

## تأثیر تمرین ترکیبی و مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی E و C بر روی بیوژنز میتوکندری در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع دو

الهه حیدرنیا<sup>۱</sup>، فرزانه تقیان<sup>۱\*</sup>، خسرو جلالی دهکردی<sup>۱</sup>، مهرزاد مقدسی<sup>۲</sup>

### چکیده

**مقدمه:** فرایند آپوپتوز به‌عنوان یک وضعیت شایع در آسیب‌های قلبی می‌تواند به‌طور قابل توجهی توسط افزایش قند خون به‌صورت مزمن تحمیل شود. از این‌رو هدف پژوهش حاضر، تعیین اثرات تمرین ترکیبی و مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی E و C بر عملکرد و بیوژنز عملکرد بافت قلب موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بود.

**روش‌ها:** در مطالعه‌ی تجربی و بنیادی حاضر، تعداد پنجاه سر موش صحرایی نر نژاد Sprague Dawley به‌صورت تصادفی در پنج گروه (در هر گروه ۱۰ سر موش) تقسیم شدند: موش‌های سالم به‌عنوان گروه کنترل، موش‌های دیابتی، تمرینات مقاومتی/استقامتی دیابتی، موش‌های دیابتی که مکمل ویتامین E و C مصرف می‌کردند و مکمل و تمرین ترکیبی تقسیم‌بندی شدند. تمرین ترکیبی شامل، تمرین مقاومتی، ۵ روز در هفته با شدت فزاینده‌ی ۵-۴۵ درصد وزن موش‌های صحرایی و تمرین استقامتی بروی نوارگردان به‌صورت فزاینده از ۳۰-۱۰ دقیقه و شدت فزاینده‌ی ۷۵-۴۰ درصد حداکثر سرعت طی ۸ هفته انجام شد. ۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین بافت قلب استخراج و بیان ژن‌های PGC1 $\alpha$  و Tfam از طریق Real-Time PCR ارزیابی شد. داده‌های پژوهش با آزمون آماری واریانس دو طرفه tow way-ANOVA تجزیه و تحلیل شد ( $P < 0/05$ ).

**یافته‌ها:** القا دیابت باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های PGC1 $\alpha$  و Tfam ( $P < 0/05$ ) بین گروه کنترل سالم و گروه کنترل دیابت شد. از سویی در این مطالعه مشاهده شده است که مصرف مکمل و تمرین اثر فزاینده‌ای بر افزایش بیان ژن‌های PGC1 $\alpha$  و Tfam در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین داشته است. علاوه بر این، میزان غلظت گلوکز و وزن موش‌های صحرایی تیمار شده با مصرف مکمل و تمرین به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافته است ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** براساس نتایج به‌دست آمده، مصرف مکمل‌های غنی از آنتی‌اکسیدان و تمرین ترکیبی سبب کاهش میزان گلوکز خون و از سویی باعث بهبود بیوژنز میتوکندری بافت قلب موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو شده است. از سویی، تمرین ترکیبی و مکمل آنتی‌اکسیدانت اثر بیشتری در روند بهبودی دیابت نوع دو نسبت به اثر هر کدام از آنها به تنهایی داشته است.

**واژگان کلیدی:** تمرین ترکیبی، مکمل آنتی‌اکسیدانی، بیوژنز میتوکندری، عملکرد میتوکندری، موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسی

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۲- گروه تربیت بدنی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

\***نشانی:** اصفهان، ارغوانیه، خیابان جی، بلوار دانشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشکده‌ی علوم ورزشی، تلفن:

۰۹۱۳۳۰۸۰۲۴۱، صندوق پستی: ۱۵۸/۸۱۵۹۵، پست الکترونیک: f\_taghian@yahoo.com

## مقدمه

دیابت نوع دو با افزایش سطح قند خون، خطر نارسایی قلبی و مرگ و میر را به میزان قابل توجهی افزایش داده و منجر به عوارض جانبی بر قلب می‌شود [۱، ۲]. اگرچه سازکارهای پاتوژنز نارسایی قلبی روشن نشده است، با این وجود چندین مسیر سیگنالینگ، از جمله التهاب، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز و اختلال در عملکرد میتوکندری سبب اختلالات قلبی و عروقی می‌گردد. در میان اندامک‌های سیتوزولی، میتوکندری با ژنوم جداگانه نقش مهمی در تولید انرژی از طریق مسیر انتقال الکترون تنفسی دارد. با توجه به اینکه اختلال بیوژنز میتوکندری، اختلالات اکسیداسیون اسیدهای چرب و اختلال میتوکندری نقش مهمی در کاهش تولید ATP بافت قلب ناشی از چاقی است. علاوه بر این، هیپرگلیسمی می‌تواند سلول‌های قلب را مستعد مرگ سلولی و اختلال در عملکرد و بیوژنز میتوکندری گردد، که می‌تواند باعث اختلال در عملکرد میوکارد و تخریب تدریجی سلول‌های بنیادی قلب می‌شود [۳، ۴]. علاوه بر این، در سطح مولکولی، این تغییرات می‌تواند به دلیل تغییر بیان یا فعالیت پروتئین‌ها و ژن‌های مختلف در حفظ یا تنظیم هموستاز داخل سلولی سلول‌ها باشد [۵].

