

## تأثیر ترکیب تمرین تناوبی شدید و داروی متفورمین بر بیان ژن‌های مایوژنین و مایواستاتین در عضله‌ی اسکلتی موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو

زهرا بدری<sup>۱</sup>، مریم دلفان<sup>۱\*</sup>، سعید دانش‌یار<sup>۲،۳</sup>

### چکیده

**مقدمه:** مایوژنین و مایواستاتین عواملی هستند که به ترتیب در رشد و تحلیل عضلانی نقش دارند. هدف از این پژوهش بررسی اثر توأم تمرین تناوبی شدید و داروی متفورمین بر بیان این دو عامل یعنی مایوژنین و مایواستاتین در عضله‌ی اسکلتی موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو بود.

**روش‌ها:** ۲۵ موش سوری نژاد C57BL/6 به دو گروه کنترل (پنج سر) و غذای پرچرب (۲۰ سر) تقسیم شدند. موش‌های گروه غذای پرچرب به مدت ۱۶ هفته با غذای پرچرب تغذیه شدند. پس از ۱۶ هفته، موش‌هایی که قند خون بالای ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر داشتند به عنوان موش‌های دیابتی (نوع دو) انتخاب شدند. سپس موش‌های دیابتی شده (۲۰ سر) به چهار گروه تقسیم شدند: گروه دیابتی کنترل (پنج سر)، دیابتی-متفورمین (پنج سر)، دیابتی-تمرین تناوبی شدید (پنج سر)، دیابتی-تمرین تناوبی شدید (پنج سر). موش‌ها به مدت هشت هفته تحت مداخله قرار گرفتند. از روش Real-Time-PCR برای سنجش بیان ژن مایوژنین و مایواستاتین در عضله‌ی راست رانی استفاده شد.

**یافته‌ها:** تمرین تناوبی شدید (اما نه متفورمین) در بیان مایوژنین تأثیر افزایشی داشت ( $P=0/05$ )؛ متفورمین تأثیر معنی‌داری در بیان مایواستاتین نداشت ( $P=0/45$ )، با این حال تمرین تناوبی شدید، بیان مایواستاتین را کاهش داد ( $P=0/01$ )، متفورمین تأثیر افزایشی یا کاهش‌دهنده در تغییر بیان مایواستاتین ناشی از تمرین تناوبی شدید نداشت ( $P=0/95$ ).

**نتیجه‌گیری:** داروی متفورمین احتمالاً تأثیر منفی یا مثبتی بر اثر تمرین تناوبی شدید در افزایش بیان مایوژنین و کاهش بیان مایواستاتین در موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو نمی‌گذارد.

**واژگان کلیدی:** تمرین ورزشی، متفورمین، دیابت نوع دو، آتروفی عضلانی

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

۲- گروه تربیت بدنی، دانشکده‌ی علوم انسانی، دانشگاه آیت‌اله بروجردی، لرستان، ایران

۳- گروه تربیت بدنی، دانشگاه صنعتی همدان، همدان، ایران

\* **نشانی:** تهران، خیابان ده ونک، میدان شیخ بهایی، دانشگاه الزهراء، دانشکده‌ی علوم ورزشی، کدپستی: ۱۹۹۳۸۹۳۹۷۳، تلفن: ۰۲۱۸۵۶۹۲۶۶۸،

نمبر: ۰۲۱۸۸۰۳۵۱۸۷، پست الکترونیک: m.delfan@alzahra.ac.ir

## مقدمه

دیابت نوع دو بیماری است که با عوارض متعددی همراه می‌شود. یکی از عوارض این بیماری، آتروفی عضلانی است. مطالعات به وضوح نشان داده‌اند که بر اثر دیابت نوع دو، عضله‌ی اسکلتی دچار آتروفی می‌شود [۱]. در همین راستا، مطالعات در سطح سلولی مولکولی نشان داده‌اند که بیان برخی از عوامل مربوط به رشد عضلانی بر اثر این بیماری تغییر می‌یابد. دو عاملی درون سلولی که متأثر از دیابت می‌شوند و در رشد و نمو عضلانی نقش مهمی دارند، مایوژنین و مایوآستاتین هستند. مطالعات اثبات کرده‌اند که در عضله‌ی اسکلتی بیماران دیابتی، بیان مایوژنین کاهش و بیان مایوآستاتین افزایش می‌یابد [۹-۲]. مایوژنین عاملی است که از طریق تنظیم نمو سلول‌های عضلانی (تمایز مایوبلاست به مایوتیوب) در رشد عضلانی نقش دارد [۱۰] و مایوآستاتین از خانواده‌ی عامل رشد تبدیل‌کننده است. (Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )). این عامل از طریق مهار تکثیر و تمایز سلول‌های عضلانی و فعال کردن سازکارهای درون سلولی همچون SMAD (*Small Mothers Against Decapentaplegic*) موجب تحلیل عضلانی می‌شود [۱۱].

به‌منظور مقابله با عوارض ناشی از دیابت همچون آتروفی عضلانی دو روش درمانی پیشنهاد می‌شود: دارودرمانی و تمرین‌های منظم ورزشی. داروی متفورمین داروی مهمی است که در اولین ردیف تجویز دارویی برای کنترل قند خون بیماران دیابتی تجویز می‌شود [۱۲]. اثر داروی متفورمین بر نمایه‌ی عضلات اسکلتی ضد و نقیض است؛ برخی از مطالعات نقش محافظتی آن در مقابل افت عضلانی ناشی از پیری، چاقی و بی‌حرکی را نشان داده‌اند [۱۵-۱۳] و برخی دیگر نقش منفی این دارو را در رشد عضلانی نشان داده‌اند [۱۷، ۱۶]. مشابه با این یافته‌های متناقض، یافته‌های مطالعات در مورد اثر داروی متفورمین بر بیان عوامل دخیل در رشد عضلانی نیز همسو نیستند. به‌عنوان مثال، برخی از این مطالعات افزایش بیان مایوژنین [۴، ۱۳]، برخی کاهش بیان مایوژنین [۱۸، ۴] و برخی

عدم تغییر آن را [۱۹] در سلول و بافت عضلانی گزارش کرده‌اند.

روش درمانی بعدی که در کنترل بیماری دیابت نوع دو و بهبود عوارض آن نقش مؤثری دارد، تمرین‌های ورزشی است [۲۰-۲۲]. اثبات شده است که تمرین ورزشی موجب هایپرتروفی عضلانی می‌شود و از آتروفی عضلانی ناشی از بیماری‌های مختلف همچون پیری و دیابت جلوگیری می‌کند [۲۳]. مطابق با این تأثیر، مطالعات نشان داده‌اند که تمرین‌های ورزشی، بیان عوامل مربوط به رشد و نمو عضلانی را تقویت می‌کنند و بیان عوامل مربوط به تحلیل عضلانی را مهار می‌کنند [۲۳]. در خصوص دو عامل مایوژنین و مایوآستاتین، مطالعات گزارش کرده‌اند که تمرین‌های ورزشی، موجب القاء بیان مایوژنین و مهار بیان مایوآستاتین در عضلات اسکلتی می‌شوند [۲۵، ۲۴، ۸، ۶]. یکی از مدل‌های تمرین ورزشی که در دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است و به‌عنوان جایگزین تمرین‌های هوازی (استقامتی تداومی با شدت متوسط) مطرح شده است، تمرین‌های تناوبی شدید (High Intensity Interval Training) است [۲۲، ۱۱]. مطالعات نشان می‌دهند که این نوع تمرین‌ها، نقش مثبتی در تحریک آنابولیسم عضلانی دارند [۲۶-۲۸] و از آتروفی ناشی از پیری (سارکوپنیا) جلوگیری می‌کنند [۲۹]. در خصوص مایوژنین و مایوآستاتین، مطالعات محدودی گزارش کرده‌اند که تمرین تناوبی شدید موجب افزایش بیان مایوژنین و کاهش بیان مایوآستاتین در عضلات اسکلتی می‌شود [۳۱، ۳۰]. با این وجود، اثر تمرین‌های تناوبی شدید بر رشد عضلات اسکلتی و عوامل مربوط به آن (همچون مایوژنین و مایوآستاتین) در بیماران دیابتی نوع دو کمتر مطالعه شده است. Kordi و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند که پنج هفته تمرین تناوبی شدید، موجب تعدیل بیش‌تنظیمی بیان ژن‌های آتروژن و مایوآستاتین در عضله‌ی اسکلتی رت‌های دیابتی شد [۳۲].

