

## Research Paper

# The Effect of Eight Weeks of Aerobic Training with Nano-eugenol Supplementation on Pancreatic Tissue UPC3 Gene Expression and MDA Serum Levels in Diabetic Rats

Shirin Fotovat, Khosro Jalali dehkordi \*, Farzaneh Taghian

Department of Sport Physiology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

**Received:** 22 September 2020

**Revised:** 22 October 2020

**Accepted:** 3 December 2020

Use your device to scan and read the article online



### Keywords:

Aerobic Training, Nano Eugenol, UPC3, Malondialdehyde, Diabetes

### Abstract

**Introduction:** The use of exercise and herbal supplements to treat diseases and metabolic disorders has become popular among the people. Regarding the health-enhancing effects of aerobic training and eugenol, the present study aimed to investigate the effect of eight weeks of aerobic training with nano-eugenol supplementation on the gene expression of non-placental protein 3 (UPC3) in pancreatic tissue and serum malondialdehyde (MDA) levels in diabetic rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 20 diabetic rats were divided into four groups of five rats: 1) control, 2) aerobic training, 3) nano-eugenol, and 4) nano-eugenol + training. To investigate the effects of diabetes induction on research variables, five healthy rats were placed in a healthy control group. For eight weeks, groups 3 and 4 received 2 mmol of nano-eugenol by gavage daily, and groups 2 and 4 performed aerobic training at 30 m/s five days a week. Kolmogorov-Smirnov tests, one-way analysis of variance with Tukey *post-hoc* test were used to analyze the data ( $P \leq 0.05$ ).

**Findings:** Induction of diabetes had a significant effect on increasing UPC3 gene expression in pancreatic tissue and MDA serum levels ( $P=0.001$ ). However, aerobic training with nano-eugenol had a significant effect on the reduction of UPC3 gene expression in pancreatic tissue ( $P=0.001$ ) and serum levels ( $P=0.01$ ).

**Conclusion:** It seems that aerobic training along with the use of nano-eugenol has more favorable effects on improving UPC3 gene expression levels and MDA serum levels than the either one alone in diabetes.

**Citation:** Fotovat Sh, Jalali dehkordi Kh, Taghian F. The effect of eight weeks of aerobic training with nano-eugenol supplementation on pancreatic tissue UPC3 gene expression and MDA serum levels in diabetic rats. *Res Sport Sci Med Plants*. 2020; 1 (1): 79- 89.

\*Corresponding author: Khosro Jalali dehkordi

**Address:** Department of Sport Physiology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

**Tell:** 00989131854997

**Email:** khosrojalali@gmail.com

## Extended Abstract

### Introduction

Type 2 diabetes mellitus is a common and growing global health issue. According to the American Diabetes Association, there are about 400 million people with diabetes in the world and it is expected to be increased to more than 600 million people in 2035. In recent years, exercise has been used as a non-pharmacological strategy to control diabetes and its complications. Exercise improves inflammatory diseases such as diabetes by reducing the secretion of inflammatory cytokines and increasing anti-inflammatory cytokines (3). Unpaired protein 3 (UPC3) catalyzes adaptive calorific value in muscle due to the increase of proton transfer from the inner mitochondrial membrane. Numerous studies have shown decreased expression of UPC3 mRNA and UPC3 protein in the skeletal muscle of subjects or as a result of aerobic training (4). Currently, the main effective treatment for diabetes is the use of insulin and synthetic drugs that lower blood glucose; but these compounds have several side effects. Given that medicinal plants have fewer side effects than synthetic drugs, therefore, researchers are looking for herbal compounds to treat or prevent this disease. Eugenol or 4-allyl-2-methoxyphenol is an aromatic molecule that is textured in the oils and in the essential oils of various plants, including cloves and cinnamon (6). Various studies have shown that natural antioxidants with phenolic structure play an important role in protecting body tissues against free radicals. According to the presented evidence, eugenol has an important protective effect against lipid peroxidation originated from free radical (7). Therefore, the present study was done to shed light on the ambiguities in this field due to the increasing prevalence of diabetes and its harmful effects on health and the incidence of its complications as well as the effect of antioxidant supplements and the specific type of physical activity on its control and lack of studies on the interactive effects of aerobic training and the use of nano-eugenol on the expression of UPC3 gene and MDA serum levels in diabetic patient.

### Materials and Methods

In this experimental study, 25 male Wistar rats were purchased and transferred to the laboratory. Subsequently, 20 rats underwent intra- peritoneal injection of streptozotocin

(STZ). After confirming the rats as diabetic, fasting glucose-based diabetic rats were divided into four groups of five series including 1) training, 2) eugenol, 3) training + eugenol and 4) control. To investigate the effects of diabetes induction on research variables, the remaining five rats were placed in a healthy control group. For eight weeks, groups 3 and 4 received 2 mmol nano-eugenol daily by gavage (10) and groups 2 and 4 performed aerobic training at a speed of 30 m/min, five days a week according to Table 1 (11). It is noteworthy that eugenol was purchased specifically from Sigma and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Nanoparticles were prepared according to the protocol with a concentration of 10% (10). Forty-eight hours after the last training session and after 14 hours of fasting, rats were injected intraperitoneally with a mixture of ketamine (10% at a dose of 50 mg/kg) and xylazine (2% at a dose of 10 mg/kg) were anesthetized and pancreatic tissue and serum of all rats were extracted. Then, UPC3 gene expression levels were measured by Real Time PCR method and MDA serum levels were measured by ELISA method using zellbio kits made in Germany. The sequence of primers of the present research is presented in Table 2. Kolmogorov- Smirnov tests, one-way analysis of variance with Tukey *post-hoc* test were used to analyze the data ( $P \leq 0.05$ ).

### Findings

The results of one-way analysis test showed that there was a significant difference in UPC3 ( $P=0.001$ ) and MDA ( $P=0.001$ ) levels of the studied groups. The results of Tukey *post-hoc* test showed that UPC3 in diabetic control ( $P=0.001$ ), training ( $P=0.008$ ), and eugenol ( $P=0.02$ ) groups was significantly higher than healthy control group. UPC3 in the training + eugenol group was significantly lower than the diabetic control group ( $P=0.001$ ) and training group ( $P=0.001$ ). MDA serum levels in diabetic control groups ( $P=0.001$ ), training group ( $P=0.02$ ), and eugenol group ( $P=0.03$ ) were significantly higher than healthy control group. In addition, UPC3 in training + eugenol group was significantly lower than the control group ( $P=0.02$ ).