تغییرات متابولیکی مانند افزایش التهاب و استرس اکسیداتیو، و از سوی هیپرگلیسمی منجر به اختلالات مولکولی میوکارد و عملکرد میتوکندری می‌شود و این تغییرات باعث از بین رفتن تدریجی سلول‌های بنیادی قلب و عوارض قلبی-عروقی می‌شود [۶، ۷]. علاوه بر این، شواهد زیادی نشان داده است که افزایش قند خون و بی‌حرکی باعث کاهش بیوژنز میتوکندری و اختلال در عملکرد آن می‌گردد. اگرچه سازکار دقیق اختلال عملکرد میتوکندری در افزایش قند خون و دیابت نوع دو مشخص نیست. با این حال، برخی گزارش‌ها نشان داده است که ژن  $PGC1\alpha$  مستقیماً در اختلال عملکرد میتوکندری نقش دارد.  $PGC1\alpha$  یکی از پروتئین‌های اصلی در بیوژنز و عملکرد میتوکندری در عضله قلب است [۸، ۹]. همچنین،  $PGC1\alpha$  سبب فعال شدن ژن  $Tfam$  می‌گردد.  $Tfam$  یک فاکتور رونویسی است که در

هسته کد می‌شود و نقش مهمی در رونویسی DNA میتوکندری دارد. در میتوکندری،  $Tfam$  با DNA میتوکندری در تعامل است و بر بیان زیر واحدهای زنجیره‌ی تنفس رمزگذاری شده در میتوکندری کمک می‌کند [۱۰، ۱۱]. مطالعات نشان داده است که دیابت و چاقی منجر به کاهش بیان ژن  $PGC1\alpha$  و کاهش فاکتور رونویسی میتوکندری ( $Tfam$ ) می‌شود. کاهش بیان این دو ژن با اختلال در عملکرد میتوکندری مرتبط هستند و نقش اساسی در نارسایی قلبی ایفا می‌کنند [۸-۱۲].

شواهد نشان می‌دهد که اختلال در عملکرد و بیوژنز میتوکندری ممکن است نقشی اساسی در پاتوژنز دیابت و عوارض قلبی داشته باشد [۱۳]. بنابراین، درمان با کمک ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تمرینات ورزشی به‌عنوان رویکردهای مؤثر برای درمان دیابت پیشنهاد می‌شود [۱۴]. برای اطمینان از فیزیولوژی مطلوب قلب، حفظ حالت مطلوب عملکرد میتوکندری مورد نیاز است. شواهد نشان می‌دهد که درمان با ترکیب ویتامین E و اسید اسکوربیک (ترولوکس) می‌تواند سازگار دفاعی آنتی‌اکسیدانی و بیوژنز میتوکندری را بالا ببرد [۱۵-۱۸]. همچنین، از مسیرهای آپوپتوز وابسته به میتوکندری جلوگیری کرده و اثرات سمی هایپرگلیسمی را تنظیم کند [۱۹]. علاوه بر این، مکمل‌های غذایی حاوی ویتامین C و E ممکن است با تعدیل هموستاز گلوکز و سیستم آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان رویکردهای درمانی عملی برای عوارض مختلف دیابت عمل کنند [۲۰].

فعالیت بدنی منظم و تمرینات ورزشی، چندین عامل خطرناک مرتبط با سلامتی را در افراد کم‌تحرك بهبود می‌بخشد. همچنین، انجام تمرینات استقامتی و مقاومتی به‌صورت ترکیبی می‌تواند برای سلامت قلب و عروق مؤثر و مفید واقع شوند [۲۱، ۲۲]. علاوه بر این، ترکیب تمرینات استقامتی و مقاومتی ممکن است با کاهش آپوپتوز و افزایش بیوژنز میتوکندریایی در سلول‌های قلب، نقش محافظتی در برابر عوارض دیابت ایفا کند [۲۳]. شواهد نشان داده است که تمرینات مداوم و متناوب به‌طور قابل توجهی بیان نسبی  $PGC1\alpha$  و  $Tfam$  را در بافت قلب افزایش

<sup>2</sup> Transcription Factor A, Mitochondrial

<sup>1</sup> Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1alpha

در این تحقیق، ۵۰ سر موش صحرایی نر با نژاد Sprague Dawley بین ۱۴-۱۲ ماه و محدوده‌ی وزن تقریبی ۳۱۰-۲۸۰ گرم استفاده شد. موش‌های صحرایی در لانه‌ی حیوانات در شرایط استاندارد دمای ۲۴-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت  $\pm 5$  درصد با چرخه‌ی ۱۲ ساعت نور/۱۲ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. همچنین، حیوانات با رژیم غذایی استاندارد تغذیه شدند. موش‌ها به‌طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند (در هر گروه ۱۰ سر موش)، شامل موش‌های صحرایی سالم به‌عنوان گروه کنترل، موش‌های صحرایی دیابتی (دیابتی)، تمرینات مقاومتی/استقامتی دیابتی (ورزش)، موش‌های دیابتی که مکمل ویتامین E و C مصرف کردند (مکمل)، و گروه مکمل و تمرین ورزشی ترکیبی (ورزش+مکمل).

