

تأثیر شش هفته تمرین استقامتی به همراه مصرف مکمل کوئرستین بر بیان ژن های PGC-1 α و Atf2 میتوکندریایی هیپوکامپ رت های نر دیابتی

رها محمدی^۱، لطفعلی بلبلی^{۲*}، محمدجواد پوروقار^۳، رقیه افرونده^۴

تاریخ دریافت ۱۴۰۱/۰۹/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۰۲/۱۳

چکیده

پیش زمینه و هدف: هایپرگلیسمی ناشی از دیابت سبب اختلال در سیستم های قلبی - عروقی، کلیه، شبکه، عدسی چشم، پوست و سیستم عصبی مرکزی و محیطی می شود. از آنجایی که دو شاخص PGC-1 α و Atf2 در بیوژنز میتوکندریایی دخیل هستند، از این رو، مطالعه حاضر جهت بررسی تأثیر شش هفته تمرین استقامتی به همراه مصرف مکمل کوئرستین بر بیان ژن های PGC-1 α و Atf2 میتوکندریایی هیپوکامپ رت های نر دیابتی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش کار: پژوهش حاضر از نوع تجربی با طرح پس آزمون به همراه گروه کنترل بوده که به روش آزمایشگاهی انجام شد. در پژوهش حاضر، تعداد ۳۵ رت نژاد ویستار به ۵ گروه (۷ رت در هر گروه) شامل: سالم کنترل، دیابت کنترل، دیابت مکمل کوئرستین، دیابت تمرین و دیابت تمرین مکمل کوئرستین تقسیم شدند. به دو گروه آزمون (دیابتی تمرین مکمل و مکمل)، ۱۵ میلی گرم کوئرستین به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن، هر روز بعد از القای دیابت، تزریق شد. پروتکل مورد استفاده در پژوهش حاضر، ۶ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط (۵۰-۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) بود. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، بافت هیپوکامپ برای بررسی بیان ژن های PGC-1 α و Atf2 جدا شد. از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه با آزمون تعقیبی توکی (با سطح معناداری $P < 0/05$) برای بررسی داده ها استفاده شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که پس از ۶ هفته مداخله، میزان بیان ژن PGC-1 α و Atf2 در گروه دیابت تمرین مکمل نسبت به گروه های کنترل دیابت، دیابت تمرین و مکمل کوئرستین افزایش معنادار داشته ($P < 0/05$). گروه دیابت تمرین نیز نسبت به گروه دیابتی کنترل افزایش معناداری برای هر دو ژن مذکور داشت ($P < 0/05$).

بحث و نتیجه گیری: این گونه به نظر می رسد که ۶ هفته تمرین استقامتی به تنهایی و همراه با مصرف مکمل کوئرستین می تواند بر بیان ژن PGC-1 α و Atf2 میتوکندری تأثیر مثبتی داشته و باعث افزایش بیان آن ها در شرایط بیماری دیابت شود.

کلیدواژه ها: Atf2، تمرین استقامتی، کوئرستین، میتوکندری، PGC-1 α

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و چهارم، شماره اول، ص ۱۱-۱، فروردین ۱۴۰۲

آدرس مکاتبه: اردبیل، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، تلفن: ۰۴۵-۳۳۵۲۰۴۵۸

Email: l_bolboli@uma.ac.ir

مقدمه

عصبی محیطی و مرکزی نتیجه گیری می شود که بیماری های عصبی می توانند عوارض ناتوان کننده به همراه داشته و بر ناحیه های حساس مغز مثل هیپوکامپ تأثیرگذار باشند (۳). هیپوکامپ از جمله نواحی حساس مغز است که در مقابل عوامل آسیب رسان مانند استرس، ایسکمی و DM بسیار آسیب پذیر بوده و طی آن دستخوش تغییرات

دیابت ملیتوس (DM^۵) عوارضی از قبیل آتروژنز، فشارخون، بیماری های کلیوی، قلبی - عروقی و بسیاری از بیماری های دستگاه عصبی محیطی و مرکزی را به همراه دارد (۱، ۲). با بررسی دستگاه

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۲ استاد گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

^۴ دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۵ Diabetes Mellitus

نوروفیزیولوژیکی، ساختاری و مولکولی می شود (۴). از آنجایی که بیماران دیابتی در معرض استرس اکسیداتیو هستند، با افزایش استرس اکسیداتیو میزان فعالیت آنزیم ها، عملکرد و ساختار اندام ها و به افت های مختلف از قبیل مغز دست خوش تغییراتی می شود (۲، ۵). سطح بالای رادیکال های آزاد و افزایش استرس اکسیداتیو در بیماری DM سبب تضعیف سیستم آنتی اکسیدانی می شود و باعث صدمه به اندام های سلولی از قبیل میتوکندری شده و در ادامه به ایجاد و پیشرفت عوارض این بیماری می انجامد (۶، ۷).

شواهد نشان دهنده آن است که بیماری DM خطر آترونی مغز و در نتیجه بیماری آلزایمر را افزایش می دهد (۸). در واقع، تجمع یافتن گونه های فعال اکسیژنی (ROS) که جایگاه اصلی سنتز آن میتوکندری است منجر به استرس اکسیداتیو می شود و عامل اصلی در بیماری آلزایمر (AD^۲) به شمار می رود (۹، ۱۰). گزارش شده است که در افراد دارای AD در دیواره ی عروق مارکرهای استرس اکسیداتیو، حذف mtDNA و ناهنجاری در ساختار میتوکندری افزایش می یابد (۱۱). بنابراین، از فرآیندهای حائز اهمیت سلولی در بیماری DM بایونتر میتوکندریایی می باشد. تنظیم کننده مهم در ساخت میتوکندری PGC-1 α می باشد که متابولیسم اکسیداتیو در برخی از به افت ها را به خوبی تنظیم می کند (۱۲، ۱۳). دو شاخص PGC-1 α و Atf2 به عنوان فاکتورهای کمکی برای هماهنگی بایونتری و کاتابولیسم میتوکندری هستند (۱۳). این گونه مطرح شده است تحریکات بیرونی از قبیل تمرینات ورزشی از طریق p38MAPK باعث فعالیت Atf2 شده که در نهایت باعث بیان شاخص PGC-1 α می شود (۱۴).

