



تأثیر شش هفته تمرین هوازی فزاینده و مکمل ال کارنیتین بر گیرنده آپلین بافت قلبی و گلوکز خون موش های

دیابتی

سرحد آقایی: دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد، کرمانشاه، ایران

ناصر بهپور: دانشیار، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران (* نویسنده مسئول) n_bhpoor@yahoo.com

صدیقه حسین پور دلاور: استادیار، دانشگاه آزاد، کرمانشاه، ایران

حسن صفی خانی: استادیار، دانشگاه آزاد، کرمانشاه، ایران

محمد جلیوند: استادیار، دانشگاه آزاد، کرمانشاه، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

دیابت،
گیرنده آپلین،
تمرین هوازی،
ال-کارنیتین،
گلوکز

زمینه و هدف: مصرف آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی به صورت مکمل‌های غذایی، می‌تواند از طریق شکار رادیکال-های آزاد تأثیر مثبتی در جهت کاهش استرس اکسیداتیو داشته باشند. هدف از انجام پژوهش حاضر تعیین تأثیر ۶ هفته تمرین هوازی فزاینده و مکمل ال-کارنیتین بر گیرنده آپلین بافت قلبی و مقادیر گلوکز خون موش‌های دیابتی بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار به صورت تصادفی در پنج گروه کنترل سالم، کنترل دیابتی، دیابت + ال-کارنیتین، دیابت + تمرین هوازی و دیابت + تمرین + ال-کارنیتین تقسیم شدند. بعد از دیابتی کردن رت‌ها، روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم ال-کارنیتین را به صورت خوراکی دریافت کردند. برنامه تمرین هوازی نیز پنج روز در هفته، به مدت شش هفته، با شیب صفر درجه، سرعت ۱۰ متر و زمان ۱۰ دقیقه در هفته اول شروع شده و در هفته آخر شیب به ۵ درجه، سرعت ۲۰ متر و زمان ۴۰ دقیقه رسید.

یافته‌ها: نتایج بیانگر افزایش معنی‌دار گیرنده آپلین در گروه‌های دیابت+تمرین هوازی و گروه دیابت+تمرین هوازی+ ال-کارنیتین نسبت به گروه کنترل و دارونما بود ($p=0/001$). بین دو گروه فعال پژوهش نیز اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($p=0/274$). نتایج آزمون تعقیبی بیانگر کاهش معنی‌دار گلوکز در گروه‌های فعال نسبت به گروه کنترل و دارونما بود ($p=0/001$).

نتیجه‌گیری: تمرین هوازی و مصرف ال-کارنیتین می‌تواند سبب افزایش گیرنده آپلین بافت قلبی و کاهش گلوکز شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه آزاد کرمانشاه

شیوه استناد به این مقاله:

Aghaie S, Behpor N, Hosseinpour Delavar S, Safikhani H, Jalilvand M. Effect of six weeks of increasing and complementary L-carnitine aerobic exercise on apline receptor for cardiac tissue and blood glucose in diabetic mice. Razi J Med Sci. 2020;27(9):11-20.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.



Original Article

Effect of six weeks of increasing and complementary L-carnitine aerobic exercise on apline receptor for cardiac tissue and blood glucose in diabetic mice

Sarhad Aghaie: PhD Student, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

Naser Behpor: Associate Professor, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran (* Corresponding author) n_bhpoor@yahoo.com

Sedigheh Hosseini Delavar: Assistant Professor Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

Hasan Safikhani: Assistant Professor, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

Mohamad Jalilvand: Assistant Professor, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

Abstract

Background and Aims: In the relationship between apline and insulin resistance in diabetes mellitus, it has been shown that hyperinsulinemia combined with insulin resistance can regulate the activation of signaling pathways of phosphofructokinase, protein kinase and mitogen-activated protein kinase. Increased expression of adipose tissue. Insulin, as a potent regulator of apline expression, has a direct effect on the production and secretion of apline. Elevated plasma levels of insulin and apline in diabetic rats indicate a disorder of apline homeostasis in type 2 diabetes mellitus, and increased plasma insulin can enhance plasma apline levels, while insulin levels are associated with decreased apline expression in the animal model. Diabetics are reduced Consumption of non-enzymatic antioxidants in the form of dietary supplements can have a positive effect on reducing oxidative stress by hunting down free radicals. Because exercise strengthens the anti-oxidant system and increases long-term levels of anti-inflammatory interleukins, it may be possible to use exercise as a tool to improve the effects of diabetes. The aim of this study was to determine the effect of 6 weeks of increasing aerobic exercise and L-carnitine supplementation on cardiac tissue uptake receptor and blood glucose levels in diabetic rats.

Methods: In this experimental study, 40 male Wistar rats were randomly divided into five groups: healthy control, diabetic control, diabetes + L-carnitine, diabetes + aerobic exercise and diabetes + exercise + L-carnitine. After diabetic rats received 100 mg of L-carnitine orally daily. The aerobic exercise program also started five days a week, for six weeks, with a zero degree slope, a speed of 10 meters and a time of 10 minutes in the first week, and in the last week the slope reached 5 degrees, a speed of 20 meters and a time of 40 minutes. At the end of the course and eliminating the acute effect of exercise, 32 hours after the last training session, rats were anesthetized by intraperitoneal injection of a combination of ketamine and xylazine and then by opening the chest, drawing blood directly from the heart and centrifuging putting up. Next, the hearts of isolated rats and the corresponding steps of the Apline receptor assay were used by the Sandwich ELISA method, and glucose levels were measured by cutting the tail tip and plasma levels. Descriptive statistics were used to calculate the central indices and Kolmogorov-Smirnov test was used for normal and significant data distribution between groups in the post-test,

Keywords

Diabetes,
Apline receptor,
Aerobic exercise,
LCarnitine,
Glucose

Received: 24/08/2020

Published: 22/11/2020

ANOVA test and Tukey post hoc test, respectively. All statistical operations were performed by SPSS software version 23 and the significance level of the tests was at the level of $P \geq 0.05$.

