

تأثیر هم‌افزایی چهار هفته تمرین استقامتی به همراه مکمل یاری پروبیوتیک بر بیان ژن‌های PGC-1 α و سیترات سنتاز در عضله نعلی رت‌های دیابتی

مریم دلفان^۱، راحله آماده جویباری^۲

۱- نویسنده مسئول: استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران. پست الکترونیکی: m.delfan@alzahra.ac.ir

۲- کارشناس ارشد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: ناکارآمدی میتوکندریایی یکی از سازوکارهای احتمالی پیدایش و پیشرفت دیابت می‌باشد. بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر هم‌افزایی تمرین استقامتی به همراه مکمل یاری پروبیوتیک بر بیان ژن PGC-1 α و سیترات سنتاز (CS) در رت‌های دیابتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۳۲ سر رت نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به پنج گروه: کنترل-سالم (NC)، کنترل-دیابتی (DC)، مکمل-دیابتی (SDC)، تمرین-دیابتی (TD)، مکمل-تمرین-دیابتی (STD) تقسیم شدند. پروتکل تمرینی با شدت ۶۰ تا ۶۵ درصد vVO_{2peak} ، پنج روز در هفته در طی چهار هفته اجرا شد. همزمان رت‌ها روزانه دو گرم پروبیوتیک محلول در ۳۰ میلی‌لیتر آب مصرف نمودند. بیان ژن PGC-1 α و CS به روش qReal-TimePCR اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس دوطرفه در سطح معنی‌داری $p \leq 0.05$ انجام شد.

یافته‌ها: بیان ژن PGC-1 α در گروه‌های TD ($P=0.006$) و STD ($P=0.000$) نسبت به گروه DC افزایش معنی‌داری داشت. همچنین بیان ژن CS در گروه‌های TD ($P=0.03$) و STD ($P=0.00$) نسبت به DC افزایش معنی‌داری داشت، اما بین دو گروه TD و STD در بیان ژن PGC-1 α ($P=0.06$) و CS ($P=0.27$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین اثر متقابل و همزمان دو عامل تمرین هوازی و مکمل پروبیوتیک بر بیان ژن PGC-1 α ($P=0.25$) و CS ($P=0.46$) مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: اگرچه چهار هفته تمرین استقامتی به تنهایی و در ترکیب با پروبیوتیک منجر به افزایش بیان ژن PGC-1 α و CS گردید، با این حال به نظر می‌رسد این افزایش ناشی از تمرینات استقامتی بوده و مصرف همزمان پروبیوتیک تجویز شده با تمرین استقامتی دارای تأثیر هم‌افزایی و تعاملی نبود.

واژگان کلیدی: دیابت، تمرین هوازی، پروبیوتیک، PGC-1 α ، سیترات سنتاز

• مقدمه

خون توسط عضله اسکلتی جذب می‌شود، هرگونه اختلال در جذب گلوکز توسط عضله می‌تواند در رخداد هایپرگلیسمی و پاتوژنز دیابت نقش داشته باشد. میتوکندری نقشی حیاتی در کنترل فرآیندهای فیزیولوژیکی سلول عضلانی داشته و در صورتی که عملکرد خود را به درستی انجام ندهد، با تحت تأثیر قرار دادن عضله اسکلتی قابلیت زیادی در ایجاد پاتوژنز سلولی دارد (۴). بررسی‌های انجام شده بر روی سلول‌های اندوتلیال نشان می‌دهد که افزایش ROS در شرایط هایپرگلیسمی منجر به استرس اکسیداتیو و به دنبال آن

دیابت نوعی اختلال متابولیسمی مزمن و از شایع‌ترین بیماری‌های اندوکراین در سراسر جهان است (۱). بر اساس گزارش منتشر شده توسط فدراسیون بین‌المللی دیابت (IDF)، ۴۶۳ میلیون نفر در سال ۲۰۱۹ به دیابت مبتلا بودند و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۴۵، این تعداد به ۷۰۰ میلیون نفر افزایش یابد (۲). صرف نظر از نوع دیابت، مشخصه بارز این بیماری هایپرگلیسمی است که در نهایت این ناهنجاری با تحت تأثیر قرار دادن سلول‌ها منجر به ناکارآمدی اندام‌های بدن می‌گردد (۳). با توجه به اینکه نزدیک به ۸۰ درصد گلوکز

گیرنده‌های جفت شونده با G پروتئین‌ها (GPR41 و GPR43)، ترشح پپتید YY و پپتید شبه گلوکاگون (GLP-1) را در سلول‌های اپیتلیال روده تحریک می‌کنند (۱۶). با تحریک ترشح GLP-1/2 ترشح انسولین و آدیپونکتین افزایش می‌یابد و از این طریق می‌تواند در افزایش حساسیت به انسولین و کاهش التهاب درجه پایین دخیل باشد (۱۳). بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که تعامل دو طرفه بین میتوکندری و میکروبیوتا وجود دارد. در واقع، میکروبیوتای روده در تنظیم فعال کننده‌های کمکی، آنزیم‌ها و عوامل رونویسی درگیر در بایوژنز میتوکندری مانند ژن‌های PGC-1 α ، AMPK و SIRT1 نقش دارند (۱۷).