فعالیت های ورزشی به طور گسترده ای به عنوان یک روش برای جلوگیری و کنترل بسیاری از بیماری ها به خصوص DM توصیه شده است (۱۵، ۱۶). مطالعات گسترده ای نشان داده اند که تمرین منظم استقامتی سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم های میتوکندری و افزایش حداکثر اکسیژن مصرفی میتوکندری می شود (۱۷، ۱۸). چنانچه در مطالعه Seyyedy و همکاران (۲۰۲۲) که به بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط بر سطوح پروتئینی PGC-1 α و NRF2 در قلب موش های دیابتی پرداخته شد. نتایج نشان داد که تمرین استقامتی باعث افزایش میزان شاخص های مذکور شده است (۱۹) و یا در تحقیق استکی و همکاران (۱۳۹۸) که به بررسی تأثیر ۸ هفته تمرین ورزشی هوازی بر میزان PGC-1 α و Atf2 قشر مخ در شرایط آلودگی پرداخته شد.

یافته ها نشان داد که تمرین هوازی باعث افزایش بیان Atf2 و PGC-1 α قشر مخ در شرایط آلودگی هوا شده است (۲۰).

از سوی دیگر ثابت شده است که گیاهان دارویی نیز در درمان بیماری دیابت بسیار رایج هستند (۲۱). از فواید عمده استفاده از گیاهان دارویی، مؤثر بودن، آثار جانبی کمتر و قیمت پایین آن ها است (۱۴). یکی از فراوان ترین خانواده ی فلاونوئیدها مکمل کوئرستین بوده که خاصیت آنتی اکسیدانی زیادی دارد و تحقیقات قبلی بیان کرده اند که حدود شش برابر در مقایسه با ویتامین ث قوی تر می باشد. مصرف این مکمل تا میزان ۱۰۰۰ mg در روز به خوبی در انسان قابل تحمل است و تاکنون در نتیجه ی مصرف آن اثرات مضر فیزیولوژیکی یا عوارض جانبی دیده نشده است (۲۲). خوشبختانه اخیراً نشان داده شده است که مصرف مکمل کوئرستین می تواند از میتوکندری های مغزی در برابر آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو محافظت کرده و باعث بهبود عملکرد میتوکندریایی شود (۲۳، ۲۴). بدین ترتیب، پشتوانه ی تحقیقاتی که شامل اثر مثبت محافظتی کوئرستین بر میتوکندری باشد در دسترس است و در پژوهش حاضر براساس این پژوهش ها این گیاه را انتخاب شده است. به دلیل اینکه در رابطه با تأثیر هم زمان ورزش استقامتی و کوئرستین بر روی سازگاری های سلولی - مولکولی میتوکندری هیپوکامپ بیماران دیابتی خلأ تحقیقاتی وجود دارد. از این رو، در این مطالعه به بررسی تغییرات بیان ژن PGC-1 α و Atf2 میتوکندری در سازگاری با فعالیت ورزشی و مصرف کوئرستین پرداخته شد. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ۶ تمرین استقامتی به همراه مصرف مکمل کوئرستین بر بیان ژن های PGC-1 α و Atf2 میتوکندری هیپوکامپ رت های نر دیابتی بود.

مواد و روش کار

تحقیق حاضر از نوع تجربی با طرح پس آزمون به همراه گروه کنترل بوده که به روش آزمایشگاهی انجام شد. در این پژوهش ۳۵ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار مورد آزمایش از خانه حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری شد. کد اخلاق در پژوهش پژوهش حاضر IR.SSRC.REC.1401.097 می باشد. پس از انتقال رت ها به محیط آزمایشگاه، به صورت گروه های ۲ و ۳ تایی در قفس های پلی کربنات شفاف در محیطی با دمای ۲۴±۱ درجه سانتیگراد و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. طی دوره پژوهش، حیوانات به صورت آزاد به غذا و آب مورد نیازشان دسترسی داشتند. در طول مرحله، به منظور آشنایی رت ها با شرایط آزمایشگاه و نوارگردان، حیوانات ۵ روز در هفته به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و با سرعت ۵-۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند و با چگونگی دویدن بر روی نوارگردان آشنا

² Alzheimers Disease

¹ Reactive Oxygen Species

دوره، به گروه‌های دیابت کوئرتستین، دیابتی تمرین به همراه مصرف مکمل بعد از القای دیابت، ۱۵ میلی‌گرم کوئرتستین به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن در روز تزریق شد (۲۵).