Results: The results showed an increase in the significance of Aplin receptor in the groups of diabetes + aerobic exercise and diabetes + aerobic exercise + L-carnitine compared to the control and placebo groups ($p = 0.001$). There was no significant difference between the two active groups ($p = 0.274$). The results of the post hoc test showed a significant decrease in glucose in the active groups compared to the control and placebo groups ($p = 0.001$). In the present study, it was observed that performing aerobic exercise for 6 weeks as well as performing a combination of aerobic exercise protocol and L-carnitine supplementation significantly reduced insulin resistance. The results of linear regression analysis in previous studies also showed that there is a negative correlation between the content of aplin and the receptor of aplin to the amount of insulin, which is consistent with the results of the present study. In the present study, we showed that aerobic activity alone or in combination with L-carnitine supplementation increased the apleric system of cardiac tissue so that the levels of aplin receptor in the heart in the group diabetes + aerobic exercise and also diabetes + aerobic exercise + L-carnitine had a significant increase compared to other groups. We also showed that the appendicular system of heart tissue in diabetic mice is highly negatively regulated and may be directly regulated by the mechanism of angiotensin receptors. In the present study, the combined effect of aerobic exercise and L-carnitine supplementation improved diabetes-related indicators in diabetic rats; however, the exact mechanism by which physical activity improves diabetes was not well understood. Physical activity modulates insulin resistance by reducing sympathetic nerve activity, improving organ perfusion, regulating energy metabolism, and regulating food.

Conclusion: L-carnitine intake and aerobic exercise decreased in diabetic rats. The decrease in serum insulin and glucose levels was significant in the groups of diabetes + aerobic exercise and diabetes + exercise + L-carnitine. Insulin resistance is known to be the most important factor in the development of type 2 diabetes and the spread of its associated complications. Aplin, as an adipokine, is involved in the pathology of insulin resistance, and regular exercise along with increased levels of aplin can improve the metabolic parameters of diabetic patients. However, two mechanisms have been proposed to regulate insulin sensitivity through aplin, namely: reduction of glucose by aplin through the signal pathway associated with the aplin receptor and activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase and endothelium nitric oxide synthetase. Hemodynamic factors have been shown to play a role in glucose uptake, so that venipuncture increases insulin sensitivity and stenosis reduces glucose uptake. Due to the fact that endurance training promotes skeletal muscle adaptation and the development of insulin sensitivity and causes fat oxidation (aerobic training and L-ka consumption).

Conflicts of interest: None

Funding: Islamic Azad University Kermanshah

Cite this article as:

Aghaie S, Behpor N, Hosseinpour Delavar S, Safikhani H, Jalilvand M. Effect of six weeks of increasing and complementary L-carnitine aerobic exercise on apline receptor for cardiac tissue and blood glucose in diabetic mice. *Razi J Med Sci.* 2020;27(9):11-20.

*This work is published under [CC BY-NC-SA 3.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).

مقدمه

چاقی، مهم‌ترین مشکل سلامتی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه می‌باشد و می‌تواند خطر ابتلا به بیماری‌های مختلف از جمله خطر حمله قلبی، آرتروز، دیابت نوع ۲ و فشارخون بالا را افزایش دهد (۱). دیابت ملیتوس، گروهی از بیماری‌های متابولیکی را در بر می‌گیرد که با افزایش قند خون ناشی از کمبود ترشح انسولین، مقاومت انسولینی و یا ترکیبی از هر دو مورد رخ می‌دهد (۲). در واقع، دیابت نوع دوم وضعیت پیچیده‌ای است که در آن مقادیر توده چربی به‌طور معنی‌داری افزایش داشته است (۴). افزایش در مقادیر توده چربی ابتلا به دیابت را تسهیل می‌کند (۳). طی دهه اخیر، شمار رو به رشدی از هورمون‌های مشتق شده از سلول‌های چربی یا آدیپوکاین‌ها شامل لپتین، آدیپونکتین، رزیستین، و لیپوکالین شناسایی شده‌اند (۵). این آدیپوکاین‌ها در تنظیمات فیزیولوژیک ذخیره چربی، سوخت و ساز، رفتار تغذیه‌ای و نیز اختلالات مرتبط با چاقی شامل دیابت نوع دو و فشارخون بالا نقش دارند (۴). در میان آدیپوکاین‌های جدید، آپلین (Apline) به عنوان آدیپوکاین مفید مرتبط با عوامل خطرزای قلبی عروقی و دیابت نوع دو شناخته شده است (۶). آپلین یک هورمون پپتیدی است که به عنوان یک لیگاند آندوژنی برای گیرنده آپلین (APJ)، گیرنده‌های شبیه گیرنده آنژیوتانسین، جفت شده با پروتئین G، معرفی شده است (۶). این هورمون در بافت‌های مختلف بدن انسان از جمله سلول‌های چربی، کلیه، قلب، عضلات اسکلتی و مغز، بیان و ترشح می‌شود و بر متابولیسم انرژی و حساسیت به انسولین مؤثر است (۸). در زمینه ارتباط بین آپلین و مقاومت به انسولین در وضعیت دیابت نشان داده شده است که هاپر انسولینمی همراه با مقاومت به انسولین می‌تواند از طریق فعال‌سازی مسیرهای سیگنالی فسفوفروکتوکیناز، پروتئین کیناز و پروتئین کیناز فعال شونده با میتوزن، باعث تنظیم افزایشی بیان آپلین بافت چربی شود. انسولین، به عنوان تنظیم‌گر قوی بیان آپلین، اثر مستقیم بر تولید و ترشح آپلین می‌گذارد. افزایش سطوح پلاسمایی انسولین و نیز آپلین در موش‌های دیابتی نشانگر اختلال هومئوستاز آپلین در وضعیت دیابت نوع ۲ بوده و افزایش انسولین پلازما

می‌تواند افزایش سطح پلاسمایی آپلین را تقویت نماید، این در حالی است که سطح انسولین همراستا با کاهش بیان آپلین در مدل حیوانی دیابتی شده کاهش می‌یابد (۱۲).