علاوه بر پروبیوتیک‌ها، تمرینات ورزشی به نوبه خود قادر به تغییر ترکیب میکروبیوم و بهبود آن می‌باشند، به طوری که مزایای متابولیکی ناشی از تمرینات ورزشی ممکن است تا حدی به واسطه تأثیر آن بر بهبود میکروبیوتا باشد (۱۸). از این رو، تمرینات ورزشی و پروبیوتیک در کنار هم ممکن است فلور میکروبی روده را به طور مؤثرتری دستخوش تغییرات قرار دهند. یکی از برجسته‌ترین سازگاری‌ها در عضله اسکلتی تغییر در میزان پروتئین، محتوا و عملکرد میتوکندری است که در پاسخ به تمرینات ورزشی ایجاد می‌شود (۱۹). جهت تأمین انرژی و حفظ انقباضات عضلانی در طول دوره تمرینات استقامتی به تدریج بیان GLUT-4 و بایوژنز میتوکندری افزایش می‌یابند. افزایش GLUT-4 و پروتئین‌های میتوکندریایی به طور کلی عوامل کلیدی مرتبط با افزایش جذب گلوکز و متابولیسم اسیدهای چرب در عضلات اسکلتی هستند (۲۰). Teglas و همکاران (۲۰۲۰) در پژوهشی تأثیر تمرینات ورزشی و پروبیوتیک را بر تغییرات میکروبیوم و محتوی میتوکندری موش‌های تراریخته APP/PS1 مورد بررسی قرار دادند، اما نتایج پژوهش تغییر معنی‌داری را در تراکم میتوکندری کبدی و سطوح پروتئین‌های COX4، IRT3 و PGC-1 α نشان نداد (۲۱). با این وجود تاکنون تحقیقی مدون در خصوص تأثیر تعاملی و فزاینده تمرینات هوازی و مکمل پروبیوتیک در بهبود ناکارآمدی میتوکندریایی مرتبط با بیماری دیابت صورت نگرفته و این موضوع مبهم باقی مانده است. لذا پژوهش حاضر برای اولین بار با هدف بررسی تأثیر تمرین استقامتی به همراه مکمل‌یاری پروبیوتیک بر بیان ژن PGC-1 α و CS عضله نعلی رت‌های دیابتی انجام شد.

جهش mtDNA و آسیب میتوکندریایی می‌شود (۵). به طوری که برآورد شده است ۹/۰-۰/۱ درصد از علل وقوع دیابت جهش در mtDNA می‌باشد (۶). برای فعال کردن عملکرد میتوکندری در عضله اسکلتی، فعال کردن چندین مکانیسم سیگنالینگ از جمله مسیر کلسی‌نورین/NFAT، پروتئین کیناز وابسته به کلسیم/کالمودولین IV و پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) مهم هستند. چنین مکانیسم‌هایی در عضله با فعال سازی PGC-1 α مرتبط می‌باشند (۷).

PGC-1 α به عنوان فعال کننده کمکی رونویسی و تنظیم کننده اصلی بایوژنز میتوکندری محسوب می‌شود (۸). فرآیند بایوژنز میتوکندری شامل بیان پروتئین‌های رمزگذاری شده هسته‌ای است که برای تکثیر و بیان ژن‌های رمزگذاری شده mtDNA ضروری هستند. فاکتور رونویسی میتوکندری (TFAM) در ثبات و رونویسی mtDNA دخیل می‌باشد و PGC-1 α از طریق فعال سازی NRF1/2 جهت تحریک بیان TFAM، نقش مهمی را در تنظیم این مسیر متابولیکی ایفا می‌کند (۹). همچنین PGC-1 α با سایر فاکتورهای رونویسی مورد نیاز برای متابولیسم اکسیداتیو و سیگنالینگ انسولین در تعامل بوده و در پژوهش‌های انجام شده بر روی موش‌های دارای نقص در ژن PGC-1 α ، اختلال در هموستاز گلوکز و کاهش عملکرد اکسیداتیو عضلات اسکلتی گزارش شده است (۱۰). افزون بر این، عملکرد میتوکندری وابستگی زیادی به فعالیت آنزیم‌های متعددی از جمله سیترات سنتاز (CS) دارد (۱۱). به طوری که نقص ذاتی عملکرد CS ممکن است مسئول کاهش میزان اکسیداسیون اسیدهای چرب و مقاومت به انسولین در عضلات اسکلتی بیماران دیابتی باشد (۱۲).

شواهد رو به افزایشی نشان می‌دهد تغذیه نامناسب و عدم تحرک باعث به هم خوردن تعادل میکروبی روده می‌شود و بسیاری از پژوهش‌ها اثرات عدم تعادل میکروبیوتای روده را در بروز دیابت نشان دادند (۱۳). در این خصوص افراد چاق و دیابتی در مقایسه با افراد سالم ممکن است میزان فیرمیکوت بیشتر و باکترئوئید کمتری را دارا باشند (۱۴). مصرف پروبیوتیک‌ها به منظور بهبود فلور میکروبی روده می‌تواند به عنوان یک راهبرد اساسی در نظر گرفته شود. تجویز خوراکی پروبیوتیک‌ها از جمله باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک شامل لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم، می‌تواند اثرات مثبتی بر وزن بدن، حساسیت به انسولین و متابولیسم گلوکز و چربی داشته باشد (۱۵). اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFAs) که با تخمیر میکروبی تولید می‌شوند، از طریق فعال سازی

• مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی-آزمایشگاهی است که بر روی مدل حیوانی انجام شد. ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۸ هفته، میانگین وزن 27.0 ± 1.0 گرم) از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی ایران منتقل شدند. تمام مراحل پژوهش با رعایت مسائل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و با اخذ کد اخلاق IR.SSRC.REC.1398.013 مورد تأیید کمیته اخلاق پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی اجرا شد. همه حیوانات در شرایط یکسان و مطلوب حیوانات آزمایشگاهی (دمای 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵-۵۰٪، سیکل روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲) نگهداری شدند و به صورت آزادانه از آب و غذا تغذیه کردند.