پروتکل تمرینی:

پروتکل مورد استفاده در تحقیق حاضر برطبق مطالعه Coskun و همکاران بود، بدین ترتیب تمرین استقامتی با شدت متوسط (۵۰-۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) به اجرا درآمد (۲۷). در این پروتکل گروه‌های تمرینی در معرض تمرین نوارگردان حیوانی (مدل آذرخش) برای ۵ جلسه در هفته و به مدت ۶ هفته قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به تدریج افزایش یافت. تمامی متغیرهای تمرینی در هفته‌ی پایانی، هفته ششم جهت یکنواخت کردن سازگاری‌های به‌دست آمده، ثابت نگه داشته شدند. همچنین در این پروتکل، برای گرم کردن و برای سرد کردن هر کدام به‌صورت مجزا ۳ دقیقه زمان در نظر گرفته شد (۲۸). پروتکل تمرینی فزاینده و بدون شیب در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول (۱): نمایش عددی پروتکل در هفته‌های مختلف تمرین

هفته‌ها	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
مدت تمرین (دقیقه)	۱۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۳۰
سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)	۱۰	۱۰	۱۵	۱۵	۱۸	۱۸

گردید. بدین ترتیب نمونه‌هایی که نسبت جذب آن‌ها بیش از ۱/۸ بوده جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. برای سنتز cDNA: کیت تجاری AmpliSence استفاده شد. واکنش ابتدا روی به افت‌های هیپوکامپ به‌منظور تأیید بیان ژن‌های مورد بررسی انجام و پس از آن برای بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها از آزمون PCR در زمان حقیقی استفاده شد. همچنین برای طراحی پروب و پرایمر، نرم‌افزار Beacon designer TM7/01 به‌کار گرفته شد. برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها، روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و کیت تجاری PCR Probe Master Bioneer به‌کار گرفته شد. میزان مقایسه‌ای بیان دو ژن PGC-1 α و Atf2 در مقایسه با بیان GAPDH در هر بافت توسط نرم‌افزار ژن، ارزیابی و براساس رابطه‌ی $2^{-\Delta\Delta Ct}$ گزارش گردید.

جدول (۲): توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

Genes	Forward	Reverse
GAPDH	ACAGGCCAGACTTTGTTGGA	TGGCTTTTCCACTTTCGCTG
PGC-1 α	GCAACATGCTCAAGCCAAAC	TGCAGTTCCAGAGAGTTCCA
Atf2	AGAAGTCTGGCTATCATACTGCTG	AAGTGGCTCCAGCTTCTGTT

شدند به‌صورت تصادفی ۷ سر رت به‌عنوان (۱) گروه کنترل سالم انتخاب شده و پس از آن بقیه موش‌ها جهت القای دیابت با استرپتوزوتوسین (STZ^۱) مورد تزریق قرار گرفتند. پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، با تزریق درون صفاقی ۶۰ mg/kg محلول استرپتوزوسین (Sigma S0130-1G) USA، تهیه شده در بافر سیترات تازه ۰/۱ مولار با PH۴.۵ = دیابتی شدند (۲۵). مدت‌زمان ۷۲ ساعت پس از تزریق، بر روی ورید دم یک جراحی ایجاد گردید و یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار گرفت و به‌وسیله دستگاه گلوکومتر (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) اندازه‌گیری شد و رت‌هایی که قند خون آن‌ها ۲۰۵ mg/dl یا بالاتر از آن باشد، به‌عنوان گروه دیابتی در نظر گرفته شدند (۲۵). میزان قند خون رت‌ها به‌طور منظم هر ۱۴ روز یکبار اندازه‌گیری شد تا از عدم بازگشت قند خون اطمینان حاصل گردد (۲۶). در ادامه نیز رت‌های دیابتی شده با STZ به‌صورت تصادفی در ۴ گروه ۷ تایی: (۲) گروه دیابت کنترل، (۳) گروه دیابت کوئرتستین، (۴) دیابت تمرینی و (۵) دیابت تمرین به همراه مکمل کوئرتستین تقسیم شدند. در طول

نمونه‌برداری و بیان ژن:

پس از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین جلسه‌ی تمرین استقامتی، رت‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی ۷۵ ml/kg-1 کتامین و ۵ ml/kg-1 زایلازین بیهوش شدند و درادامه در شرایط استریل بافت هیپوکامپ جدا شد. پس از استخراج هیپوکامپ، این به‌افت‌ها را فوراً داخل نیتروژن مایع قرار داده و در ادامه در فریزر -۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منجمد و تا زمان انجام آزمایش‌های سلولی-مولکولی در آن‌جا نگهداری شدند. با استفاده از کیت تجاری TRIzol و براساس روش ارائه شده شرکت، استخراج RNA صورت گرفت. مقادیر غلظت و خلوص نمونه‌های RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر بیوفتومتر پس از قرائت جذب آن‌ها در طول موج ۲۶۰nm و نیز محاسبه کردن نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ مشخص

¹ Streptozotocin

تحلیل آماری:

داده های تحقیق حاضر با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ تجزیه و تحلیل شد. از آزمون شاپیروویلک (با سطح معناداری $P \geq 0.05$) و آزمون تحلیل واریانس یک طرفه با آزمون تعقیبی Tukey (با سطح معناداری $P < 0.05$) به ترتیب برای بررسی نرمال بودن داده ها و برای مقایسه گروه ها استفاده شد.