مطالعات اخیر نشان داده است که آپلین یک عامل جدید ضد پر فشارخونی آندروژن (درون زا) است که به میزان قابل توجهی در بیماران مبتلا به پرفشارخونی کاهش می‌یابد (۱۳). طبق یافته‌های پژوهشی مختلف سیستم آپلینرژیک رویکردهای متفاوتی را در شرایط مختلف بدن ایجاد می‌کند. به نظر می‌رسد این نوروپپتید نیز در تعامل با شرایط استرس ناشی از موقعیت‌های گوناگون همچون اجرای برنامه ورزشی و یا استفاده از مکمل‌های گیاهی، به عنوان یک سیگنال تنظیمی عمل می‌کند (۱۴). به عنوان مثال، لی و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده‌اند که مقادیر آپلین پلازما در پاسخ به بیماری‌های قلبی و عروقی دچار تغییرات معنی‌داری می‌شود (۱۲) و همچنین تمپل و همکاران (۲۰۱۲) معتقدند که استفاده از شیوه‌های درمانی غیر دارویی تمرین ورزشی حتی به‌صورت کوتاه‌مدت در افزایش سطوح آپلین قلب در موش‌های صحرایی مبتلا به نارسای کلیوی مؤثر است (۱۱). Stöhr و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان داده‌اند ۱۲ هفته تمرین تناوبی شدید باعث افزایش چهار برابری در مقادیر mRNA آپلین قلبی در موش‌های صحرایی می‌شود (۴). عزیزی و همکاران (۲۰۱۷) نیز بیان کردند که تغذیه موش‌ها با یک رژیم غذایی با کالری بالا سبب افزایش انسولین، گلوکز و آپلین می‌شود (۲۷).

یکی از راه‌های درمانی و پیشگیرانه برای عوارض دیابت، توصیه فعالیت بدنی به شکل منظم در طول روز برای بیماران می‌باشد (۱۱) اما اینکه چه ورزشی و با چه نوع پروتکلی، سؤال است که محققین همیشه در پی کشف آن هستند (۱۲). از سویی دیگر استفاده از مکمل‌های با خاصیت آنتی‌اکسیدانی از موضوعات پژوهشی موردعلاقه محققان در سال‌های اخیر بوده است. درباره تأثیر مکمل ال-کارنیتین (L-carnitine) بر ترکیب بدن، بافت چربی و وزن بدن، تحقیقات مختلفی وجود دارد که با توجه به مقدار مصرف مکمل، نوع آزمودنی و روش کار، نتایج متفاوتی وجود داشته است. برخی تحقیقات نشان می‌دهند که مکمل ال-

تأثیرات منفی دیابت و کشف راهی برای کنترل یا کاهش عوامل ایجاد کننده آن، آیا ۶ هفته تمرین هوازی فزاینده و مکمل ال-کارنیتین بر گیرنده آپلین بافت قلبی و گلوکز خون موش‌های دیابتی می‌تواند تأثیر داشته باشد؟

روش کار

روش پژوهش حاضر از نوع تجربی با طرح پس آزمون با گروه کنترل بود. برای این منظور تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با محدوده وزنی 20 ± 180 گرم از مؤسسه پاستورایران خریداری شد. پس از ۲ هفته سازگاری با محیط جدید، موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی به پنج گروه کنترل سالم، کنترل دیابتی، دیابت+ال-کارنیتین، دیابت+تمرین هوازی، و دیابت+تمرین+ال-کارنیتین تقسیم شدند. سپس موش‌های صحرایی به مدت ۱۰ هفته رژیم غذایی پرچرب (ساخت انستیتو سرم سازی رازی) و گروه کنترل سالم غذای استاندارد (ساخت انستیتو سرم سازی رازی) را مصرف کردند. پس از اتمام ۱۰ هفته، قد، وزن و شاخص لی محاسبه شد و موش‌های صحرایی چاق شده وارد پژوهش حاضر شدند. در پژوهش حاضر کلیه قوانین و نحوه رفتار با حیوانات (آشناسازی، تمرین، بیهوشی و کشتن حیوان بر اساس AAALAC) و کد اخلاق IR.KUMS.REC.1398.691 دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه رعایت گردید. برای دیابتی کردن هر موش صحرایی، استرپتوزوتوسین با دوز ۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از راه صفاقی تزریق شد. گلوکز خون ناشتا پس از ۱۲ ساعت بی غذایی، قبل از تزریق استرپتوزوتوسین، و نیز به ترتیب در فاصله زمانی ۱، ۳ و ۴ هفته پس از تزریق استرپتوزوتوسین با خون گیری از طریق بریدن نوک دم، به وسیله گلوکومتر اندازه گیری شد و موش‌هایی که دارای قند خون 300 میلی گرم بر

کارنیتین، اکسیداسیون چربی را در آزمودنی‌های دچار اضافه‌وزن سرعت می‌بخشد (۱۶). در حقیقت، مصرف منظم کارنیتین، غلظت پلاسمایی و درون سلولی کارنیتین را افزایش داده و به افزایش اکسیداسیون چربی و کاهش تدریجی ذخایر چربی بدن می‌انجامد. اعتقاد بر این است که مصرف مکمل ال-کارنیتین، عمل گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید را تعدیل کرده و از این رو می‌تواند بعضی از فعالیت‌های زیستی گلوکوکورتیکوئیدها را شامل تحریک لیپولیز در بافت چربی، تقلید کند. از سوی دیگر، رنجبر و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که کمبود کارنیتین می‌تواند به کاهش اکسیداسیون چربی و انباشته شدن اسیدهای چرب و تری گلیسیرید در بافت‌های چربی منجر شود (۵). والینا و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که مصرف مکمل خوراکی ال-کارنیتین به همراه تمرین هوازی و مصرف رژیم غذایی پر پروتئین، وزن بدن، شاخص توده بدن، درصد چربی و نسبت دور کمر به باسن را کاهش می‌دهد. آنها نتیجه گرفتند که احتمال دارد افزایش ۶۷ درصدی پروتئین غذایی (با وجود مصرف مکمل ال-کارنیتین) موجب افزایش جذب رودهای کارنیتین شود. از سوی دیگر، موجودیت زیستی کارنیتین در منابع غذایی ۷۵ و در منابع مکملی ۵ تا ۱۸ درصد است و این مورد می‌تواند موجودیت زیستی کارنیتین را از طریق رژیم غذایی (به ویژه پروتئین غذایی) افزایش داده و در نهایت تأثیر بیشتری بر اکسیداسیون چربی داشته باشد (۲۰).