تاکنون مطالعه‌ای تأثیر ترکیبی داروی متفورمین و تمرین ورزشی را بر بیان عوامل درگیر در رشد عضلانی همچون مایوژنین و مایوآستاتین، بررسی نکرده است. بنابراین در این پژوهش، اثر ترکیبی تمرین تناوبی شدید و داروی متفورمین بر بیان مایوژنین

تناوبی شدید، علاوه بر مصرف غذای پُرچرب، به مدت هشت هفته تحت مداخله‌ی داروی متفورمین و تمرین تناوبی شدید قرار گرفتند.

### القاء دیابت نوع دو

موش‌ها از طریق مصرف غذای پُرچرب به دیابت نوع دو مبتلا شدند که برای این منظور به مدت ۱۶ هفته با غذای پُرچرب تغذیه شدند [۳۳]. سپس قند خون موش‌ها اندازه‌گیری شد و قند خون ناشتایی بالای ۲۰۰ میلی‌گرم بی‌دسی‌لیتر به‌عنوان معیار دیابت نوع دو لحاظ شد. در ادامه‌ی مداخله‌ی پژوهش (یا فاز دوم مداخله) که هشت هفته به طول انجامید، موش‌ها رژیم غذای پُرچرب را برای حفظ بیماری ادامه دادند.

### غذای پُرچرب

غیر از موش‌های گروه کنترل، همه‌ی موش‌های گروه‌های مورد پژوهش به مدت ۲۴ هفته (۱۶ هفته در فاز اول و هشت هفته در فاز دوم) غذای پُرچرب مصرف کردند. ترکیب غذای پُرچرب شامل ۴۵ درصد کیلوکالری چربی، ۳۵ درصد کیلوکالری کربوهیدرات و بیست درصد کیلوکالری پروتئین بود. مجموع کالری برابر با ۴/۷۳ کیلوکالری بر گرم بود [۳۴]. موش‌های گروه کنترل با غذای استاندارد موش‌ها تغذیه شدند که شامل ۱۵ درصد کیلوکالری چربی، ۲۵ درصد کیلوکالری پروتئین و ۶۰ درصد کیلوکالری کربوهیدرات بود. مجموع کالری غذای استاندارد برابر با ۳/۸۰ کیلوکالری بر گرم بود [۳۵].

### داروی متفورمین

داروی متفورمین از شرکت داروسازی عبیدی (ایران) تهیه شد و قبل از پلت کردن غذا به میزان ۲/۵ گرم بر کیلوگرم به غذای پُرچرب موش‌ها افزوده شد [۳۶]. به این ترتیب، موش‌های گروه‌های دیابت متفورمین و دیابت متفورمین-تمرین تناوبی شدید، در فاز دوم مداخله‌ی پژوهش به همراه خوردن غذای پُرچرب، داروی متفورمین مصرف کردند.

و مایواستاتین در عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابت نوع دو مورد بررسی قرار گرفت.

## روش‌ها

### آزمودنی‌های تحقیق

۲۵ سر موش سوری نر نژاد C57BL/6 با سن یک هفته و با وزن تقریبی ۱۰ گرم از مرکز انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. روش نگهداری و اعمال مداخله در مورد آزمودنی‌های حیوانی این پژوهش براساس دستورالعمل کمیته‌ی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی و تأییدیه‌ی کمیته‌ی اخلاق پژوهش‌کننده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی (شماره: IR.SSRI.REC.1400.1352) بود. نمونه‌ها تحت چرخه‌ی خواب و بیداری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و در دمای  $22 \pm 3$  درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد نگهداری می‌شدند. در طول نگهداری حیوانات، آب و غذای استاندارد موش به میزان دل‌خواه در اختیار آنها گذاشته می‌شد. پس از همسان‌سازی وزن، موش‌ها به‌صورت تصادفی به دو گروه: ۱- کنترل (پنج سر) و ۲- تغذیه‌ی پُرچرب (۲۰ سر) تقسیم شدند. به موش‌های گروه کنترل، غذای معمولی و به موش‌های گروه غذای پُرچرب، به مدت ۱۶ هفته غذای پُرچرب داده شد. پس از گذشت ۱۶ هفته از این مداخله، قند خون ناشتای موش‌های گروه پُرچرب اندازه‌گیری شد و موش‌های با قند خون بالای ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان «موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو» برگزیده شدند (همه‌ی ۲۰ موش مبتلا شده بودند). سپس موش‌های دیابتی به‌صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل دیابتی (پنج سر)، ۲- گروه دیابتی-متفورمین (پنج سر)، ۳- گروه دیابتی-تمرین تناوبی شدید (پنج سر)، ۴- گروه دیابتی-متفورمین-تمرین تناوبی شدید (پنج سر).

موش‌های گروه دیابت کنترل، مصرف غذای پُرچرب را به مدت هشت هفته دیگر ادامه دادند. موش‌های گروه دیابت متفورمین علاوه بر مصرف غذای پُرچرب، هشت هفته داروی متفورمین مصرف کردند. موش‌های گروه دیابت-تمرین تناوبی شدید، علاوه بر مصرف غذای پُرچرب به مدت هشت هفته تحت تمرین تناوبی شدید قرار گرفتند و موش‌های گروه دیابت-متفورمین-

### تمرین تناوبی شدید

تمرین تناوبی شدید، به مدت هشت هفته، هفته‌ای پنج جلسه بروی تردمیل ویژه‌ی موش (در شیب صفر درجه) انجام شد. پروتکل تمرین شامل وهله‌های چهار دقیقه‌ای دویدن سریع با شدت ۹۰ درصد سرعت در اوج اکسیژن مصرفی ( $vVo2peak$ ) به همراه دو دقیقه ریکاوری با شدت شدت ۷۰ درصد سرعت در اوج اکسیژن مصرفی در بین وهله‌های شدید بود. در هفته‌های اولیه مداخله، تمرین در چهار وهله انجام شد که به تدریج تا هفته‌های نهایی تعداد وهله‌ها افزایش یافت به طوری که در هفته هشتم، تمرین در هفت وهله انجام شد. هر جلسه تمرین تناوبی شدید با احتساب وهله‌های دویدن سریع و ریکاوری، در هفته‌های اولیه به مدت ۲۶ دقیقه و در هفته‌های پایانی به مدت ۳۶ دقیقه به طول انجامید که با پنج دقیقه گرم کردن (در شروع تمرین) و با پنج دقیقه سرد کردن (در پایان تمرین) همراه می‌شد [۳۷].

اندازه‌گیری سرعت در اوج اکسیژن مصرفی ( $vVo2peak$ ): در شروع پروتکل تمرین و هر دو هفته یک بار تست ورزشی فزاینده بروی تردمیل (در شیب صفر درجه) انجام می‌شد و براساس آن سرعت در اوج اکسیژن مصرفی به دست می‌آمد و شدت تمرین براساس آن باز تنظیم می‌شد. این تست شامل وهله‌های دو دقیقه‌ای دویدن بروی تردمیل با شیب صفر درجه است که در هر مرحله، دو متر بر دقیقه بر سرعت وهله‌ی قبلی افزوده می‌شود. نقطه پایان زمانی است که موش‌ها قادر نباشند در سرعت افزوده شده بیش از ۱۰ ثانیه بدونند [۳۸].

### اندازه‌ی وزن بدن

وزن موش‌ها به صورت هفتگی با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۱ (ساخت ژاپن) اندازه‌گیری شد.