**Table 1.** The protocol of aerobic training

| Week         | Time (minute) | Speed (m/min) |
|--------------|---------------|---------------|
| First week   | 5             | 8             |
| Second week  | 10            | 10            |
| Third week   | 14            | 10            |
| Fourth week  | 18            | 14            |
| Fifth week   | 22            | 14            |
| Sixth week   | 26            | 17            |
| Seventh week | 30            | 20            |
| Eighth week  | 30            | 20            |

**Table 2.** Sequence of primers of the present research

| Gene Name | Sequence of oligonucleotides 5'-3'  | Access number  |
|-----------|---|----------------|
| UPC3      | F 5' GCAGCCTGTTTTGCTGCTCT 3'<br>R 5'GGTTCTCCCTTGGATGTG3'                      | NM_012675.3    |
| GAPDH     | F 5' CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C3'<br>R 5' AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G 3' | XM_017593963.1 |

## Discussion

The results of the present study showed that induction of diabetes had a significant effect on increasing UPC3 gene expression in pancreatic tissue and MDA serum levels. However, aerobic training had no significant effect on pancreatic UPC3 gene expression levels and MDA serum levels in diabetic rats. The findings of some studies show that UPC3 has significant changes due to the consumption of fatty foods, weight gain, as well as under the influence of training and weight loss. Fallahi *et al.*, examined an eight-week period and an acute phase of high-intensity intermittent training (HIIT) on UCP2 and UCP3 in heart tissue of rats and reported an increase in UCP3 expression following the acute phase. They also reported that UCP2 and UCP3 gene expression decreased after a period of HIIT (14). To sum up what was mentioned above, it seems that response to UCPs expression is not related to the type of training; because HIIT was used in the study of Fallahi *et al.*, but it is probably the intensity of the activity that plays a role in the expression of their genes. The researchers said that adaptation to exercise caused the reduction in the expression of UCPs, though; they showed an increase in UCP3 expression after an acute activity. Anyway, increasing or decreasing UCP3 gene expression has been reported inconsistently in various studies (14) and requires further discussion. The results of the present study also showed

that eight weeks of eugenol use alone did not have a significant effect on pancreatic tissue UPC3 gene expression levels and MDA serum levels in diabetic rats. However, eight weeks of eugenol consumption along with training had a significant effect on reducing gene expression levels of UPC3 in pancreatic tissue and MDA serum levels in diabetic rats. Moreover, consumption of eugenol with training has a more favorable effect on reducing the expression levels of UPC3 gene in pancreatic tissue and MDA serum levels of diabetic rats than the training alone. In this regard, a significant decrease in the MDA index was observed in the research of Aziz Beigi *et al.*, following incremental resistance training (21). Fetors *et al.*, and Carabolt *et al.*, in their studies also reported a significant decrease in MDA due to the training, the results of which are consistent with the present study (22, 23). Lack of control total calorie intake and calorie consumption of rats along with the measurement of metabolic- cellular parameters is one of the limitations of the present study; therefore, it is suggested that the effect of aerobic exercise with different intensities along with taking nano-eugenol supplements with different doses on these variables be investigated in the future studies.

## Conclusion

It seems that aerobic training accompanied by nano-eugenol consumption has more beneficial effects than each of them alone on the improving UPC3 gene expression levels and MDA serum levels in diabetics.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of the Isfahan (Khorasgan) Branch of Islamic Azad University with ethical code: IR.IAU.KHUISF.REC.1398.178.

## Funding

Isfahan (Khorasgan) Branch of Islamic Azad University.

## Authors' contributions

Design and conceptualization: Khosro Jalali Dehkordi and Farzaneh Taghian; Methodology and data analysis: Shirin Fotovat; Supervision and final writing: Khosro Jalali Dehkordi and Farzaneh Taghian.

## Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

## مقاله پژوهشی

## اثر هشت هفته تمرین هوازی همراه با مصرف مکمل نانو اوژنول بر بیان ژنی UPC3 بافت پانکراس و سطوح سرمی MDA در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت

شیرین فتوت، خسرو جلالی دهکردی\*، فرزانه تقیان

گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

## چکیده

**مقدمه و هدف:** استفاده از تمرینات ورزشی و مکمل‌های گیاهی برای درمان بیماری‌ها و اختلالات سوخت و سازی در بین مردم رواج یافته است. با توجه به اثرات بهبود دهنده سلامتی تمرین هوازی و اوژنول، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر هشت هفته تمرین هوازی همراه با مصرف مکمل نانو اوژنول بر بیان ژنی پروتئین غیر جفتی ۳ (UPC3) بافت پانکراس و سطوح سرمی مالون دی آلدئید (MDA) موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت صورت گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تجربی، ۲۰ سر موش صحرایی دیابتی در چهار گروه پنج سری (۱) کنترل، (۲) تمرین هوازی، (۳) نانو اوژنول، و (۴) تمرین + نانو اوژنول تقسیم شدند. جهت بررسی اثرات القای دیابت بر متغیرهای تحقیق، پنج سر موش صحرایی سالم در گروه کنترل سالم قرار گرفتند. در مدت هشت هفته گروه‌ها ۳ و ۴ روزانه ۲ میلی مول نانو اوژنول به صورت گاوآز دریافت کردند و گروه‌های ۲ و ۴ به میزان پنج روز در هفته با سرعت ۳۰ متر بر دقیقه تمرینات هوازی را انجام دادند. جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها، از آزمون‌های کالموگروف-اسمیرنوف، تحلیل واریانس یک راهه همراه با آزمون تعقیبی توکی استفاده شد ( $P \leq 0.05$ ).

**یافته‌ها:** القای دیابت اثر معنی داری بر افزایش بیان ژنی UPC3 بافت پانکراس و سطوح سرمی MDA داشت ( $P=0.001$ ) با این وجود تمرین هوازی همراه با مصرف نانو اوژنول اثر معنی داری بر کاهش بیان ژنی UPC3 بافت پانکراس ( $P=0.001$ ) و سطوح سرمی MDA ( $P=0.001$ ) داشت.