با توجه به اینکه تمرینات ورزشی، تقویت سیستم ضد اکسایشی و افزایش سطوح اینترلوکین‌های ضد التهابی در طولانی‌مدت را در پی دارند (۲۴)، بنابراین شاید بتوان از فعالیت‌های ورزشی به عنوان ابزاری در جهت بهبود عوارض ناشی از دیابت بهره برد اما اطلاعات دقیقی در ارتباط با نوع پروتکل‌های تمرینی و شدت و مدت‌های مطلوب وجود ندارد. از طرف دیگر با توجه به

جدول ۱- برنامه تمرین هوازی

هفته	سرعت	زمان	تعداد جلسات در هفته	شیب
اول	۱۰ متر	۲۰ دقیقه	۵ جلسه	۵
دوم	۱۰ متر	۲۰ دقیقه	۵ جلسه	۵
سوم	۲۰ متر	۳۰ دقیقه	۵ جلسه	۵
چهارم	۲۰ متر	۳۰ دقیقه	۵ جلسه	۵
پنجم و ششم	۲۰ متر	۴۰ دقیقه	۵ جلسه	۵

پس از پایان دوره و به منظور از بین بردن اثر حاد تمرین، ۳۲ ساعت پس از آخرین نوبت تمرینی، رت‌ها با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین (50 mg/kg) - 30 و زایلازین (5 mg/kg - 3) بی‌هوش شده و سپس با باز کردن قفسه سینه، ابتدا 10 میلی لیتر خون بطور مستقیم از قلب کشیده شده و آن را مورد سانتریفیوژ قرار داده (15 دقیقه با سرعت 4000 دور در دقیقه)، و سرم حاصله در لوله های 2 میلی لیتری جدا شد. بعد، قلب موش‌های صحرای جدا شده و پس از شستشو در محلول کلرور سدیم بلافاصله در مایع نیتروژن قرار می‌دهیم و در دمای 70 - درجه سانتیگراد نگهداری شد و پس از هوموژنیزه شدن برای سنجش گیرنده آپلین با روش Sandwich ELISA مورد استفاده قرار داده شد. برای هوموژنیزاسیون، بافت قلب را در مایع نیتروژن پودر و بعد، 100 میلی‌گرم از بافت پودر شده را جدا و با 1 میلی لیتر بافر حاوی 137 میلی مول NaCl ، 20 میلی مول $\text{Tris hydrochloride}$ با 0.8 pH، 1 درصد NP40، 10 درصد گلیسرول، 1 میلیلیتر فنیل متیل الانیل فلورید، 1 میلی گرم لوپیتین، 0.5 میلی مول سدیم و 100 میلی گرم بنزوسولفونیل فلورید هیدروکلورید هوموژنیزه شده و پس از 15 دقیقه با دور 10000 سانتریفیوژ، محلول بدست آمده برای سنجش شاخص‌های مورد نظر با استفاده از یخ خشک به آزمایشگاه منتقل شد. سطوح گلوکز بوسیله گلوکومتر ساخت کشور آلمان از طریق بریدن نوک دم و سطوح پلاسمایی انسولین با کیت ELISA ساخت چین با حساسیت کمتر از 0.5 میکرویونیت/میلی لیتر و ضریب تغییر 0.36 درصد اندازه گیری شد.

روش آماری

از آمار توصیفی برای محاسبه شاخص‌های مرکزی و در بخش آمار استنباطی، از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف ($\text{kolmogorov-smirnov}$) جهت توزیع طبیعی داده‌ها و برای مطالعه معنی‌داری بین گروهی در پس آزمون به ترتیب از آزمون ANOVA و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. کلیه عملیات آماری توسط نرم افزار SPSS نسخه 23 و سطح معنی‌داری آزمون‌ها در سطح $P \leq 0.05$ انجام شد.

دسی لیتر بودند به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (۱۵).

در انتهای هفته دوازدهم، گروه‌های کنترل سالم (8 سر رت) و کنترل دیابتی (8 سر رت)، پس از 12 ساعت ناشتایی شبانه برای تعیین اثر دیابت کشته شدند (بافت برداری و نمونه گیری مرحله اول). در ادامه، 24 سر رت دیابتی شده بصورت تصادفی به 3 گروه مصرف ال-کارنیتین، تمرین هوازی، و تمرین هوازی+ال-کارنیتین تقسیم شدند. گروه‌های فعال به مدت 6 هفته، 5 جلسه در هفته به فعالیت ورزشی پرداختند. 48 ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، تمامی موش‌های صحرایی دو گروه تمرینی به اضافه موش‌های صحرایی گروه مصرف ال-کارنیتین، پس از 12 ساعت ناشتایی شبانه کشته شدند (بافت برداری و نمونه گیری مرحله دوم). لازم به ذکر است که 6 سر رت به دلیل عدم رسیدن به معیار چاقی (بر اساس شاخص لی) از ادامه پژوهش حاضر حذف شدند (12). غذای حیوانات این پژوهش به صورت پلت توسط شرکت خوراک دام بهرپور کرج تولید و با توجه به وزن کشی هفتگی در هر قفس قرار داده شد. همچنین موش‌ها روزانه به ازای هر 100 گرم وزن بدن به 10 تا 12 میلی لیتر آب نیاز داشتند. در این پژوهش آب مورد نیاز هر حیوان به صورت آزاد در بطری 500 میلی لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آنها قرار داده شد (14). موش‌های صحرایی دریافت کننده ال-کارنیتین روزانه 100 میلی‌گرم ال-کارنیتین را به صورت خوراکی دریافت نمودند. گروه‌های تمرین هوازی نیز برنامه تمرین هوازی روی نوارگردان را 5 روز در هفته، به مدت 6 هفته انجام دادند (11).