**القاء دیابت:** موش‌های صحرایی با تزریق یکبار ماده‌ی شیمیایی استرپتوزوتوسین<sup>۱</sup> (STZ) به‌صورت داخل صفاقی<sup>۲</sup> (IP) به دیابت مبتلا شدند، و استرپتوزوتوسین (۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در ۰/۱ مولار سیترات با pH= ۴/۵ حل شد. علاوه بر این، به موش‌های صحرایی غیر دیابتی نیز حجم معادل با بافر سیترات تزریق شد. پنج روز پس از تزریق، سطح گلوکز خون به‌وسیله‌ی گلوکومتر (Accu-Chek, Active) از ورید دمی اندازه‌گیری شد و گلوکز ناشتا بیش از ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر دیابتی در نظر گرفته شد [۲۸].

**مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی:** مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی از شرکت سیگما-آلدریج و مرک آلمان تهیه شد. در این مطالعه از مکمل آنتی‌اکسیدانی شامل اسید اسکوربیک<sup>۳</sup> (ویتامین C) و ویتامین E<sup>۴</sup> استفاده گردید. نحوه‌ی آماده‌سازی مکمل به این صورت بود که از ۱ گرم ویتامین C و ۶۰۰ میلی‌گرم ویتامین E محلول را در روغن زیتون حل کرده و به روش گاواژ (میلی‌لیتر/کیلوگرم وزن بدن موش) یک بار در روز به‌مدت هشت هفته به موش‌های صحرایی داده شد [۲۹].

**تمرین ترکیبی:** شامل انجام تمرین مقاومتی و تمرین استقامتی بود. تمرین مقاومتی ۵ روز در هفته در ۳ دوره با ۴ تکرار و فاصله‌ی استراحت بین تکرارها یک دقیقه و بین دوره‌ها ۳ دقیقه

می‌دهد. علاوه بر این، تمرینات استقامتی و مقاومتی مؤثرترین روش برای کاهش قند خون ناشتا، بهبود عملکرد میتوکندری و مقاومت به انسولین، افزایش بتا اکسیداسیون است [۲۵، ۲۴]. درحالی‌که تمرینات هوازی و مقاومتی می‌تواند هموستاز گلوکز و سازکار آپوپتوز را بهبود بخشد. سازکارهای مولکولی این پدیده به‌صورت کامل مشخص نیست. از سویی در مطالعه‌ی توسط Venditti و همکاران (۲۰۱۶) مشخص گردید که مصرف ویتامین E به تنهایی قادر بر افزایش بیان ژن PGC1 $\alpha$  در بافت قلب نیست اما همراه با انجام تمرینات ورزشی، سبب افزایش بیان PGC1 $\alpha$  می‌گردد [۲۶]. همچنین، Hejazi و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که ۸ هفته تمرین هوازی، مصرف ویتامین C و ترکیب هر دو با هم، باعث افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بیماران دیابتی شده و از استرس اکسیداتیو ناشی از ورزش و همچنین بروز بیماری دیابت جلوگیری می‌کنند [۲۷].

در مجموع، هم‌زمانی تمرین و مصرف مکمل بر عملکرد و بیورژن میتوکندری در بافت‌های دیابتی مشهود است اما با توجه عدم وجود پژوهش در زمینه‌ی تأثیر هم‌زمان تمرین‌های مقاومتی و استقامتی با هم در یک جلسه‌ی تمرین ترکیبی و مصرف هم‌زمان مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی E و C، در مطالعه‌ی حاضر نقش محافظتی تمرین ترکیبی و مصرف مکمل‌های ویتامینی E و C به‌صورت جداگانه و هم‌زمان بر عملکرد و بیورژن میتوکندری با ارزیابی بیان ژن‌های PGC1 $\alpha$  و Tfam بافت قلب رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بررسی شد.

## روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع مطالعات تجربی و بنیادی، با طرح گروهی چند متغیره و از نوع کاربردی است که با تأیید کمیته‌ی اخلاق در پژوهش بر روی حیوانات دانشکده‌ی علوم ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) و با رعایت کلیه‌ی پروتکل‌های کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است. (IR.IAU.KHUISF.REC.1399.043)

<sup>3</sup>Ascorbic acid

<sup>4</sup> DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate

<sup>1</sup>Streptozotocin

<sup>2</sup>Intra-peritoneal

روی نوارگردان به صورت فزاینده و پیشرونده به مدت ۵ روز در هفته انجام شد. در هفته‌ی اول و دوم ۱۰ دقیقه با شدت ۴۰ و ۵۰ درصد، هفته‌ی سوم ۱۵ دقیقه با شدت ۵۰ درصد، هفته‌ی چهارم ۲۰ دقیقه با شدت ۶۰ درصد، هفته‌ی پنجم ۲۵ دقیقه با شدت ۶۵ درصد، و نهایتاً در دو هفته‌ی آخر تا ۳۰ دقیقه با شدت ۷۰ و ۷۵ درصد حداکثر سرعت موش‌های صحرائی دیابتی شده انجام شد [۳۳-۳۰] (جدول ۱).