**بحث و نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرین هوازی همراه با مصرف نانو اوژنول نسبت به هر کدام به تنهایی اثرات مطلوب‌تری بر بهبود سطوح بیان ژنی UPC3 و سطوح سرمی MDA در وضعیت ابتلا به دیابت دارد.

تاریخ دریافت: ۱ مهر ۱۳۹۹

تاریخ داوری: ۱ آبان ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: ۱۳ آذر ۱۳۹۹

از دستگاه خود برای اسکن و خواندن مقاله به صورت آنلاین استفاده کنید



## واژه‌های کلیدی:

تمرین هوازی، دیابت،

مالون دی آلدئید، نانو اوژنول، UPC3

## مقدمه

در ایران نیز بیش از ۱۰ درصد جمعیت بالغ را دیابتی‌ها تشکیل می‌دهند که نیمی از آنها از دیابت خود بی‌اطلاع هستند. دیابت هر ساله سبب مرگ بیش از پنج میلیون نفر می‌شود و هزینه درمان دیابت و عوارض آن بیش از ۵۵۰ میلیارد دلار در سال است (۱).

دیابت نوع ۲ به عنوان یک مسئله بهداشت جهانی شایع بوده و رو به افزایش می‌باشد. بر اساس آمار انجمن دیابت آمریکا، در جهان حدود ۴۰۰ میلیون نفر به دیابت مبتلا هستند که پیش بینی می‌شود این رقم در سال ۲۰۳۵ به بیش از ۶۰۰ میلیون نفر افزایش یابد.

\* نویسنده مسئول: خسرو جلالی دهکردی

نشانی: گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تلفن: ۰۹۱۳۱۸۵۴۹۹۷

پست الکترونیکی: khosrojalali@gmail.com

زمینه ساز این تاثیرات نامشخص بوده و نیازمند تحقیقات بیشتری است. با توجه به شیوع روزافزون دیابت و اثرات مضر آن بر سلامتی و بروز عوارض ناشی از آن و همچنین تاثیر مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی و نوع خاص فعالیت بدنی بر کنترل آن و کمبود مطالعات در رابطه با اثرات تعاملی تمرین هوازی و مصرف مکمل نانو اوژنول بر بیان ژنی UPC3 و سطوح سرمی MDA در وضعیت ابتلا به دیابت، مطالعه حاضر با هدف پاسخ به ابهامات در این زمینه صورت گرفت.

### مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی و از نوع بنیادی، ۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰۰ الی ۲۵۰ گرم خریداری و به محیط آزمایشگاه انتقال داده شد. در ادامه ۲۰ سر موش صحرایی تحت تزریق داخل صفاقی استروپتوزوتوسین<sup>۳</sup> (STZ) قرار گرفتند و پس از تایید دیابتی شدن موش‌های صحرایی، موش‌های صحرایی دیابتی بر اساس گلوکز ناشتا در چهار گروه پنج سری شامل (۱) تمرین، (۲) اوژنول، (۳) تمرین + اوژنول و (۴) کنترل قرار گرفتند. جهت بررسی اثرات القای دیابت بر متغیرهای تحقیق، پنج سر موش صحرایی باقیمانده در گروه کنترل سالم قرار گرفتند. در کل دوره تحقیق حیوانات در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد، چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی و با دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس‌های پلی اتیلنی شش تایی نگهداری شدند. پروتکل‌های آزمایشی مطالعه حاضر توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان با کد اخلاق IR.IAU.KHUISF.REC.1398.141 تایید شد.

### نحوه دیابتی کردن موش‌های صحرایی

از داروی STZ برای دیابتی کردن حیوانات استفاده شد؛ بدین صورت که موش‌های صحرایی با  $60 \text{ mg/kg}$  سم STZ دیابتی شدند. در ادامه گلوکز ناشتای حیوانات پس از یک هفته اندازه‌گیری شد و موش‌های صحرایی دارای گلوکز ناشتای بیشتر از ۲۵۰ تا ۳۰۰ میلی-گرم در دسی لیتر دیابتی در نظر گرفته شد (۹).

### تهیه نانو اوژنول

ماده اوژنول به صورت خاص شده از شرکت سیگما خریداری گردید و در دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد. نانو ذره طبق پروتکل با غلظت ۱۰ درصد تهیه شد. به طور خلاصه روغن اوژنول و توئین ۲۰ (سورفاکتانت غیر یونی) آهسته و در شرایطی که به آرامی روی همزن هم زده می‌شدند، با هم مخلوط شدند؛ تا جاییکه همگن شدند. سپس آب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطره قطره به مخلوط اضافه شد. این مخلوط تحت اولتراسوند به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از تهیه مکمل به صورت نانو میزان، ۲ میلی لیتر روزانه در ساعات یکسان و مشابه با پروتکل تمرین ورزشی (پنج روز در هفته به مدت