نتایج تجزیه و تحلیل بافت هیپوکامپ:

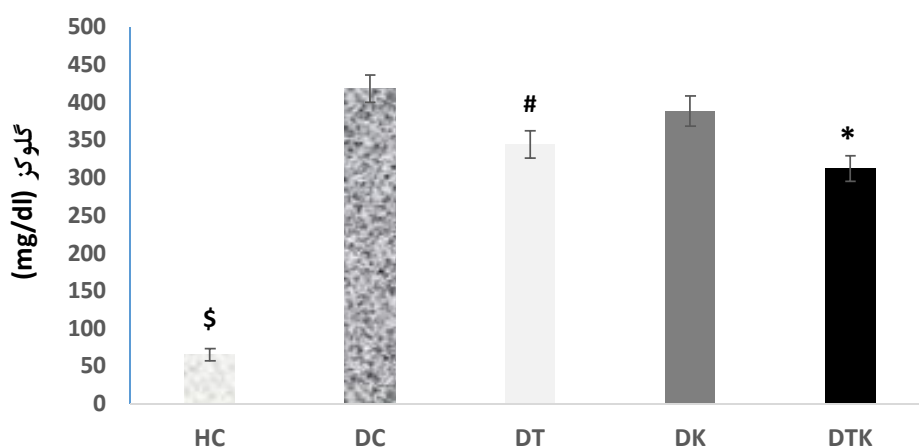
بر اساس آزمون شاپیروویلک مشخص گردید که بین پنج گروه تفاوت معناداری وجود ندارد و میزان نرمالیت PGC-1 α و Atf2 به ترتیب با سطح معناداری 0.083 و 0.09 گزارش شد، همچنین نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که برای هر سه شاخص گلوکز، PGC-1 α و Atf2 بین پنج گروه با سطح معناداری ($P = 0.001$) تفاوت وجود دارد. نتایج آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که ۶ هفته تمرین استقامتی به تنهایی و همراه با

مصرف مکمل کوثرستین باعث کنترل سطوح خون موش های دیابتی با سطح معناداری ($P = 0.001$) نسبت به گروه کنترل دیابت می شود. نتایج آزمون تعقیبی توکی برای PGC-1 α نشان داد که میزان بیان ژن در گروه دیابت تمین مکمل نسبت به گروه کنترل دیابت، دیابت تمرین و مکمل کوثرستین با سطح معناداری ($P = 0.001$) افزایش معناداری داشته است. همچنین میزان بیان ژن آن در گروه دیابت تمرین نسبت به گروه کنترل دیابت با سطح معناداری ($P = 0.003$) افزایش معناداری داشته است. نتایج آزمون تعقیبی Tukey برای Atf2 نشان داد که میزان بیان ژن آن در گروه دیابت تمرین مکمل نسبت به گروه کنترل دیابت، دیابت تمرین و مکمل کوثرستین به ترتیب با سطح معناداری ($P = 0.001$)، ($P = 0.001$) و ($P = 0.001$) افزایش معناداری داشته است. همچنین میزان بیان ژن آن در گروه دیابت تمرین نسبت به گروه کنترل دیابت با سطح معناداری ($P = 0.001$) افزایش معناداری داشته است.

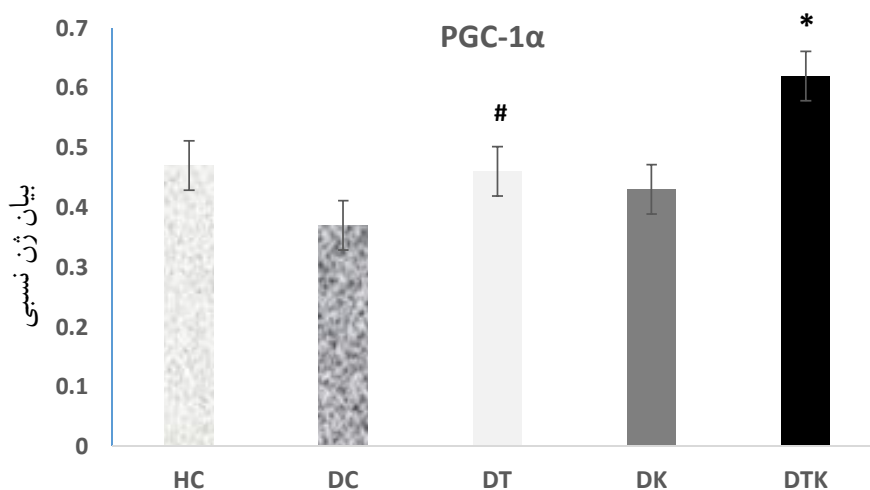
جدول (۳): نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی

تحلیل واریانس یک راهه			آزمون تعقیبی PGC-1 α			آزمون تعقیبی Atf2		
P	فاکتورها		P	گروه ها		P	گروه ها	
$\times P < 0.001$	PGC-1 α	CH	CH	DC	#P < 0.001	CH	DC	#0.042
		DT	DT	DT	0.949	DT	DT	0.720
		DK	DK	DK	0.192	DK	DK	0.848
		DKT	DKT	DKT	#P < 0.001	DKT	DKT	#P < 0.001
		CH	CH	DC	#P < 0.001	CH	DC	0.042
		DT	DT	DT	#0.003	DT	DT	#0.001
		DK	DK	DK	0.116	DK	DK	0.267
		DKT	DKT	DKT	#P < 0.001	DKT	DKT	#P < 0.001
		CH	CH	DT	0.949	CH	DT	0.720
		DC	DC	DT	#0.003	DC	DT	#0.001
		DK	DK	DT	0.560	DK	DT	0.156
		DKT	DKT	DT	#P < 0.001	DKT	DT	#P < 0.001
$\times P < 0.001$	Atf2	CH	CH	DK	0.192	CH	DK	0.848
		CD	CD	DK	0.119	CD	DK	0.267
		DT	DT	DK	0.560	DT	DK	0.156
		DKT	DKT	DK	#P < 0.001	DKT	DK	#P < 0.001
		CH	CH	DKT	#P < 0.001	CH	DKT	#P < 0.001
		CD	CD	DKT	#P < 0.001	CD	DKT	#P < 0.001
		DT	DT	DKT	#P < 0.001	DT	DKT	#P < 0.001
		DK	DK	DKT	#P < 0.001	DK	DKT	#P < 0.001