**جراحی و استخراج بافت:** ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین و پس از یک شب ناشتایی، موش‌ها از طریق تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند [۳۹]. پس از بی‌هوشی، به هنگام

تشریح، خون از طریق سرنگ هپارینی شده، از قلب موش‌ها کشیده شد و در تیوب‌های EDTA قرار گرفت. سپس از طریق سانتریفوژ (به مدت ۱۰ دقیقه، با سرعت چرخش ۳۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) پلاسما از خون جدا شد و در دمای ۸۰- فریز شد. همچنین، عضله‌ی چهار سر رانی (*Quadriceps muscle*) موش‌ها با دقت برداشته شد و پس از وزن‌کشی با ترازوی Radwag (با دقت ۰/۰۱ میلی‌گرم) در داخل میکروتیوب قرار گرفت و سپس در یخچال (۸۰-) فریز شدند.

### سنجش مقاومت انسولین

گلوکز پلاسما به روش گلوکز اکسیداز اندازه‌گیری شد (کیت شرکت پارس آزمون) و انسولین پلاسما به روش الایزا بر اساس دستورالعمل کیت (*10-1247-01; Mercodia, Uppsala, Sweden*) اندازه‌گیری شد.

به منظور سنجش مقاومت انسولینی از مدل ارزیابی هموستاتیک مقاومت به انسولین (HOMA-IR) استفاده شد که معادله آن بدین صورت است:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{غلظت انسولین ناشتایی (میکروبیونیت بر میلی‌لیتر)} \times \text{غلظت گلوکز ناشتایی (میلی‌مول بر لیتر)}}{22.5}$$

### سنجش میزان بیان ژن

**طراحی و سنتز پرایمر:** توالی پرایمر ژن‌های مایوژنین و مایواستاتین و ژن خانه گردان GAPDH به عنوان ژن کنترل از مطالعات گذشته اخذ شد. سپس ویژگی و کیفیت پرایمر توسط سایت بلست پرایمر (*primer-blast/NCBI*) و امکان تشکیل ساختارهای دایمر و سنجاج سر توسط نرم‌افزار *اولیگوآنالیزور (Oligo Analyzer - 1.0.2)* بررسی و مورد تأیید قرار گرفت. پرایمرها توسط شرکت پیشگام (ایران) سنتز شد. مشخصات پرایمرها در جدول ۱ ذکر شده است.

**استخراج RNA:** بافت چربی طبق دستورالعمل کیت ترایزول (*Thermo Scientific/آزما*) استخراج شد. به طور خلاصه: ۵۰ میلی‌گرم از نمونه بافت چربی، پس از افزودن یک میلی‌لیتر محلول ترایزول، از طریق دستگاه هم‌زن هم‌وزن شد.

مخلوط واکنش شامل سه میکرولیتر cDNA (۱۰ درصد)، نیم میکرولیتر پرایمر رفت (غلظت ۱۰ پیکومول)، نیم میکرولیتر پرایمر معکوس (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱۰ میکرولیتر سایبرپریمیکس، نیم میکرولیتر رنگ مرجع روکس و آب مقطر بود. سپس از طریق دستگاه کوربت (RG-6000, Corbett, Australia)، با برنامه‌ی زمانی ذیل تکثیر انجام شد و هم‌زمان پایش صورت گرفت.

مرحله‌ی اول: واسرشت‌سازی اولیه: ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه ی سانتی‌گراد

مرحله‌ی دوم: واسرشت-اتصال-گسترش؛ ۴۰ چرخه: (۱) ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد؛ (۲) ۶۰ ثانیه در دمای ۵۷/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد

مرحله‌ی سوم: به‌منظور ترسیم دمای ذوب، در انتها یک مرحله ی واکنشی شامل ۴۰ ثانیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد اضافه شد. کمی‌سازی میزان بیان ژن: تغییرات بیان ژن براساس «چند برابر» (Fold Change) محاسبه شد. در ابتدا کارایی پرایمرها و PCR (PCR Efficiency) توسط نرم‌افزار LinRegPCR به‌صورت مجزا محاسبه شد. منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت و نمونه‌هایی که نمودار آنها منطبق با الگو نبود، کنار گذاشته شدند. از طریق معادله Pffafli، بیان نسبی ژن محاسبه شد (Genex16.1).

بافت هموزن شده در دوره‌های متفاوت سانتریفوژ شد که محصول آن تشکیل رسوب حاوی RNA بود که پس از اضافه کردن آب دیس (سفیر آزما/Thermo Scientific) به‌مدت ۱۰ دقیقه درون دستگاه ترموبلاک (KiagenTech, Canada) در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد آنکوبه شد.

قرائت غلظت RNA: خلوص (در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر) و غلظت (در طول موج ۲۶۰ نانومتر) RNA استخراج شده توسط دستگاه طیف‌سنجی نور (Pharmacia Biotech) (Ultraspec 3000) از طریق فرایند جذب نوری (OD) تعیین شد. خلوص بیشتر از ۱/۶ مورد قبول واقع شد.

سنتز cDNA: RNA استخراج شده در مرحله قبل، به روش رونویسی معکوس، توسط دستورالعمل کیت سنتز cDNA (04897030001; Roche, Switzerland) به DNAی مکمل تبدیل شد. در طی این مرحله، مواد ذیل به‌کار گرفته شد: رندم هگزامر (Random Hexamer)، مهارکننده‌ی RNAase، آنزیم رونویس معکوس (Revert Aid)، بافر و بازهای سازنده‌ی DNA (dNTPs).

واکنش Real Time RT-PCR: برای انجام مراحل Real Time-RT-PCR از کیت RT-PCR Master Mix (Amplicon, Denmark) استفاده شد. واکنش‌ها به‌صورت دوتایی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در پلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام شدند.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای ژن‌های مورد پژوهش

| نام ژن                     | شماره دستیابی (Accession) | توالی رفت (Forward) 5'→3' | توالی معکوس (Reverse) 5'→3' | اندازه قطعه‌ی تکثیر (bp) | منبع |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|------|
| مایوژنین (Myogenin) (Myog) | NM_031189.2               | CAACCCAGGAGATCATTTCG      | CATATCCTCCACCGTGATGC        | ۹۷                       | [۴۰] |
| مایواستاتین (Mstn)         | NM_010834.3               | GCACTGGTATTTGGCAGAGT      | TTCAGCCCATCTTCTCCTGG        | ۱۵۴                      | [۱۶] |
| ژن کنترل (Gapdh)           | NM_001289726.1            | GTGTTCTACCCCAATGTG        | CCTGCTTACCACCTTCTTG         | ۹۳                       | [۱۶] |

## روش‌های آماری

از آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk) برای نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. به منظور مقایسه‌ی وزن آزمودنی‌ها در گروه‌های پژوهش از آزمون تحلیل واریانس یک سویه (One Way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد (SPSS22). برای بررسی اثر متفورمین، اثر تمرین تناوبی شدید و اثر برهم کنش متفورمین و تمرین بر بیان ژن‌های مایوژنین و مایواستاتین از آزمون تحلیل واریانس دوسویه (Two-Way ANOVA) استفاده شد (Genex16.1) و برای مقایسه میزان بیان ژن‌های مایوژنین و مایواستاتین در گروه‌های مورد پژوهش از تحلیل واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد (Genex16.1). سطح معنی‌داری برای آزمون‌های آماری  $P \leq 0.05$ .

در نظر گرفته شد. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار گراف پد (*prism 8; GraphPad, USA*) استفاده شد.

## یافته‌ها

داده‌های میزان گلوکز و انسولین پلاسما در گروه‌های مورد پژوهش در جدول ۲ درج شده است. داده‌های این جدول نشان می‌دهد که میزان گلوکز و انسولین و همچنین مقاومت انسولینی (براساس مدل HOMA) گروه کنترل دیابت در قیاس با گروه کنترل سالم افزایش بسیار زیادی یافته است ( $P < 0.001$ ) و داروی متفورمین و تمرین تناوبی شدید، این بیش تنظیمی در میزان گلوکز، انسولین و مقاومت انسولینی را تعدیل کرده‌اند ( $P < 0.001$ ).