گروه‌های پژوهش: آزمودنی‌ها پس از آشنایی با محیط به صورت تصادفی به ۵ گروه: کنترل سالم NC (n=۶)؛ کنترل دیابتی DC (n=۶)؛ مکمل پروبیوتیک دیابتی SDC (n=۶)؛ تمرین هوازی دیابتی TD (n=۷)؛ مکمل پروبیوتیک تمرین هوازی دیابتی STD (n=۷) تقسیم شدند.

القا دیابت: جهت القا دیابت در ۴ گروه (همه گروه‌ها به جز گروه کنترل سالم)، تزریق استرپتوزوتوسین (STZ) (Zellbio آلمان) پس از ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه به صورت تزریق داخل صفاقی (IP) به میزان 45 mg/kg به صورت حل شده در بافر 0.05 مول سیترات $\text{PH}=4.5$ انجام شد. ۷۲ ساعت پس از تزریق STZ، نمونه خون از ورید دمی آزمودنی‌ها جهت سنجش سطوح قند خون ناشتا با استفاده از گلوکومتر (Glucocard 01، ژاپن) جمع‌آوری شد. معیار دیابتی شدن، قند خون ناشتا بالاتر از 300 mg/dl بوده است (۲۲).

آماده‌سازی مکمل: مکمل‌یاری آزمودنی‌ها به مدت چهار هفته روزانه (۸-۱۰ صبح) انجام شد. به این صورت که به ازای هر رت ۲ گرم پودر پروبیوتیک (زیست تخمیر ایران) محلول در ۳۰ میلی‌لیتر آب در بطری آب گروه‌های مکمل ریخته شد. پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس-فرمنتوم، بیفیدوباکتریوم لانگیوم (10^{10} CFU/g) بود (۲۳، ۲۴). **اجرا پروتکل تمرین هوازی:** یک هفته پس از القا دیابت، رت‌ها به منظور آشناسازی با نحوه دویدن بر روی تردمیل جوندگان ۱۰ کانال (دانش سالار ایرانیان، ایران)، پنج جلسه و در هر جلسه ۵ تا ۱۵ دقیقه با نهایت دقت روی تردمیل قرار داده شدند و با سرعت بسیار پایین و یکنواخت شروع به تمرین کردند. از هفته دوم تمرین اصلی به مدت چهار هفته اجرا شد. برای ارزیابی توان هوازی رت‌ها از روش غیرمستقیم به شرح زیر استفاده شد:

پس از ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت 0.3 m/min با شیب صفر، سرعت نوارگردان هر سه دقیقه یک بار به میزان $1/8 \text{ m/min}$ افزایش می‌یابد، $v\text{VO}_{2\text{peak}}$ زمانی است که رت‌ها حداقل $1/30$ دقیقه نتوانند با یک سرعت ثابت بدوند و بلافاصله پس از آن با افزایش سرعت قادر به دویدن نباشند (۲۵، ۲۶). رسیدن به سرعت بیشینه با غلظت لاکتات بالاتر از 6 mmol/L و نسبت تبادل تنفسی VCO_2/VO_2 معادل $1/5$ است. پژوهش‌ها نشان می‌دهند، ارتباط بالایی بین $v\text{VO}_{2\text{peak}}$ و $\text{VO}_{2\text{peak}}$ رت‌ها وجود دارد ($r=0.98$ ، $p<0.05$). از این جهت شدت‌ها با توجه به این سرعت بدست آمده، تنظیم گردید. هر جلسه پروتکل تمرین هوازی برای گروه‌های تمرینی شامل ۵ دقیقه گرم کردن با شدت ۳۰-۴۰ درصد $v\text{VO}_{2\text{peak}}$ ، سپس ۳۰ دقیقه دویدن روی تردمیل با شدت ۶۰-۶۵ درصد $v\text{VO}_{2\text{peak}}$ و در انتها ۵ دقیقه سرد کردن با شدت ۳۰-۴۰ درصد $v\text{VO}_{2\text{peak}}$ بود (جدول ۱).

جدول ۱. برنامه تمرین استقامتی در طی چهار هفته

هفته‌های تمرینی	اول	دوم	سوم	چهارم
سرعت بیشینه در زمان رسیدن به $\text{VO}_{2\text{peak}}$ (m/min)	۱۵	۱۸	۲۰	۲۰
سرعت (m/min)	۹	۱۱	۱۲	۱۲
زمان (min)	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰

روش‌های آماری: در بخش آمار توصیفی از میانگین، انحراف استاندارد و نمودار استفاده شد. طبیعی بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (K-S) مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی تفاوت بین گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی از آزمون T مستقل و تفاوت بین گروه‌های دیابتی از آزمون واریانس دو طرفه و برای تعیین جایگاه معنی‌داری از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. برای تعیین همبستگی از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد. تجزیه تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری GraphPad Prism-8 در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ انجام شد.

• یافته‌ها

گلوکز پلاسما: در جدول ۲ مقادیر مربوط به وزن، وزن عضله نعلی و گلوکز در گروه‌های پژوهش نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود گلوکز پلاسما در گروه‌های TD و STD نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌داری داشت. همچنین بین گروه TD و STD تفاوت معنی‌داری مشاهده شده است، در واقع کاهش گلوکز پلاسما در گروه STD بیشتر بود.

بیان ژن PGC-1 α و CS: نتایج آزمون T مستقل تفاوت معنی‌داری را در بیان ژن PGC-1 α عضله نعلی بین گروه کنترل دیابتی و گروه کنترل سالم نشان داد ($P=0.000$)، در واقع القا دیابت منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن PGC-1 α در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم شد. نتایج آزمون تحلیل واریانس دو طرفه، وجود اختلاف معنی‌داری را در بیان ژن PGC-1 α بین گروه‌ها نشان داد ($p < 0.05$). نتایج بررسی بین گروهی حاصل از آزمون تعقیبی توکی نشان داد که بیان ژن PGC-1 α در دو گروه TD ($P=0.006$) و STD ($P=0.000$) نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌داری داشت، همچنین در مقایسه با گروه SDC بیان این ژن در گروه‌های TD ($P=0.024$) و STD ($P=0.002$) افزایش معنی‌داری داشت، این در حالی بود که مصرف پروبیوتیک به تنهایی بر بیان ژن PGC-1 α تأثیر معنی‌داری نداشت و بین دو گروه کنترل دیابتی و SDC تفاوتی مشاهده نشد ($P=0.43$). همچنین بین دو گروه TD و STD تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P=0.06$) (نمودار ۱).