این شدت تمرین برای موش‌های دیابتی، معادل شدت در آستانه لاکتات و معادل تقریباً 60 درصد حداکثر اکسیژن مصرفی در نظر گرفته شده است که شدت به نسبت بالایی برای موش‌های دیابتی محسوب میگردد (12). در شروع هر جلسه تمرین، 5 دقیقه (سرعت 10 متر در دقیقه و شیب صفر) جهت گرم کردن در نظر گرفته شد. در پایان هر جلسه به منظور سرد کردن، در مدت 5 دقیقه، سرعت نوارگردان به طور معکوس کاهش یافت تا به سرعت اولیه برسد. به منظور تحریک موش‌ها برای دوییدن، از محرک صوتی (ضربه به دیواره تردمیل) استفاده شد (13).

یافته‌ها

گروه کنترل دیابتی و افزایش معنی‌دار نسبت به گروه سالم بود ($p=0/001$). سطوح سرمی گلوکز نیز بین گروه‌های کنترل دیابتی و تمرینی+ال-کارنیتین و تمرین هوازی تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p=0/001$). نتایج آزمون تعقیبی بیانگر کاهش معنی‌دار گلوکز در گروه‌های دیابت+ال-کارنیتین، دیابت-تمرین هوازی و دیابت+تمرین+ال-کارنیتین نسبت به گروه کنترل دیابتی و سالم بود ($p=0/001$). همچنین بین گروه‌های دیابت-تمرین هوازی و دیابت+تمرین+ال-کارنیتین نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در مقایسه بین گروه‌ها، گروه‌های دیابت+تمرین هوازی و دیابت+تمرین+ال-کارنیتین سبب کاهش گلوکز شده است.

بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد سطوح انسولین و گلوکز همراه با مصرف ال-کارنیتین و تمرین هوازی در موش‌های دیابتی کاهش یافت. کاهش سطوح سرمی

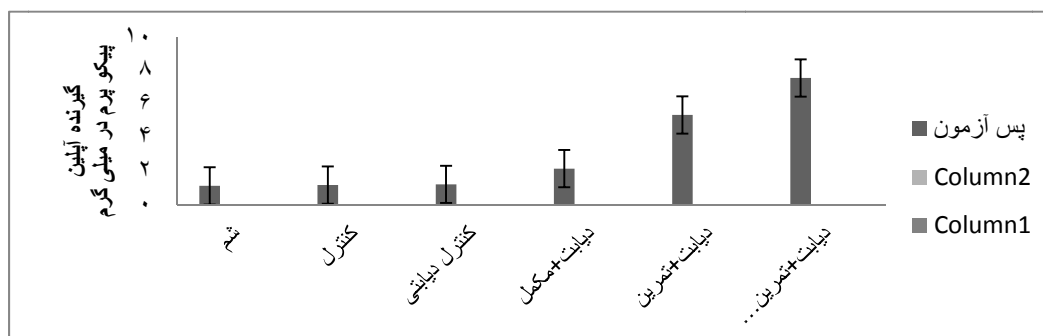
در شروع تحقیق تفاوت معنی‌داری بین میانگین وزنی گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت. وزن بدن موش‌های صحرایی در گروه‌های دیابت+ال-کارنیتین، دیابت+تمرین هوازی و دیابت+تمرین+ال-کارنیتین در طول پژوهش با کاهش همراه بود. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار دیابت بر شاخص‌های گلوکز و انسولین بود. این شاخص‌ها در گروه‌های دیابتی در مقایسه با گروه‌های سالم تغییر داشته‌اند. گروه‌های دیابتی در مقایسه با گروه‌های سالم دارای وزن کمتر، گلوکز بالاتر و انسولین پایین‌تر بودند. تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسه مقادیر گیرنده آپلین در سه گروه دیابت+ال-کارنیتین، دیابت+تمرین هوازی و دیابت+تمرین+ال-کارنیتین تفاوت معنی‌دار بین سه میانگین گروه را نشان داد. نتایج آزمون تعقیبی بیانگر افزایش معنی‌دار گیرنده آپلین در گروه دیابت-تمرین هوازی و دیابت+تمرین+ال-کارنیتین نسبت به

جدول ۲- نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه

ANOVA	مجموع مجزورات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig
درون گروهی	۱۱/۲۳۲	۵	۳/۱۵۷		
بین گروهی	۵/۵۵۶	۴۲	۰/۶۹	۲۴/۳۲	* ۰/۰۰۱
کل	۱۶/۷۸۸	۴۸			

جدول ۳- نتایج آزمون تعقیبی توکی برای متغیر گیرنده آپلین و گلوکز

گروه‌ها	اختلاف میانگین	خطای استاندارد	معنی داری
گیرنده آپلین			
دیابت-ال کارنیتین	۱/۶	۰/۱۲۸	۰/۱۶۹
دیابت-تمرین هوازی	۳/۵۸	۰/۱۲۸	* ۰/۰۰۱
دیابت+تمرین+ال کارنیتین	۵/۹۸	۰/۱۲۸	* ۰/۰۰۲
گلوکز			
دیابت-ال کارنیتین	-۰/۳۵۳	۰/۱۳۶	۰/۱۰۷
دیابت-تمرین هوازی	۳/۵۸	-۰/۶۸۶	* ۰/۰۰۲
دیابت+تمرین+ال کارنیتین	۵/۹۸	-۰/۳۳۳	* ۰/۰۰۳