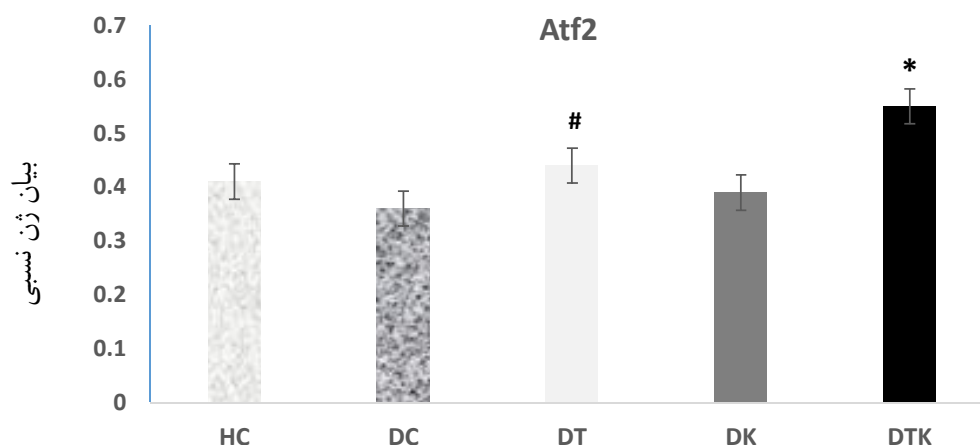
$\times$ نشان دهنده تفاوت معنادار آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و # نشان دهنده تفاوت معنادار دوجه دو در گروه ها. علائم اختصاری: HC: سالم کنترل، DC: کنترل دیابت، DT: تمرین دیابت، DK: مکمل دیابت و DKT: مکمل دیابت تمرین.



نمودار (۱): سطح سرمی گلوکز ناشتا ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) در موش‌های صحرایی گروه‌های مختلف پس از ۶ هفته تمرین استقامتی. «تفاوت معنادار بین گروه دیابت تمرین مکمل نسبت به مکمل کوئرسستین و دیابت کنترل و # نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه دیابت تمرین نسبت به گروه دیابت کنترل و مکمل کوئرسستین. علائم اختصاری: HC: سالم کنترل، DC: کنترل دیابت، DT: تمرین دیابت، DK: مکمل دیابت و DTK: مکمل دیابت تمرین.



نمودار (۲): میزان بیان ژن آنزیم PGC-1α بافت هیپوکامپ پس از شش هفته تمرین استقامتی بر اساس آزمون آماری تحلیل واریانس یک راهه. «نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه دیابت تمرین مکمل نسبت به گروه‌های دیابت کنترل، دیابت تمرین و مکمل کوئرسستین و # نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین گروه دیابت تمرین با گروه دیابت کنترل. علائم اختصاری: HC: سالم کنترل، DC: کنترل دیابت، DT: تمرین دیابت، DK: مکمل دیابت و DTK: مکمل دیابت تمرین.



نمودار (۳): میزان بیان ژن آنزیم Atf2 بافت هیپوکامپ پس از شش هفته تمرین استقامتی بر اساس آزمون آماری تحلیل واریانس یک راهه. *نشان دهنده تفاوت معنادار بین گروه دیابت تمرین مکمل نسبت به گروه های دیابت کنترل، دیابت تمرین و مکمل کوثرستین و # نشان دهنده اختلاف معنادار بین گروه دیابت تمرین با گروه دیابت کنترل. علائم اختصاری: HC: سالم کنترل، DC: کنترل دیابت، DT: تمرین دیابت، DK: مکمل دیابت و DKT: مکمل دیابت تمرین.

بحث و نتیجه گیری

هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین استقامتی به همراه مصرف مکمل کوثرستین بر بیان ژن های PGC-1 α و Atf2 میتوکندریایی بافت هیپوکامپ رت های نر دیابتی بود. نتایج نشان داد که STZ باعث افزایش سطوح گلوکز خون موش ها شده است. نتایج تحقیقات نشان می دهد که STZ با وارد نمودن آسیب به غشاء سلول های بتا پانکراس موجب تخریب این سلول ها که وظیفه بیوسنتز و ترشح انسولین را دارند شده، لذا از این طریق موجب افزایش گلوکز خون می شود (۲۹). اجرای ۶ هفته تمرین استقامتی با و بدون مصرف مکمل کوثرستین باعث کنترل سطوح گلوکز خون موش های دیابتی و افزایش بیان ژن های PGC-1 α و Atf2 در بافت هیپوکامپ حیوانات دیابتی شده است. لازم به ذکر است هنگامی که تمرینات به همراه مصرف مکمل بوده این تغییرات محسوس تر است. درمورد گروه مکمل کوثرستین نسبت به گروه دیابت اگرچه کاهش معناداری در سطوح گلوکز مشاهده نشده است، اما کاهش چشمگیری در این گروه داشته است که علت آن می تواند فلاونوئیدهای کوثرستین باشد، چراکه مشخص شده است فلاونوئیدهای مختلف قادرند قند خون را کاهش دهند و ترشح انسولین و حساسیت به آن را افزایش دهند (۳۰، ۳۱).