جدول ۲- مقادیر گلوکز و انسولین پلاسما در گروه‌های مورد پژوهش

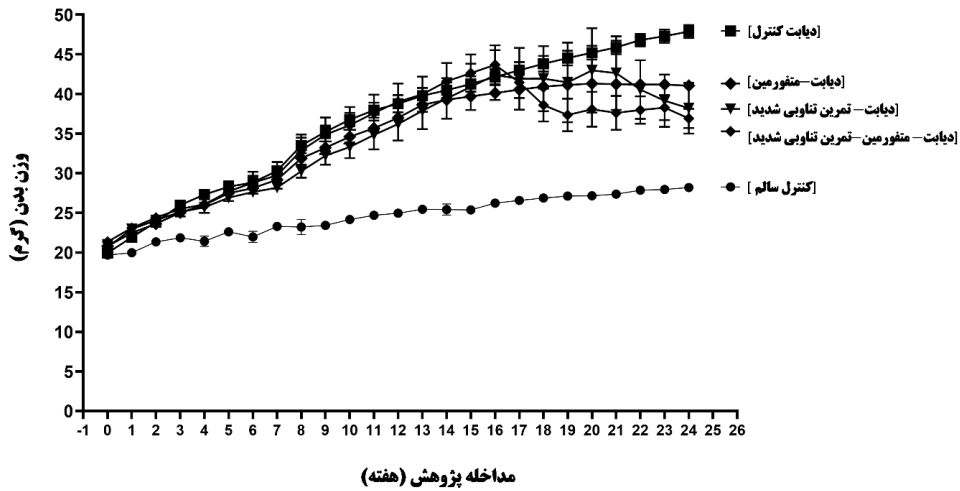
| کنترل سالم                                    | کنترل دیابتی  | دیابتی - متفورمین | دیابتی - تمرین | دیابتی - متفورمین - تمرین تناوبی شدید |
|---|---------------|-------------------|----------------|---------------------------------------|
| ۱۱۹±۱/۴ (mg/dL)                               | ۲۸۰±۳/۲***    | ۱۸۴±۳/۶†††        | ۱۶۹±۴/۹۱†††    | ۱۵۰±۳/۰†††                            |
| ۸/۱۱±۰/۸۲ (μU/mL)                             | ۳۶/۴۳±۲/۳۶*** | ۱۱/۴۵±۱/۰۷†††     | ۱۲/۰۴±۱/۰۵†††  | ۱۰/۳۸±۱/۰۳†††                         |
| ۲/۳۹±۰/۵۱                                     | ۲۵/۲۳±۲/۹۴*** | ۵/۲۳±۰/۸۶†††      | ۵/۰۵±۰/۷۱†††   | ۳/۸۶±۰/۷۲†††                          |
| ارزیابی هموستاتیک مقاومت به انسولین (HOMA-IR) |               |                   |                |                                       |

مصرف مداوم غذای پُرچرب بود. از هفته ۱۶ به بعد، افزایش وزن موش‌های دیابتی مورد مداخله با داروی متفورمین و تمرین تناوبی شدید در قیاس با گروه دیابتی کنترل، رو به کاهش گذاشت.

مقایسه‌ی وزن موش‌های گروه‌های تحقیق در پایان دوره‌ی پژوهش نشان داد (شکل ۲) که وزن موش‌های گروه دیابتی کنترل (۴۷ گرم) بسیار بالاتر از گروه کنترل سالم (۲۸ گرم) بود ( $P < 0.001$ )؛ و وزن موش‌های گروه‌های «دیابتی-متفورمین»، «دیابتی-تمرین تناوبی شدید» و «دیابتی-متفورمین-تناوبی شدید» در قیاس با گروه کنترل دیابتی کمتر بود ( $P < 0.05$ ).

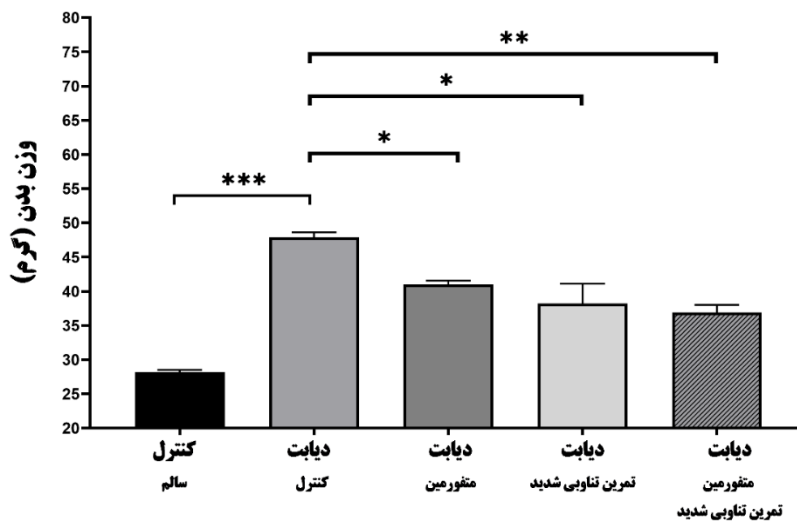
نتایج حاصل از پژوهش تجربی بر روی ۲۵ سر موش سوری نر نژاد C57BL/6 با پنج گروه (هر گروه: ۵ سر) بود. تحلیل آماری از طریق آزمون تحلیل واریانس یک سویه و آزمون تعقیبی توکی انجام شده است. \*\*\* بیان گر اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) نسبت به گروه کنترل سالم، ††† بیانگر اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) نسبت به گروه دیابتی کنترل است.

افزایش وزن موش‌های گروه مورد پژوهش طی پروتکل تحقیق که ۲۴ هفته به طول انجامید در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان افزایش وزن موش‌های دیابت کنترل در طول دوره‌ی پژوهش در قیاس با گروه کنترل سالم بسیار بیشتر بود که به دلیل



شکل ۱- تغییرات وزن بدن موش‌های گروه‌های مورد پژوهش طی دوره‌ی مداخله تحقیق

داده‌های نمودار به صورت «میانگین ± خطای استاندارد از میانگین» ارائه شده‌اند. آزمودنی‌های این پژوهش شامل ۲۵ سر موش سوری نر نژاد C57BL/6 با پنج گروه مورد پژوهش (هر گروه: ۵ سر) بود.

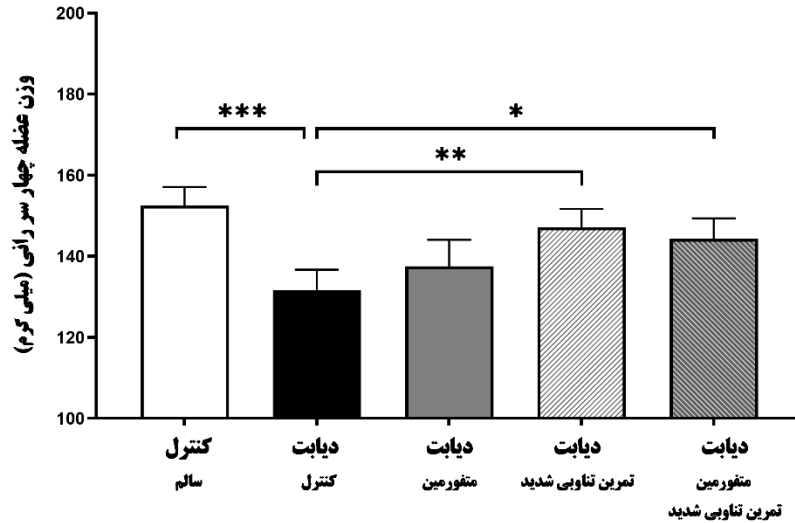


شکل ۲- مقایسه‌ی وزن بدن موش‌های گروه‌های مورد پژوهش پس از پایان مداخله‌ها

داده‌های نمودار به صورت «میانگین ± خطای استاندارد از میانگین» ارائه شده‌اند. آزمودنی‌های این پژوهش شامل ۲۵ سر موش سوری نر نژاد C57BL/6 با پنج گروه مورد پژوهش (هر گروه: ۵ سر) بود. تحلیل آماری از طریق تحلیل واریانس یک سویه با آزمون تعقیبی توکی انجام شده است. \* بیانگر  $P < 0.05$ ، \*\* بیانگر  $P < 0.01$ ، \*\*\* بیانگر  $P < 0.001$  است.

در موش‌های دیابتی که تحت تمرین تناوبی شدید قرار گرفتند بیشتر از گروه دیابتی کنترل بود ( $P < 0.05$ ) که حاکی از این است که تمرین تناوبی شدید از افت عضلانی ناشی از دیابت تا حدی پیشگیری کرده است.

مقایسه‌ی وزن عضله‌ی چهار سر رانی در گروه‌های مورد تحقیق در شکل ۳ نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد که وزن این عضله در گروه دیابتی کنترل، کمتر از گروه کنترل سالم بود ( $P < 0.001$ ) که دلالت بر افت عضلانی ناشی از دیابت دارد. همچنین این نمودار نشان می‌دهد که وزن عضله‌ی چهار سر رانی

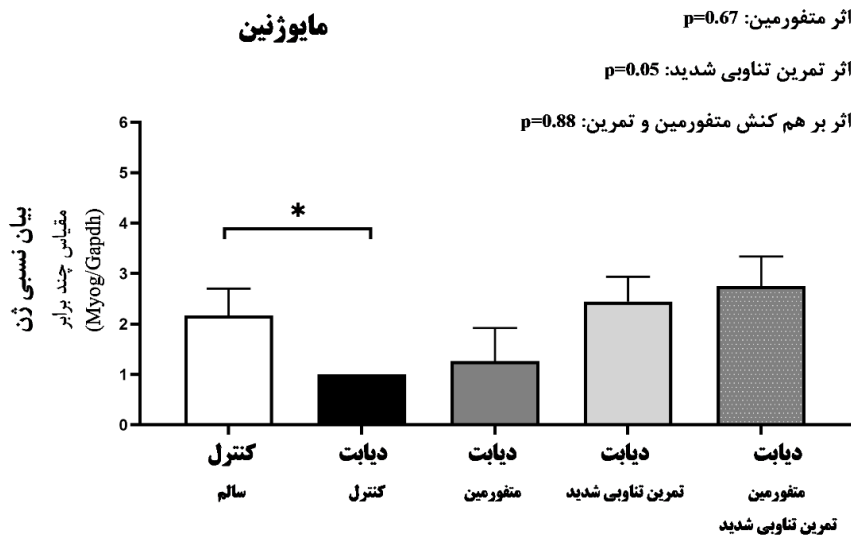


شکل ۳- مقایسه‌ی وزن عضله‌ی چهارسر رانی موش‌های گروه‌های مورد پژوهش پس از پایان مداخله

داده‌های نمودار به صورت «میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین» ارائه شده‌اند. آزمودنی‌های این پژوهش شامل ۲۵ سر موش سوری نر نژاد C57BL/6 با پنج گروه مورد پژوهش (هر گروه: ۵ سر) بود. تحلیل آماری از طریق تحلیل واریانس یک سویه با آزمون تعقیبی توکی انجام شده است. \* بیانگر  $P < 0.05$ ، \*\* بیانگر  $P < 0.01$ ، \*\*\* بیانگر  $P < 0.001$  است.

همچنین، نتایج آزمون تحلیل واریانس یک سویه نشان داد که میزان بیان ژن مایوژنین در گروه‌های مورد پژوهش تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت ( $P > 0.05$ ).

شکل ۴ میزان بیان ژن مایوژنین را در گروه‌های مورد پژوهش نشان می‌دهد. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوسویه نشان داد که تنها اثر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن مایوژنین معنی‌دار بود



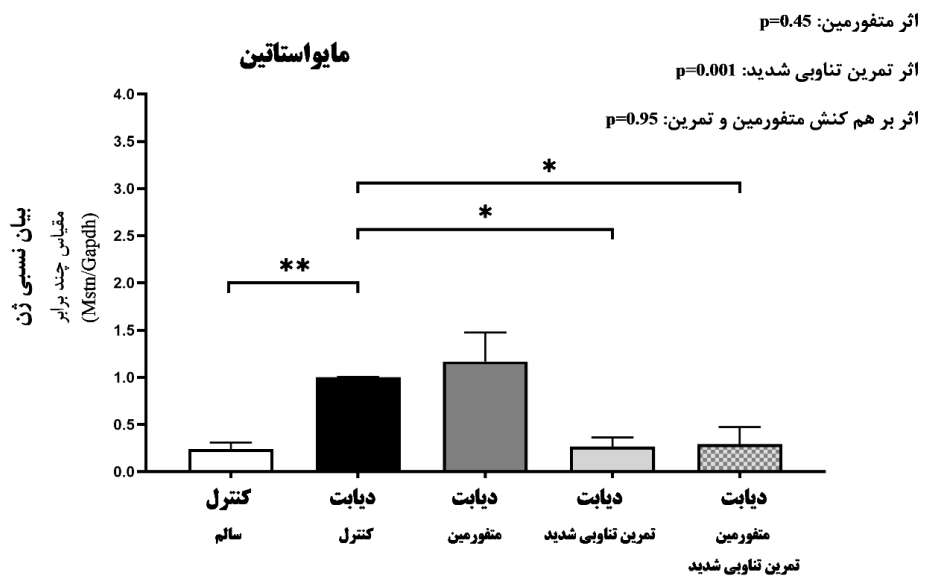
شکل ۴- بیان نسبی ژن مایوژنین در گروه‌های مورد پژوهش

داده‌های بیان ژن براساس معیار چند برابر تعیین شده‌اند. داده‌های نمودار به صورت «میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین» نمایش داده شده‌اند. آزمودنی‌های این پژوهش شامل ۲۵ سر موش سوری نر نژاد C57BL/6 با پنج گروه مورد پژوهش (هر گروه: ۵ سر) بود. نتایج آزمون تحلیل واریانس دو طرفه در بالای نمودار ارائه شده است.



ژن مایواستاتین در گروه کنترل دیابتی در قیاس با گروه کنترل سالم بالاتر بود ( $P=0/01$ )، و میزان بیان این ژن در گروه دیابتی که تمرین تناوبی شدید داشتند در مقایسه با گروه دیابتی کنترل، کمتر بود که دلالت بر نقش کاهنده و تعدیل کننده‌ی تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن مایواستاتین در موش‌های دیابتی دارد ( $P<0/05$ ).

شکل ۵ میزان بیان ژن مایواستاتین را در گروه‌های مورد پژوهش نشان می‌دهد. نتایج آزمون تحلیل واریانس دو سویه نشان داد که اثر تمرین تناوبی شدید (و نه داروی متفورمین) در بیان ژن مایواستاتین معنی‌دار بود ( $P=0/01$ ) و این که تمرین تناوبی شدید و داروی متفورمین اثر برهم‌کنش نداشتند ( $P=0/94$ ). همچنین نتایج آزمون تحلیل واریانس یک سویه نشان داد که بیان



شکل ۴- بیان نسبی ژن مایواستاتین در گروه‌های مورد پژوهش

داده‌های بیان ژن براساس معیار چند برابر تعیین شده‌اند. داده‌های نمودار به صورت «میانگین ± خطای استاندارد از میانگین» نمایش داده شده‌اند. آزمودنی‌های این پژوهش شامل ۲۵ سر موش سوری نر نژاد C57BL/6 با پنج گروه مورد پژوهش (هر گروه: ۵ سر) بود. نتایج آزمون تحلیل واریانس دو طرفه در بالای نمودار ارائه شده است. نتایج آزمون تعقیبی توکی در بالای ستون‌ها نشان داده شده است \* بیانگر  $P<0/05$ ، \*\* بیانگر  $P<0/01$  است.