شکل ۱- مقادیر گیرنده آپلین در بین گروه‌های تحقیق

انسولین و گلوکز در گروه‌های دیابت+تمرین هوازی و دیابت+تمرین+ال-کارنیتین معنی‌دار بود. مقاومت به انسولین به عنوان مهم‌ترین عامل پیشرفت دیابت نوع ۲ و گسترش عوارض مرتبط با آن شناخته شده است. از طرفی مطالعات نشان داده است که آپلین با مقاومت به انسولین در ارتباط است و با تغییر در سطوح آپلین، سطوح انسولین خون تغییر می‌کند که به نظر می‌رسد آپلین از ترشح انسولین در پانکراس جلوگیری می‌کند. همچنین تمرین‌های بدنی منظم، با تمرین سمپاتیکی و افزایش آدیپوسایتوکین‌های ضد التهابی، در میزان رهایش میانجی‌های التهابی که در ابتلا به بیماری‌های مزمن نقش مهمی دارند، تأثیر دارد. از پژوهش حاضر چنین می‌توان نتیجه گرفت که تمرین هوازی و مصرف مکمل ال-کارنیتین به کاهش گلوکز و مقاومت به انسولین در موش‌های صحرایی دیابتی می‌انجامد و با توجه به کاهش وزن در هر دو گروه فعال، مقاومت به انسولین کاهش یافته است.

به تازگی برخی از مطالعات نشان داده‌اند که تمرین‌های ورزشی موجب افزایش مقادیر گیرنده آپلین در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌شود (۲۱). در این راستا بینیت و همکاران (۲۰۱۸) افزایش معنی‌دار مقادیر آپلین سرم و کاهش مقاومت به انسولین را به دنبال یک دوره فعالیت بدنی طولانی مدت نشان دادند (۲۶). از طرفی پویندجو و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه خود، کاهش معنی‌دار مقادیر آپلین را پس از تمرین‌های منظم هوازی در زنان مبتلا به دیابت نوع ۲ گزارش کردند (۲۳).

در مطالعه حاضر، سطوح انسولین خون پس از ۶ هفته تمرین هوازی به‌طور معناداری کاهش یافت. این تغییر با بررسی رابطه بین عمل سایتوکینی و انسولین قابل توجیه است. فسفریله شدن سریع سوبسترای گیرنده‌ی انسولین (IRS) از سازوکارهای اصلی بروز مقاومت به انسولین است (۱۹). کاهش تولید انسولین موجب بهبود حساسیت به انسولین و کاهش مقاومت به انسولین می‌شود. از طرفی، بسیاری از پژوهشگران بیان کرده‌اند بهبود آمادگی جسمانی ناشی از اثرات فیزیولوژیک تمرین، عامل اساسی بهبود سطح آدیپوسایتوکین‌ها است (۲۰).

همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان‌داد مقادیر گیرنده

آپلین همراه با انجام فعالیت استقامتی و مصرف مکمل ال-کارنیتین در موش‌های دیابتی افزایش یافت. افزایش سطوح بافت قلبی آپلین در دیابت-تمرین هوازی و دیابت+تمرین+ال-کارنیتین معنی‌دار بود، یافته‌های پژوهشی حاضر نشان داد استفاده از مکمل ال-کارنیتین و تمرین هوازی از طریق کاهش آنزیم مهارکننده آنژیوتانسین نوع-۲ گشته و همچنین مقادیر آپلین قلبی و گیرنده آن در بافت قلب، افزایش قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه‌های دیگر داشته است. افزون بر این، در مطالعه حاضر مشاهده شد که اجرای تمرینات هوازی به مدت ۶ هفته و همچنین اجرای پروتکل ترکیبی تمرینات هوازی و مکمل ال-کارنیتین، موجب کاهش معنی‌دار مقاومت به انسولین شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل رگرسیون خطی در مطالعات گذشته نیز نشان داده شد که همبستگی منفی بین محتوای آپلین و گیرنده آپلین نسبت به مقادیر انسولین وجود دارد که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز همسو بوده است. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، تاکنون تنها یک مطالعه در زمینه اثر تمرینات ورزشی بر سیستم آپلینرژیک وجود دارد که با نتایج تحقیق حاضر همسو می‌باشد. در این پژوهش، Zang و همکاران (۲۰۱۴) اثر ۹ هفته تمرین شنا بر آپلین و گیرنده آن در بافت‌های قلبی عروقی موش‌های مبتلا به دیابت را بررسی کردند. در این پژوهش، پژوهشگران، با مطالعه روی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت گزارش دادند که افزایشی در بیان mRNA آپلین در بافت‌های قلبی و عروقی و نیز به‌طور معنی‌دار افزایش در سطح آپلین در پلاسما و عضله قلب و آنورت مشاهده شد. همچنین این محققان نشان دادند که تمرین شنا در طولانی مدت، پائوژنز پرفشارخونی و هایپرتروفی را بهبود می‌بخشد و تنظیم کاهشی سیستم آپلینرژیک قلبی-عروقی تحریک شده توسط دیابت را معکوس می‌کند و در نهایت نشان دادند که بهبود اثر تمرین شنا بر آپلین و گیرنده آن می‌تواند میانجی تنظیم افزایشی سیستم آپلینرژیک عروقی باشد (۲۸). در پژوهشی که توسط Pchejetski و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد، اثر رتینوئیک اسید بر علامت دهی گیرنده آپلین در موش‌های مبتلا به دیابت، بررسی شد. این پژوهشگران بیان کردند آپلین و گیرنده آن در میوکارد و بافت عروق موش‌های مبتلا به

کاهش اکسیداسیون چربی و انباشته شدن اسیدهای چرب و تری گلیسیرید در بافت‌های چربی منجر شود (۲۲). در پژوهش حاضر اثر همزمان تمرین هوازی و مصرف مکمل ال-کارنیتین سبب بهبود شاخص‌های مرتبط با بیماری دیابت در موش‌های دیابتی شد، با این وجود، سازوکار دقیقی که بوسیله آن فعالیت بدنی موجب بهبود دیابت می‌شود به خوبی مشخص نشده است. فعالیت بدنی از طریق کاهش فعالیت عصب سمپاتیک، پیشرفت پرفزیون ارگان‌ها، تنظیم متابولیسم انرژی و تنظیم غذا، موجب تعدیل مقاومت به انسولین می‌شود.