بیماری دیابت ۱ نوع اختلال سوخت و سازی است که منجر به نقص در ترشح انسولین، عمل آن و یا هر دو شده و نتیجه آن هیپرگلیسمی همراه با اختلال در سوخت و ساز کربوهیدرات، چربی و پروتئین می‌باشد. عواقب طولانی مدت دیابت شامل رتینوپاتی، نفروپاتی، نوروپاتی و افزایش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شود (۲). در سال‌های اخیر از تمرینات ورزشی بعنوان یک استراتژی غیردارویی برای کنترل دیابت و عوارض ناشی از آن استفاده شده است. فعالیت ورزشی با کاهش ترشح سیتوکین‌های التهابی و افزایش سیتوکین‌های ضدالتهابی شده و در بهبود بیماری‌های التهابی مانند دیابت نقش دارد (۳). پروتئین غیر جفتی ۳ (UPC3) به واسطه‌ی افزایش انتقال پروتون از غشای داخلی میتوکندری، گرم‌زایی سازشی را در عضله کاتالیزور می‌کند. نشست پروتون‌ها از راه UPC3، اکسیداسیون سوبسترا را از فسفوریلاسیون ADP به ATP جدا کرده و منجر به مصرف سریع اکسیژن و تولید گرما می‌شود؛ بنابراین شرایطی که در آن تغییرات سوخت و سازی رخ دهد، می‌تواند منجر به پاسخ بیان mRNA و پروتئین UPC3 شود. به علاوه افزایش پروتئین UPC3 سبب افزایش در اکسیداسیون چربی می‌شود که در ارتباط با کاهش وزن و چربی بدن مورد توجه است. پژوهش‌های متعددی کاهش بیان mRNA UPC3 و پروتئین UPC3 را در عضله اسکلتی آزمودنی‌های تمرین کرده و یا در اثر تمرین‌های هوازی نشان داده‌اند (۴). محبی و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی تاثیر چاقی و کاهش وزن ناشی از تمرین‌های استقامتی بر بیان mRNA UCP3 در موش‌های نژاد C57BL/6 پرداختند. نتایج نشان داد زمانی که انرژی دریافتی افزایش یافته و در پی آن وزن بدن افزایش می‌یابد، UPC3 نیز افزایش می‌یابد تا اکسیداسیون اسیدهای چرب را افزایش دهد؛ اما در مقابل با کاهش وزن ناشی از فعالیت ورزشی مقادیر UCP3 نیز کاهش می‌یابد تا این روند مقابله کند (۵). در حال حاضر درمان اصلی و موثر دیابت، استفاده از انسولین و داروهای سنتتیک کاهنده گلوکز خون است؛ اما این ترکیب‌ها دارای عوارض جانبی متعددی هستند. با توجه به این مطلب که گیاهان دارویی نسبت به داروهای سنتتیک اثرات جانبی کمتری دارند؛ بنابراین پژوهشگران بدنبال یافتن ترکیب‌های گیاهی برای درمان و یا پیشگیری از این بیماری هستند. اوژنول یا 4-allyl-2-methoxyphenol مولکولی آروماتیک است که در روغن‌ها و اسانس گیاهان مختلف از جمله میخک و دارچین یافت می‌شود (۶). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی دارای ساختار فنولی، نقش مهمی در حفاظت بافت‌های بدن بر علیه رادیکال‌های آزاد دارند. بر اساس مدارک ارائه شده، اوژنول اثر محافظت‌کنندگی مهمی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از رادیکال آزاد دارد. در همین ارتباط ناگابابو و همکارانش<sup>۲</sup> گزارش کرده‌اند که اثرات آنتی‌اکسیدانی اوژنول پنج برابر قوی‌تر از ویتامین E بوده و استفاده از آن موجب مهار پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۷ و ۸). با این حال مکانیسم‌های

1 Uncoupling protein

2 Nagababu et al.,

3 Streptozotocin

های zellbio ساخت کشور آلمان استفاده شد. توالی پرایمرهای تحقیق حاضر در جدول ۲ ارائه شده است.

### تجزیه و تحلیل یافته‌ها

از میانگین و انحراف استاندارد برای گزارش توصیفی داده‌ها استفاده شد. پس از تأیید طبیعی بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک، به منظور تعیین معنی‌دار بودن تفاوت میانگین متغیرهای گروه‌های تحقیق، از آزمون‌های آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. اطلاعات مورد نیاز پس از جمع‌آوری، به وسیله نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ تجزیه و تحلیل شد ( $P \leq 0.05$ ).

### یافته‌ها

میانگین متغیرهای UPC3 و MDA در شکل ۱ و ۲ ارائه شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطوح UPC3 ( $P=0.001$ ) و MDA ( $P=0.001$ ) در گروه‌های مورد مطالعه وجود داشت. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد UPC3 در گروه کنترل دیابتی ( $P=0.001$ )، تمرین ( $P=0.008$ )، اوژنول ( $P=0.02$ ) به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل سالم بود؛ در UPC3 در گروه تمرین + اوژنول به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه کنترل دیابتی ( $P=0.001$ ) و تمرین ( $P=0.001$ ) بود (شکل ۱). سطوح سرمی MDA در گروه‌های کنترل دیابتی ( $P=0.001$ )، تمرین ( $P=0.02$ )، اوژنول ( $P=0.03$ ) به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل سالم بود همچنین در گروه تمرین + اوژنول به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه کنترل بود ( $P=0.02$ ) (شکل ۲).

هشت هفته) به گروه‌های اوژنول و تمرین + اوژنول به صورت گاوآژه خورنده شد (۱۰).

### برنامه تمرینی استقامتی

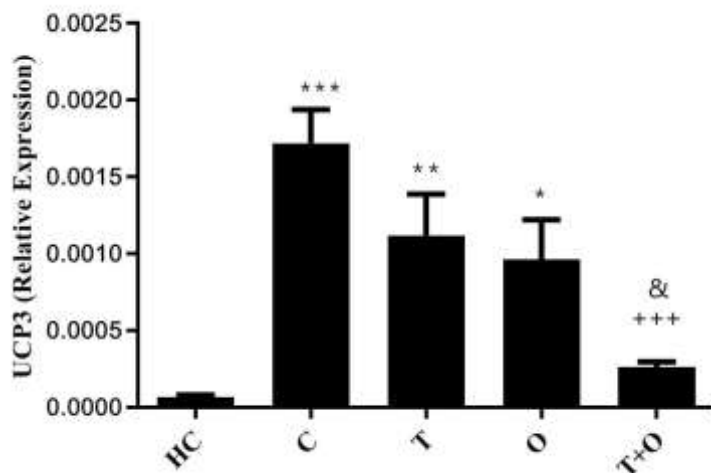
موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین و تمرین + اوژنول به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته تمرینات استقامتی را انجام دادند به طوری که به تدریج و طبق زمانبندی (به شرح جدول ۱) بر سرعت و مدت زمان تمرین اضافه شد. سایر گروه‌ها در مدت اجرای پروتکل در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. لازم به ذکر است در طول برنامه تمرینی از هیچگونه شوک تمرینی استفاده نشد و در صورت لزوم از با ایجاد محرک صوتی روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات مجبور به ادامه تمرین می‌شدند (۱۱).

