همراستا با سطوح Klotho کاهش یافت و سطوح سرمی آن تحت تأثیر بیماری دیابت قرار گرفت و تمرین نتوانست بر میزان سرمی آن تغییراتی را ایجاد کند. علاوه براین باید بیان

نمود که وضعیت ساختاری و عملکردی شریان‌ها بازتاب تأثیر عوامل خطر قلبی-عروقی است [۱۹] و بر اثر بیماری دیابت سختی شریانی دیده می‌گردد [۳۷] که متأثر عواملی از قبیل Klotho و قند خون است. درواقع ارتباط سختی شریانی و کاهش سطح قند خون ناشتا وابسته به ساز و کار هموگلوبین گلیکوزیله است و از طرفی، در فعالیت هوازی Klotho افزایش می‌یابد و بهبود سختی شریانی را از مسیرهای مختلفی میسر می‌سازد [۶]، در تحقیق حاضر نیز مشاهده گردید که با اثر تمرین استقامتی با شدت متوسط بر کنترل سطوح گلوکز خون و افزایش سطوح سرمی Klotho احتمالاً کاهش سختی شریانی هم پدیدار شده باشد.

از دیگر فاکتورهایی که پس از شش هفته تمرین استقامتی در موش‌های دیابتی مورد بررسی قرار گرفت تعیین میزان بیان ژن FGF23 بوده است که تحت شرایط بیماری دیابت میزان بیان ژن آن افزایش پیدا کرده بود و تمرین تأثیر معنی‌داری بر تغییرات بیان ژن آن نداشته است هرچند تاحدودی کاهش در آن دیده شد که معنی‌دار نبود. نتیجه این تحقیق در زمینه بررسی نتیجه FGF23 با نتایج بسیاری از پژوهش‌ها همسو است چرا که مشخص گردیده است این فاکتور به سختی تحت تأثیر فعالیت بدنی قرار می‌گیرد. چنانچه در مطالعه Afkhamy ardakani که به بررسی اثر فعالیت هوازی هشت هفته‌ای بر محور کلتو- FGF23 و کلسیمی شدن شریان در زنان یائسه و دیابتی نوع دو پرداخته بودند نتایج نشان داده عدم تغییر معنی‌داری در میزان FGF23 تحت تأثیر فعالیت بدنی بود [۶] که با مطالعه حاضر همسو است. از طرف

دیگر، در محدود پژوهش‌های صورت گرفته شده این فاکتور تغییر سطوح داده است، به‌عنوان مثال در تحقیق Li و همکارانش سطوح FGF23 متعاقب فعالیت ورزشی در موش‌ها افزایش پیدا کرده است [۲۱]. در کل، دلایل مختلفی در ناهم‌سویی تحقیقات دخیل هستند که از جمله آن‌ها تفاوت در پروتکل برنامه تمرینی، شدت و حجم و نوع آزمودنی‌ها می‌تواند باشد [۱۸].

در مطالعه Li نیز شاید دلیل افزایش FGF23 فعالیت ورزشی کوتاه مدت، درمانده ساز و یک‌هفته‌ای بوده است چرا که افزایش FGF23 یک پاسخ کوتاه مدت به فعالیت ورزشی است [۲۱]. سازوکارهای متعددی وجود دارد که نشان دهنده نقش منفی ازدیاد FGF23 در بیماری‌های قلبی-عروقی است. یکی از ساز و کارهای احتمالی FGF23، مشارکت آن در فرایند پیچیده کلسیمی شدن عروقی است. بیان گردیده است که سطح بالایی از FGF23 منجر به کمبود Klotho می‌شود [۶] و FGF23 باعث افزایش جذب مجدد سدیم کلیه می‌شود، بنابراین باعث پرفشاری خون و هایپرتروفی قلبی می‌شود [۳۸]. هم‌چنین بیان گردیده است که FGF23 در تحریک تولید مولکول‌های چسبان V-cam1 و E-selectin نقش دارد که این خود باعث عملکرد غیر طبیعی اندوتلیال عروق می‌گردد [۳۹]. اعتقاد بر این است که در شرایط طبیعی و غیرآزمایشگاهی گیرنده FGF3 میانجی اصلی تأثیرات FGF23 است. ظاهراً Klotho به FGF23 اجازه می‌دهد با تمایل بیشتری نسبت به زمانی که به تنهایی عمل می‌کند به گیرنده‌اش متصل گردد. به این ترتیب مانع از رسوب کلسیم

است، پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات آینده دیگر فاکتورهای مرتبط نیز اندازه‌گیری شوند.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی براساس یافته‌های پژوهش حاضر مبنی بر کنترل سطوح گلوکز خون، افزایش سطوح سرمی Klotho در نتیجه تمرین استقامتی با شدت متوسط می‌توان بیان نمود که ظاهراً این نوع تمرین می‌تواند در کنترل سختی شریان بیماران دیابتی نقش مؤثری داشته باشد، هرچند برای اظهار نظر قطعی نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتری وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی است. نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی آن دانشگاه به‌دلیل حمایت مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند.

ماتریکس شود [۹-۶]. به‌علاوه FGF23 در حضور Klotho پیام‌های پایین‌دستی را فعال می‌کند، از جمله فعال‌سازی عناصر پاسخ رشدی زودرس (Egr_1) و فسفوریله شدن سوبسترای $\alpha 2$ گیرنده FGF، کینازهای تنظیم کننده خارج سلولی، P38، کینازهای پایانه‌های jun_NHz (junc) و پروتئین‌های AKT می‌باشد. این مشاهدات نشان می‌دهد که تعامل FGF23 و گیرنده‌اش و فعالیت پیام‌رسانی پس از آن به کوفاکتور Klotho نیاز دارد [۹].

از جمله محدودیت‌های پژوهش پیش‌رو عدم ارزیابی سایر عوامل درگیر در پروسه سختی شریانی و عدم اندازه‌گیری سطوح پروتئینی دو فاکتور Klotho و FGF23 می‌باشد. بنابراین، با توجه به این‌که در پژوهش حاضر تنها دو فاکتور مربوط به عوامل درگیر در پروسه سختی شریانی بررسی شده

References

- [1] Cho SMJ, Lee H, Shim J S, Kim H C. Association of snoring with prediabetes and type 2 diabetes mellitus: the cardiovascular and metabolic diseases etiology research center cohort. *Diabetes Metab* 2020; 44(5): 687-98.
- [2] Kantharidis P, Bo Wang, Rosemarie M. Carew, Hui Yao Lan. Diabetes Complications: The MicroRNA Perspective. *Diabetes* 2011; 60: 1832-7.
- [3] Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Exp Gerontol* 2015; 46(4): 217-24.
- [4] Porter KE, Riches K. The vascular smooth muscle cell: a therapeutic target in Type 2 diabetes?. *Clin Sci Lond* 2013; 125(4): 167-82.

- [5] Hsu WT, Tsai LY, Lin SK, Hsiao JK, Chen BH. Effects of diabetes duration and glycemic control on free radicals in children with type 1 diabetes mellitus. *Ann Clin Lab Sci* 2006; 36(2): 174-8.
- [6] Afkhamy ardakani M. The effect of Aerobic training on Klotho-FGF23 axis and arterial calcification in type 2 diabetic Postmenopausal women. *J Sport Exerc Psychol* 2020; 13(1): 27-38. [Farsi]
- [7] Bektas A, Schurman SH, Sharov AA, Carter MG, Dietz HC, Francomano CA. Klotho gene variation and expression in 20 inbred mouse strains. *Mamm Genome* 2004; 15(10): 759-67.
- [8] Soleimany A, Hajizadeh R, Khadem vatani K, Seyyed-Mohammadzad M H, Khan ahmadi S. Evaluation of serum klotho level in patients with and without coronary disease. *Stud Med Sci* 2020; 31(3): 178-87. [Farsi]
- [9] Lim K, Lu T S, Molostvov G, Lee C, Lam FT, Zehnder D, et al. Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. *Circulation* 2012; 125(18): 2243-55.
- [10] Kuro-oM. The FGF23 and Klotho system beyond mineral metabolism. *Clin Exp Nephrol* 2017; 21(1): 64-9.
- [11] Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, et al. Regulation of Fibroblast Growth Factor-23 Signaling by Klotho. *J Biol Chem* 2006; 281(10): 6120-3.
- [12] Seiler S, Cremers B, Rebling N M, Hornof F, Jeken J, Kersting S, et al. The phosphatonin fibroblast growth factor 23 links calcium-phosphate metabolism with left-ventricular dysfunction and atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2011; 32(21): 2688-96.
- [13] Fukumoto S. Physiological regulation and disorders of phosphate metabolism-pivotal role of fibroblast growth factor 23. *Inter med* 2008; 47(5): 337-43.
- [14] Sagiv M, Sherve C, Ben-Sira D, Sagiv M, Goldhammer E. Aerobic training effect on blood S-Klotho levels in coronary artery disease patients. *J Clin Exp Cardiol* 2016; 7(8): 1-4.
- [15] Ratanapo S, Kittanamongkolchai W, Srivali N, Ahmed S, Cheungpasitporn W, Chongnarungsin D. The Role of Fibroblast Growth Factor-23 in Left Atrial Volume. *Am Heart J* 2013; 165(5): 902-9.
- [16] Geach T. FGF-23 associated with incident AF—a link with CKD?. *Nat Rev Cardiol* 2014; 11(8): 436-6.
- [17] Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt K P, et al. Regulation of fibroblast

- growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* 2006; 281(10): 6120-3.
- [18] Bolboli L, Khajehlandi M. A Comparison of the Effect of Endurance Training on the Activities of Glutathione Peroxidase and Superoxide Dismutase in the Cardiac Tissue of Healthy and Diabetic Rats. *Yafte* 2020; 21 (4): 20-31. [Farsi]
- [19] Najafipour H, Rostamzadeh F, Yeganeh-Hajahmadi M, & Joukar S. Improvement of Cardiac Function in Rats With Myocardial Infarction by Low-Intensity to Moderate-Intensity Endurance Exercise Is Associated With Normalization of Klotho and SIRT1. *J Cardiovasc Pharmacol* 2021; 77(1): 79-86.
- [20] Avin K G, Coen P M, Huang W, Stolz D B, Sowa GA, Dubé J J, et al. Skeletal muscle as a regulator of the longevity protein, Klotho. *Front Physiol* 2014; 17: 5: 189-98.
- [21] Li DJ, Fu H, Zhao T, Ni M, Shen FM. Exercise-stimulated FGF23 promotes exercise performance via controlling the excess reactive oxygen species production and enhancing mitochondrial function in skeletal muscle. *Metabolism* 2016; 65(5): 747-56.
- [22] Ascensão A, Ferreira R, Magalhães J. Exercise-induced cardioprotection - biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol* 2007; 117(1): 16-30.
- [23] Szkudelski T, The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50(6): 537-46.
- [24] Chae CH, Jung SL, An SH, Jung CK, Nam SN, Kim HT. Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats & quot. *Physiol Biochem* 2011; 67(2): 235-41.
- [25] Fatemi S, fallahmohammadi Z. The effect of vitamin D supplementation on the levels of Klotho in the brain tissue of female lewis rats after 6 weeks of swimming. *J Sports Sci* 2018; 10(2): 207-19.
- [26] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the2-DDCT method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- [27] Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, et al. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation* 2004; 109(14): 1776-82.
- [28] Rokhsati S, Souri R, Shabkhiz F, Rabbani SH, Shahsavari Z. Effect of High Intensity Interval