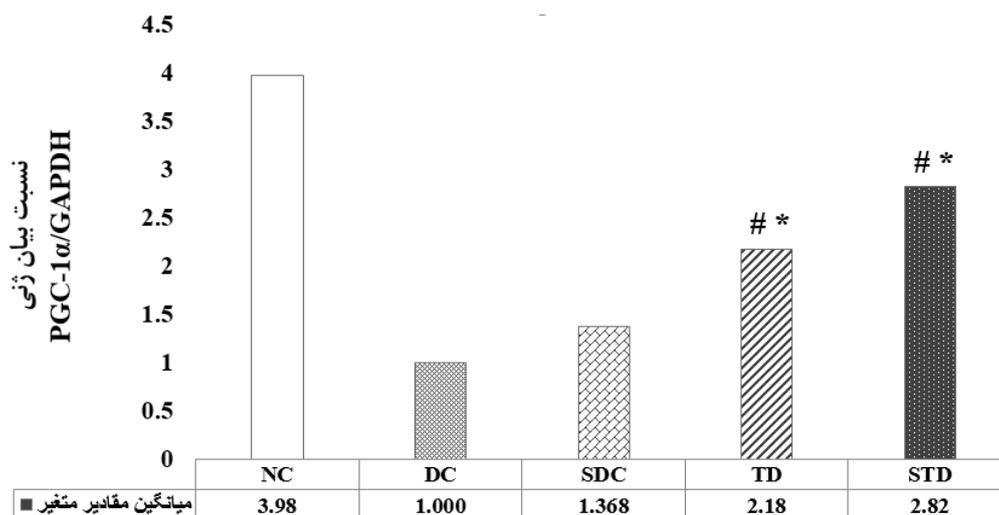
استخراج نمونه‌ها و سنجش متغیرهای وابسته: آزمودنی‌ها ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و پس از ناشتا شبانه، به واسطه تزریق درون صفاقی کتامین (۸۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بیهوش شده و تحت جراحی قرار گرفتند. نمونه خون از قلب آنها جمع‌آوری و در لوله‌های حاوی هپارین ریخته شد و جهت جداسازی سرم به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ rpm در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Eppendorf، آلمان) شد. سرم جداسازی شده را به میکروتیوپ نامگذاری شده منتقل کرده و بلافاصله با استفاده از ازت مایع منجمد کرده و برای تجزیه تحلیل‌های بعدی در فریزر (۸۰- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. سپس عضله نعلی رت‌ها استخراج و بعد از اندازه‌گیری وزن، در ازت مایع قرار گرفتند تا پس از هموژنیزاسیون برای سنجش میزان بیان ژنی CS و PGC-1 α استفاده شود. سنجش گلوکز پلاسما به روش گلوکز اکسیداز و به وسیله کیت تشخیص کمی گلوکز پلاسما (پارس آزمون) با حساسیت ۵ mg/dl انجام شد. جهت بررسی تغییرات بیان ژن CS و PGC-1 α از تکنیک qReal-Time PCR استفاده شد. بدین منظور ابتدا RNA بافت عضله نعلی با استفاده از ترايزول (Qiagen، آلمان) استخراج شد و سپس طی مراحل DNase I treatment، با DNase I تیمار شد. در نهایت cDNA ساخته شد و واکنش‌های qReal-Time PCR انجام شد. برای سنتز cDNA از کیت Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche، آلمان) طبق دستورالعمل کیت مذکور استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از Master Mix (ampliqon، دانمارک) در دستگاه Real Time PCR (Corbett، Rotor-Gene 6000) انجام شد. واکنش‌های تکثیر در طی ۴۰ سیکل بر اساس دستورالعمل سازنده کیت به شکل زیر انجام شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه. لازم به ذکر است که دنا تورا سیون اولیه دما ۹۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۵ دقیقه بود. در نهایت منحنی استاندارد و تکثیر پرایمرها توسط نرم افزار موجود در سیستم تجزیه تحلیل و رسم شد.

از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن مورد نظر استفاده شد.

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار مقادیر وزن، وزن عضله نعلی و مقادیر گلوکز در گروه‌های پژوهش

متغیر	NC	DC	SDC	TD	STD
وزن بدن (g)	۳۲۵/۴۷±۵/۰۲	۲۱۴/۳۹±۲/۹۸	۲۲۱/۹±۲/۳۹	۲۳۹/۱۴±۵/۱۷	۲۸۹/۲۱±۸/۲۵
وزن عضله نعلی (mg)	۱۷۴/۱۸±۱/۹۰	۱۰۶/۱۱±۹/۵۰	۱۱۲/۱۵±۱/۶۲	۱۳۸/۲۱±۰/۳۳	۱۳۵/۱۵±۲/۸۲
گلوکز (mg/dl)	۲۱۹/۲۳±۰/۱۰	۵۰/۱۸±۸/۳۳*#	۴۱۶/۷۶±۷/۵۵#	۲۶۷/۶۲±۵/۴۶#	۲۲۰/۴۰±۳/۹۹

اعداد به شکل میانگین ± خطای معیار بیان شده‌اند، * نشانه معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم، † نشانه معنی‌داری نسبت به گروه کنترل دیابتی، # نشانه معنی‌داری نسبت به گروه تمرین با مکمل



نمودار ۱. تغییرات بیان ژن PGC-1α در گروه‌های پژوهش

* معنی‌داری نسبت به گروه DC، # معنی‌داری نسبت به گروه SDC (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل)

گروه‌های SDC ($P=0/1$) و STD ($P=0/27$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۲). در آماره CS در بررسی دو عامل تمرین هوازی و مکمل پروبیوتیک اثر متقابل و همزمان این دو عامل با هم وجود نداشت ($P=0/46$) (جدول ۳).

وزن عضله نعلی: نتایج آزمون تحلیل واریانس دو طرفه اختلاف معنی‌داری را در وزن عضله نعلی بین گروه‌ها نشان نداده است ($p>0/05$).

مطابق با نتایج آزمون همبستگی پیرسون بین وزن عضله نعلی و گلوکز پلاسما در رت‌های دیابتی همبستگی معنی‌داری وجود نداشت ($r=0/24$, $P=0/63$). علاوه بر این، بین بیان ژن PGC-1α و گلوکز پلاسما همبستگی معنی‌داری وجود نداشت ($r=-0/48$, $P=0/33$). همچنین بین بیان ژن CS و گلوکز پلاسما همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد ($r=-0/71$, $P=0/10$).

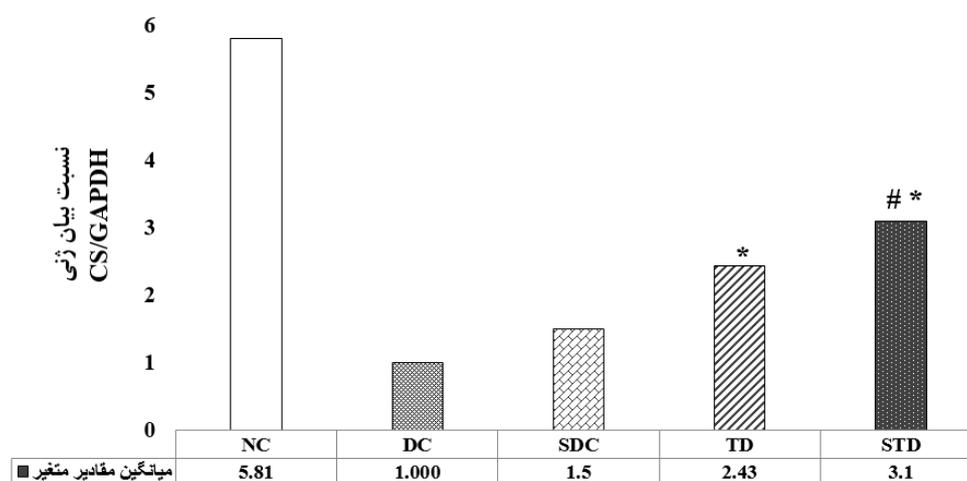
در نتایج آماره PGC-1α اثر متقابل و همزمان دو عامل تمرین هوازی و مکمل پروبیوتیک بر بیان این ژن مشاهده نشده است ($P=0/25$) (جدول ۳).

نتایج آزمون T مستقل وجود تفاوت معنی‌دار در بیان ژن CS عضله نعلی بین گروه کنترل دیابتی و گروه کنترل سالم نشان داد ($P=0/000$) و القا دیابت موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن CS در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم شد. علاوه بر این میزان بیان ژن CS بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($p<0/05$). در نتایج به دست آمده از آزمون تعقیبی توکی، افزایش معنی‌داری در بیان ژن CS در گروه‌های TD ($P=0/03$) و STD ($P=0/00$) نسبت به گروه کنترل دیابتی مشاهده شد، همچنین افزایش بیان این ژن در گروه STD در مقایسه با گروه SDC معنی‌دار بود ($P=0/01$). اما بین گروه کنترل دیابتی و SDC در بیان ژن CS تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P=0/76$). علاوه بر این بین گروه TD با

جدول ۳. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه برای بیان ژن PGC-1 α و CS

متغیر	منبع تغییر	مقدار F	اندازه اثر	سطح معنی‌داری
PGC-1 α	اثر مکمل	۴۷/۶۲	۰/۰۹	۰/۴۳
	اثر تمرین	۹۴/۸۲	۰/۹۷	۰/۰۰۰*
	اثر متقابل مکمل*تمرین	۱/۶۳	۰/۰۳	۰/۲۵
CS	اثر مکمل	۷/۰۷	۰/۶۹	۰/۰۶
	اثر تمرین	۵۷/۴۰	۰/۷۶	۰/۰۰۰*
	اثر متقابل مکمل*تمرین	۰/۶۳	۰/۰۸	۰/۴۶

* نشانه سطح معنی‌داری، ۰/۰۵ می‌باشد.



نمودار ۲. تغییرات بیان ژن CS در گروه‌های پژوهش

* معنی‌داری نسبت به گروه DC، # معنی‌داری نسبت به گروه SDC (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل)

• بحث

در نتایج پژوهش حاضر کاهش سطوح گلوکز پلازما در گروه TD و STD در مقایسه با گروه کنترل دیابتی مشاهده شد. علاوه بر این، سطوح گلوکز پلازما در گروه STD کاهش بیشتری نسبت به گروه TD داشت. در واقع می‌توان بیان کرد چهار هفته تمرین استقامتی به تنهایی یا همراه با مکمل پروبیوتیک باعث کاهش گلوکز پلازما موش‌های دیابتی شده است. به نظر می‌رسد که پروبیوتیک‌ها می‌توانند لیپوپولی ساکاریدها (LPS) و الیگوساکاریدها را به SCFAs تخمیر کنند و با کاهش LPS، ممکن است سیگنالینگ TLR-4، پاسخ التهاب سیستمیک و استرس اکسیداتیو مرتبط با دیابت را کاهش داده و از بروز مقاومت به انسولین جلوگیری کنند (۲۷). داروهای فعلی دیابت یا برای کاهش گلوکز در بدن (مهارکننده‌های α -گلوکوزیداز و بی‌گوانیدها) یا برای افزایش سطوح انسولین (تزریق انسولین و سولفونیل‌اوره) و یا افزایش

حساسیت به انسولین (GLP-1) تجویز می‌شوند (۱)، در این مورد برخی از پروبیوتیک‌ها مانند داروهای شیمیایی دارای عملکرد درمانی بر دیابت از طریق مهار فعالیت α -گلوکوزیداز هستند (۲۸). همچنین گزارش شده است که لاکتوباسیلوس ممکن است بیان GLUT-4 mRNA را افزایش دهند (۲۹). در خصوص تمرینات ورزشی به نظر می‌رسد که در حین اجرا تمرین، جذب گلوکز خون به واسطه جابه‌جایی GLUT-4 به غشا سلولی، مستقل از انسولین باشد و از طریق چندین مسیر از جمله AMPK، Ca²⁺ سارکوپلاسمی و مسیریهای سیگنالینگ CaMK-I، CaMK-II، و ترشح آدرنالین صورت گیرد (۳۰، ۳۱). با توجه به موارد مطرح شده یکی از اثرات مشترک و متقابل تمرینات ورزشی و مکمل پروبیوتیک بر کاهش گلوکز پلازما، احتمالاً تأثیر هر دو عامل بر افزایش بیان GLUT-4 می‌باشد.

در پژوهش حاضر بیان ژن PGC-1 α به طور معنی‌داری در گروه TD نسبت به کنترل دیابتی بیشتر بود. در پژوهشی همسو با پژوهش حاضر Ko و همکاران نشان دادند ۸ هفته تمرین استقامتی سطوح AMPK، PGC-1 α و GLUT-4 عضله اسکلتی را افزایش می‌دهد (۳۲). با تنظیم و فعال‌سازی PGC-1 α از طریق بیان، فسفوریلاسیون (توسط AMPK) و دی-استیلاسیون (توسط SIRT1) می‌توان فعال‌سازی برنامه بیوژنتیکی میتوکندری را تحریک کرد و منجر به تولید میتوکندری بیشتری شد (۸). در طی تمرینات ورزشی افزایش نسبت AMP به ATP با افزایش مصرف انرژی، منجر به فعال شدن AMPK شده (۳۲) و به دنبال آن فعال‌سازی PGC-1 α اتفاق می‌افتد. AMPK همچنین با فعال‌سازی SIRT1 می‌تواند منجر به افزایش بیشتر فعالیت PGC-1 α شود (۳۳). در پژوهشی مغایر با پژوهش حاضر Téglás و همکاران نشان دادند تمرینات ورزشی همراه با مکمل پروبیوتیک تغییرات معنی‌داری در سطوح COX4، SIRT3، PGC-1 α ، GLUT-4 و تراکم میتوکندری ایجاد نمی‌کند (۳۴). طبق نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر بیان ژن PGC-1 α در گروه STD نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌داری داشت. یکی از دلایل احتمالی مغایرت به وجود آمده را می‌توان تفاوت در نوع بافت مورد بررسی، طول دوره تمرینی و نوع رژیم غذایی در نظر گرفت. در پژوهشی دیگر Ren و همکاران نشان دادند که پروبیوتیک‌ها با بهبود سطوح PGC-1 α mRNA و فعال‌سازی مسیر SIRT1/PGC-1 α می‌توانند از آسیب و تورم میتوکندری جلوگیری کنند و عملکرد تنفسی و ساختار میتوکندری را بهبود ببخشند (۳۵). اما در پژوهش حاضر بین گروه کنترل دیابتی و SDC در بیان ژن PGC-1 α تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، در توجیه مغایرت بین نتایج می‌توان به دلایلی نظیر عدم وجود مداخله دیابت، طول دوره مکمل‌یاری و نوع مصرف پروبیوتیک در پژوهش Ren اشاره کرد که به صورت گاوآژ انجام گرفت. یکی از عواملی احتمالی که بر نتیجه پژوهش‌ها تأثیر می‌گذارد سویه و دوز پروبیوتیک مصرف شده در پژوهش و قابلیت زیستی و زنده‌مانی پروبیوتیک است که در صورت تغییر هر یک از این عوامل ممکن است نتایج به دست آمده متفاوت باشد (۳۶).

تغییر در عملکرد میتوکندری مانند بهبود تنفس میتوکندریایی و افزایش فعالیت آنزیم CS، از جمله سازگاری-های میتوکندری در پاسخ به تمرینات ورزشی می‌باشد (۳۷). (۱۱). برخی پژوهش‌ها سطوح پایین CS را در موش‌های دیابتی و تأثیر تمرین هوازی بر تنظیم افزایشی این آنزیم گزارش کرده‌اند. Li و همکاران در یک مطالعه متابولیسم غیر طبیعی گلوکز و سطوح پایین CS را در موش‌های دیابتی نشان دادند. پس از چهار هفته تمرین هوازی در موش‌های دیابتی CS تنظیم افزایشی یافت (۳۸)، که این نتایج با نتایج پژوهش حاضر همسو بود. در بررسی نتایج، اختلاف معنی‌داری در وزن عضله نعلی بین گروه‌ها مشاهده نشد. در پژوهشی Bindels و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند بهبود میکروبیوتای روده با اضافه کردن سویه‌های خاص پروبیوتیک موجب کاهش سیتوکین‌های التهابی می‌شود، این کاهش با کاهش مارکرهای آتروفی عضله اسکلتی در ارتباط است (۱۶). در این مطالعه لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس گاسری بیان مارکرهای آتروفی را در عضله گاستروکمیوس و تیبیالیس کاهش دادند. اما لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (NCFM) بر مارکرهای آتروفی عضلات و التهاب سیستمیک تأثیری نداشت، از این رو می‌توان بیان کرد که این تغییرات از اثرات مثبت سویه خاص پروبیوتیک‌ها می‌باشد و با تغییر سویه ممکن است نتایج متفاوتی مشاهده شود (۳۹).

تحلیل کلی از نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تمرینات هوازی در کاهش سطوح گلوکز پلازما نمونه‌های حیوانی دیابتی مؤثر هستند، اما مصرف پروبیوتیک در کنار تمرینات هوازی ممکن است تأثیر هم‌افزایی در کاهش گلوکز پلازما داشته باشد. همچنین چهار هفته تمرین استقامتی به همراه مکمل‌یاری پروبیوتیک نسبت به تمرین بدون مکمل‌یاری، تأثیر هم‌افزایی بر افزایش بیان ژن‌های PGC-1 α و CS نداشته است و بررسی اثر همزمان این دو مداخله بر بیان این ژن‌ها، مستلزم تحقیقات بیشتر و به کارگیری انواع پروتکل‌های تمرینی و استفاده از سویه‌ها و دوزهای مختلف پروبیوتیک همراه با دوره مداخله طولانی‌تر می‌باشد.

• References

- Mekala KC, Bertoni AG. Epidemiology of diabetes mellitus. Transplantation, bioengineering, and regeneration of the endocrine pancreas: Elsevier; 2020. p. 49-58.
- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes research and clinical practice*. 2019;157:107843.
- Perez-Leighton CE, Lockridge AD, Teske JA, Alejandro EU, Klotz CM. *Rat Models of Obesity, Metabolic Syndrome, and Diabetes*. The Laboratory Rat: Elsevier; 2020. p. 987-1002.
- Ghareghani P, Shanaki M, Ahmadi S, Khoshdel AR, Rezvan N, Meshkani R, et al. Aerobic endurance training improves nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) features via miR-33 dependent autophagy induction in high fat diet fed mice. *Obesity research & clinical practice*. 2018;12(1):80-9.
- Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology*. 2006;212(2):167-78.
- Plaza SM. Mitochondrial factors in the pathogenesis of diabetes: a hypothesis for treatment. *Altern Med Rev*. 2002;7(2):94-111.
- Jung S, Kim K. Exercise-induced PGC-1 α transcriptional factors in skeletal muscle. *Integrative medicine research*. 2014;3(4):155-60.
- Krishnaswamy V, Alugoju P, Periyasamy L. Physiological effects of carotenoids on hyperglycemia and associated events. *Studies in Natural Products Chemistry*. 64: Elsevier; 2020. p. 303-20.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *The FASEB journal*. 2002;16(14):1879-86.
- Melouane A, Yoshioka M, St-Amand J. Extracellular matrix/mitochondria pathway: A novel potential target for sarcopenia. *Mitochondrion*. 2020;50:63-70.
- Cai Z, Deng Y, Ye J, Zhuo Y, Liu Z, Liang Y, et al. Aberrant expression of citrate synthase is linked to disease progression and clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Management and Research*. 2020;12:6149.
- Ørtenblad N, Mogensen M, Petersen I, Højlund K, Levin K, Sahlin K, et al. Reduced insulin-mediated citrate synthase activity in cultured skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes: evidence for an intrinsic oxidative enzyme defect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2005;1741(1-2):206-14.
- Mailing LJ, Allen JM, Buford TW, Fields CJ, Woods JA. Exercise and the gut microbiome: a review of the evidence, potential mechanisms, and implications for human health. *Exercise and sport sciences reviews*. 2019;47(2):75-85.
- Denou E, Marcinko K, Surette MG, Steinberg GR, Schertzer JD. High-intensity exercise training increases the diversity and metabolic capacity of the mouse distal gut microbiota during diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2016;310(11):E982-E93.
- Kobyliak N, Conte C, Cammarota G, Haley AP, Styriak I, Gaspar L, et al. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. *Nutrition & metabolism*. 2016;13(1):14.
- Silva-Sperb AS, Moraes HA, de Moura BC, Alves BC, Bruch-Bertani JP, Azevedo VZ, et al. Effect of probiotic supplementation in nonalcoholic steatohepatitis patients: PROBILIVER TRIAL protocol. *Trials*. 2019;20(1):1-8.
- Clark A, Mach N. The crosstalk between the gut microbiota and mitochondria during exercise. *Frontiers in physiology*. 2017;8:319.
- Lambert JE, Myslicki JP, Bomhof MR, Belke DD, Shearer J, Reimer RA. Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2015;40(7):749-52.
- Oliveira AN, Hood DA. Exercise is mitochondrial medicine for muscle. *Sports Medicine and Health Science*. 2019;1(1):11-8.
- Park J-S, Holloszy JO, Kim K, Koh J-H. Exercise training-induced PPAR β increases PGC-1 α protein stability and improves insulin-induced glucose uptake in rodent muscles. *Nutrients*. 2020;12(3):652.
- Téglás T, Ábrahám D, Jókai M, Kondo S, Mohammadi R, Fehér J, et al. Exercise combined with a probiotics treatment alters the microbiome, but moderately affects signalling pathways in the liver of male APP/PS1 transgenic mice. *Biogerontology*. 2020;21(6):807-15.
- Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology*. 2015;70(1):5.47. 1-5.. 20.
- Kaur IP, Kuhad A, Garg A, Chopra K. Probiotics: delineation of prophylactic and therapeutic benefits. *Journal of medicinal food*. 2009;12(2):219-35.
- Fernández MF, Boris S, Barbes C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*. 2003;94(3):449-55.
- PITHON-CURI TNC. Aprogram Of Moderate Physical Training For Wistar Rats Based On Maximal Oxygen Consumption. *Journal of strength and conditioning research*. 2007;21(3):000-.
- Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2007;14(6):753-60.
- Murti LNW. Probiotic Usage as Therapy on Diabetes Mellitus Type II. A Literature Review. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*. 2019;4(2):73-7.

28. Li X, Wang N, Yin B, Fang D, Zhao J, Zhang H, et al. Lactobacillus plantarum X1 with α -glucosidase inhibitory activity ameliorates type 2 diabetes in mice. *RSC advances*. 2016;6(68):63536-47.
29. Mazidi M, Rezaie P, Kengne AP, Mobarhan MG, Ferns GA. Gut microbiome and metabolic syndrome. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2016;10(2):S150-S7.
30. 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.
31. Delfan M, Rabiee M, Amadeh Juybari R. SYNERGISTIC EFFECT OF HIGH INTENSITY INTERVAL TRAINING (HIIT) COMBINED WITH CURCUMIN ON BAX AND BCL-2 GENE EXPRESSION IN SOLEUS MUSCLE OF DIABETIC RATS. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*. 2021;20(3):210-9.
32. Ko JR, Seo DY, Park SH, Kwak HB, Kim M, Ko KS, et al. Aerobic exercise training decreases cereblon and increases AMPK signaling in the skeletal muscle of STZ-induced diabetic rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;501(2):448-53.
33. Meng Q, Qi X, Fu Y, Chen Q, Cheng P, Yu X, et al. Flavonoids extracted from mulberry (*Morus alba* L.) leaf improve skeletal muscle mitochondrial function by activating AMPK in type 2 diabetes. *Journal of ethnopharmacology*. 2020;248:112326.
34. Téglás T, Abraham D, Jókai M, Kondo S, Mohammadi R, Fehér J, et al. Exercise combined with a probiotics treatment alters the microbiome, but moderately affects signalling pathways in the liver of male APP/PS1 transgenic mice. *Biogerontology*. 2020:1-9.
35. Ren T, Zhu L, Shen Y, Mou Q, Lin T, Feng H. Protection of hepatocyte mitochondrial function by blueberry juice and probiotics via SIRT1 regulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Food & function*. 2019;10(3):1540-51.
36. Kwon J, Kim B, Lee C, Joung H, Kim B-K, Choi IS, et al. Comprehensive amelioration of high-fat diet-induced metabolic dysfunctions through activation of the PGC-1 α pathway by probiotics treatment in mice. *PloS one*. 2020;15(2):e0228932.
37. Teimourian M, Fatolahi H, Mateenhomaei H. Effect of Different Exercise Mode and Ur-solic Acid Supplementation on FNDC5 and UCP1 Gene Expression and Plasma Irisin in Rats. *Int J Sports Exerc Med*. 2020;6(1):1-7.
38. Li J, Liu B, Cai M, Lin X, Lou S. Glucose metabolic alterations in hippocampus of diabetes mellitus rats and the regulation of aerobic exercise. *Behavioural Brain Research*. 2019;364:447-56.
39. Bindels LB, Beck R, Schakman O, Martin JC, De Backer F, Sohet FM, et al. Restoring specific lactobacilli levels decreases inflammation and muscle atrophy markers in an acute leukemia mouse model. *PloS one*. 2012;7(6):e37971.

Synergistic Effects of Four Weeks of Endurance Training with Probiotic Supplementation on the Expression of PGC-1 α and Citrate Synthase Genes in Soleus Muscles of Diabetic Rats

Delfan M^{*1}, Amadeh Jouybari R²

1-**Corresponding author: Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran. Email: m.delfan@alzahra.ac.ir*

2- *M.Sc, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran*

Received 2 May, 2021

Accepted 26 Jul, 2021

Background and Objectives: Mitochondrial dysfunction is one of the probable mechanisms for the onset and progression of diabetes. Therefore, the aim of the present study was to investigate the synergistic effects of endurance training with probiotic supplementation on PGC-1 α and citrate synthase (CS) gene expression in diabetic rats.

Materials & Methods: Briefly, 32 Wistar male rats were randomly divided into five groups of normal control (NC), diabetic control (DC), diabetic supplement (SDC), diabetic training (TD), and diabetic supplement training (STD). The training protocol was carried out with 60–65% vVO_{2peak} intensity, five days a week for four weeks. Furthermore, rats daily received 2 g of probiotic dissolved in 30 ml of water. The PGC-1 α and CS gene expression were assessed using the quantitative real-time polymerase chain reaction method. Data were analyzed using two-way analysis of variance at significant levels of $p \leq 0.05$.

Results: Expression of the PGC-1 α gene significantly increased in TD ($p = 0.006$) and STD ($p = 0.000$) groups, compared to DC. The CS gene expression significantly increased in TD ($p = 0.03$) and STD ($p = 0.00$) groups, compared to DC. No significant differences were seen between the TD and STD groups in PGC-1 α ($p = 0.06$) and CS ($p = 0.27$) gene expression. Moreover, no synergistic effects of aerobic exercise and probiotic supplement on the expression of PGC-1 α ($p = 0.25$) and CS ($p = 0.46$) genes were observed.

Conclusion: Although four weeks of endurance training alone and in combination with probiotics increased the expression of PGC-1 α and CS genes; however, this increase seems to be due to endurance training and concomitant use of the prescribed probiotics with endurance training did not include synergistic and interactive effects.

Keywords: Diabetes, Aerobic exercise, Probiotic, PGC-1 α , Citrate synthase