### نمونه‌گیری بافتی و سرمی

چهل و هشت ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و پس از ۱۴ ساعت ناشتایی، موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین (۱۰ درصد و با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۲ درصد و با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. پس از جراحی، بخشی از بافت پانکراس تحت شرایط استریل خارج شد و پس از پاکسازی از بافت چربی همبند بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفته و تا انجام آزمایشات سلولی مولکولی در ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌گیری تمام گروه‌ها در یک روز انجام شد. برای بررسی بیان ژنی UPC3 نیز، بررسی بافت‌ها با تکنیک Real Time PCR صورت گرفت. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cdNA تبدیل گردید. سپس cdNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری MDA به روش الایزا و با استفاده از کیت-

جدول ۱. پروتکل تمرین هوایی

| زمان (دقیقه) | سرعت (m/min) | ایام هفته    |
|--------------|--------------|--------------|
| ۵            | ۸            | هفته‌ی اول   |
| ۱۰           | ۱۰           | هفته‌ی دوم   |
| ۱۴           | ۱۰           | هفته‌ی سوم   |
| ۱۸           | ۱۴           | هفته‌ی چهارم |
| ۲۲           | ۱۴           | هفته‌ی پنجم  |
| ۲۶           | ۱۷           | هفته‌ی ششم   |
| ۳۰           | ۲۰           | هفته‌ی هفتم  |
| ۳۰           | ۲۰           | هفته‌ی هشتم  |

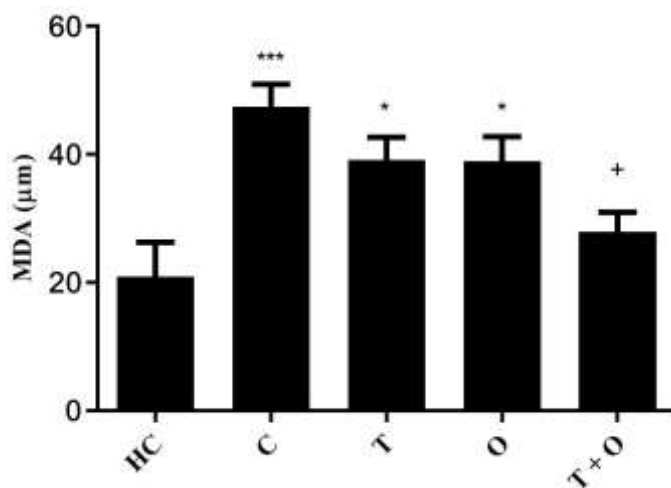


HC به نسبت به گروه HC  $P \leq 0.001$  \*\*\*,  $P \leq 0.01$  \*\*,  $P \leq 0.05$  \* افزایش معنی دار نسبت به گروه HC

C به نسبت به گروه C  $P \leq 0.001$  +++ کاهش معنی دار نسبت به گروه C

T به نسبت به گروه T  $P \leq 0.05$  & کاهش معنی دار نسبت به گروه T

شکل ۱. سطوح بیان ژنی UPC3 در گروه‌های مختلف پژوهش. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند.



HC به نسبت به گروه HC  $P \leq 0.001$  \*\*\*,  $P \leq 0.01$  \*\*,  $P \leq 0.05$  \* افزایش معنی دار نسبت به گروه HC

C به نسبت به گروه C  $P \leq 0.001$  +++ کاهش معنی دار نسبت به گروه C

شکل ۲. سطوح سرمی MDA در گروه‌های مختلف پژوهش. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند.

جدول ۲. توالی پرایمرهای تحقیق حاضر

| نام ژن | توالی الیگو نوکلئوتیدها 5'-3'   | شماره دستیابی  |
|--------|---|----------------|
| UPC3   | F 5' GCAGCCTGTTTGTCTGCTCT 3'<br>R 5'GGTTCTCCCCTTGGATGTG3'                     | NM_012675.3    |
| GAPDH  | F 5' CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C3'<br>R 5' AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G 3' | XM_017593963.1 |

## بحث و بررسی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد القای دیابت اثر معنی داری بر افزایش بیان ژنی UCP3 بافت پانکراس و سطوح سرمی MDA داشت با این وجود تمرین هوازی اثر معنی داری بر سطوح بیان ژنی UCP3 بافت پانکراس و سطوح سرمی MDA در موش‌های صحرایی دیابتی نداشت. یافته‌های برخی مطالعات نشان می‌دهد که UCP3 در اثر مصرف غذای چرب، افزایش وزن و همچنین تحت تاثیر تمرین‌های ورزشی و کاهش وزن تغییرات مهم و قابل توجهی دارد. UCP3 در انسان و موش‌ها به ترتیب روی کروموزوم ۱۱ و ۷ قرار دارد و در مطالعات پیشین نیز نشان داده شده این ناحیه با میزان سوخت و ساز پایه ارتباط دارد. بسیاری از بررسی‌ها، ارتباط پلی مورفیسم‌هایی در ژن UCP3 را با تغییرات ترکیب بدن و انرژی مصرفی نشان داده‌اند (۱۲) و بیان UCP3 ارتباط مثبتی با انرژی مصرفی هنگام خواب دارد، همچنین و ارتباط منفی با تغییرات شاخص توده بدن دارد (۱۳). فلاحی و همکاران به بررسی یک دوره هشت هفته‌ای و یک مرحله حاد تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) روی UCP2 و UCP3 قلب موش‌های صحرایی پرداختند و افزایش بیان UCP3 را به دنبال مرحله حاد گزارش کردند. هم چنین گزارش کردند که بیان ژن UCP2 و UCP3 پس از یک دوره HIIT کاهش یافته است (۱۴). در یک جمع بندی از مطالب بالا به نظر می‌رسد پاسخ بیان UCPS ها مربوط به نوع فعالیت ورزشی نمی‌شود؛ چرا که در مطالعه فلاحی و همکاران از HIIT استفاده شده بود، بلکه احتمالاً شدت فعالیت است که بر بیان ژن آن‌ها نقش دارد. این محققین اظهار داشتند سازگاری با تمرین باعث کاهش بیان UCPS شده است، چنانچه افزایش بیان UCP3 را پس از فعالیت حاد نشان دادند. در هر حال افزایش یا کاهش بیان ژن UCP3 در تحقیقات مختلف به صورت متناقض ذکر شده است (۱۴) و نیازمند بحث و بررسی بیشتر در این زمینه است. در برخی تحقیقات نتایج نشان داد که موش‌هایی که افزایش بیان ژن UCP3 را به صورت غیر طبیعی داشتند، پرخوری می‌کردند، اما نسبت به گروه کنترل، افزایش وزن کمتری را داشتند. بر این اساس، افزایش بیان ژن UCP3 در سطوحی بیش از حد فیزیولوژیک (۶۶ برابر افزایش) سبب کاهش وزن و چربی بدن در مقایسه با موش‌های کنترل شد. این یافته‌ها در پژوهش هورواث و همکاران<sup>۲</sup> (۱۵) نیز مشاهده شد که افزایش بیان ژن UCP3 را در حد فیزیولوژیک (چهار برابر افزایش) در موش‌های دیابتی ایجاد کرده بودند. در مقابل، پژوهش‌های دیگری نیز نشان داده‌اند تفاوتی در بیان ژن UCP3 بین افراد دیابتی و طبیعی وجود ندارد (۱۵). با این حال، یافته‌های پژوهش حاضر به همراه یافته‌های پژوهش‌های یاد شده، همگی نشان دهنده ارتباط بین UCP3 و دیابت هستند. اگرچه در ظاهر یافته‌های غیرهمسو نیز دیده می‌شوند، اما باید عنوان نمود پژوهش‌های پیشین با دستکاری UCP3 به بررسی تغییرات فیزیولوژی و سوخت و سازی بدن در پی آن پرداخته‌اند، در حالی که