اجرا شد. تمرین مقاومتی متشکل از بالا رفتن از نردبان به طول یک متر و با اضافه کردن وزنه به دم موش‌های صحرائی به صورت تدریجی انجام شد. در هفته‌ی اول مقدار وزنه ۵ درصد، هفته‌ی دوم ۱۰ درصد، هفته‌ی سوم و چهارم ۱۵ و ۲۰ درصد، هفته‌ی پنجم ۳۰ درصد، هفته‌ی ششم ۳۵ درصد، هفته‌ی هفتم و هشتم ۴۰ و ۴۵ درصد وزن رت‌ها به‌عنوان مقاومت انتخاب و توسط رت‌ها جابجا شد [۳۰]. ورزش هوازی پس از ۱ ساعت استراحت آغاز شد. تمرینات هوازی شامل راه رفتن و دویدن

جدول ۱- پروتکل تمرینی

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
شدت	٪۴۰	٪۵۰	٪۵۰	٪۶۰	٪۶۵	٪۷۰	٪۷۵	٪۷۵
مدت	۱۰	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۰	۳۰
شدت	٪۵	٪۱۰	٪۱۵	٪۱۵	٪۲۰	٪۳۵	٪۴۰	٪۴۵
تکرار	۳*۴	۳*۴	۳*۴	۳*۴	۳*۴	۳*۴	۳*۴	۳*۴

نمونه برداری از بافت: پس از آخرین مداخله، موش‌های صحرائی با کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) طبق پروتکل‌های اخلاقی بیهوش شدند. پس از بی‌هوشی کامل، ابتدا بافت قلب جدا شد و بافت‌های چربی و همبند آن برداشته شد، پس از جداسازی بلافاصله بافت‌ها به ویال‌های مخصوص فریز منتقل و در نیتروژن مایع انجماد فوری شده و در فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: طبق دستورالعمل شرکت سازنده، بیست میلی‌گرم بافت قلب همگن شد و RNA از بافت قلب با استفاده از کیت (RNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN) استخراج شد. با کمک روش طیف‌سنجی به‌وسیله استفاده از دستگاه NanoDrop میزان خلوص غلظت RNA استخراج شده اندازه‌گیری شد. سنتز cDNA با ۱ میکروگرم RNA مطابق دستورالعمل سازنده (کیت Fermentase K1622) انجام شد.

Real-Time PCR (RT-PCR) زمانی که cDNA آماده شد، نمونه‌ها را برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی<sup>۱</sup> توسط دستگاه RotorGene 6000 و کیت تک مرحله‌ای SYBR PrimeScript RT-PCR Kit از شرکت سازنده Takara Bio Inc ساخت کشور ژاپن استفاده شد. علاوه بر این، بیان ژن با توجه به روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  مورد ارزیابی قرار گرفت و سطح بیان ژن‌های مرجع در این مطالعه به‌وسیله ژن بتا-۲-میکروگلوبولین (B2M) در نظر گرفته شد. علاوه بر این، آغازگرها از ماکروژن (کره‌ی جنوبی) خریداری شده‌اند توالی ژن‌ها در جدول ۲ آمده است.

۱Real-Time PCR (RT-PCR)

جدول ۲- توالی پرایمرها

ژن‌ها	توالی پرایمرها	سایز (bp)
B2m	Forward: 5'- CGTGCTTGCCATTCAGAAA -3'	244
	Reverse: 5'-ATATACATCGGTCTCGGTGG -3'	
PGC1 $\alpha$	Forward: 5'- CCCTGCCATTGTTAAGACC-3'	161
	Reverse: 5'- TGCTGCTGTTCTGTTTTC-3'	
Tfam	Forward: 5'-CTTCAACCACCACCACT-3'	92
	Reverse: 5'-AATCTCTAAGCCTCCTCAATACAA-3'	

میزان غلظت گلوکز خون در موش‌های صحرایی دیابتی شده به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است ( $P < 0.05$ ). همچنین میزان وزن گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش قابل توجهی داشته است ( $P < 0.05$ ). تیمارهای به کار گرفته شده در این مطالعه سبب کاهش قند خون در گروه دیابتی شد به‌صورتی که در هر سه گروه تمرین، مکمل، تمرین و مکمل میزان غلظت گلوکز خون کاهش معنی‌داری نسبت به گروه دیابت مشاهده شد. از سویی، در این مطالعه مشاهده شده است که میزان غلظت گلوکز به میزان قابل توجهی در گروه تمرین و مکمل نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافته است. (جدول ۳).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism جهت آمار توصیفی و استنباطی محاسبه شد است. برای همگن سازی توزیع، آزمون شاپیرو-ویلک<sup>۱</sup> انجام شد. علاوه بر این، داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس دو طرفه<sup>۲</sup> (ANOVA) محاسبه شد. در سطح آمار توصیفی نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) نشان داده شده است. سطح اهمیت آماری در همه‌ی تجزیه و تحلیل‌ها  $P < 0.05$  تعیین شد.