ازجمله شاخص های بایوژن میتوکندریایی اندازه گیری شده در پژوهش حاضر میزان بیان ژن PGC-1 α و Atf2 در هیپوکامپ

موش های دیابتی بود و نتایج نشان داد اجرای ۶ هفته تمرین استقامتی با و بدون مصرف مکمل باعث افزایش سطوح بیان ژن آن ها شده است و مصرف کوثرستین به تنهایی نسبت به گروه دیابت اگرچه تاحدودی باعث بهبود بیان ژن آن شده است، اما این افزایش معنادار نبوده است. این گونه به نظر می رسد که ظاهراً این مکمل با اثر بر تعدیل گونه های آزاد اکسایشی و اثر ضد التهابی نقش خود را در زمینه تولید انرژی و افزایش بایوژن میتوکندری ایفا می کند (۲۳). بنابراین، در مصداق بهبود بیان ژن و افزایش بیان ژن دو شاخص مذکور می توان این گونه بیان نمود که کوثرستین با ایجاد تعادل در استرس اکسایشی و وضعیت آنتی اکسیدانی در بایوژن میتوکندری اثر مثبتی دارد و بدین ترتیب می تواند در افزایش بیان PGC-1 α و Atf2 نقش خود را ایفا کند. در کنار مصرف مکمل کوثرستین، فعالیت ورزشی ازجمله عوامل اثرگذار بر بایوژن میتوکندری بوده و همان طور که مشاهده شده است باعث افزایش بیان ژن های مذکور شده است. اگرچه در تمام به افت ها نمی توان یک عامل تنظیم کننده را بیان کرد که در همه مسیرهای درگیر در ایجاد سازگاری های تمرینات استقامتی نقش دارند، اما شواهد این گونه نشان می دهند که هر دو شاخص PGC-1 α و Atf2 فاکتورهای کمکی برای هماهنگی کاتابولیکی و بایوژن میتوکندریایی هستند (۱۳). اکثر مطالعات حاکی از افزایش دو شاخص بارز میتوکندریایی PGC-1 α و Atf2 پس از فعالیت ورزشی بوده اند. چنانچه می بینیم در مطالعه

نشان می‌دهد که Atf2 برای پیشرفت سیستم عصبی مرکزی و محیطی نیاز است (۴۱). بدین ترتیب، بیان mRNA Atf2 در چندین نقطه مغز صورت گرفته، اما تنظیمات آن ناشناخته است. همچنین مسیر Atf2-P38mapk در نواحی از مغز توسط عوامل پیش‌التهابی همچون $TNF-\alpha$ آلفا بر روی سلول‌های میکروگلیا تأثیرگذار بوده است (۴۲)، پس ممکن است این مسیر توسط تمرین تقویت شده، بنابراین بر بیان Atf2 در بافت مغز تأثیرگذار باشد. درمورد تأثیر مکمل کوئرستین بر شاخص‌های مذکور در شرایط بیماری یا شرایط فیزیولوژیک پژوهشی یافت نشد، اما ظاهراً هنگامی که مصرف این مکمل با تمرین ورزشی باشد تغییرات بیان این دو ژن نسبت به زمانی که تمرین به تنهایی اجرا شد، بیشتر است. از جمله محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم اندازه‌گیری سایر متغیرهای درگیر در روند آنژیوژنز و میزان بیان پروتئینی شاخص‌های مذکور است. این گونه به نظر می‌رسد که مصرف مکمل کوئرستین به تنهایی نتوانسته میزان سطوح گلوکز، $PGC-1\alpha$ و Atf2 را کنترل کند، اما هنگامی که مصرف مکمل همراه با تمرین ورزشی باشد نسبت به زمانی که تمرین به تنهایی انجام شود اثرگذاری بیشتری بر سطوح کنترل خون و میزان بیان ژن‌های $PGC-1\alpha$ و Atf2 دیده می‌شود. پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های آتی محققان به تغییر دوز مصرفی این مکمل و بررسی شاخص‌های مرتبط در بیماری DM بپردازند.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری در گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی است. هزینه اجرای آن از محل اعتبار پژوهانه واحد پژوهشی دانشگاه تأمین شده است. صمیمانه از مسئولین و کسانی که در اجرای تحقیق ما را یاری نمودند سپاسگزاری می‌نمایم.

Liang و همکاران (۲۰۲۱) (۳۲)، Lee و همکاران (۲۰۲۱) (۳۳)، Wang و همکاران (۲۰۲۰) (۳۴) و Shute و همکاران (۲۰۱۸) (۳۵) افزایش میزان آن‌ها پس از تمرینات ورزشی دیده شده است، اما در بخش کمی از نتایج مطالعات چنین تأثیری دیده نشد. همچنین خدابنده و همکاران (۱۴۰۰) (۳۶) نشان دادند که تمرین مقاومتی تأثیری بر بیان $PGC-1\alpha$ بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند اثری ندارد و یا در مطالعه شعبانی و همکاران (۱۳۹۵) (۳۷) بیان شده است که تمرین مقاومتی بر $PGC-1\alpha$ عضله قلبی موش‌های نر سالم تأثیر معناداری ندارد. شاید تفاوت در بافت بررسی شده (بافت قلب و کبد در مقابل بافت مغز) و همچنین، نوع حیوانات مورد بررسی (سالمند و سالم در مقابل دیابتی) و همچنین تفاوت در پروتکل‌های تمرینی (مقاومتی در مقابل استقامتی) باعث تفاوت در نتایج شده است. دلایل تغییر سطوح که برای افزایش $PGC-1\alpha$ می‌توان در نظر گرفت مسیرهای پیام‌رسانی است که بهترین مسیر AMPK است، چرا هنگام فعالیت ورزشی و در نتیجه تقاضای بیشتر انرژی افزایش AMP، کلسیم درون سلولی و گونه‌های آزاد اکسیژن دیده می‌شود. بدین ترتیب این تغییرات باعث فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی از قبیل AMPK و $p38AMPK$ می‌شود (۳۸). در نتیجه با افزایش کلسیم درون‌سلولی متعاقب تمرین ورزشی فعالیت آنزیم‌های میتوکندریایی و سیتوکروم c افزایش می‌یابد که این فرآیند نیز باعث افزایش بیان ژن $PGC-1\alpha$ و Atf2 می‌شود (۳۹). به‌طور کلی این‌گونه مطرح شده است که تمرینات ورزشی از طریق مسیر $p38AMPK$ به‌طور مستقیم باعث فعالیت شاخص Atf2 می‌شوند که در نتیجه افزایش $PGC-1\alpha$ دیده می‌شود. افزایش بیان $PGC-1\alpha$ احتمالاً سازوکاری برای تعدیل جریان‌های متابولیکی در پاسخ به کاهش سطوح ATP و دگرگونی نیازهای سوختی ناشی از فعالیت ورزشی یا محدودیت کالری است (۴۰). در رابطه با نقش بیولوژیکی Atf2 در بافت مغز اطلاعات کمی وجود دارد؛ البته نتایج مطالعات