نتیجه‌گیری

آپلین به عنوان آدیپوکاین در پاتولوژی مقاومت به انسولین نقش دارد و تمرین ورزشی منظم به همراه افزایش سطوح آپلین می‌تواند پارامترهای متابولیسمی بیماران دیابتی را بهبود بخشد. این در حالی است که دو سازوکار برای تنظیم حساسیت به انسولین از طریق آپلین پیشنهاد شده است که عبارتند از: کاهش گلوکز توسط آپلین از طریق مسیر سیگنالی مربوط به گیرنده آپلین و فعال‌سازی پروتئین کیناز فعال شونده با آدنوزین منوفسفات و نیتریک اکساید سنتتاز اندوتلیوم نشان داده شده است که عوامل همودینامیکی در مصرف گلوکز نقش دارند، به‌طوریکه رگ‌گشایی موجب افزایش حساسیت به انسولین می‌شود و رگ‌تنگی منجر به کاهش مصرف گلوکز می‌شود. با توجه به این مطلب که تمرینات استقامتی، سازگاری‌های عضله اسکلتی و گسترش حساسیت به انسولین را ایجاد می‌کنند و باعث اکسیداسیون چربی می‌شوند (۱۶) و نیز اکسیداسیون چربی در شدت‌های متوسط ورزش، به اوج می‌رسد و همچنین با دانستن این مطلب که کاهش pH به دنبال تمرین شدید به‌طور بالقوه لیپولیز را کاهش می‌دهد، فرض بر این است که تمرین استقامتی در مقایسه با تمرین‌های شدید، می‌تواند تأثیر بیشتری بر میزان متابولیسم گلوکز، لیپیدها و سیستم آپلینریژیک داشته باشد.

تقدیر و تشکر

از استاد راهنمای اول به خاطر راهنمایی و کمک در

دیابت که از دارونما (۱ میلی‌گرم/کیلوگرم، ناقل ۵۰٪ اینترالیپید، ۴۵٪ سالین، ۵٪ اتانول) استفاده کردند تنظیم منفی (downregulation) شده و حجم آپلین در پلاسما و بافت قلبی عروقی کاهش یافت که ناشی از افزایش آنژیوتانسین نوع II است. آن‌ها بیان داشتند که افزایش در فشارخون و توانایی انقباض عروقی توسط آنژیوتانسین نوع II حاکی از نقص در سیستم آپلین-APJ است (۳۰). از سوی دیگر، با توجه به پژوهش‌های اندک انجام شده در زمینه اثرات فعالیت بدنی بر سیستم آپلینریژیک دو بافت قلب و کلیه، پژوهش حاضر می‌تواند جزء نخستین پژوهش‌هایی باشد که به بررسی همزمان فعالیت بدنی بر سیستم آپلینریژیک بافت قلب در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت می‌پردازد. در پژوهش حاضر، ما نشان دادیم اجرای فعالیت هوازی به تنهایی و یا در ترکیب با مکمل ال-کارنیتین، موجب افزایش سیستم آپلینریژیک بافت قلب گردید به‌طوری که مقادیر گیرنده آپلین در قلب در گروه دیابت+تمرین هوازی و همچنین دیابت+تمرین هوازی+ ال-کارنیتین افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر داشته است. این نتایج ممکن است مسئول برخی از اثرات سودمند ورزش در درمان دیابت باشد، همچنین ما نشان دادیم که سیستم آپلینریژیک بافت‌های قلب در موش‌های مبتلا به دیابت، تا حد زیادی تنظیم منفی شده است و ممکن است به‌طور مستقیم توسط مکانیسم گیرنده‌های آنژیوتانسین تنظیم شود (۱۴). سازوکاری که بوسیله آن سیستم آپلینریژیک بیان و یا ترشح می‌شود، به خوبی شناسایی نشده است و پژوهش‌های بیشتر را لازم می‌نماید.

درباره تأثیر مکمل ال-کارنیتین بر ترکیب بدن، بافت چربی و وزن بدن، پژوهش‌های مختلفی وجود دارد که با توجه به مقدار مصرف مکمل، نوع آزمودنی و روش تحقیق، نتایج متفاوتی داشته است. برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهند مکمل ال-کارنیتین، اکسیداسیون چربی را در آزمودنی‌های دچار اضافه‌وزن سرعت می‌بخشد (۲۱) در حقیقت، مصرف منظم کارنیتین غلظت پلاسمایی و درون سلولی کارنیتین را افزایش می‌دهد و به افزایش اکسیداسیون چربی و کاهش تدریجی ذخایر چربی بدن می‌انجامد. Badrasawi و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که کمبود کارنیتین می‌تواند به

nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Diabetes*. 2012;61:454-462.

16. Kandalam V, Basu R, Abraham T, Wang X, Awad A, Wang W, et al. Early activation of matrix metalloproteinase underlies the exacerbated systolic and diastolic dysfunction in mice lacking TIMP3 following myocardial infarction. *American Journal of Physiology. Heart Circul Physiol*. 2010;299:H1012-H1023.

17. Carnevale D, Cifelli G, Mascio G, Madonna M, Sbruggio M, Perrino C, et al. Placental growth factor regulates cardiac inflammation through the tissue inhibitor of metalloproteinases-3/tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme axis: crucial role for adaptive cardiac remodeling during cardiac pressure overload. *Circulation*. 2011; 124:1337-1350.

18. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genom*. 2004;16:349-360.

19. Marino A, Menghini R, Fabrizi M, Casagrande V, Mavilio M, Stoehr R, et al. ITCH deficiency protects from diet-induced obesity. *Diabetes*. 2014; 63: 550-561.

20. Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujó B, Langa C, Gonzalez-Nunez M, Llano E, et al. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation*. 2012;126:2612-2624.

21. Tieland M, Dirks ML, Van der Zwaluw N, Verdijk LB, Van de Rest O, De Groot, LC, Van Loon LJ. Protein supplementation increases muscle mass gain during prolonged resistance-type exercise training in frail elderly people, A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Med Dir Assoc*. 2012;13,713-719.

22. Badrasawi M, Shahar S, Zahara AM, Nor Fadilah R, Singh DK. Efficacy of L-carnitine supplementation on frailty status and its biomarkers, nutritional status, and physical and cognitive function among prefrail older adults; A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Clin. Interv. Aging*. 2016;11,1675-1686.

23. Pooyandjoo M, Nouhi M, Shab-Bidar S, Djafarian K, Olyaeemanesh A. The effect of carnitine on weight loss in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes. Rev*. 2016;17,970-976.

24. Keller J, Couturier A, Haferkamp M, Most E, Eder K. Supplementation of carnitine leads to an activation of the igf-1/pi3k/akt signalling pathway and down regulates the e3 ligase murf1 in skeletal muscle of rats. *Nutr Metab. (Lond)*. 2013;10,28.

25. Lou PH, Zhang L, Lucchinetti E, Heck M, Affolter A, Gandhi M, et al. Infarct-remodelled hearts with limited oxidative capacity boost fatty acid oxidation after conditioning against ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2013; 97:251-261.

26. Binint S, Hu P, Zhang D, Wang X, Wayment B, Olsen C, et al. Impaired insulin signaling accelerates cardiac mitochondrial dysfunction after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;46:910-918.

27. Azizi Y, Faghihi M, Imani A, Roghani M, Nazari A. Post-infarct treatment with [Pyr1]-apelin-13 reduces myocardial damage through reduction of oxidative injury and nitric oxide enhancement in the rat model of myocardial infarction. *Peptides*. 2017;46:76-82.

28. Zang C, Lairez O, Calise D, Pathak A, Guilbeau-Frugier C, Valet P, et al. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett*. 2014;584:2363-2370.

29. Pisarenko OI, Lankin VZ, Konovalova GG, Serebryakova LI, Shulzhenko VS, Timoshin AA, et al. Apelin-12 and its structural analog enhance antioxidant defense in experimental myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem*. 2014; 391:241-250.

30. Pchejetski D, Foussal C, Alfaro C, Lairez O, Calise D, Guilbeau-Frugier C, et al. Apelin prevents cardiac fibroblast activation and collagen production through inhibition of sphingosine kinase 1. *Eur Heart J*. 2012;33:2360-2369.

انتخاب موضوع و همچنین از مسئولین و دوستان آزمایشگاه رازی تهران به خاطر راهنمایی ها و کمک در انجام پژوهش و از اساتید راهنمای دوم و مشاورین محترم که ما را راهنمایی نمودند و از دانشگاه آزاد که با حمایتهای خود باعث انجام پژوهش مربوطه گردیده سپاسگزاری می نمایم.

References

1. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90:207-258.

2. Fiorentino L, Cavalera M, Menini S, Marchetti V, Mavilio M, Fabrizi M, et al. Loss of TIMP3 underlies diabetic nephropathy via FoxO1/STAT1 interplay. *EMBO Mol Med*. 2013;5:441-455.

3. Casagrande V, Menghini R, Menini S, Marino A, Marchetti V, Cavalera M, et al. Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in macrophages reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscleros Thrombos Vasc Biol*. 2012;32:74-81.

4. Robert, Stöhr, Ben Arpad Kappel, Daniela Carnevale. Effects of Dietary Eicosapentaenoic Acid (EPA) Supplementation in High-Fat Fed Mice on Lipid Metabolism and Apelin/APJ System in Skeletal Muscle. *Mol Metab*. 2018;741-752.

5. Ranjbar Kohan PhD, Saeed Nazifi PhD, Mohammad Reza Tabandeh PhD, and Maryam Ansari Lari PhD. Effect of L-Carnitine Supplementation on Apelin and Apelin Receptor (Apj) Expression in Cardiac Muscle of Obese Diabetic Rats. *Cell J*. 2018 Autumn. 20(3): 427-434.

6. Attane C, Foussal C, Le Gonidec S, Benani A, Daviaud D, Waneq E, et al. Apelin treatment increases complete fatty acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes*. 2012;61:310-320.

7. Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Kunduzova O, Valet P. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23:234-241.

8. Chandrasekaran B, Kalra PR, Donovan J, Hooper J, Clague JR, McDonagh TA. Myocardial apelin production is reduced in humans with left ventricular systolic dysfunction. *J Cardiac Fail*. 2010; 16:556-561.

9. Wang W, McKinnie SM, Patel VB, Haddad G, Wang Z, Zhabyeyev P, et al. Loss of apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic apelin analogues. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:-000249.

10. Scimia MC, Hurtado C, Ray S, Metzler S, Wei K, Wang ., et al. APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. *Nature*. 2012;488:394-398.

11. Tempel D, de Boer M, van Deel ED, Haasdijk RA, Duncker DJ, Cheng C, et al. Apelin enhances cardiac neovascularization after myocardial infarction by recruiting aplnrp circulating cells. *Circul Res*. 2012;111:585-598.

12. Li L, Zeng H, Chen JX. Apelin-13 increases myocardial progenitor cells and improves repair postmyocardial infarction. *American Journal of Physiology. Heart Circul Physiol*. 2012;303:H605-H618.

13. Spinale FG, Zile MR. Integrating the myocardial matrix into heart failure recognition and management. *Circul Res*. 2013; 113:725-738.

14. Carnevale D, Lembo G. Placental growth factor and cardiac inflammation. *Trends Cardiovasc Med*. 2012;22:209-212.

15. Menghini R, Casagrande V, Menini S, Marino A, Marzano V, Hribal ML, et al. TIMP3 overexpression in macrophages protects from insulin resistance, adipose inflammation, and