## یافته‌ها

در جدول ۳ اطلاعات توصیفی متغیرهای وزن و قند خون در گروه‌های پژوهش ارائه شده است. نتایج نشان داده است که

جدول ۳- اطلاعات توصیفی متغیرها (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

گروه‌ها	وزن (گرم)	قند خون (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)
کنترل	۲۰ $\pm$ ۲۸۰	۹۸/۳ $\pm$ ۶/۵
دیابت	۱۵ $\pm$ ۳۶۵	* ۴۵۰/۴ $\pm$ ۲۳/۶
تمرین	۱۳,۵ $\pm$ ۳۴۶	** ۳۶۵ $\pm$ ۲۴/۱
مکمل	۱۰ $\pm$ ۳۳۶	** ۳۲۰/۵ $\pm$ ۲۴/۳
تمرین و مکمل	۱۹ $\pm$ ۳۰۰	** ۲۷۰/۷ $\pm$ ۱۹/۶

\* نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سالم و گروه کنترل دیابتی

\*\* نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تیمار با گروه کنترل دیابت

تمرین و مکمل نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ( $P < 0.05$ ). همچنین، میزان بیان ژن PGC1 $\alpha$  در گروه

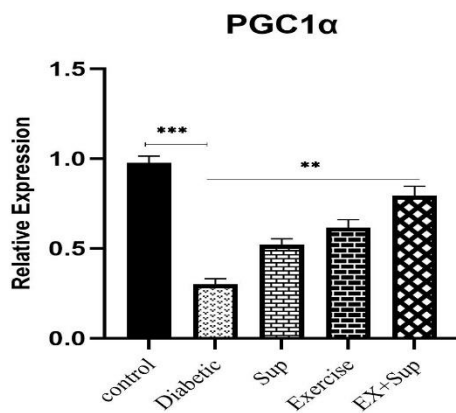
با توجه به نمودار ۱ نتایج به‌دست آمده از آزمون تحلیل واریانس دو طرفه مشخص شده است که میزان بیان ژن PGC1 $\alpha$  در گروه

<sup>2</sup> Two-way analysis of variance

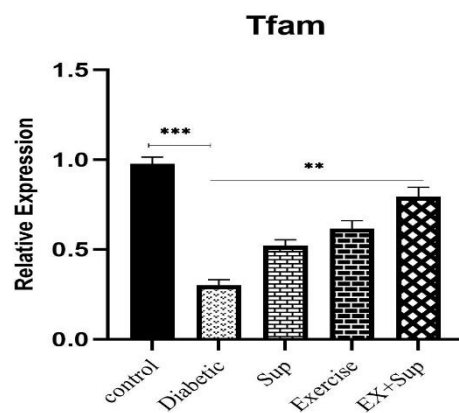
<sup>1</sup> Shapiro-Wilk Test

نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافته است ( $P < 0.05$ ). تیمارهای به‌کار گرفته شده در این مطالعه باعث افزایش بیان ژن *Tfam* در گروه‌های مکمل، تمرین و تمرین-مکمل نسبت به گروه دیابتی شده است ( $P < 0.05$ ، نمودار ۲). براساس نتایج فوق می‌توان چنین استنباط کرد مداخله‌ی تمرین و مکمل تأثیر معنی‌داری بر روی عملکرد و بیوژنز میتوکندری دارد و می‌تواند اختلال در عملکرد میتوکندری را در موش‌های صحرایی دیابتی بهبود دهند.

دیابتی نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافته است ( $P < 0.05$ ). تیمارهای به‌کار گرفته شده در این مطالعه باعث افزایش بیان ژن *PGC1 $\alpha$*  در گروه‌های مکمل، تمرین و تمرین-مکمل نسبت به گروه دیابتی شده است ( $P < 0.05$ ، نمودار ۱). از سویی، در این تحقیق مشخص گردید، با توجه به نمودار ۲ نتایج به‌دست آمده از آزمون تحلیل واریانس دو طرفه، میزان بیان ژن *Tfam* به‌طور معنی‌داری در گروه دیابت نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافته است ( $P < 0.05$ ). همچنین، میزان بیان ژن *Tfam* در گروه دیابتی



نمودار ۱- بیان ژن *PGC1 $\alpha$*  در بافت قلب موش های صحرایی در گروه‌های مختلف



نمودار ۲- بیان ژن *Tfam* در بافت قلب موش های صحرایی در گروه‌های مختلف

هموستاز گلوکز و مسیر پیام‌رسانی انسولین را بهبود می‌بخشد [۳۴]. علاوه بر این، ورزش می‌تواند اکسیداسیون اسیدهای چرب را از طریق سازکارهای بیوژنز میتوکندری افزایش دهد، که باعث کاهش توده‌ی چربی در افراد دیابتی می‌شود [۳۵]. این سازکارها شامل فعال‌سازی آدنوزین مونوفسفات کیناز<sup>۱</sup>، *PGC1 $\alpha$* ، پروتئین کیناز II وابسته به کلسیم/کالمودولین (*CAMKII*)، پروتئین کینازهای فعال شده با میتوز<sup>۲</sup> و *Sirtuin* (*SIRT3*)<sup>۳</sup>، که عوامل افزایش دهنده‌ی میوسیت و تنظیم کننده‌های مهم در سنتز پروتئین میتوکندری و توسعه‌ی توده‌ی میتوکندری هستند و علاوه بر این، هشت هفته تمرین استقامتی

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تمرینات ترکیبی (استقامت و مقاومتی) و استفاده هم‌زمان از ویتامین E و C (به تنهایی و ترکیبی) بر بیان مسیر *PGC1 $\alpha$*  و *Tfam* تأثیر می‌گذارد. علاوه بر این، غلظت گلوکز خون و میزان تغییرات وزن نشان دهنده تأثیر هم‌افزایی تمرینات و مکمل‌های ویتامین بر بهبود عملکرد بافت میوکارد موش‌های صحرایی دیابتی است. علاوه بر این، نتایج نشان داده است تمرینات ترکیبی و مصرف ویتامین E و C سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *PGC1 $\alpha$*  و *Tfam* شده است. این داده‌ها نشان داد که مصرف مکمل آنتی‌اکسیدانی و تمرینات ورزشی اثر آگونیستی بر روی بیوژنز میتوکندری دارد. ورزش

<sup>2</sup>Mitogen-activated protein kinase

<sup>1</sup> AMP-activated protein kinase

به‌طور قابل توجهی غلظت پروتئین<sup>۱</sup> Fas در بافت میوکارد موش‌های دیابتی را کاهش داد [۳۶].