References:

- Maritim A, Sanders a, Watkins Iii J. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol 2003;17(1):24-38.
- Bolboli L, Khajehlandi M. The Effect of Six Weeks of Moderate-Intensity Endurance Training on Serum Levels of Klotho and Expression of the Fibroblast-23 Growth Factor Gene (FGF23) in the Hearts of Diabetic Rats: An Experimental Study. J Rafsanjan Univ Med Sci Health Serv 2021;20(4):371-86.
- Alipour M, Salehi I, Ghadiri Soufi F. Effect of exercise on diabetes-induced oxidative stress in the rat hippocampus. Red Crescent Med J 2012;14(4):222-8.
- Orlovsky M, Spiga F, Lebed Y, Skibo G, Lightman S. Early molecular events in the hippocampus of rats with streptozotocin-induced diabetes. Clin Neurophysiol 2007;39(6):435-8.
- Wang B-n, Wu C-b, Chen Z-m, Zheng P-p, Liu Y-

- q, Xiong J, et al. DL-3-n-butylphthalide ameliorates diabetes-associated cognitive decline by enhancing PI3K/Akt signaling and suppressing oxidative stress. *Acta Pharmacol Sin* 2021;42(3):347-60.
6. Lukačínová A, Mojžiš J, Beňačka R, Rácz O, Ništiar F. Structure-activity relationships of preventive effects of flavonoids in alloxan-induced diabetes mellitus in rats. *J Anim Feed Sci* 2008;17(3):411-21.
 7. Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler H, Rosen P, Halliwell B, et al. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 1997;40(6):647-53.
 8. Šerbedžija P, Madl JE, Ishii DN. Insulin and IGF-I prevent brain atrophy and DNA loss in diabetes. *Brain Res Bull* 2009; 1303:179-94.
 9. Dumont M, Beal MF. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 2011;51(5):1014-26.
 10. Müller M, Cheung K-H, Fosskett JK. Enhanced ROS generation mediated by Alzheimer's disease presenilin regulation of InsP3R Ca²⁺ signaling. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(7):1225-35.
 11. Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 2006;15(9):1437-49.
 12. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect* 2003;111(4):455-60.
 13. Arany Z. PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease *Curr Opin Genet Dev* 2008;18(5):426-34.
 14. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* 2011;93(4):884S-90S.
 15. Warst A, Wang P, LaValley M, Avorn J, Solomon D. American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations Diabetes Care: 1 (S1) 12. Self-management education program in chronic disease: a systematic review and methodological critique of the literature. *Arch Intern Med* 146(15):1641-9.
 16. Weinger K, de Groot M, Cefalu WT. Psychosocial research and care in diabetes: altering lives by understanding attitudes. *Diabetes Care* 2016;39(12):2122-5.
 17. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 2013;17(2):162-84.
 18. Arabmomeni A, Mohebbi H, Riasi A, Marandi M. Effect of intermittent training on oxidative and glycolytic capacity in rat skeletal muscles. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2014;22(5):1554-66.
 19. Seyyidi SM, Tofighi A, Rahmati M, Toloueiazar J. Exercise and Urtica Dioica extract ameliorate mitochondrial function and the expression of cardiac muscle Nuclear Respiratory Factor 2 and Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha in STZ-induced diabetic rats. *Gene* 2022:146351.
 20. Steki A, Valipour V, Ghahramanlo E, Kargarfard M. The effect of endurance training in air pollution on the expression of brain cortex PGC-1 α and Atf2 genes in Wistar male rats. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2019;23(6):615-626.
 21. Pari L, Maheswari JU. Hypoglycaemic effect of Musa sapientum L. in alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 1999;68(1-3):321-5.
 22. Knab AM, Shanely RA, Henson DA, Jin F, Heinz SA, Austin MD, et al. Influence of quercetin supplementation on disease risk factors in community-dwelling adults. *J Acad Nutr Diet* 2011;111(4):542-9.
 23. Lakroun Z, Kebiche M, Lahouel A, Zama D,