مایوژنین و کاهش بیان مایواستاتین ناشی از تمرین تناوبی شدید، ایجاد نکرد.

یافته‌های این پژوهش در خصوص وزن بدن نشان می‌دهد که وزن موش‌های دیابتی در قیاس با گروه کنترل سالم نزدیک به دو برابر بیشتر بود (۴۷ گرم در قیاس با ۲۷ گرم). این یافته حاکی از این هست که ۲۴ هفته تغذیه‌ی پُرچرب موجب چاقی بارز موش‌ها شده است. همچنین، ارزیابی قند ناشتایی پلاسما پس از پایان دوره‌ی پژوهش نشان می‌دهد که قند خون موش‌های دارای تغذیه‌ی پُرچرب در مقایسه با گروه کنترل سالم، بیش از دو برابر افزایش یافته بود (۲۸۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در مقایسه با ۱۲۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) که دال بر بروز دیابت نوع دو دارد. در

## بحث

هدف از این پژوهش بررسی اثر توأم تمرین تناوبی شدید و داروی متفورمین بر بیان مایوژنین و مایواستاتین در عضله‌ی اسکلتی موش‌های مبتلا به دیابت نوع بود. به‌طور کلی یافته‌های این مطالعه نشان داد که داروی متفورمین تأثیر معنی‌داری در بیان ژن مایوژنین و مایواستاتین در عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی نداشت؛ درحالی‌که تمرین تناوبی شدید، موجب افزایش بیان مایوژنین و کاهش در بیان مایواستاتین شد. همچنین مشاهده شد، در شرایطی که هر دو عامل دارو و تمرین به‌صورت توأم تجویز شدند، داروی متفورمین، تغییر معنی‌داری در افزایش بیان

دیابتی ناشی از استرپتوزوتوکسین (STZ) و بیماران دیابت نوع دو (انسانی) افزایش یافت [۴۱، ۷، ۶، ۳].

تمرین‌های ورزشی علاوه بر اینکه نقش مهمی در کنترل بیماری دیابت نوع دو دارند، می‌توانند از آتروفی عضلانی ناشی از بیماری‌های مختلف همچون دیابت جلوگیری کنند. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که تمرین استقامتی قادر است بیان مایواستاتین را در عضله اسکلتی کاهش دهد [۶]. به علاوه، مطالعاتی نیز وجود دارند که گزارش کرده‌اند که تمرین‌های هوازی (تمرین شنا) می‌تواند بیان مایواستاتین را در عضله اسکلتی رت‌های دیابتی کاهش دهد [۲۵، ۸]. همچنین چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که میزان بیان مایواستاتین بر اثر تمرین تناوبی شدید در عضله اسکلتی رت‌های با قند خون بالا و رت دیابتی ناشی از استرپتوزوتوکسین کاهش می‌یابد [۳۲، ۳۰]. موافق با مطالعات ذکر شده، نتایج این پژوهش نشان داد که تمرین تناوبی شدید اثر کاهنده در بیان مایواستاتین داشت؛ به طوری که میزان بیان این ژن در گروه دیابتی-تناوبی شدید در قیاس با گروه دیابتی کنترل کمتر بود. به طور کلی، یافته‌ی این پژوهش همراه با یافته‌های پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهند که تمرین تناوبی شدید در کاهش بیان ژن مایواستاتین در موش‌های دیابتی مؤثر است. همچنین می‌توان پیشنهاد داد که تمرین تناوبی شدید از طریق کاهش بیان این عامل (یعنی مایواستاتین) که مهارکننده‌ی رشد عضلانی است، می‌تواند از آتروفی ناشی از دیابت نوع دو پیشگیری کند. به نظر می‌رسد، تمرین‌های ورزشی از طریق کاهش چاقی و بهبود مقاومت انسولینی در تعدیل بیان مایواستاتین در موش‌های دیابتی ایفای نقش می‌کند. چرا که مطالعاتی نشان داده‌اند که بر اثر کاهش وزن میزان بیان مایواستاتین کاهش می‌یابد [۴۲، ۴۱]. همچنین گزارش شده است که بیان مایواستاتین با مقاومت انسولینی رابطه‌ی مستقیمی دارد [۴۳]. از طرف دیگر در این پژوهش با انجام تمرین تناوبی شدید، کاهش وزن حاصل شد و مقاومت انسولینی براساس مدل HOMA بهبود پیدا کرد. بنابراین می‌توان پنداشت که تمرین تناوبی شدید احتمالاً با کاهش چربی بدن و بهبود مقاومت انسولینی، بیان مایواستاتین را در موش‌های دیابتی تعدیل کرده است.

مجموع می‌توان اظهار داشت که ۲۴ هفته تغذیه‌ی پُرچرب موجب چاقی و دیابت نوع دو در موش‌های مورد پژوهش شده است. همچنین، مشاهده شد که داروی متفورمین و تمرین تناوبی شدید تا حدی از افزایش وزن ناشی از تغذیه‌ی پُرچرب مقابله کردند.

در این پژوهش دیده شد که وزن عضله‌ی چهارسررانی بر اثر دیابت ناشی از تغذیه‌ی پُرچرب، دچار کاهش شد که دلالت بر آتروفی ناشی از دیابت نوع دو دارد. به علاوه، دیده شد که تمرین تناوبی شدید (و نه داروی متفورمین) از این افت وزن جلوگیری کرد که دلالت بر اثر محافظتی تمرین تناوبی شدید در مقابل آتروفی ناشی از دیابت دارد.

مایوژنین عاملی است که در تمایز سلول‌های عضلانی در دوره‌ی جنینی نقش دارد. همچنین این عامل در بزرگسالی در تمایز سلول‌های اقماری به هسته‌ی سلول عضلانی نقش کلیدی دارد [۱۰]. یافته‌های این پژوهش نشان داد که میزان بیان این عامل در عضله‌ی راست رانی موش‌های دیابتی، کمتر از گروه کنترل سالم بود که مطابق با یافته‌های مطالعات گذشته بود [۵، ۴، ۲]. همچنین مشاهده شد که تمرین تناوبی شدید اثر افزایش‌دهنده در میزان بیان مایوژنین داشت. با این حال، مقایسه‌ی بین گروهی این عامل نشان داد که تغییرات بیان ژن مایوژنین بین گروه‌های مورد پژوهش معنی‌دار نبود. این یافته‌ها دلالت بر این دارد که اثر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن مایوژنین فزاینده است، با این حال، این اثر به میزانی نیست که اختلاف آن در گروه‌های دیابتی-تناوبی شدید و دیابتی متفورمین-تناوبی شدید در مقایسه با گروه دیابتی کنترل، معنی‌دار شود.

مایواستاتین عامل منفی رشد عضلانی است که از طریق سازکارهای مختلف، رشد عضلانی را مهار می‌کند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که بیان مایواستاتین در عضله‌ی راست رانی گروه کنترل دیابتی در قیاس با گروه کنترل سالم بالاتر بود که دلالت بر این دارد که بر اثر مصرف ۲۴ هفته رژیم غذایی پُرچرب که موجب بروز دیابت نوع دو شد، بیان ژن مایواستاتین در عضله‌ی اسکلتی افزایش یافت. موافق با این یافته، مطالعات گذشته نشان داده‌اند که بیان مایواستاتین در عضله‌ی اسکلتی موش‌های

[۴۶]. به نظر می‌رسد اختلاف بین یافته‌های این مطالعه با پژوهش Kulkarni و همکاران مربوط به ۱- اختلاف آزمودنی (آزمودنی موش در این پژوهش و آزمودنی‌های انسانی در مطالعه ذکر شده) ۲- تفاوت تجویز در دوز داروی متفورمین، ۳- تفاوت در نوع تمرین ورزشی (تمرین تناوبی شدید در این مطالعه - تمرین مقاومتی در مطالعه‌ی ذکر شده) و ۴- تفاوت در روش سنجش بیان ژن است (Real Time PCR در این پژوهش و روش میکروآرای در مطالعه‌ی ذکر شده) است.

### نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌توان استدلال کرد که داروی متفورمین تأثیر محسوسی در بیان ژن مایوژنین و مایوآستاتین در عضله‌ی اسکلتی موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو ندارد؛ درحالی که تمرین تناوبی شدید، اثر افزایشی در بیان مایوژنین و اثر کاهش‌ی در بیان مایوآستاتین دارد. همچنین می‌توان پیشنهاد داد که داروی متفورمین، تغییرات ناشی از تمرین تناوبی شدید در بیان مایوژنین و مایوآستاتین را در عضله‌ی اسکلتی موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو، متأثر نمی‌سازد.

### سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی فیزیولوژی ورزش (دانشگاه الزهرا) است. بدین‌وسیله از همه‌ی افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

داروی متفورمین یکی از مهم‌ترین دارویی است که برای کنترل عوارض دیابت تجویز می‌شود. در این مطالعه دیده شد که داروی متفورمین تأثیری منفی یا مثبتی بر اثر تمرین تناوبی شدید بر جرم عضلانی (عضله‌ی چهارسرانی) نداشت. مشابه با این یافته، مطالعه‌ای در گذشته نشان داده است که داروی متفورمین، رشد عضلانی ناشی از تمرین هوازی را کاهش نداد [۴۴]. از سوی دیگر، مطالعه‌ای گزارش کرده است که داروی متفورمین اثر مثبت تمرین مقاومتی بر هایپرتروفی عضلانی را کاهش می‌دهد [۴۵]. در خصوص اثر داروی متفورمین بر بیان مایوآستاتین، داده‌های این پژوهش نشان داد که متفورمین تأثیری در بیان ژن مایوآستاتین در عضله‌ی راست رانی موش‌های دیابتی نداشت. با این حال، مطالعه‌ای در گذشته گزارش کرده است که متفورمین موجب افزایش تنظیمی بیان مایوآستاتین در مایوتیوب شد [۱۶]. دلیل این اختلاف را می‌توان به تفاوت مدل تحقیق یعنی بررسی بر روی داخل بدن موجود زنده (in vivo) و محیط برون تنی و آزمایشگاهی در شرایط کشت (in vitro) نسبت داد.

یافته‌ی اصلی و مهم این پژوهش این بود که ترکیب داروی متفورمین و تمرین تناوبی شدید اثر برهم کنش در بیان ژن مایوآستاتین در عضله‌ی موش‌های دیابتی نداشت؛ به طوری که هیچ‌یک از این دو عامل، تأثیر عامل دیگری را در بیان مایوآستاتین تقویت یا تضعیف نکردند. به عنوان مثال، در این پژوهش، مشاهده شد که داروی متفورمین تأثیر افزایشی تمرین تناوبی شدید در بیان مایوآستاتین را تغییر نداد. این یافته ناهمسو با یافته‌های مطالعه گذشته توسط Kulkarni و همکاران (۲۰۲۰) است که گزارش کرده‌اند، داروی متفورمین، پاسخ نسخه برداری ناشی از تمرین مقاومتی در عضله‌ی اسکلتی را کاهش می‌دهد

### مآخذ

1. Perry BD, Caldwell MK, Brennan-Speranza TC, Sbaraglia M, Jerums G, Garnham A, et al. Muscle atrophy in patients with Type 2 Diabetes Mellitus: roles of inflammatory pathways, physical activity and exercise. *Exercise immunology review* 2016; 22: 94.
2. Wang M, Wu X, Gan L, Teng Z, Zhang H, and Zhang Y. Overexpression of Dnmt3a ameliorates diabetic muscle atrophy by modulating the Pten/Akt pathway. *Experimental Physiology* 2020; 105(11): 1918-1927.
3. Hulmi JJ, Silvennoinen M, Lehti M, Kivelä R, and Kainulainen H. Altered REDD1, myostatin, and Akt/mTOR/FoxO/MAPK signaling in streptozotocin-induced diabetic muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2012; 302(3): E307-E315.
4. Amin SN, Hussein UK, Yassa HD, Hassan SS, and Rashed LA. Synergistic actions of vitamin D and metformin on skeletal muscles and insulin resistance

- of type 2 diabetic rats. *Journal of Cellular Physiology* 2018; 233(8): 5768-5779.
5. D'Souza DM, Al-Sajee D, and Hawke TJ. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Frontiers in physiology* 2013; 4: 379.
  6. Allen DL, Hittel DS, and McPherron AC. Expression and function of myostatin in obesity, diabetes, and exercise adaptation. *Medicine and science in sports and exercise* 2011; 43(10): 1828.
  7. Jeong J, Conboy MJ, and Conboy IM. Pharmacological inhibition of myostatin/TGF- $\beta$  receptor/pSmad3 signaling rescues muscle regenerative responses in mouse model of type 1 diabetes. *Acta Pharmacologica Sinica* 2013; 34(8): 1052-1060.
  8. Bassi D, Bueno PdG, Nonaka KO, Selistre-Araujo HS, and Leal AMdO. Exercise alters myostatin protein expression in sedentary and exercised streptozotocin-diabetic rats. *Archives of endocrinology and metabolism* 2015; 59: 148-153.
  9. Chen Y, Cao L, Ye J, and Zhu D. Upregulation of myostatin gene expression in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice is attenuated by insulin. *Biochemical and biophysical research communications* 2009; 388(1): 112-116.
  10. Ganassi M, Badodi S, Wanders K, Zammit PS, and Hughes SM. Myogenin is an essential regulator of adult myofibre growth and muscle stem cell homeostasis. *Elife* 2020; 9
  11. Lee S-J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004; 20: 61-86.
  12. Sanchez-Rangel E and Inzucchi SE. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2017; 60(9): 1586-1593.
  13. Senesi P, Montesano A, Luzzi L, Codella R, Benedini S, and Terruzzi I. Metformin Treatment Prevents Sedentariness Related Damages in Mice. *Journal of Diabetes Research* 2016; 2016: 8274689.
  14. Ai Y, Xu R, and Liu L. The prevalence and risk factors of sarcopenia in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Diabetology & metabolic syndrome* 2021; 13(1): 1-12.
  15. Hasan MM, Shalaby SM, El-Gendy J, and Abdelghany EM. Beneficial effects of metformin on muscle atrophy induced by obesity in rats. *Journal of cellular biochemistry* 2019; 120(4): 5677-5686.
  16. Kang MJ, Moon JW, Lee JO, Kim JH, Jung EJ, Kim SJ, et al. Metformin induces muscle atrophy by transcriptional regulation of myostatin via HDAC6 and FoxO3a. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2022; 13(1): 605-620.
  17. Pavlidou T, Marinkovic M, Rosina M, Fuoco C, Vumbaca S, Gargioli C, et al. Metformin delays satellite cell activation and maintains quiescence. *Stem Cells International* 2019; 2019.
  18. Pavlidou T, Rosina M, Fuoco C, Gerini G, Gargioli C, Castagnoli L, et al. Regulation of myoblast differentiation by metabolic perturbations induced by metformin. *PLoS One* 2017;8(12): e0182475.
  19. Cui J, Song L, Wang R, Hu S, Yang Z, Zhang Z, et al. Maternal Metformin Treatment during Gestation and Lactation Improves Skeletal Muscle Development in Offspring of Rat Dams Fed High-Fat Diet. *Nutrients* 2021; 13(10): 3417.
  20. Scherrenberg M and Dendale P. *Exercise training in diabetes*. 2019, SAGE Publications Sage UK: London, England. p. 698-700.
  21. Shanaki M, Khosravi M, Khoshdooni-Farahani A, Dadashi A, Heydari MF, Delfan M, et al. High-intensity interval training reversed high-fat diet-induced M1-macrophage polarization in rat adipose tissue via inhibition of NOTCH signaling. *Journal of Inflammation Research*. 2020;13:165.
  22. Delfan M, Delphan M, Kordi MR, Ravasi AA, Safa M, Gorgani-Firuzjaee S, et al. High intensity interval training improves diabetic cardiomyopathy via miR-1 dependent suppression of cardiomyocyte apoptosis in diabetic rats. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2020;19(1):145-52.
  23. Voet NB, van der Kooi EL, van Engelen BG, and Geurts AC. Strength training and aerobic exercise training for muscle disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2019 (12).
  24. Akagawa M, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Ono Y, Yuasa Y, Nagahata I, et al. Effects of activated vitamin D, alfacalcidol, and low-intensity aerobic exercise on osteopenia and muscle atrophy in type 2 diabetes mellitus model rats. *PLoS One* 2018; 13(10): e0204857.
  25. Dutra DB, Bueno PG, Silva RN, Nakahara NH, Selistre- Araujo HS, Nonaka KO, et al. Expression of myostatin, myostatin receptors and follistatin in diabetic rats submitted to exercise. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2012; 39(5): 417-422.
  26. Gibala MJ, Little JP, MacDonald MJ, and Hawley JA. Physiological adaptations to low- volume, high-intensity interval training in health and disease. *The Journal of physiology* 2012; 59: 1077-1088.
  27. Callahan MJ, Parr EB, Hawley JA, and Camera DM. Can high-intensity interval training promote skeletal muscle anabolism? *Sports Medicine* 2021; 51(3): 405-421.
  28. Delfan M, Vahed A, Bishop DJ, Amadeh Juybari R, Laher I, Saeidi A, et al. Effects of two workload-matched high intensity interval training protocols on regulatory factors associated with mitochondrial biogenesis in the soleus muscle of diabetic rats. *Frontiers in Physiology*. 2022:1730.
  29. Liu Q-Q, Xie W-Q, Luo Y-X, Li Y-D, Huang W-H, Wu Y-X, et al. High Intensity Interval Training: A Potential Method for Treating Sarcopenia. *Clinical Interventions in Aging* 2022; 17: 857.
  30. Azhir S, Alijani E, Martínez-Huenchullán S, Amni H, and Baker JS. Effects of exercise intensity on soleus muscle myostatin and follistatin levels