در سال‌های اخیر با توجه به اثرات مفید آنتی‌اکسیدانی ویتامین‌ها مطالعات زیادی در جهت بهبودی دیابت نوع دوم انجام شده است. در مطالعه‌ای نشان داده شد که مصرف ویتامین E و C سبب بهبود گلوکز ناشتا، انسولین و HbA1c در مردان مبتلا به دیابت نوع دو شده است. از سویی در مطالعه‌ای دیگر که توسط Minter و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام شده است، مشاهده کردند هنگامی که سلول‌های اندوتلیال در معرض لیپوپولی ساکارید به اضافه ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پپتیدوگلیکان G قرار بگیرند میزان بیوزنز میتوکندریها به شدت کاهش می‌یابد و زمانی که به محیط کشت ۴ میکرو مولار ویتامین E و C اضافه می‌کنند میزان بیوزنز میتوکندری افزایش می‌یابد [۳۷]. در مطالعه‌ی مدرس‌ی و همکاران در سال ۲۰۲۰ مشخص گردید که میزان پروتئین PGC1 $\alpha$  و Tfam در موش‌های چاق به میزان قابل توجهی کاهش یافته بود. از سویی میزان سیترات سنتاز و سیتوکروم C اکسیداز نیز در موش‌های چاق در مقایسه با موش‌های سالم کاهش یافته بود. همچنین در این تحقیق نشان داده شد که انجام تمرینات استقامتی کوتاه مدت و بلند مدت سبب افزایش بیان و تنظیم عوامل مؤثر در عملکرد و بیوزنز میتوکندری دارد [۳۸]. در مطالعه‌ای دیگر توسط Meex و همکاران نشان داده شده که انجام تمرینات پُرفشار در مردان دیابتی سبب بهبود عملکرد زنجیره‌ی انتقال الکترون و افزایش سیتوکروم C اکسیداز شده است [۳۹]. از سویی، Chavanelle و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که ۸۰ دقیقه تمرینات ورزشی با شدت ۶۰ تا ۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی تأثیری بر روی بیان ژن‌های PGC1 $\alpha$  و Tfam موش‌های دیابتی ندارد [۴۰].

در اثر دیابت و چاقی میزان رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و در نتیجه میزان بیوزنز میتوکندری‌ها در اثر افزایش سطح رادیکال‌های آزاد کاهش می‌یابد [۳۷]. در گروه‌های تمرین و مکمل و ترکیب تمرین-مکمل، به دلیل افزایش بیان ژن‌های

<sup>1</sup> Fas Cell Surface Death Receptor

رابطه‌ی آنها با میزان بیوژنز میتوکندری از دیگر محدودیت‌های این مطالعه است.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از آقای دکتر امیر احمدی به دلیل کمک به انجام امور آزمایشگاهی و حمایت‌هایشان کمال سپاس و قدردانی را دارند.

می‌تواند به تفاوت در نوع و شدت برنامه تمرینی، نوع و دوز مکمل آنتی‌اکسیدانی در تحریک و تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسایش مربوط باشد. به‌کارگیری تمرینات ورزشی هوازی و مقاومتی با شدت، مدت و تکرارهای مختلف به‌طور جداگانه و مقایسه‌ی اثرات آنها با یکدیگر و با تمرین ترکیبی و از سویی استفاده از مکمل‌های ویتامین E و C به‌صورت جداگانه و مقایسه‌ی تأثیر آنها با مکمل ترکیبی ویتامین E و C می‌تواند از محدودیت‌های این مطالعه نام برد. همچنین، سنجش میزان رادیکال‌های آزاد و فاکتورهای التهابی و استرس اکسیداتیو و