- Training on the Level of Atrial Fibrillation, Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho Protein in Male Rats with Renal Failure. *J Shahid Sadoughi Uni Med Sci* 2020; 28(5): 2660-72. [Farsi]
- [29] Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Quindry JC. Mechanisms of Exercise-Induced Cardioprotection. *Physiol* 2014; 29(1): 27-38.
- [30] Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. ExerciseInduced Cardioprotection Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Free Radical Biology Med* 2008; 44(2): 193-201.
- [31] Saito Y, Yamagishi T, Nakamura T, Ohyama Y, Aizawa H, Suga T, et al. Klotho Protein Protects Against Endothelial Dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248(2): 324-9.
- [32] Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, et al. Klotho Inhibits Transforming Growth Factor-B1 (TGF-B1) Signaling and Suppresses Renal Fibrosis and Cancer Metastasis in Mice. *J Biolog Chem* 2011; 286(10): 8655-65.
- [33] Fleenor BS, Marshall KD, Durrant JR, Lesniewski LA, Seals DR. Arterial Stiffening With Ageing is Associated with Transforming Growth Factor B1 Related Changes in Adventitial Collagen: Reversal by Aerobic Exercise. *J Physiol* 2010; 588(20): 3971-82.
- [34] Cadigan KM, Liu YI. Wnt Signaling: Complexity at the Surface. *J Cell Sci* 2006; 119(3): 395-402.
- [35] Shirinzadeh M, Shakerhoseini R, Navaee L, Hoshyar rad A, Saadat N, Golestan B. Assessment of vitamin D supplementation effect on insulin resistance among type 2 diabetic patients. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 2008; 15; 1(2): 1-6. [Farsi]
- [36] Ramez M, Rajabi H, Ramezani F, Naderi N, Darbandi-Azar A, Nasirinezhad F. The Greater Effect of High-Intensity Interval Training Versus Moderate-Intensity Continuous Training on Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury Through Klotho Levels and Attenuate of Myocardial TRPC6 Expression. *BMC Cardiovasc Disord* 2019; 19(1): 118-27.
- [37] Fakhrzadeh H, Sharifi F. Pre-clinical atherosclerosis, a review article. *IJDO* 2017; 15; 10(2): 117-29.
- [38] Kizilgul M, Kan S, Beysel S, Apaydin M, Ozcelik O, Caliskan M, et al. I fibroblast growth factor 23 a new cardiovascular risk marker in gestational diabetes?. *Arch Endocrinol Metab* 2017; 61(6): 562-66.
- [39] Kitagawa M, Sugiyama H, Morinaga H, Inoue T, Takiue K, Ogawa A, et al. A decreased level of serum soluble Klotho is an independent biomarker associated with

arterial stiffness in patients with chronic kidney disease. *PloS one* 2013; 8(2): e56695.

The Effect of Six Weeks of Moderate-Intensity Endurance Training on Serum Levels of Klotho and Expression of the Fibroblast-23 Growth Factor Gene (FGF23) in the Hearts of Diabetic Rats: An Experimental Study

L. Bolboli¹, M. Khajehlandi²

Received: 28/03/21 Sent for Revision: 24/04/21 Received Revised Manuscript: 15/05/21 Accepted: 16/05/21

Background and Objectives: Diabetic patients are highly susceptible to cardiovascular involvement. Therefore, the aim of the present study was to determine the effect of six weeks of moderate-intensity endurance training on serum levels of Klotho and expression of the fibroblast-23 growth factor (FGF23) gene in the hearts of diabetic rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 21 adult male Wistar rats were randomly divided into three groups of seven: diabetic training group (DT), diabetic control group (DC), and healthy control group (HC). Diabetes was induced by intraperitoneal injection of Streptozotocin (STZ). Animals performed moderate-intensity endurance training for six weeks. Serum levels of Klotho and FGF23 gene expression in the heart tissue were evaluated by Elisa method and real time PCR, respectively. Data were analyzed by one-way analysis of variance and Scheffe's post hoc test.

Results: The findings showed that after six weeks of training, blood glucose concentration (mg/dl) in the DT group was significantly lower than the DC group ($p=0.001$), and serum levels of Klotho (ng/ml) was significantly increased compared to the DC ($p=0.032$), but there was no significant difference between the DT and DC groups in the expression of FGF23 gene (relative expression) ($p=0.171$).

Conclusion: The results suggested that moderate-intensity endurance training has a positive effect on the serum levels of Klotho and blood glucose, and it appears to be somewhat protective of heart function.

Key words: Klotho, FGF23, Endurance training, Diabetes, Heart, Rat

Funding: This study was funded by University of Mohaghegh Ardabili.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Ardabil University of Medical Sciences approved the study (IR.ARUMS.REC.1398.251).

How to cite this article: Bolboli L, Khajehlandi M. The Effect of Six Weeks of Moderate-Intensity Endurance Training on Serum Levels of Klotho and Expression of the Fibroblast-23 Growth Factor Gene (FGF23) in the Hearts of Diabetic Rats: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2021; 20 (4): 371-86. [Farsi]

1- Associate Prof., Dept. of Exercise Physiology, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, ORCID: 0000-0002-7981-4343

(Corresponding Author) Tel: (045) 33520457, Fax: (045) 33520457, E-mail: L_bolboli@uma.ac.ir

2- PhD Candidate, Dept. of Exercise Physiology, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, ORCID: 0000-0002-5275-9305