در مقابل، در پژوهش حاضر، با ایجاد مدل دیابتی، تغییرات ژن UCP3 بررسی گردید. به نظر می‌رسد این دو علت و معلول یکدیگر باشند؛ بنابراین، افزایش بیان UCP3 در پی افزایش وزن، سازوکاری است که بدن برای مقابله با تغییرات وزن به کار می‌گیرد تا از افزایش بیش از حد وزن در اثر مصرف غذا و افزایش انرژی دریافتی پیشگیری نماید (۱۶). این موضوع نیز در پژوهش حاضر مشاهده شد که میزان بیان UCP3 در گروه تمرین به نسبت کمتر از گروه کنترل دیابتی بود. بر اساس برخی پژوهش‌های قبلی، اگرچه بیان UCP3 پس از فعالیت ورزشی حاد افزایش می‌یابد، اما پژوهش‌های متعدد، کاهش بیان UCP3 را در عضله اسکلتی آزمودنی‌های تمرین کرده نشان داده‌اند، که همسو با نتایج تحقیق حاضر بود. محبی و همکاران به بررسی اثر چاقی و کاهش وزن ناشی از تمرین‌های استقامتی بر بیان mRNA UCP3 در موش‌های چاق نژاد C57Bl/6 پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد زمانی که انرژی دریافتی افزایش یافته و در پی آن وزن بدن افزایش می‌یابد؛ UCP3 نیز افزایش می‌یابد تا گرمزایی و همچنین اکسیداسیون اسیدهای چرب را افزایش دهد؛ اما در مقابل با کاهش وزن ناشی از فعالیت ورزشی، مقادیر UCP3 نیز کاهش می‌یابد تا با این روند مقابله کند (۱۷). پژوهشگران ادعان نمودند که در وضعیت تمرین کرده، نیازی برای کارایی متابولیکی بالا با کاهش بیان mRNA پروتئین‌های UCP در عضلات اسکلتی همراه است که هدر رفت انرژی را کاهش خواهد داد (۱۷). در پژوهش دیگری نیز گزارش شده مردان تمرین کرده‌ی استقامتی، کاهش معنی‌دار سطح UCP3 را در عضلات چهار سر ران در مقایسه با مردان تمرین نکرده داشتند. پایین بودن محتوای UCP3 پس از تمرین‌ها بیانگر این است که سازگاری‌ای وجود دارد که با افزایش ناشی از تمرین‌های استقامتی در کارایی تولید ATP هوازی همخوانی دارد. از سوی دیگر، نقش اسیدهای چرب آزاد پلازما نیز در تنظیم ژن UCP3 مهم شمرده شده است (۱۸). بر این اساس، به منظور متمایز کردن اثر فعالیت ورزشی از اثر افزایش اسیدهای چرب ناشی از فعالیت ورزشی، بیان ژن UCP3 قبل و چهار ساعت پس از یک فعالیت ورزشی دو ساعته ارزیابی شد، که نشان داد تغییرات UCP3 پس از فعالیت ورزشی، ناشی از تغییرات سطح اسیدهای چرب پلازما است. علاوه بر این، در پژوهش‌های غیر مرتبط با تمرین‌های ورزشی نیز این موضوع اثبات شده است (۱۹). مشاهده شده روزه داری و مصرف غذای پرچرب در جوندگان سبب تنظیم مثبت بیان UCP3 می‌شود. این دو وضعیت، آثار متضادی بر انرژی مصرفی دارند، اما هر دو موجب افزایش غلظت FFA پلازما و افزایش میزان اکسیداسیون چربی می‌شوند. تنظیم مثبت بیان UCP3 در موش‌های ob / ob و db / db نیز مشاهده شده است. به طور مشابه، در عضله اسکلتی انسان نیز، تنظیم مثبت بیان UCP3 در بیماران دیابتی نوع ۲ یا چاق و در حین روزه داری گزارش شده که ویژگی مشترک این شرایط، بالا بودن FFA پلازما است. در واقع، اسیدهای چرب به طور مستقیم یا غیرمستقیم باعث افزایش بیان ژن UCP3 می‌گردد، زیرا تزریق چربی و مهار اکسیداسیون اسیدهای چرب توسط اتوموکسیر (که منجر به تجمع

1 High Intensity Interval Training

2 Horvath et al.,



کاهش التهاب، کاهش UPC3 و MDA می‌گردد. عدم کنترل میزان کالری دریافتی و مصرفی موش‌های صحرایی به همراه اندازه‌گیری شاخص‌های متابولیکی - سلولی از محدودیت‌های پژوهش حاضر است؛ از این رو پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی به بررسی اثر تمرینات هوازی با شدت‌های مختلف همراه با مصرف مکمل نانو اوژنول با دوزهای مختلف بر متغیرهای مذکور پرداخته شود.