### مآخذ

- Kim HS, Kim SY, Kwak YL, Hwang KC, Shim YH. Hyperglycemia attenuates myocardial preconditioning of remifentanyl. *Journal of Surgical Research* 2012; 174(2):231-7.
- Imam K. Clinical features, diagnostic criteria and pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes* 2013:340-55.
- Duan J, Zhang H-Y, Adkins SD, Ren BH, Norby FL, Zhang X, et al. Impaired cardiac function and IGF-I response in myocytes from calmodulin-diabetic mice: role of Akt and RhoA. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 2003; 284(2):E366-E76.
- Turan B, Tuncay E. Enhanced Antioxidant-Defense Preserves Cardiac Dysfunction via Regulation of Cytosolic Levels of Zn and Ca Ions in Hyperglycemic Cardiomyocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 2016;100:S178-S9.
- Tanoorsaz S, Behpour N, Tadibi V. Investigating the Effect of mid-term of aerobic exercise on apoptosis biomarkers in the cardiomyocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 2018; 7(4):488-97.
- Akyürek Ö, Akyürek N, Sayin T, Dinçer I, Berkalp B, Akyol G, et al. Association between the severity of heart failure and the susceptibility of myocytes to apoptosis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *International journal of cardiology* 2001; 80(1):29-36.
- Mooren FC, Bloming D, Lechtermann A, Lerch MM, Volker K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *Journal of applied physiology* 2002; 93(1):147-53.
- Hood DA, Tryon LD, Vainshtein A, Memme J, Chen C, Pauly M, et al. Exercise and the regulation of mitochondrial turnover. *Progress in molecular biology and translational science* 2015; 135:99-127.
- Cho YM, Park KS, Lee HK. Genetic factors related to mitochondrial function and risk of diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice* 2007; 77(3):S172-S7.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics* 2003; 34(3):267-73.
- Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481(7382):463-8.
- De Filippis E, Alvarez G, Berria R, Cusi K, Everman S, Meyer C, et al. Insulin-resistant muscle is exercise resistant: evidence for reduced response of nuclear-encoded mitochondrial genes to exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2008; 294(3):E607-E14.
- Wang CH, Wang CC, Wei YH. Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitochondrial role in type 2 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010; 1201(1):157-65.
- Rahimi G, Heydari S, Rahimi B, Abedpoor N, Niktab I, Safaeinejad Z, et al. A combination of herbal compound (SPTC) along with exercise or metformin more efficiently alleviated diabetic complications through down-regulation of stress oxidative pathway upon activating Nrf2-Keap1 axis in AGE rich diet-induced type 2 diabetic mice. *Nutrition & Metabolism* 2021; 18(1):1-14.
- Perry RC, Shankar RR, Fineberg N, McGill J, Baron AD. HbA1c measurement improves the



- detection of type 2 diabetes in high-risk individuals with nondiagnostic levels of fasting plasma glucose: the Early Diabetes Intervention Program (EDIP). *Diabetes Care* 2001;24(3):465-71.
16. Alper G, Olukman M, Irer S, Çağlayan O, Duman E, Yılmaz C, et al. Effect of vitamin E and C supplementation combined with oral antidiabetic therapy on the endothelial dysfunction in the neonatally streptozotocin injected diabetic rat. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2006; 22(3):190-7.
  17. Balbi ME, Tonin FS, Mendes AM, Borba HH, Wiens A, Fernandez-Llimos F, et al. Antioxidant effects of vitamins in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetology & metabolic syndrome* 2018;10(1):1-12.
  18. Christie-David DJ, Girgis CM, Gunton JE. Effects of vitamins C and D in type 2 diabetes mellitus. *Nutrition and Dietary Supplements*. 2015;7:21-8.
  19. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing research reviews* 2008; 7(1):34-42.
  20. Deng H, Wen Q, Luo Y, Huang Y, Huang R. Influence of different extracts from persimmon leaves on the antioxidant activity in diabetic mice. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban. Journal of Central South University Medical Sciences* 2012; 37(5):469-73.
  21. Church TS, Cheng YJ, Earnest CP, Barlow CE, Gibbons LW, Priest EL, et al. Exercise capacity and body composition as predictors of mortality among men with diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(1):83-8.
  22. Church TS, LaMonte MJ, Barlow CE, Blair SN. Cardiorespiratory fitness and body mass index as predictors of cardiovascular disease mortality among men with diabetes. *Archives of internal medicine* 2005; 165(18):2114-20.
  23. Kanter M, Aksu F, Takir M, Kostek O, Kanter B, Oymagil A. Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in Streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2017; 125(09):583-91.
  24. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metabolism* 2008; 7(1):45-56.
  25. Schwingshackl L, Missbach B, Dias S, König J, Hoffmann G. Impact of different training modalities on glycaemic control and blood lipids in patients with type 2 diabetes: a systematic review and network meta-analysis. *Diabetologia* 2014; 57(9):1789-97.
  26. Venditti P, Napolitano G, Barone D, Di Meo S. Vitamin E supplementation modifies adaptive responses to training in rat skeletal muscle. *Free radical research* 2014; 48(10):1179-89.
  27. Hejazi M. A Comparison of the Effect of Eight Weeks Aerobic Training and Vitamin C Supplements Consumption on Antioxidant Enzymes in Men With Type 2 Diabetes. *The Horizon of Medical Sciences* 2018; 24(2):103-10.
  28. Halter JB, Ouslander JG, Studenski S, High KP, Asthana S, Supiano MA, et al. *Hazzard's geriatric medicine and gerontology*: McGraw-Hill Professional Publishing; 2009.
  29. Jesudason DR, Dunstan K, Leong D, Wittert GA. Macrovascular risk and diagnostic criteria for type 2 diabetes: implications for the use of FPG and HbA1c for cost-effective screening. *Diabetes Care*. 2003; 26(2):485-90.
  30. Dotzert MS, McDonald MW, Murray MR, Nickels JZ, Noble EG, Melling CJ. Effect of combined exercise versus aerobic-only training on skeletal muscle lipid metabolism in a rodent model of type 1 diabetes. *Canadian journal of diabetes* 2018; 42(4):404-11.
  31. Poole DC, Copp SW, Colburn TD, Craig JC, Allen DL, Sturek M, et al. Guidelines for animal exercise and training protocols for cardiovascular studies. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2020; 318(5):H1100-H38.
  32. Garcia NF, Sponton AC, Delbin MA, Parente JM, Castro MM, Zanesco A, et al. Metabolic parameters and responsiveness of isolated iliac artery in LDLr<sup>-/-</sup> mice: role of aerobic exercise training. *American journal of cardiovascular disease* 2017; 7(2):64.
  33. McDonald MW, Dotzert MS, Jiang M, Murray MR, Noble EG, James Melling C. Exercise training induced cardioprotection with moderate hyperglycemia versus sedentary intensive glycemic control in type 1 diabetic rats. *Journal of diabetes research* 2018;2018.
  34. Fernandes T, Magalhães FdC, Carmo ECd, Oliveira Emd. Aerobic exercise training inhibits skeletal muscular apoptotic signaling mediated by VEGF-VEGR2 in spontaneously hypertensive rats. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 2012;18:412-8.
  35. Kolwicz Jr SC. An "exercise" in cardiac metabolism. *Frontiers in cardiovascular medicine* 2018; 5:66.
  36. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell* 2014; 159(4):738-49.
  37. Minter BE, Lowes DA, Webster NR, Galley HF. Differential effects of MitoVitE,  $\alpha$ -Tocopherol and Trolox on oxidative stress, mitochondrial function and inflammatory signalling pathways in endothelial cells cultured under conditions mimicking sepsis. *Antioxidants* 2020; 9(3):195.
  38. Modaresi MS, Fathei M, Hosseini SRA, Ziaaldini MM, Shahi MRS. The effects of two iso-volume endurance training protocols on mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic male mice. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2020; 19(2):1097-103.