- of hyperglycaemic rats. *Retos: nuevas tendencias en educación física, deporte y recreación* 2022; (44): 889-896.
31. Nourshahi M, Rostami S, and Khodaghohi F. Effect of eight weeks sprint interval training on myogenin rate in aged rats skeletal muscle tissue. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences* 2017; 39(3): 76-82.
  32. Kordi M, Khoramshahi S, Eshghi S, Gaeeni A, and Moosakhani A. The effect of high intensity interval training on some atrophic and anti-atrophic gene expression in rat skeletal muscle with diabetes. *Science & Sports* 2020; 35(3): e75-e81.
  33. Surwit RS, Kuhn CM, Cochran C, McCubbin JA, and Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 1988; 37(9): 1163-7.
  34. Matsui Y, Hirasawa Y, Sugiura T, Toyoshi T, Kyuki K, and Ito M. Metformin reduces body weight gain and improves glucose intolerance in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2010; 33(6): 963-970.
  35. Yang Y, Smith Jr DL, Keating KD, Allison DB, and Nagy TR. Variations in body weight, food intake and body composition after long-term high-fat diet feeding in C57BL/6J mice. *Obesity* 2014; 22(10): 2147-2155.
  36. Matsui Y, Hirasawa Y, Sugiura T, Toyoshi T, Kyuki K, and Ito M. Metformin reduces body weight gain and improves glucose intolerance in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(6): 963-70.
  37. Chavanelle V, Boisseau N, Otero YF, Combaret L, Dardevet D, Montaurier C, et al. Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on glycaemic control and skeletal muscle mitochondrial function in db/db mice. *Scientific reports* 2017; 7(1): 1-10.
  38. Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ, and Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO<sub>2</sub> max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(3): H1301-10.
  39. Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, and Rüllicke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comparative medicine* 2001; 51(5): 443-456.
  40. Boelen A, van der Spek AH, Bloise F, de Vries EM, Surovtseva OV, van Beeren M, et al. Tissue thyroid hormone metabolism is differentially regulated during illness in mice. *J Endocrinol* 2017; 233(1): 25-36.
  41. Palsgaard J, Brøns C, Friedrichsen M, Dominguez H, Jensen M, Storgaard H, et al. Gene expression in skeletal muscle biopsies from people with type 2 diabetes and relatives: differential regulation of insulin signaling pathways. *PloS one* 2009; 4(8): e6575.
  42. Milan G, Dalla Nora E, Pilon C, Pagano C, Granzotto M, Manco M, et al. Changes in muscle myostatin expression in obese subjects after weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(6): 2724-2727.
  43. White TA and LeBrasseur NK. Myostatin and sarcopenia: opportunities and challenges-a mini-review. *Gerontology* 2014; 60(4): 289-293.
  44. Hernández-Álvarez D, Mena-Montes B, Toledo-Pérez R, Pedraza-Vázquez G, López-Cervantes SP, Morales-Salazar A, et al. Long-term moderate exercise combined with metformin treatment induces an hormetic response that prevents strength and muscle mass loss in old female wistar rats. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019; 2019.
  45. Walton RG, Dungan CM, Long DE, Tuggle SC, Kosmac K, Peck BD, et al. Metformin blunts muscle hypertrophy in response to progressive resistance exercise training in older adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial: The MASTERS trial. *Aging cell* 2019; 18(6): e13039.
  46. Kulkarni AS, Peck BD, Walton RG, Kern PA, Mar JC, Windham ST, et al. Metformin alters skeletal muscle transcriptome adaptations to resistance training in older adults. *Aging (Albany NY)* 2020; 12(20): 19852.

## The Combined Effect of High-Intensity Interval Training and Metformin on Gene Expression of Myogenin and Myostatin in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetic Mice

Zahra Badri<sup>1</sup>, Maryam Delfan<sup>1\*</sup>, Saeed Daneshyar<sup>2,3</sup>

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

2. Department of Physical Education, Faculty of Human Science, Ayatollahozmah Broujerdi University, Lorestan, Iran

3. Department of Physical Education, Hamedan University of Technology, Hamedan, Iran

### ABSTRACT

**Background:** Myogenin (MyoG) and Myostatin (Mstn) play role in muscle growth and wasting, respectively. The present study aimed to investigate the combined effect of High-intensity Interval Training (HIIT) and Metformin drug (Metf) on gene expression of MyoG and Mstn in skeletal muscle of type 2 diabetic mice.

**Methods:** 25 mice (C57BL/6) were assigned to two groups, including 1) Control © (n=5), and 2) HFD (n=20). The mice of the HFD group were fed a high-fat diet for 16 weeks. After 16 weeks, the mice with over 200 mg/dl were selected as diabetic mice. Then, the diabetic mice were divided into four groups including 1) Control Diabetic (CD) (n=5), 2) Diabet with Metf (DM) (n=5), 3) Diabet with HIIT (DH) (n=5) 4) Diabet with Metf and HIIT (DMH) (n=5). The mice of experimental groups underwent the interventions for eight weeks. The Real-Time-PCR methods were used to measure the mRNA expression of MyoG and Mstn in the Rectus-Femoris muscle.

**Results:** HIIT (but no Metf) upregulated the gene expression of MyoG (p=0.05). Metformin did not affect Mstn expression (p=0.45), However, HIIT downregulated the expression of Mstn (p=0.001). Metformin did not affect decreasingly or incrementally the downregulating effect of HIIT on Mstn expression (p=0.95).

**Conclusion:** Metf may not positively or negatively affect the expression changes of MyoG and Mstn induced by HIIT in skeletal muscle of mice with type 2 diabetes.

**Keywords:** Exercise Training, Metformin, Type 2 Diabetes, Muscle Atrophy

\* North Sheikh Bahaee St., Deh-e Vanak, Alzahra University, Tehran, Iran. Tel: +982185692668, Fax: +982188035187, Email: m.delfan@alzahra.ac.ir