### نتیجه گیری

به نظر می‌رسد تمرین هوازی همراه با مصرف نانو اوژنول نسبت به هر کدام به تنهایی اثرات مطلوب‌تری بر بهبود سطوح بیان ژنی UPC3 و سطوح سرمی MDA در وضعیت ابتلا به دیابت دارد.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

مطالعه حاضر در کمیته اخلاق در پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) با کد اخلاق IR.IAU.KHUISF.REC.1398.178 مصوب شده است.

### حامی مالی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان).

### مشارکت نویسندگان

طراحی و ایده پردازی: خسرو جلالی دهکردی و فرزانه تقیان؛ روش‌شناسی و تحلیل داده‌ها: شیرین فتوت؛ نظارت و نگارش نهایی: خسرو جلالی دهکردی و فرزانه تقیان.

### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان مقاله حاضر فاقد هرگونه تعارض منافع بوده است.

سیتوزولی اسیدهای چرب می‌شود" سبب افزایش بیان ژن UPC3 در جوندگان می‌گردد (۲۰). در مطالعه‌ای دیگر نتایج نشان می‌دهد UPC3 نقشی بالقوه را به عنوان تسهیل‌کننده اکسیداسیون چربی دارد. در همین راستا، موش‌هایی که به طور غیر طبیعی افزایش بیان ژن UPC3 را داشتند، در پاسخ به مصرف غذای پرچرب، افزایش اکسیژن مصرفی، افزایش وزن کمتر، کاهش در تجمع چربی‌های درون سلولی و همچنین، محافظت در مقابل مقاومت انسولینی ناشی از چربی را در مقایسه با موش‌های طبیعی گروه کنترل نشان دادند (۱۷). نتایج تحقیق حاضر نشان داد هشت هفته مصرف اوژنول به تنهایی اثر معنی‌داری بر سطوح بیان ژنی UPC3 بافت پانکراس و سطوح سرمی MDA موش‌های صحرایی دیابتی ندارد با این وجود هشت هفته مصرف اوژنول همراه با تمرین اثر معنی‌داری بر کاهش سطوح بیان ژنی UPC3 بافت پانکراس و سطوح سرمی MDA موش‌های صحرایی دیابتی دارد. همچنین مصرف اوژنول همراه با تمرین نسبت به تمرین به تنهایی اثر مطلوب‌تری بر کاهش سطوح بیان ژنی UPC3 بافت پانکراس و سطوح سرمی MDA موش‌های صحرایی دیابتی دارد. در همین راستا در تحقیق عزیز بیگی و همکاران نیز به دنبال تمرینات مقاومتی فزاینده، کاهش معنی‌دار در شاخص MDA مشاهده شد (۲۱). همچنین فتورز و همکاران<sup>۱</sup> و کارابولت و همکاران<sup>۲</sup> نیز در مطالعات خود کاهش معنی‌دار MDA را در اثر تمرینات ورزشی گزارش کرده‌اند که نتایج تحقیقات آنها با تحقیق حاضر همسو است (۲۲ و ۲۳). از بین گونه‌های واکنشی اکسیژن گروه رادیکال هیدروکسیل موجب پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود که از محصولات آن می‌توان MDA را نام برد و به عنوان شاخص فشار اکسایشی در نظر گرفت. به نظر می‌رسد کاهش MDA ناشی از دفاع ضد اکسایشی در اجرای فعالیت‌های منظم باشد. اجرای تمرینات منظم هوازی منجر به افزایش دفاع ضد اکسایشی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و پروتئنی می‌شود (۲۴). در واقع تقویت دفاع ضد اکسایشی شیب خنثی شدن بیشتر رادیکال‌های آزاد می‌شود. تمرین منظم توانایی سیستم‌های ضد اکسایشی بدن را افزایش می‌دهد و بدن را در مقابل خاصیت تخریب‌کنندگی فشار اکسایشی که در اثر ورزش افزایش می‌یابد، محافظت می‌کند. اوژنول از دیرباز در بسیاری از کشورها از جمله ایران مصارف درمانی یا غذایی فراوانی داشته است؛ از جمله ترکیبات فنلی موجود در گیاهان، می‌توان به اوژنول اشاره کرد. اوژنول مایعی بیرنگ، روغنی یا زرد روشن می‌باشد که تا به امروز تحقیقات بسیاری در زمینه اثرات ضد سرطانی این ماده روی انواع مختلف سرطان‌ها انجام شده است (۲۵). میزان بالای اوژنول در میخک اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی قوی را باعث می‌شود؛ به طوریکه قادر است پروتئین‌ها را دناتوره کرده و با فسفولیپیدهای غشای سلولی واکنش دهد و نفوذپذیری آنها را تغییر داده و سبب به دام انداختن رادیکال‌های آزاد شود (۲۶). احتمالاً اوژنول با ترکیبات فنولی خود باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی،