39. Meex RC, Schrauwen-Hinderling VB, Moonen-Kornips E, Schaart G, Mensink M, Phielix E, et al. Restoration of muscle mitochondrial function and metabolic flexibility in type 2 diabetes by exercise training is paralleled by increased myocellular fat storage and improved insulin sensitivity. *Diabetes* 2010; 59(3):572-9.
40. 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.
41. Kędziora-Kornatowska K, Szram S, Kornatowski T, Szadujkis-Szadurski L, Kędziora J, Bartosz G. Effect of vitamin E and vitamin C supplementation on antioxidative state and renal glomerular basement membrane thickness in diabetic kidney. *Nephron Experimental Nephrology* 2003; 95(4):e134-e43.
42. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2016; 1863(12):2977-92.

## The Effect of Combined Training and Consumption of E And C Antioxidant Supplements On Mitochondrial Function and Biogenesis in the Heart Tissue of Diabetic Rats

Elaheh Heidarnia<sup>1</sup>, Farzaneh Taghian\*<sup>1</sup>, Khosro Jalali Dehkordi<sup>1</sup>, Mehrzad Moghadasi<sup>2</sup>

1. Department of Sports Physiology, Faculty of Sports Sciences , Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2. Department of Exercise physiology, shiraz Branch, Islamic Azad University, shiraz, Iran

### ABSTRACT

**Background:** The apoptosis process as a common status in heart injuries could be imposed significantly by hyperglycemia chronically. Therefore, the aim of this study was to investigate the inhibitory effects of concurrent training and antioxidant supplementation individually and in combination on biogenesis and function of mitochondrial in the heart tissue of diabetic rats with STZ.

**Methods:** In this experimental study, fifty male Sprague Dawley rats were classified into five groups (n=10 each group): healthy rats as control, diabetic rats, diabetic combined resistance/endurance training, diabetic rats which consumed supplementation vitamin E and C, and the combined supplementation and training. Here, we calculated changes in genes expression based on artificial intelligence methods and evaluated genes expression in apoptotic influencing combined training and antioxidants vitamins consumption in heart injured models by streptozotocin via Real-Time PCR. Combination training including, respectively, resistance training, 5 days a week with increasing intensity of 5-45% of rat weight and endurance training on treadmill increasingly from 10-30 minutes and intensity of 40-75% of maximum speed during 8 weeks. Data were analyzed by two-way ANOVA (P<0.05).

**Results:** the relative expression of PGC1 $\alpha$  and Tfam were significantly decreased between healthy control and diabetes controls group. The results indicated that significantly increased of PGC1 $\alpha$  and Tfam in the training(P<0.05), supplement(P<0.05) and combination groups(p<0.05). In addition, in this study, it was observed that supplementation and exercise had an increasing effect on the expression of PGC1 $\alpha$  and Tfam genes. On the other hand, glucose concentration and weight of rats treated with supplementation and exercise were significantly reduced compared to other groups (P<0.05).

**Conclusion:** Based on the results, interaction between antioxidant supplements and exercise reduced the glucose concentration and improved the mitochondrial biogenesis of heart tissue, while the combination of these two interventions compared to the effect of each alone, the effect has more.

**Keywords:** Combination Training, Antioxidant Supplements, Function and Mitochondrial Biogenesis, Diabetic Rats with STZ

\* Faculty of Sports Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, University Blvd, Jey Street, Arqavanieh, Iran, Isfahan. Postcode: 81551-39998, Tele: +989133080241, Fax: +9803135354135, Email: f\_taghian@yahoo.com