- Desor F, Soulimani R. Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in rat. *Environ Sci Pollut Res* 2015;22(10):7776-81.
24. Costa LG, Garrick JM, Roqu  PJ, Pellacani C. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:2986796.
 25. Kilincarslan G, Donmez N. Effect of Quercetin Administration and Exercise on Plasma Cytokine Levels in Rats with STZ Induced Diabetes. *Bull Env Pharmacol* 2019;8:119-27.
 26. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung Circ* 2003;12(1):44-50.
 27. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 2005;51(2):117-23.
 28. Chen S-R, Pan H-L. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *J Neurophysiol* 2002;87(6):2726-33.
 29. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord* 2013;12(1):1-7.
 30. Hanhineva K, T rr nen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykk nen H, et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci* 2010;11(4):1365-402.
 31. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol* 1983;32(7):1141-8.
 32. Liang J, Zhang H, Zeng Z, Wu L, Zhang Y, Guo Y, et al. Lifelong Aerobic Exercise Alleviates Sarcopenia by Activating Autophagy and Inhibiting Protein Degradation via the AMPK/PGC-1 α Signaling Pathway. *Metabolites* 2021;11(5):323.
 33. Lee J-H, Zhang D, Kwak S-E, Shin H-E, Song W. Effects of exercise and a high-fat, high-sucrose restriction diet on metabolic indicators, Nr4a3, and mitochondria-associated protein expression in the gastrocnemius muscles of mice with diet-induced obesity. *J Obes Metab Syndr* 2021;30(1):44.
 34. Wang SY, Zhu S, Wu J, Zhang M, Xu Y, Xu W, et al. Exercise enhances cardiac function by improving mitochondrial dysfunction and maintaining energy homeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy. *J Mol Med* 2020;98(2):245-61.
 35. Shute RJ, Heesch MW, Zak RB, Kreiling JL, Slivka DR. Effects of exercise in a cold environment on transcriptional control of PGC-1 α . *Am J Physiol Regul Integr* 2018;314(6):R850-R7.
 36. Khodabandeh M, Peeri M, Azarbayjani MA, Matinhomae H. Effect of Resistance Exercise and Liposomal Vitamin C on Some Factors of Mitochondrial Dynamics and Biogenesis. *J Complement Med Res* 2021;11(1):82-97.
 37. Shabani M, Choobineh S, Kordi MR, Afghan M. The effect of 8 weeks of high intensity interval training on the expression of PGC-1 α and VEGF genes in myocardial muscle of male healthy rats. *J Sports Sci* 2016;8(2):169-76.
 38. Kang C, Li Ji L. Role of PGC-1 α signaling in skeletal muscle health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1271(1):110-7.
 39. Anghel L, Duca G. A review of the biogenesis of iron nanoparticles using microorganisms and their applications. *Chem J Mold* 2013;8(2):32-41.
 40. Novelle MG, Contreras C, Romero-Pic  A, L pez M, Di guez C. Irisin, two years later. *Int J Endocrinol* 2013;2013.
 41. Huguier S, Baguet J, Perez S, van Dam H, Castellazzi M. Transcription factor ATF2

cooperates with v-Jun to promote growth factor-independent proliferation in vitro and tumor formation in vivo. Mol Cell Biol 1998;18(12):7020-9.

42. Li M, Zhang D, Ge X, Zhu X, Zhou Y, Zhang Y, et al. TRAF6-p38/JNK-ATF2 axis promotes microglial inflammatory activation. Exp Cell Res 2019;376(2):133-48.

EFFECT OF 6 WEEKS ENDURANCE TRAINING WITH QUERCETIN SUPPLEMENTATION ON THE EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL PGC-1A AND ATF2 GENES IN THE HIPPOCAMPUS OF DIABETIC MALE RATS

Raha Mohammadi¹, Lotfali Bolboli^{2*}, Mohammad Javad Pourvaghar³, Roghayeh Afroundeh⁴

Received: 22 November, 2022; Accepted: 03 May, 2023

Abstract

Background & Aims: Hyperglycemia causes disorders of cardiovascular system, kidneys, retina, lens of the eyes, skin, and central and peripheral nervous system. Since two indicators PGC-1 α and Atf2 are involved in mitochondrial biogenesis, therefore, this study was designed and implemented to evaluate the effect of 6 weeks' endurance training with quercetin supplementation on the expression of mitochondrial PGC-1 α and Atf2 genes in the hippocampus of diabetic male rats.

Materials & Methods: The present study was an experimental study with a post-test design with a control group that was performed by laboratory method. In the present study, 35 Wistar rats were divided into 5 groups (7 in each) including: healthy control, quercetin supplement, control diabetic, exercise diabetic, and diabetic quercetin supplement. 15 mg of quercetin per kg of body weight were injected to two experimental groups (diabetic exercise supplement and supplement) each day after diabetes induction. The protocol used in the present study was 6 weeks' moderate intensity endurance training (55-50% of maximum oxygen consumption). Hippocampal tissue was taken surgically 24 hours after the last training session to evaluate the expression of PGC-1 α and Atf2 genes. One-way analysis of variance with Tukey *post-hoc* test (with a significance level of $P < 0.05$) was used to examine the data.

Results: Results showed that the expression of PGC-1 α and Atf2 genes after 6 weeks of intervention, increased significantly in the diabetic supplement training group compared to the diabetic control, training diabetes, and quercetin supplementation groups ($P < 0.05$). The diabetic exercise group had a significant increase compared to the diabetes control group for both of the genes ($P < 0.05$).

Conclusion: It seems that 6 weeks' endurance training alone and in combination with quercetin supplementation has a positive effect on mitochondrial PGC-1 α and Atf2 gene expression, and increases them in the diabetic patients.

Keywords: Atf2, Endurance Training, Quercetin, Mitochondria, PGC-1 α

Address: Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Tel: +984533520458

Email: l_bolboli@uma.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2023; 34(1): 11 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2023 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ PhD Student in Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

² Professor of Sport Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran (Corresponding Author)

³ Associate Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, University of Kashan, Kashan, Iran

⁴ Associated Professor of Sport Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran