Journal of Sport Biosciences

University of Tehran Press

Online ISSN: 2676-4148

The Interactive Effect of Six Weeks of Berberine Supplementation with Aerobic Exercise on Some Oxidative and Anti-Oxidative Indices and Caspase-3 Gene Expression in the Quadriceps Muscle of Streptozotocin-Diabetic Male Rats

Azam Hamzezadeh[1], Javad Ramezani[2]✉, Saeed Naghibi[3]

1. Department of Sports Sciences, Faculty of Humanities, Payame Noor University, Karaj Center. Email: azamhamzehzadeh5@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Sports Sciences, Faculty of Humanities, Payame Noor University, P.O. BOX, 19395-4697, Tehran, Iran. E-mail: j_ramezani@pnu.ac.ir
3. Department of Sports Sciences, Faculty of Humanities, Payame Noor University, P.O. BOX, 19395-4697, Tehran, Iran. E-mail: sdnaghibi@pnu.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:
Received:
23 August 2023
Received in revised form:
5 November 2023
Accepted:
18 November 2023
Published online:
22 December 2023

Keywords:
Aerobic Exercise,
Berberine,
Caspase-3,
Diabetic,
Oxidative,
Streptozotocin.

ABSTRACT

Introduction: Type-1 diabetes is associated with the weakness of the body's antioxidant defense and also affects skeletal muscles. This research aimed to investigate the interaction of Berberine supplementation with aerobic exercise on Malondialdehyde (MDA), Superoxide Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPX), and also the Caspase-3 gene expression in quadriceps muscle tissue of type-1 diabetic rats.

Methods: 35 male Wistar rats were randomly divided into five groups: 1) healthy control, 2) diabetic control, 3) Berberine supplement, 4) aerobic exercise and 5) Aerobic exercise + Berberine supplement. After ensuring the induction of diabetes by STZ in the treatment groups, moderate intensity aerobic exercise was performed for six weeks with a frequency of five sessions per week according to the schedule. Berberine supplementation with a dose of 50 mg/kg was implemented by gavage on all days of the week and half an hour before exercise.

Results: The MDA and SOD levels in Berberine + aerobic exercise group significantly decreased ($P<0.0019$) and increased ($P<0.0063$), respectively compared to other groups. The level of GPX in the Berberine + aerobic exercise group had a significant increase compared to the diabetes control and aerobic exercise groups ($P<0.0005$ and $P<0.001$, respectively). Also, there was a significant increase in GPX level in the Berberine supplement group compared to the diabetes control group ($P<0.0017$), however, there was no significant difference between the group of Berberine + aerobic exercise and Berberine supplement ($P=0.132$). The Caspase-3 gene expression in Berberine + aerobic exercise group had a significant decrease compared to diabetes control and aerobic exercise groups ($P<0.0001$ and $P<0.001$, respectively). This variable also had a significant decrease in the Berberine supplement group compared to the diabetes control group ($P<0.0005$).

Conclusion: It seems that the simultaneous intervention of Berberine supplementation and aerobic exercise has positive synergistic effects and plays an important role in reducing MDA, caspase-3 gene expression, and increasing SOD and GPX in the quadriceps muscle of type-1 diabetic rats.

Cite this article: Hamzezadeh Azam., Ramezani Javad., & Naghibi Saeed. The Interactive Effect of Six Weeks of Berberine Supplementation with Aerobic Training on Some Oxidative and Anti-Oxidative Indices and Caspase-3 Gene Expression in the Quadriceps Muscle of Streptozotocin- Diabetic Male Rats. *Journal of Sport Biosciences*. 2023; 15(4):85-100.

DOI: http//doi.org/10.22059/JSB.2023.363750.1602

Journal of Sport Biosciences by University of Tehran Press is licensed under CC BY-NC 4.0. | Web site: https://jsb.ut.ac.ir/ | Email: jsb@ut.ac.ir.

© The Author(s). Publisher: The University of Tehran Press.

Journal of Sport Biosciences
University of Tehran Press
Online ISSN: 2676-4148

Extended Abstract

Introduction

Diabetes is one of the metabolic diseases characterized by chronic hyperglycemia and is associated with increased oxidative stress and inflammation in the body. In the process of oxidative stress, reactive oxygen species (ROS) are produced, especially in mitochondria. One of the indicators of oxidative stress is the accumulation of Malondialdehyde (MDA) in the body, which contributes to the damage of the main cellular components such as lipids, proteins, and DNA. The body's antioxidant defense system provides a vital defense to the biological system by limiting the damaging effects of ROS. There are many antioxidant enzymes in the body, including Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione Peroxidase (GPX), which limit the destructive effects of ROS. Alternatively, there are signaling pathways linking oxidative stress to cellular processes that lead to cellular protein loss and muscle atrophy. Evidence suggests that a protease called caspase-3 may also selectively contribute to muscle atrophy. Exercise and Berberine supplementation may help as anti-inflammatory agents and increase the capacity of the antioxidant system in the body. This research aimed to investigate the interaction of Berberine supplement with aerobic training on MDA, SOD, GPX, and Caspase-3 as an indicator of atrophy in quadriceps muscle tissue of diabetic male Wistar rats.

Methods

35 healthy adult male Wistar rats (about 8 weeks old) were purchased from the Pasteur Institute of Iran, Tehran, and randomly divided into 5 groups (n=7). In the treatment groups, diabetes was induced by intraperitoneal (IP) injection of streptozotocin at a dose of 60 mg/kg. After the confirmation of diabetes, the aerobic training program was performed for six weeks with the frequency of five sessions per week according to the training program, as well as Berberine supplementation with a dose of 50 mg/kg according to the program in the respective groups on all days of the week. Forty-eight hours after the last training session (to eliminate the body's response to the last session of physical activity) and after 12 hours of fasting, blood sampling was drawn from the control and treatment groups. First, the animals were anesthetized by intraperitoneally injection of ketamine-Xylazine solution and then euthanized. The tissue of the quadriceps muscle of the right leg of the rats was removed and immediately transferred to the nitrogen tank. On the day of the experiment, a piece of quadriceps muscle tissue weighing 100 mg was removed and placed in one milliliter of PBS buffer (pH=4.7). Then, the samples were completely dissolved using a homogenizer (model T 10 Basic, IKA, Germany) on ice for five minutes. The solution was centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes at 4°C. The clear supernatant was transferred to a 1 ml microtube. In order to measure antioxidants, special kits were used and the tests were performed according to its standard instructions using the ELISA method. Relative gene expression of caspase-3 in quadriceps muscle tissue was measured by RT-PCR technique and after its quantification using $2^{-\Delta\Delta cT}$ formula, relative changes of the caspase-3 gene were calculated and analyzed. Data analysis was done through one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test ($P<0.05$).

Results

The MDA and SOD levels in Berberine + aerobic exercise group significantly decreased ($P<0.0019$) and increased ($P<0.0063$), respectively compared to other groups. The level of GPX in the Berberine + aerobic exercise group had a significant increase compared to the diabetes control and aerobic exercise groups ($P<0.0005$ and $P<0.001$, respectively). Also, there was a significant increase in GPX level in the Berberine supplement group compared to the diabetes control group ($P<0.0017$), however, there was no significant difference between the group of Berberine + aerobic exercise and Berberine supplement ($P=0.132$). The Caspase-3 gene expression in Berberine + aerobic exercise group had a significant decrease compared to diabetes control and aerobic exercise groups ($P<0.0001$ and $P<0.001$, respectively). This variable also had a significant decrease in the Berberine supplement group compared to the diabetes control group ($P<0.0005$).

Conclusion

Six weeks of aerobic training alone has no significant effect on oxidative stress, antioxidant defense, and atrophy of quadriceps muscles of diabetic rats, but its simultaneous intervention with Berberine supplement at a dose of 50 mg/kg has beneficial and significant effects. This improvement resulting from the simultaneous intervention of aerobic exercise and Berberine supplementation indicates more detoxification of free radicals and increased fight against inflammatory conditions caused by diabetes. On the other hand, the decrease in caspase-3 gene expression indicates a decrease in cell apoptosis and, as a result, a decrease in quadriceps muscle atrophy in diabetic rats. Therefore, the simultaneous use of aerobic exercise and Berberine supplementation can be a suitable solution to reduce oxidative stress, increase antioxidant defense, and reduce the amount of muscle atrophy in diabetic samples. However, to generalize it to human samples, more clinical research is needed.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines: This study followed the ethical

Journal of Sport Biosciences
University of Tehran Press
Online ISSN: 2676-4148

standards and was approved by the Ethics Committee of Payame Noor University with the ethical code: (IR.PNU.REC.1401.012).

Funding: This study was extracted from the MSc thesis of the first author. No funding was received for this study.

Authors' contribution: All authors contributed to the study design. Azam Hamzezadeh and Javad Ramezani collected the data. Saeed Naghibi and Javad Ramezani revised the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments: We hereby sincerely thank and appreciate all the people who have cooperated in this research.

علوم زیستی ورزشی
انتشارات دانشگاه تهران
شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۴۱۴۸

اثر تعاملی شش هفته مکمل‌دهی بربرین به‌همراه تمرین هوازی بر برخی از شاخص‌های اکسایشی و ضداکسایشی و بیان ژن کاسپاز-۳ در عضلهٔ چهارسرران موش‌های صحرایی نر دیابتی‌شده با استرپتوزوسین

اعظم حمزه‌زاده[۱]، جواد رمضانی[۲] ✉، سعید نقیبی[۳]

۱. گروه فیزیولوژی فعالیت بدنی و تندرستی، دانشگاه پیام نور، مرکز کرج. رایانامه: azamhamzehzadeh5@gmail.com
۲. نویسندهٔ مسئول، گروه علوم ورزشی، دانشکدهٔ علوم انسانی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران. رایانامه: J_ramezani@pnu.ac.ir
۳. گروه علوم ورزشی، دانشکدهٔ علوم انسانی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران. رایانامه: sdnaghibi@pnu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۷
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۱۰/۰۱

کلیدواژه‌ها:
استرپتوزوسین،
اکسایش،
بربرین،
تمرین هوازی،
دیابت،
کاسپاز-۳.

چکیده

مقدمه: دیابت نوع۱ با ضعف دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن همراه است و بر عضلات اسکلتی نیز تأثیر دارد. هدف از این پژوهش، بررسی تعامل مکمل‌دهی بربرین به‌همراه تمرین هوازی بر مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و همچنین بیان ژن Caspase-3 در بافت عضلهٔ چهارسر ران موش‌های صحرایی دیابتی نوع۱ بود.

روش پژوهش: ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، به‌صورت تصادفی در پنج گروه ۱. کنترل سالم، ۲. کنترل دیابتی، ۳. مکمل بربرین، ۴. تمرین هوازی و ۵. تمرین هوازی+مکمل بربرین قرار گرفتند. پس از اطمینان از القای دیابت توسط STZ در گروه‌های تیمار، تمرین هوازی با شدت متوسط به مدت شش هفته با تواتر پنج جلسه در هفته طبق برنامه انجام گرفت. مکمل‌دهی بربرین با دوز ۵۰ mg/kg در تمام روزهای هفته و نیم ساعت پیش از تمرین به‌صورت گاواژ انجام گرفت.

یافته‌ها: سطح MDA و SOD در گروه مکمل بربرین+تمرین هوازی نسبت به سایر گروه‌ها به‌ترتیب کاهش (P<۰/۰۰۱۹) و افزایش معنادار (P<۰/۰۰۶۳) داشت. سطح GPX در گروه مکمل بربرین+تمرین هوازی نسبت به گروه‌های کنترل دیابت و تمرین هوازی (به‌ترتیب P<۰/۰۰۰۵ و P<۰/۰۰۱) دارای افزایش معناداری بود. همچنین در گروه مکمل بربرین نسبت به گروه کنترل دیابت (P<۰/۰۰۱۷) افزایش معنادار بود. با این حال تفاوت معناداری بین گروه مکمل بربرین+تمرین هوازی و مکمل بربرین دیده نشد (P=۰/۱۳۲). بیان ژن Caspase-3 در گروه مکمل بربرین+تمرین هوازی نسبت به گروه‌های کنترل دیابت و تمرین هوازی (به‌ترتیب P<۰/۰۰۰۱ و P<۰/۰۰۱) کاهش معناداری داشت. این متغیر نیز در گروه مکمل بربرین نسبت به گروه کنترل دیابت کاهش معناداری داشت (P<۰/۰۰۰۵).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد مداخلهٔ همزمان مکمل‌دهی بربرین و تمرین هوازی دارای تأثیرات هم‌افزایی مثبت است و نقش مهمی در کاهش MDA و بیان ژن کاسپاز-۳ و افزایش SOD و GPX در عضلهٔ چهارسر ران موش‌های دیابتی نوع ۱ دارد.

استناد: حمزه‌زاده، اعظم؛ رمضانی، جواد؛ و نقیبی، سعید. اثر تعاملی شش هفته مکمل‌دهی بربرین به‌همراه تمرین هوازی بر برخی از شاخص‌های اکسایشی و ضداکسایشی و بیان ژن کاسپاز-۳ در عضلهٔ چهارسرران موش‌های صحرایی دیابتی‌شده با استرپتوزوسین. نشریهٔ *علوم زیستی ورزشی*.۱۴۰۲؛ (۴) ۱۵،۱۰۰-۸۵.
DOI: http://doi.org/10.22059/JSB.2023.363750.1602

دسترسی به این نشریهٔ علمی، رایگان است و حق مالکیت فکری خود را بر اساس لایسنس کریتیو کامنز (CC BY-NC 4.0) به نویسندگان واگذار کرده است.| آدرس نشریه: https://jsb.ut.ac.ir/| ایمیل: jsb@ut.ac.ir

ناشر: انتشارات دانشگاه تهران. © نویسندگان.

مقدمه

دیابت نوع ۱ (T1DM) یک بیماری متابولیکی است که با خودایمنی بدن در برابر سلول‌های بتای پانکراس و تخریب آنها، سبب وابستگی بیماران به جایگزینی مادام‌العمر تزریق انسولین می‌شود [۱]. این بیماری با افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب مزمن در بدن همراه است و عوارض زیادی، از جمله اختلالات قلبی- عروقی، کلیوی و شبکیه به‌همراه دارد [۲]. همچنین عضلات اسکلتی به‌عنوان یک بافت بزرگ در بدن، هدف آسیب دیابت نوع ۱ قرار دارد [۳]. در فرایند استرس اکسیداتیو، گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS) به‌خصوص در میتوکندری‌ها تولید می‌شوند و می‌توانند پاسخ‌های التهابی را از طریق پروتئین کینازها، فاکتورهای رونویسی و بیان ژنومی عوامل پیش التهابی تحریک کنند [۴]. افزایش تجمع ROS ها به افزایش عوامل استرس اکسیداتیو از جمله مالون دی آلدئید (MDA) منجر می‌شود که به آسیب اجزای اصلی سلولی از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA کمک می‌کند [۵]. پراکسیداسیون لیپیدی به‌عنوان یکی از پیامدهای افزایش گلوکز خون (هایپرگلیسمی) محسوب شده و نشانگر آسیب اکسیداتیو ناشی از افزایش ROSs به‌دلیل غیرفعال شدن دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن است که به اتصال ROS با اسیدهای چرب غیراشباع و تغییر ساختار آنها منجر می‌شود. اختلال در DNA میتوکندری به نقص در رونویسی اجزای زنجیرهٔ انتقال الکترون و در نهایت افزایش تولید ROS ها منجر می‌شود [۶]. سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان بدن که از آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) تشکیل شده است، می‌تواند از آسیب ناشی از ROSs جلوگیری کند [۷]. ROS ها همچنین از طریق مسیرهای سیگنالینگ داخل‌سلولی می‌توانند به از دست دادن پروتئین سلولی و آتروفی عضلانی منجر شوند [۸]. افراد دیابتی نوع ۱ که درمان مناسبی ندارند، مقدار چشمگیری از حجم عضلانی خود را از دست می‌دهند (عضلات تحلیل می‌روند) [۹] که این مسئله به افزایش بیشتر غلظت گلوکز خون و در نتیجه یک چرخهٔ معیوب منجر می‌شود [۱۰]. آتروفی عضلانی در پاسخ به بسیاری از آسیب‌ها، از جمله عدم استفادهٔ طولانی‌مدت از عضلات، پیری و بیماری‌های مزمن مانند دیابت رخ می‌دهد. آتروفی عضلات نتیجهٔ تعادل منفی بین میزان سنتز پروتئین انقباضی و تخریب آن است. در شرایط کاتابولیک، آتروفی عضلات در ترکیب با بی‌تحرکی می‌تواند ظرفیت انجام فعالیت‌های روزمره و کیفیت زندگی را کاهش و متعاقباً میزان مرگ‌ومیر را افزایش دهد. مسیرهای پروتئولیتیک با واسطه یوبیکویتین پروتئازم، اتوفاژی-لیزوزوم و کاسپاز-۳ مسئول تخریب پروتئین در عضلات هستند و در نتیجه سبب آتروفی عضلانی می‌شوند [۱۱].

کاسپازها آنزیم‌های وابسته به سیستئین هستند که به وضعیت ردوکس سلول حساس‌اند. یکی از نقش‌های کاسپازها، غیرفعال کردن پروتئین‌هایی است که برای بقای سلول حیاتی‌اند. این آنزیم‌ها تماس سلول را با سلول‌های اطراف قطع می‌کنند، اسکلت سلولی را به هم می‌ریزند و تکثیر و ترمیم DNA را متوقف می‌کنند، ساختار هسته‌ای را مختل کرده و تغییرات بیوشیمیایی را در سطح سلول برای تشخیص آسان توسط فاگوسیت‌ها ایجاد می‌کنند و در نهایت سلول را به اجسام وزیکولی متلاشی می‌کنند. شروع رویدادهای آپوپتوز به توانایی کمپلکس‌های سیگنالینگ برای تولید یک پروتئاز فعال بستگی دارد [۱۲]. کاسپاز -۳ از عوامل اصلی آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول) بوده و فعال شدن آن نشان‌دهندهٔ مرگ برگشت‌ناپذیر سلولی خواهد بود [۱۳]. شواهد نشان می‌دهد که پروتئاز کاسپاز-۳ به تخریب پروتئین و آتروفی عضلانی کمک می‌کند. در این زمینه فعال‌سازی کاسپاز-۳ سبب تخریب کمپلکس‌های اکتومیوزین می‌شود و مهار فعالیت کاسپاز-۳، سرعت کلی پروتئولیز ناشی از دیابت و آتروفی میوفیبر را سرکوب می‌کند [۱۴]. کنترل فعالیت کاسپاز-۳ در سلول پیچیده است و شامل مسیرهای سیگنال دهی به‌هم‌پیوستهٔ متعددی است. در مورد آتروفی عضلانی ناشی از دیابت، به‌نظر می‌رسد که کاسپاز-۳ توسط کاسپاز-۱۲ (از طریق مسیر آزادسازی کلسیم) و/یا فعال شدن کاسپاز-۹ (از طریق مسیر میتوکندری) فعال می‌شود. یک تعامل بالقوه بین این مسیرهای فعال‌سازی کاسپاز-۳ این است که هر دوی این مسیرها می‌توانند توسطROS ها فعال شوند [۱۵]. بنابراین بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن می‌تواند در کاهش ROSs و کاهش بیان ژن کاسپاز-۳ و در نهایت کاهش یا توقف آتروفی عضلانی نقش مهمی را ایفا کند. در این تحقیق سعی داریم از این زاویه به حل مسئله بپردازیم.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که تمرینات ورزشی می‌تواند به تغییر وضعیت اکسیداتیو در بدن منجر شود [۱۶،۱۷]. اگرچه ورزش حاد استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد، ورزش منظم استرس لازم را برای تحریک سازگاری‌های مزمن مفید از جمله کاهش پاسخ التهابی و استرس اکسیداتیو با افزایش ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌کند [۱۸]. رابطهٔ بین ورزش و استرس اکسیداتیو بسیار پیچیده است و نه‌تنها به نوع، شدت و مدت زمان تمرین، بلکه به سایر عوامل مؤثری مانند سن، جنسیت، سطح سلامتی، استرس روانی و تغذیه بستگی دارد [۱۹،۲۰]. تحقیقات نشان می‌دهند که تمرینات با شدت متوسط دارای بیشترین تأثیرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی هستند [۲۱،۲۲]. در این تحقیق نیز از پروتکل تمرینی با شدت متوسط استفاده شد [۲۳]. برخی شواهد نشان می‌دهد فعالیت ورزشی، پیشرفت در اختلال تحمل گلوکز را آهسته می‌کند [۲۴] و ممکن است هایپرگلایسمی را نیز در بیماران دیابتی نوع ۱ کاهش دهد [۲۵]. همچنین پژوهشی نشان داد که فعالیت ورزشی می‌تواند تودهٔ سلول‌های بتا را در جوندگان دیابتی نوع ۱ ترمیم کند [۲۶]. از طرف دیگر، بربرین از جمله مکمل‌های گیاهی است که هم نقش آنتی‌اکسیدانی و هم نقش تنظیم‌کنندگی متابولیسم را داراست [۲۷]. این ماده در بسیاری از گیاهان از جمله انگور ارگون[1] زرشک[2] و زردچوبه[3] یافت می‌شود [۲۸]. یکی از اقدامات اصلی بربرین در فضای سلولی فعال کردن آنزیمی به نام AMPK است که گاهی اوقات از آن به‌عنوان «کلید اصلی متابولیک» یاد می‌شود. آنزیم مذکور در سلول‌های ارگان‌های مختلف از جمله مغز، کلیه، عضلات، قلب و کبد وجود دارد و نقش مهمی در تنظیم سوخت‌وساز ایفا می‌کند [۲۷].

حال با توجه به تأثیر مهم ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی هریک از متغیرهای مذکور، در این تحقیق، به بررسی تعامل مکمل‌دهی بربرین به‌همراه شش هفته تمرین هوازی بر سطح مالون دی‌آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و همچنین میزان بیان ژن کاسپاز-۳ به‌عنوان یک فاکتور مؤثر در آتروفی عضلانی در عضلهٔ چهارسر ران موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۱ پرداختیم. در واقع این سؤال مطرح است که آیا این تأثیرات مهم، می‌توانند جنبهٔ هم‌افزایی نیز داشته باشند یا خیر؟

روش‌شناسی پژوهش

روند اجرایی پژوهش

تعداد ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ سالم (سن حدود هشت هفته) از نژاد ویستار با میانگین وزنی حدود ۲۰۰- ۲۵۰ گرم به‌صورت تصادفی از انستیتو پاستور ایران، تهران خریداری شدند و در قفس‌هایی از جنس پلی‌بی‌کربنات به ابعاد ۹۰×۶۰×۴۰ سانتی‌متر قرار گرفتند. موش‌های صحرایی بر اساس وزن همسان‌سازی شده و به‌صورت تصادفی به پنج گروه هفت‌تایی شامل ۱. کنترل سالم، ۲. کنترل دیابتی، ۳. دیابت+ مکمل بربرین، ۴. دیابت+ تمرین هوازی و ۵. دیابت+ تمرین هوازی+ مکمل بربرین تقسیم شدند. تمام موارد استاندارد از جمله شرایط دمایی (۱ ± ۲۴ درجهٔ سانتی‌گراد)، میزان رطوبت نسبی (٪ ۳ ± ۴۰)، دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد (شامل پروتئین ۲۳٪، چربی خام ۳/۵- ۴/۵٪ ، فیبر خام ۴- ۴/۵ ٪ و به اندازهٔ کافی از مواد معدنی و ویتامین‌ها ساخت شرکت بهپرور، ایران) و همچنین سیکل تاریکی/ روشنایی (۱۲ ساعته) و همچنین تمام ملاحظات اخلاقی مطابق با راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی ویرایش هشتم و تأیید کمیتهٔ اخلاق در پژوهش دانشگاه پیام نور با شناسهٔ IR.PNU.REC.1401.012 رعایت شد. در گروه‌های درمان، القای دیابت با تزریق داخل‌صفاقی استرپتوزوسین (ساخت شرکت سیگما با کد نامبر: S0130) با دوز ۶۰ mg/kg حل‌شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با PH=۴/۵ صورت گرفت. در گروه کنترل سالم، حجمی معادل با STZ تزریقی در گروه‌های درمان، محلول نرمال سالین تزریق شد. این تزریق صرفاً به‌سبب وارد کردن استرس ناشی از تزریق به همهٔ حیوانات انجام گرفت. پس از تزریق STZ و به مدت ۴۸ ساعت، به‌منظور کاهش مرگ‌ومیر موش‌ها ناشی از شوک افزایش قند خون، به‌جای آب از محلول گلوکز ۵ درصد استفاده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت از تزریق STZ، غلظت گلوکز خون پس از ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه به‌وسیلهٔ دستگاه گلوکوکارد ۰۱ (ساخت ژاپن) اندازه‌گیری شد. قند خون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شد. روزی که در آن دیابت تأیید شود به‌عنوان روز صفر تعیین شد.

[1]. Berberis aquifolium
[2]. Berberis vulgaris
[3]. Berberis aristata

برنامهٔ تمرین هوازی و مکمل‌دهی بربرین

به تمام حیوانات اجازه داده شد تا به مدت دو هفته با محیط آزمایشگاه سازگاری پیدا کنند. در هفتهٔ اول هیچ‌گونه تحرکی روی نوار گردان نداشتند اما در هفتهٔ دوم به‌منظور آشناسازی حیوانات با نوار گردان، سه جلسه با سرعت ۲–۵ متر بر دقیقه و شیب صفر درصد به مدت ۵–۱۰ دقیقه روی نوار گردان (ساخت شرکت برج صنعت آزما مدل T.S8000) راه رفتند. پروتکل تمرینی شامل شش هفته دویدن روی نوار گردان با شدت متوسط با تواتر پنج جلسه در هفته (سه روز تمرین و یک روز استراحت) بود. در هر جلسهٔ تمرین، پنج دقیقه برای گرم کردن در ابتدا و پنج دقیقه برای سرد کردن در انتها با سرعت ۴–۵ متر بر دقیقه در نظر گرفته شد که این مدت به زمان اصلی تمرین اضافه شد. سرعت و مدت زمان تمرین بر روی نوار گردان به‌تدریج از ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در هفتهٔ اول، به ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در هفتهٔ دوم، ۱۴–۱۵ متر بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در هفتهٔ سوم، ۱۴–۱۵ متر بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در هفتهٔ چهارم، ۱۸–۱۷ دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در هفتهٔ پنجم و در نهایت ۱۷–۱۸ متر بر دقیقه به مدت ۴۰ دقیقه در هفتهٔ ششم افزایش یافت [۲۳]. همچنین حین برنامهٔ تمرینی از هیچ نوع شوک الکتریکی استفاده نشد، در صورت لزوم با استفاده از دست و یا ایجاد محرک صوتی بر روی درپوش نوار گردان، حیوانات وادار به ادامهٔ تمرین شدند. گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی هیچ‌گونه تمرینی را دریافت نکردند. مکمل مورد استفاده در این تحقیق، پودر بربرین (ساخت شرکت سیگما با کد نامبر : 14050) مستخرج از گیاه زرشک با درجهٔ خلوص ۹۰ درصد بود. این پودر در هر جلسه به اندازهٔ مورد نیاز در محلول نرمالین سالین حل می‌شد. سپس محلول آماده‌شده با دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، در تمام روزهای هفته و به مدت شش هفته به‌صورت خوراکی (گاواژ) نیم ساعت پیش از تمرین به گروه‌های درمان خورانده می‌شد.

روش نمونه‌برداری و آماده‌سازی بافت‌ها

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین (برای از بین بردن پاسخ بدن به آخرین جلسهٔ فعالیت بدنی) و پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، نمونه‌گیری از گروه‌های کنترل و درمان انجام گرفت. برای جمع‌آوری نمونه‌ها، ابتدا حیوانات با تزریق همزمان داروی کتامین[1](۵۰ mg/kg) و زایلازین[2](۵ mg/kg) به‌صورت داخل‌صفاقی (IP) بی‌هوش شدند. سپس قفسهٔ سینه حیوان شکافته شد و خون‌گیری مستقیماً از بطن چپ قلب موش به‌عمل آمد. خون به‌سرعت در لوله‌های حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ریخته شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (ساخت شرکت Hi tech، آلمان) و مایع رویی آن در داخل میکروتیوب‌های برچسب‌دار ریخته شد و بلافاصله به تانک ازت منتقل شد. همچنین عضلهٔ چهارسر ران از بدن حیوان جدا شد و در داخل میکروتیوب‌های برچسب دار قرار داده شد و بلافاصله به تانک ازت منتقل شد. در روز آزمایش، قطعه‌ای از بافت عضلهٔ چهارسرران حیوانات به وزن حدوداً ۱۰۰ میلی‌گرم جدا کردیم و آن را در یک میلی‌لیتر بافر PBS (PH=7/4) قرار دادیم. سپس نمونه‌ها با استفاده از هموژنایزر (مدل T 10 Basic، IKA آلمان) بر روی یخ به مدت پنج دقیقه کاملاً حل شدند. محلول به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع شفاف رویی به یک میکروتیوب ۱ میلی‌لیتر منتقل شد. به‌منظور اندازه‌گیری متغیرها از کیت‌های اختصاصی (ZB-MDA، ZB-SOD و ZB-GPX) استفاده شد و آزمایش‌ها طبق دستورالعمل استاندارد آن به روش الایزا انجام شد. بیان نسبی ژن کاسپاز–۳ در بافت عضلهٔ چهارسرران به‌وسیلهٔ تکنیک RT-PCR سنجش شد و پس از کمی‌سازی آن با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ ، تغییرات نسبی ژن کاسپاز–۳ محاسبه و تجزیه‌وتحلیل انجام گرفت.

برای استخراج RNA ابتدا ۷۰ میلی‌گرم از بافت عضلهٔ چهارسر ران حیوان بعد از هموژن کردن کامل در ۱ میلی‌لیتر ترایزول (ساخت شرکت کیازیست، ایران) ریخته شد تا لیزات سلول به‌دست آید. سپس در مرحلهٔ اول مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (ساخت مجتمع صنایع شیمیایی دکتر مجللی، ایران) به نمونه‌ها اضافه شد و ۱۵ ثانیه تکان داده شد تا مخلوط شوند (بدون ورتکس). میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ RPM و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. فاز شفاف

[1]. Ketamine
[2]. Xylazine

رویی حاوی RNA جدا شده و به میکروتیوب دیگری منتقل شد. به میکروتیوب‌های حاوی از شفاف رویی، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (ساخت مجتمع صنایع شیمیایی دکتر مجللی، ایران) اضافه شد و دو مرتبه میکروتیوب‌ها سر و ته (inverting) شدند تا محتویات میکروتیوب‌ها مخلوط شوند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای فریزر ۲۰- انکوبه شدند. به‌منظور رسوب RNA، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در RPM ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. محلول رویی تخلیه شده و رسوب‌ها با اتانول ۷۵٪ شست‌وشو داده شدند، به این صورت که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ به هر میکروتیوب اضافه شد و چند ثانیه ورتکس انجام شد تا رسوب کاملاً در اتانول شسته شده و ناخالص‌ها جدا شوند. سپس سانتریفیوژ در RPM ۷۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه انجام شد. محیط رویی تخلیه و میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه بر روی دستمال کاغذی استریل وارونه قرار داده شدند تا رسوب نیمه‌خشک شده و الکل تبخیر شود. پس از نیمه‌خشک شدن رسوب، مقدار ۳۰ میکرولیتر آب DEPC یا عاری از RNase (ساخت شرکت Thermo، آمریکا) به هر میکروتیوب اضافه شد تا رسوب RNA در آن حل شود. برای حل شدن رسوب، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه قرار گرفتند. سپس نمونه‌های RNA استخراج‌شده در دمای ۷۰- درجه نگهداری شدند. مرحلهٔ بعد سنتز cDNA بود. برای این منظور ابتدا تمام مواد کیت از دمای ۲۰- و نمونه‌ها از ۷۰- درجه خارج شده و پس از آب شدن به روی یخ منتقل شدند. مواد پیش از استفاده، ورتکس کوتاه و اسپین شدند. برای تهیهٔ میکس RT، ۵ میکرولیتر بافر RT به‌همراه آنزیم RT، ۱ میکرولیتر پرایمر طراحی‌شده (جدول ۱) و ۳ میکرولیتر آب DEPC مخلوط شد و سپس در حجم‌های ۹ میکرولیتر در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری توزیع شد. میکروتیوب‌های آماده‌شده حاوی میکس RT و نمونهٔ RNA در دستگاه Dry block heater ساخت شرکت کیاژن، ایران گذاشته شد و برنامهٔ دمایی زیر (جدول ۲) انجام گرفت. نمونه‌های cDNA آماده‌شده تا زمان استفاده در ۲۰- درجه نگهداری شدند. از کیت Easy cDNA Synthesis Kit ساخت شرکت پارس‌توس، ایران برای سنتز cDNA استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای کاسپاز-۳ به‌همراه ژن کنترل GAPDH

ژن	توالی پرایمر
Caspase-3	Forward: AAGTGATGGAGATGAAGGAGT Reverse: CAGGCGTGAATGATGAAGAGT
GAPDH	Forward: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG Reverse: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

جدول۲. برنامهٔ Real-Time

	درجهٔ سانتی‌گراد	دقیقه	
RT-PCR	۲۵	۱۰	۱X
	۴۷	۶۰	
	۸۵	۵	
سرد کردن	۴	۲	۱X

برای بررسی کمی تغییرات بیان ژن، مواد لازم برای PCR از فریزر درآورده شده و کمی ورتکس و اسپین روی یخ انجام شد. سپس در هر محلول مقدار یک میکرولیتر از نمونهٔ cDNA موردنظر اضافه شد و حجم نهایی هر واکنش PCR به ۱۰ میکرولیتر رسانده شده و سپس برنامهٔ دمایی زیر (جدول ۳) اجرا شد.

جدول ۳. برنامهٔ Real-Time PCR

مراحل	درجهٔ حرارت (سانتی‌گراد)	زمان	چرخه	Acquisition mode
دناتوره کردن	۹۵	۵ دقیقه	۱X	خاموش
تقویت (Amplification)	۹۵	۱۵ ثانیه	۴۰X	خاموش
	۶۰	۲۰–۱۵ ثانیه		خاموش
	۷۲	۳۰–۱۵ ثانیه		روشن
منحنی ذوب (Melt curve)	۹۵	۱۵ ثانیه	۱X	خاموش
	۶۵	۱ دقیقه		خاموش
	۶۵–۹۵، Slope: ۰/۳			روشن
سرد کردن	۳۰	۲۰ ثانیه	۱X	خاموش

روش آماری

برای اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو–ویلک استفاده شد. پس از تأیید طبیعی بودن توزیع داده‌ها، به‌منظور بررسی مقایسهٔ میانگین تغییرات درون‌گروهی و بین‌گروهی سطح بیان ژن گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یکراهه و تست تعقیبی توکی استفاده شد. تمامی عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۶ انجام گرفت. سطح معناداری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌های پژوهش

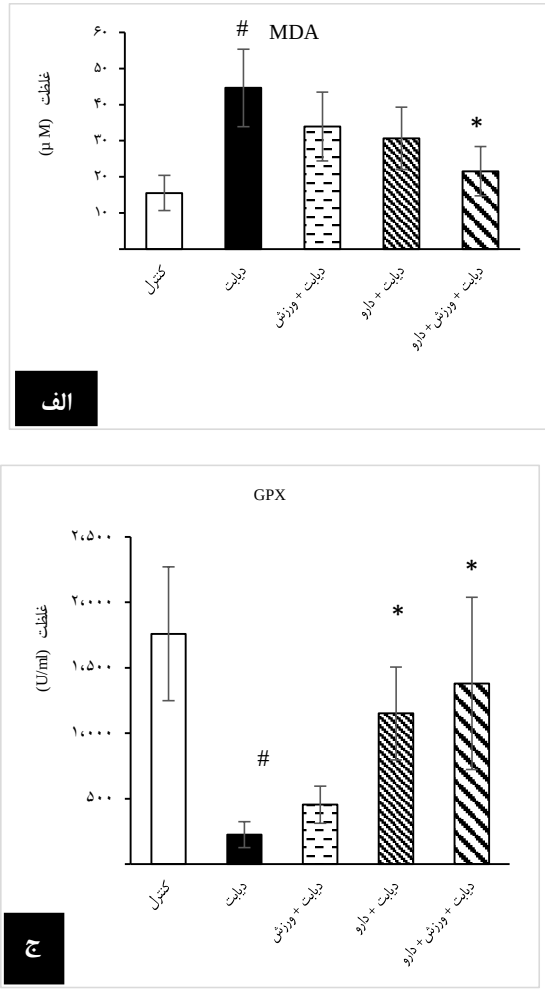
نتایج آزمون تحلیل واریانس یکراهه نشان داد که بین میانگین تغییرات MDA، SOD، GPX و Caspase-3 در گروه‌های درمان نسبت به گروه کنترل دیابتی اختلاف معنادار وجود دارد (جدول ۵). بر اساس نتایج آزمون تعقیبی توکی، سطح MDA و SOD در گروه مکمل بربرین+تمرین هوازی نسبت به سایر گروه‌ها به‌ترتیب کاهش (P<۰/۰۰۱۹) و افزایش معنادار (P<۰/۰۰۶۳) داشته است. سطح GPX در گروه مکمل بربرین+تمرین هوازی نسبت به گروه‌های کنترل دیابت و تمرین هوازی (به‌ترتیب P<۰/۰۰۰۵ و P<۰/۰۰۱) افزایش معنادار داشته است. همچنین سطح GPX در گروه مکمل بربرین نسبت به گروه کنترل دیابت (P<۰/۰۰۱۷) افزایش معنادار داشت. با این حال تفاوت معناداری بین گروه مکمل بربرین + تمرین هوازی و مکمل بربرین دیده نشد (P=۰/۱۳۲). بیان ژن Caspase-3 در گروه مکمل بربرین + تمرین هوازی نسبت به گروه‌های کنترل دیابت و تمرین هوازی (به‌ترتیب P<۰/۰۰۰۱ و P<۰/۰۰۱) کاهش معنادار داشته است. این فاکتور نیز در گروه مکمل بربرین نسبت به گروه کنترل دیابت کاهش معنادار داشت (P<۰/۰۰۰۵).

جدول ۴. میانگین و انحراف استاندارد وزن بدن و گلوکز خون در گروه‌های مورد بررسی پیش و پس از مداخله

متغیر		کنترل سالم	کنترل دیابتی	ورزش	بربرین	ورزش+بربرین
وزن بدن (گرم)	**پیش از مداخله**	۲۴۳/۲۲±۰۲/۳	۲۴۲/۵±۳۸/۱۳	۲۴۳/۴±۵۴/۴۸	۲۴۴/۲±۱۵/۹۸	۲۴۲/۶±۸۸/۵۱
	پس از مداخله	۳۱۲/۸±۴۲/۲۷	۱۷۲/۹±۱۲/۱۱	۱۸۹/۸±۵۴/۶۳	۲۵۸/۶±۴۸/۲۱	۳۰۸/۷±۲۲/۴۹
گلوکز خون (*mg/dl*)	**پیش از مداخله**	۱۰۰/۱۰±۱۹/۱۵	۴۱۷/۴۵±۴۲/۲۹	۳۸,۶۵±۴۱۹,۲۴	۴۲۰/۳۶±۵۴/۵۴	۴۱۹/۴۱±۲۴/۲۶
	پس از مداخله	۹۷/۸±۸۹/۵۴	۵۰۴/۶۴±۱۹/۵۲	۴۶۸/۵۵±۴۷/۲۱	۳۲۱/۲۱±۲۵/۳۴	۲۶۸/۱۷±۲۴/۲۱

جدول ۵. نتایج آزمون تحلیل واریانس یکراههٔ متغیرهای مورد بررسی (علامت * نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنادار بین گروه‌هاست)

متغیر	منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجات آزادی	میانگین مربعات	F	P
MDA (µ M)	بین‌گروهی	۲۰۲۹	۴	۵۰۷/۳	۷/۲۳۵	*۰/۰۰۱۹
	درون‌گروهی	۱۰۵۲	۱۵	۷۰/۱۲		
	کل	۳۰۸۱	۱۹			
SOD (U/ml)	بین‌گروهی	۳۲۴۳۱	۴	۸۱۰۸	۵/۴۹	* ۰/۰۰۶۳
	درون‌گروهی	۲۲۱۵۲	۱۵	۱۴۷۷		
	کل	۵۴۵۸۳	۱۹			
GPX (U/ml)	بین‌گروهی	۶۵۶۹۰۰۰	۴	۱۶۴۲۰۰۰	۹/۶۵۸	* ۰/۰۰۰۵
	درون‌گروهی	۲۵۵۱۰۰۰	۱۵	۱۷۰۰۴۲		
	کل	۹۱۲۰۰۰۰	۱۹			
Caspase-3	بین‌گروهی	۰/۲۱۰۸	۴	۰/۰۵۲۶۹	۲۲/۰۱	* ۰/۰۰۰۱
	درون‌گروهی	۰/۰۳۵۹۱	۱۵	۰/۰۰۲۳۹۴		
	کل	۰/۲۴۶۷	۱۹			



شکل ۱. مقایسهٔ میانگین تغییرات متغیرهای MDA، SOD، GPX و بیان نسبی ژن Caspase-3 در گروه‌های تحقیق. (علامت (*) نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل دیابت، علامت (#) نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل سالم است)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که تعامل همزمان مکمل‌دهی بربرین با دوز ۵۰ mg/kg و تمرین هوازی به مدت شش هفته، دارای تأثیرات مثبت هم‌افزایی بوده و تأثیر معناداری بر سطوح MDA، SOD و GPX و همچنین بیان ژن کاسپاز-۳ در عضلهٔ چهارسر ران موش‌های صحرایی دیابتی‌شده با استرپتوزوسین دارد. سطح MDA معمولاً به‌عنوان یک نشانگر استرس اکسیداتیو شناخته می‌شود. نتایج تحقیقی نشان داد که افزایش بیش از حد MDA بر متابولیسم، یکپارچگی و عملکرد سلول‌های عضلانی تأثیر منفی دارد [۲۹]. مقدار این ماده در بدن کودکان و نوجوانانی که کنترل گلیسمی نامطلوب دارند به‌طور چشمگیری از مقادیر نرمال فراتر می‌رود و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله GPX و GSH به‌شدت کاهش می‌یابد [۳۰]. در این تحقیق ما مشاهده کردیم که سطح MDA در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم افزایش و سطوح SOD و GPX کاهش معناداری داشته است که احتمالاً به‌دلیل ایجاد اختلال در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن به‌واسطهٔ تزریق STZ و همچنین افزایش شدید استرس اکسیداتیو بوده است. نتایج پژوهش نشان داد که شش هفته تمرین هوازی یا مصرف مکمل بربرین، هیچ‌کدام به‌تنهایی نمی‌توانند کاهش معناداری را در میزان MDA و SOD بافت عضلهٔ چهارسرران موش‌های صحرایی دیابتی ایجاد کنند که دلیل آن ممکن است مربوط به ۱. شدت و مدت زمان کوتاه دورهٔ تمرینات، ۲. دورهٔ کوتاه‌مدت مکمل بربرین و ۳. دوز مصرفی مکمل بربرین بوده باشد (شکل۱ الف،ب،ج).

با توجه به تأثیرات ضدالتهابی [۳۱] و فزایندهٔ سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در بدن به‌واسطهٔ ورزش [۱۸] و همچنین تأثیرات آنتی‌اکسیدانی بربرین [۲۷]، کاهش MDA به‌عنوان یک عامل پراکسیدسیون لیپیدی و افزایش آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر SOD و GPX در گروه مذکور منطقی به‌نظر می‌رسد. دوگان دِدِ و همکاران در سال ۲۰۱۸ طی تحقیقی به بررسی تأثیر تمرین هوازی بر سطوح MDA در دیابت نوع دو پرداختند و نشان دادند؛ دوازده هفته برنامهٔ تمرین هوازی برای بیماران دیابتی نوع ۲ در کاهش سطح MDA موثر بوده است [۳۲]. همچنین راداک و همکاران (۲۰۱۳) بیان داده‌اند که کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی مرتبط با ورزش منظم ممکن است به دلیل افزایش سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی باشد [۳۳]. سطوح بالای تجمع کلسیم به‌دلیل انقباضات شدید، که به‌طور معمول سبب آسیب می‌شود، تولید ROS را افزایش می‌دهد و احتمالاً ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی را در پاسخ به افزایش تولید ROS، افزایش می‌دهد. این یکی از سازوکارهای جبران و سازگاری بدن با استرس اکسیداتیو است [۳۴]. در همین زمینه لیما و همکاران (۲۰۱۵) طی پژوهشی به این نتیجه رسیدند که فعالیت ورزشی سبب افزایش معناداری در سطح آنزیم‌های SOD سیتوزول و همچنین GPX در سلول‌های کبدی موش‌هایی صحرایی دیابتی‌شده با STZ می‌شود [۳۵]. نقش SOD در سم‌زدایی رادیکال‌های سوپراکسید است، به‌طوری‌که آنها را به پراکسید هیدروژن تبدیل کرده و سپس توسط کاتالاز و GPX به آب که یک مادهٔ خنثی است، تبدیل می‌کند [۳۶]. در این مطالعه نشان داده شد که تمرین هوازی به‌تنهایی نمی‌تواند تأثیر معناداری بر کاهش MDA و یا افزایش SOD و GPX داشته باشد، دلیل ناهمسو بودن این یافته‌ها در تفاوت نوع دیابت و همچنین شدت و مدت زمان تمرین است.

بیشتر گزارش‌ها از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بربرین در مدل‌های حیوانی دیابتی‌شده توسط STZ حمایت می‌کنند [۳۷،۳۸]. کاهش استرس اکسیداتیو توسط بربرین با تغییر در نشانگرهای استرس اکسیداتیو و همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مشخص شد. به‌طور کلی، تجویز بربرین محتوای MDA را کاهش و محتوای SOD، GPX و GSH را افزایش می‌دهد که به نابودی رادیکال‌های آزاد بیش از حد و غلبه بر استرس اکسیداتیو کمک می‌کند [۳۹]. تنها در یکی از گزارش‌ها، اثر بربرین بر استرس اکسیداتیو آشکار به‌نظر نمی‌رسید [۴۰]. در این گزارش، محتوای MDA و SOD حیوانات دیابتی از نظر آماری تفاوت معناداری در مقایسه با گروه سالم نداشت که با نتایج سایر گزارش‌ها همخوانی ندارد. نتیجهٔ تحقیق دیگر نشان داد که سطح بیان SOD mRNA را می‌توان توسط بربرین در موش‌های دیابتی تنظیم کرد که نقش مهمی در برابر استرس اکسیداتیو دارد [۴۱]. همچنین بربرین سطح بیان سیرتوئین ۱ (SIRT1) را افزایش می‌دهد [۴۲]. در استرس اکسیداتیو، SIRT1 می‌تواند عامل‌های رونویسی Forkhead box O (FOXO) را استیل‌زدایی کرده و رونویسی ژن‌های هدف آنها را افزایش دهد که شامل SOD نیز می‌شود [۴۳]. بنابراین بربرین می‌تواند بیان SOD را از طریق مسیر SIRT1/FOXO افزایش دهد. همچنین بربرین می‌تواند استرس اکسیداتیو را با تنظیم مثبت SOD، UCP2 و کاهش بیان NADPH اکسیداز مهار کند، که ممکن

است این عمل از طریق مسیر SIRT1/FOXO یا AMPK واسطه‌گری شود [۴۴]. اما در تحقیق حاضر بربرین با دوز ۵۰ mg/kg تأثیر معناداری بر کاهش MDA و یا افزایش SOD نداشت. تنها توانست میزان GPX را به‌طور معناداری افزایش دهد. دلیل این ناهمسویی با سایر مطالعات، می‌تواند مربوط به تفاوت در دوز مکمل بربرین و یا مدت زمان استفاده از این مکمل باشد.

آتروفی عضلانی ناشی از افزایش هماهنگ در فعالیت چندین مسیر پروتئولیتیک، از جمله سیستم یوبیکوئیتین-پروتئازوم و کاسپاز-۳ (Caspase-3) است. کاسپاز-۳ با عمل به‌عنوان یک پروتئاز پایانی یا عاملی که آپوپتوز هسته‌ای را تسهیل می‌کند، نقش کلیدی در مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلول (Apoptosis) ایفا می‌کند [۴۵]. افزایش بیش از حد کاسپاز-۳ در عضلات اسکلتی به معنای مرگ سلول‌های عضلانی و در نهایت آتروفی عضلانی خواهد بود. در این مطالعه، القای دیابت توسط STZ سبب افزایش معنادار در میزان بیان ژن کاسپاز-۳ نسبت به گروه کنترل سالم شد (شکل۱ د). همچنین وزن بدن در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معناداری داشت (جدول ۴) که به‌نظر می‌رسد بخشی از این کاهش وزن مربوط به آتروفی عضلانی باشد. نتایج نشان داد میزان بیان ژن کاسپاز-۳ در گروه مکمل و گروه (تمرین+ مکمل) نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش معناداری داشته است (شکل۱ د). همچنین میانگین وزن بدن در این دو گروه نسبت به قبل از اجرای پروتکل، با افزایش همراه بوده است (جدول ۴). احتمالاً بهبود نسبی در وزن بدن و همچنین کاهش معنادار بیان ژن کاسپاز-۳ در بافت عضلانی چهارسرران موش‌های صحرایی دیابتی، ناشی از بهبود نسبی در میزان گلوکز خون در این گروه‌ها باشد (جدول ۴).

در شرایط التهاب ناشی از القای دیابت و افزایش استرس اکسیداتیو، ROSها سیتوکروم c بیشتری از طریق میتوکندری‌ها آزاد می‌کنند که به فعال شدن کاسپاز-۹ و متعاقب آن فعال شدن کاسپاز-۳ و در نهایت افزایش آپوپتوز منجر می‌شود [۴۶]. تأثیر تمرین ورزشی بر کاسپاز-۳ نشان می‌دهد که تمرین ورزشی ممکن است آپوپتوز را از طریق سیگنال‌دهی خانواده Bcl-2 بالادستی، با مشارکت بالقوهٔ مسیر سیتوکین/fas یا مسیر Ca2+/ER تنظیم کند [۴۷]. افزایش سیگنال دهی پرو آپوپتوتیک از طریق خانوادهٔ Bcl-2 میتوکندری به‌عنوان یک مکانیسم مهم به از دست دادن سلول‌های عضلانی و آتروفی منجر می‌شود [۴۶]. یک رویداد مهم در آپوپتوز ناشی از میتوکندری، تشکیل منافذ غشایی نفوذپذیر است [۴۸]، که توسط تعادل بین پروتئین‌های رقیب خانوادهٔ ضدآپوپتوز مانند Bcl-2 و پروتئین‌های پروآپوپتوز از جمله Bax تنظیم می‌شود [۴۹]. بر اساس تحقیقات، تمرین ورزشی به کاهش چشمگیر در فاکتور پرو آپوپتوز Bax و افزایش بیان پروتئین Bcl-2 در عضلهٔ اسکلتی موش‌ها منجر می‌شود. کاهش Bax ناشی از ورزش و تنظیم مثبت Bcl-2 از الگوهای مشابهی در عضلهٔ نعلی و خیاطه پیروی می‌کند. تمرین ورزشی به‌طور چشمگیری افزایش نسبت Bax/Bcl-2 ناشی از دیابت را کاهش می‌دهد. این موضع با بحث جلوگیری از تشکیل منافذ میتوکندری، شکاف کاسپاز، حذف میونوکلئوس و بقای سلولی توسط کاهش نسبت پروتئین‌های پرو به ضد آپوپتوز (مانند Bax/Bcl-2) سازگار است [۴۹]. در پژوهشی نشان داده شد که تمرین ورزشی سبب فعال شدن mTOR مستقل از اثر انسولین یا فاکتور رشد شبه‌انسولینی-۱ (IGF-1) شده و میزان تاهای نوع ۱ و نوع ۲ عضلهٔ پهن خارجی را افزایش می‌دهد [۱۱]. همچنین تحقیقی نشان داد که مصرف بربرین در موش‌های دیابتی غیرچاق (مدل دیابت نوع ۱) سبب تنظیم کاهشی در نسبت بیان ژن Bax/Bcl-2 شده، از تخریب سلول‌های بتای پانکراس محافظت کرده و متابولیسم گلوکز را تنظیم می‌کند [۵۰]. در این تحقیق تمرین هوازی به‌تنهایی تأثیر معناداری بر کاهش بیان ژن کاسپاز-۳ نداشت که احتمالاً این عدم همسویی مربوط به نوع دیابت، شدت و مدت تمرین هوازی بوده است، اما مکمل بربرین به‌تنهایی و همچنین همراه با تمرین هوازی، توانست اثر معناداری بر کاهش بیان ژن کاسپاز-۳ داشته باشد که احتمالاً به‌دلیل تأثیرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضدآپوپتوزی بربرین باشد. تغییرات میزان گلوکز خون در این دو گروه نیز مؤید بهبود نسبی وضعیت دیابت است (جدول ۴).

شش هفته تمرین هوازی به‌تنهایی تأثیر معناداری بر مالون دی آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و همچنین بیان ژن کاسپاز-۳ در عضلهٔ چهارسر ران موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۱ ندارد، اما مداخلهٔ همزمان آن با مکمل بربرین با دوز ۵۰ mg/kg دارای اثرات مفید و معناداری است. این بهبودی حاصل از مداخلهٔ همزمان تمرین هوازی و مکمل بربرین، نشان‌دهندهٔ سمزدایی بیشتر از

رادیکال‌های آزاد و افزایش مبارزه با شرایط التهابی ناشی از دیابت است. از طرف دیگر، کاهش بیان ژن کاسپاز-۳ نشان‌دهندهٔ کاهش میزان آپوپتوز سلولی و در نتیجه کاهش آتروفی عضلهٔ چهارسر ران موش‌های صحرایی دیابتی است. بنابراین استفاده همزمان از تمرینات هوازی و مکمل بربرین می‌تواند راهکار مناسبی جهت کاهش استرس اکسیداتیو، افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش میزان آتروفی عضلانی در نمونه‌های دیابتی باشد. هرچند برای تعمیم آن به نمونه‌های انسانی به تحقیقات بالینی نیاز است. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم کنترل مقدار غذا و آب مصرفی و همچنین میزان استرس وارده به موش‌ها اشاره کرد. ازاین‌رو برای مطالعات آینده توصیه می‌شود میزان غذا و آب مصرفی حیوانات اندازه‌گیری و به‌طور دقیق ثبت شود تا همگام با سایر نتایج به‌خصوص تغییرات مقدار گلوکز خون، تغییرات مصرف غذا و آب در گروه‌های مختلف بررسی شود، چراکه در توجیه بهبود وضعیت دیابت می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشد.

تقدیر و تشکر

از مدیریت و کادر محترم آزمایشگاه هیستوژنوتک بابت انجام آزمایش‌های این مطالعه، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1] Anderson J, Couper JJ, Mpundu-Kaambwa C, Giles LC, Gent R, Coppin B, et al. An extra 1,000 steps per day relates to improved cardiovascular health in children with type 1 diabetes. Diabetes Care. 2016;39(8):e108–9. https://doi.org/10.2337/dc16-0526

[2] Vazeou A, Papadopoulou A, Miha M, Drakatos A, Georgacopoulos D. Cardiovascular impairment in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes mellitus (T1DM). Eur J Pediatr. 2008;167:877–84. https://doi.org/10.1007/s00431-007-0603-z

[3] Krause MP, Riddell MC, Hawke TJ. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. Pediatr Diabetes. 2011;12(4pt1):345–64. https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2010.00699.x

[4] Mehta MM, Weinberg SE, Chandel NS. Mitochondrial control of immunity: beyond ATP. Nat Rev Immunol. 2017;17(10):608–20. https://www.nature.com/articles/nri.2017.66

[5] Sifuentes-Franco S, Pacheco-Moisés FP, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG. The role of oxidative stress, mitochondrial function, and autophagy in diabetic polyneuropathy. J Diabetes Res. 2017;2017. https://doi.org/10.1155/2017/1673081

[6] Scarpulla RC. Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress. Biochim Biophys Acta (BBA)-Gene Regul Mech. 2012;1819(9–10):1088–97. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.10.011

[7] Ibuki FK, Bergamaschi CT, da Silva Pedrosa M, Nogueira FN. Effect of vitamin C and E on oxidative stress and antioxidant system in the salivary glands of STZ-induced diabetic rats. Arch Oral Biol. 2020;116:104765. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104765

[8] Powers SK, Kavazis AN, McClung JM. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. J Appl Physiol. 2007;102(6):2389–97. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01202.2006

[9] Sala D, Zorzano A. Differential control of muscle mass in type 1 and type 2 diabetes mellitus. Cell Mol life Sci. 2015;72:3803–17. https://doi.org/10.1007/s00018-015-1954-7

[10] Tang L, Li N, Jian W, Kang Y, Yin B, Sun S, et al. Low-intensity pulsed ultrasound prevents muscle atrophy induced by type 1 diabetes in rats. Skelet Muscle. 2017;7:1–10. https://doi.org/10.1186/s13395-017-0145-7

[11] Perry BD, Caldow MK, Brennan-Speranza TC, Sbaraglia M, Jerums G, Garnham A, et al. Muscle atrophy in patients with Type 2 Diabetes Mellitus: roles of inflammatory pathways, physical activity and exercise. Exerc Immunol Rev. 2016;22:94.

[12] Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. Pathophysiology. 2000;7(3):153–63. https://doi.org/10.1016/S0928-4680(00)00053-5

[13] Yu Z, Jia Y, Chen G. Possible involvement of cathepsin B/D and caspase-3 in deferoxamine-related neuroprotection of early brain injury after subarachnoid haemorrhage in rats. Neuropathol Appl Neurobiol. 2014;40(3):270–83. https://doi.org/10.1111/nan.12091

[14] McClung JM, Kavazis AN, DeRuisseau KC, Falk DJ, Deering MA, Lee Y, et al. Caspase-3 regulation of diaphragm myonuclear domain during mechanical ventilation–induced atrophy. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(2):150–9. https://doi.org/10.1164/rccm.200601-142OC

[15] Primeau AJ, Adhihetty PJ, Hood DA. Apoptosis in heart and skeletal muscle. Can J Appl Physiol. 2002;27(4):349–95. https://doi.org/10.1139/h02-020

[16] Pal S, Chaki B, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay A. High-intensity exercise induced oxidative stress and skeletal muscle damage in postpubertal boys and girls: A comparative study. J strength Cond Res. 2018;32(4):1045–52. https://doi: 10.1519/JSC.0000000000002167

[17] Powers SK, Deminice R, Ozdemir M, Yoshihara T, Bomkamp MP, Hyatt H. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe?. Journal of sport and health science. 2020 Sep 1;9(5):415-25. https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.04.001

[18] Margaritelis NV, Theodorou AA, Paschalis V, Veskoukis AS, Dipla K, Zafeiridis A, Panayiotou G, Vrabas IS, Kyparos A, Nikolaidis MG. Adaptations to endurance training depend on exercise-induced oxidative stress: exploiting redox interindividual variability. Acta Physiologica. 2018 Feb;222(2):e12898. https://doi.org/10.1111/apha.12898

[19] Feinberg MJ, Lumia AR, McGinnis MY. The effect of anabolic-androgenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats. Physiol Behav. 1997/07/01. 1997;62(1):23–30. https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00105-4

[20] Møller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. Chem Biol Interact. 1996;102(1):17–36. https://doi.org/10.1016/0009-2797(96)03729-5

[21] Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Exercise in Diabetic Patients. Exp Diabetes Res. 2012;2012:1–16. https://doi.org/10.1155/2012/941868. [In persian]

[22] Ramezani J, Azarbayjani MA, Peeri M. The Aerobic Training and Berberine Chloride Intervention on Pancreatic Tissue Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Type 1 Diabetic Rats. Iran J diabetes Obes. 2020;11(4):257–64. https://doi.org/10.18502/ijdo.v11i4.2882. [In persian]

[23] Chae CH, Jung SL, An SH, Park BY, Wang SW, Cho IH, et al. RETRACTED: Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. Elsevier; 2009. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.075

[24] Pan X-R, Li G-W, Hu Y-H, Wang J-X, Yang W-Y, An Z-X, et al. Effects of Diet and Exercise in Preventing NIDDM in People With Impaired Glucose Tolerance: The Da Qing IGT and Diabetes Study. Diabetes Care. 1997 Apr 1;20(4):537 LP – 544. https://doi.org/10.2337/diacare.20.4.537

[25] Yardley JE, Kenny GP, Perkins BA, Riddell MC, Balaa N, Malcolm J, et al. Resistance Versus Aerobic Exercise: Acute effects on glycemia in type 1 diabetes. Diabetes Care [Internet]. 2013 Mar 1;36(3):537–42. https://doi.org/10.2337/dc12-0963

[26] Coskun O, Ocakci A, Bayraktaroglu T, Kanter M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β-cell damage in rat pancreas. Tohoku J Exp Med. 2004;203(3):145–54. https://doi.org/10.1620/tjem.203.145

[27] Yeung AWK, Orhan IE, Aggarwal BB, Battino M, Belwal T, Bishayee A, et al. Berberine, a popular dietary supplement for human and animal health: Quantitative research literature analysis a review. 2020;

[28] Vuddanda PR, Chakraborty S, Singh S. Berberine: a potential phytochemical with multispectrum therapeutic activities. Expert Opin Investig Drugs. 2010;19(10):1297–307. https://doi.org/10.1517/13543784.2010.517745

[29] Thirumalai T, Therasa SV, Elumalai EK, David E. Intense and exhaustive exercise induce oxidative stress in skeletal muscle. Asian Pacific J Trop Dis. 2011;1(1):63–6. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(11)60016-9

[30] Alghobashy AA, Alkholy UM, Talat MA, Abdalmonem N, Zaki A, Ahmed IA, et al. Trace elements and oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus. Diabetes, Metab Syndr Obes. 2018;11:85–92. https://doi.org/10.2147/DMSO.S157348

[31] Landers-Ramos RQ, Jenkins NT, Spangenburg EE, Hagberg JM, Prior SJ. Circulating angiogenic and inflammatory cytokine responses to acute aerobic exercise in trained and sedentary young men. Eur J Appl Physiol. 2014;114:1377–84. https://doi.org/10.1007/s00421-014-2861-6

[32] Dede ND, Ipekci S, Kebapcilar L, Arslan M, Kurban S, Yildiz M, et al. Effect of aerobic exercise training on serum malondialdehyde level and quality of life in type 2 diabetes. In: Endocrine Abstracts. Bioscientifica; 2018. https://www.endocrine-abstracts.org/ea/0056/ea0056gp100

[33] Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. Antioxid Redox Signal. 2013;18(10):1208–46. https://doi.org/10.1089/ars.2011.4498

[34] Pereira AS, Spagnol AR, Luciano E, de Almeida Leme JAC. Influência do treinamento físico aeróbio nos marcadores séricos de estresse oxidativo em ratos diabéticos. J Phys Educ. 2016;27(1).

[35] Lima TI, Monteiro IC, Valença S, Leal-Cardoso JH, Fortunato RS, Carvalho DP, et al. Effect of exercise training on liver antioxidant enzymes in STZ-diabetic rats. Life Sci [Internet]. 2015;128:64–71. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.01.031

[36] Baynes JW, Thorpe SR. The role of oxidative stress in diabetic complications. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 1996;3(4):277–84.

[37] Xie X, Chang X, Chen L, Huang K, Huang J, Wang S, et al. Berberine ameliorates experimental diabetes-induced renal inflammation and fibronectin by inhibiting the activation of RhoA/ROCK signaling. Mol Cell Endocrinol. 2013;381(1–2):56–65. https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.07.019

[38] Wu D, Wen W, Qi C-L, Zhao R-X, Lü J-H, Zhong C-Y, et al. Ameliorative effect of berberine on renal damage in rats with diabetes induced by high-fat diet and streptozotocin. Phytomedicine. 2012;19(8–9):712–8. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.03.003

[39] Maritim AC, Sanders aRA, Watkins Iii JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol. 2003;17(1):24–38. https://doi.org/10.1002/jbt.10058

[40] Wang Y, Campbell T, Perry B, Beaurepaire C, Qin L. Hypoglycemic and insulin-sensitizing effects of berberine in high-fat diet-and streptozotocin-induced diabetic rats. Metabolism. 2011;60(2):298–305. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.02.005

[41] Chatuphonprasert W, Lao-Ong T, Jarukamjorn K. Improvement of superoxide dismutase and catalase in streptozotocin–nicotinamide-induced type 2-diabetes in mice by berberine and glibenclamide. Pharm Biol. 2014;52(4):419–27. https://doi.org/10.3109/13880209.2013.839714

[42] Zhu X, Guo X, Mao G, Gao Z, Wang H, He Q, et al. Hepatoprotection of Berberine Against Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis by Upregulation of Sirtuin 1. Phyther Res. 2013;27(3):417–21. https://doi.org/10.1002/ptr.4728

[43] van der Horst A, Tertoolen LGJ, de Vries-Smits LMM, Frye RA, Medema RH, Burgering BMT. FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2SIRT1. J Biol Chem. 2004;279(28):28873–9. https://doi.org/10.1074/jbc.M401138200

[44] Wang Q, Zhang M, Liang B, Shirwany N, Zhu Y, Zou M-H. Activation of AMP-activated protein kinase is required for berberine-induced reduction of atherosclerosis in mice: the role of uncoupling protein 2. PLoS One. 2011;6(9):e25436. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025436

[45] Gao Y, Ordas R, Klein JD, Price SR. Regulation of caspase-3 activity by insulin in skeletal muscle cells involves both PI3-kinase and MEK-1/2. J Appl Physiol. 2008;105(6):1772–8. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.90636.2008

[46] Leeuwenburgh C. Role of apoptosis in sarcopenia. Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci. 2003;58(11):M999–1001. https://doi.org/10.1093/gerona/58.11.M999

[47] Phillips T, Leeuwenburgh C. Muscle fiber-specific apoptosis and TNF-α signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. FASEB J. 2005;19(6):1–33. https://doi.org/10.1096/fj.04-2870fje

[48] Payne AM, Dodd SL, Leeuwenburgh C. Life-long calorie restriction in Fischer 344 rats attenuates age-related loss in skeletal muscle-specific force and reduces extracellular space. J Appl Physiol. 2003;95(6):2554–62. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00758.2003

[49] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407(6805):770–6. https://doi.org/10.1038/35037710

[50] Chueh WH, Lin JY. Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits streptozotocin-induced apoptosis in mouse pancreatic islets through down-regulating Bax/Bcl-2 gene expression ratio. Food Chem [Internet]. 2012;132(1):252–60. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.065