1 Fatouros et al.,

2 Karabulut et al.,

## References

- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes Care*. 2012; 35 Suppl 1 (Suppl 1): S11-63. [DOI:10.2337/dc12-s011] [PMID:22187469] [PMCID:PMC3632172]
- Azimi-Nezhad M, Ghayour-Mobarhan M, Parizadeh MR, Safarian M, Esmaeili H, Parizadeh SM, et al. Prevalence of type 2 diabetes mellitus in Iran and its relationship with gender, urbanisation, education, marital status and occupation. *Singapore Med J*. 2008; 49 (7): 571- 6. [PMID:18695867]
- Hosseini SA, Hamzavi K, Safarzadeh H, Salehi O. Interactive effect of swimming training and fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract on glycemic indices and lipid profile in diabetic rats. *Arch Physiol Biochem*. 2020; 5: 1-5. [DOI:10.1080/13813455.2020.1826529] [PMID:33017260]
- Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J*. 2000; 345 Pt 2 (Pt 2): 161- 79. [PMID:10620491] [PMCID:PMC1220743]
- Nabben M, Hoeks J, Moonen-Kornips E, van Beurden D, Briedé JJ, Hesselink MK, et al. Significance of uncoupling protein 3 in mitochondrial function upon mid- and long-term dietary high-fat exposure. *FEBS Lett*. 2011; 585 (24): 4010- 7. [DOI:10.1016/j.febslet.2011.11.012] [PMID:22115550]
- Liang WZ, Chou CT, Hsu SS, Liao WC, Shieh P, Kuo DH, et al. The involvement of mitochondrial apoptotic pathway in eugenol-induced cell death in human glioblastoma cells. *Toxicol Lett*. 2015; 232 (1): 122- 32. [DOI:10.1016/j.toxlet.2014.10.023] [PMID:25455450]
- Nagababu E, Rifkind JM, Boindala S, Nakka L. Assessment of antioxidant activity of eugenol in vitro and in vivo. *Methods Mol Biol*. 2010; 610: 165- 80. [DOI:10.1007/978-1-60327-029-8\_10] [PMID:20013178] [PMCID:PMC3202335]
- Kong X, Liu X, Li J, Yang Y. Advances in pharmacological research of eugenol. *Curr Opin Comp Alternat Med*. 2014; 1: 8- 11. [DOI:10.1016/j.scienta.2014.03.004]
- Furman BL. Streptozotocin- induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015; 70: 5.47.1- 5.47.20. [DOI:10.1002/0471141755.ph0547s70] [PMID:26331889]
- Abd-Elsalam KA, Khokhlov AR. Eugenol oil nanoemulsion: antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and phytotoxicity on cottonseeds. *Appl Nanosci*. 2015; 5 (2): 255- 65. [DOI:10.1007/s13204-014-0398-y]
- Li S, Liang M, Gao D, Su Q, Laher I. Changes in titin and collagen modulate effects of aerobic and resistance exercise on diabetic cardiac function. *J Cardiovasc Transl Res*. 2019; 12 (5): 404- 414. [DOI:10.1007/s12265-019-09875-4] [PMID:30820865]
- Hallsall DJ, Luan J, Saker P, Huxtable S, Farooqi IS, Keogh J, et al. Uncoupling protein 3 genetic variants in human obesity: the c-55t promoter polymorphism is negatively correlated with body mass index in a UK Caucasian population. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001; 25 (4): 472- 7. [DOI:10.1038/sj.ijo.0801584] [PMID:11319649]
- Harper ME, Dent R, Monemdjou S, Bézaire V, Van Wyck L, Wells G, et al. Decreased mitochondrial proton leak and reduced expression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle of obese diet-resistant women. *Diabetes*. 2002; 51 (8): 2459- 66. [DOI:10.2337/diabetes.51.8.2459] [PMID:12145158]
- Fallahi AA, Shekarfroush S, Rahimi M, Jalali A, Khoshbaten A. Alteration in cardiac uncoupling proteins and eNOS gene expression following high-intensity interval training in favor of increasing mechanical efficiency. *Iran J Basic Med Sci*. 2016; 19 (3): 258- 64. [PMID:27114795] [PMCID:PMC4834115]
- Horvath TL, Diano S, Miyamoto S, Barry S, Gatti S, Alberati D, et al. Uncoupling proteins-2 and 3 influence obesity and



- inflammation in transgenic mice. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003; 27 (4): 433- 42. [DOI:10.1038/sj.ijo.0802257] [PMID:12664076]
16. Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, et al. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature*. 2000; 406 (6794): 415- 8. [DOI:10.1038/35019082] [PMID:10935638]
  17. Mohebi H, Rohani H, Hasanjia S, Pirpznia N. The effect of obesity and weight loss due to endurance training on expression C57BL/UCP3 mRNA in mice. *Iranian J Endocrin Metab*. 2012; 15 (3): 311- 321. <http://ijem.sbmu.ac.ir/article-1-1502-en.html>
  18. Bo H, Jiang N, Ma G, Qu J, Zhang G, Cao D, et al. Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44 (7): 1373- 81. [DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.033] [PMID:18226608]
  19. Son C, Hosoda K, Ishihara K, Bevilacqua L, Masuzaki H, Fushiki T, et al. Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle. *Diabetologia*. 2004; 47 (1): 47- 54. [DOI:10.1007/s00125-003-1272-8] [PMID:14673524]
  20. Tiraby C, Tavernier G, Capel F, Mairal A, Crampes F, Rami J, et al. Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia*. 2007; 50 (10): 2190- 9. [DOI:10.1007/s00125-007-0765-2] [PMID:17676309]
  21. Azizbeigi K, Azarbayjani MA, Peeri M, Agha-alinejad H, Stannard S. The effect of progressive resistance training on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in erythrocytes in untrained men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2013; 23 (3): 230- 8. [DOI:10.1123/ijsnem.23.3.230] [PMID:23239675]
  22. Fatouros IG, Jamurtas AZ, Villiotou V, Pouliopoulou S, Fotinakis P, Taxildaris K, et al. Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Med Sci Sports Exerc*. 2004; 36 (12): 2065- 72. [DOI:10.1249/01.mss.0000147632.17450.ff] [PMID:15570141]
  23. Karabulut AB, Kafkas ME, Kafkas AS, Onal Y, Kiran TR. The effect of regular exercise and massage on oxidant and antioxidant parameters. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2013; 57 (4): 378- 83. [PMID:24968576]
  24. Bouzid MA, Hammouda O, Matran R, Robin S, Fabre C. Low intensity aerobic exercise and oxidative stress markers in older adults. *J Aging Phys Act*. 2014; 22 (4): 536- 42. [DOI:10.1123/japa.2013-0037] [PMID:24226272]
  25. Cao W, Qiu J, Cai T, Yi L, Benardot D, Zou M. Effect of D-ribose supplementation on delayed onset muscle soreness induced by plyometric exercise in college students. *J Int Soc Sports Nutr*. 2020; 17 (1): 42. [DOI:10.1186/s12970-020-00371-8] [PMID:32778175] [PMCID:PMC7418385]
  26. Souissi W, Bouzid MA, Farjallah MA, Ben Mahmoud L, Boudaya M, Engel FA, et al. Effect of different running exercise modalities on post- exercise oxidative stress markers in trained athletes. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17 (10): 3729. [DOI:10.3390/ijerph17103729] [PMID:32466187] [PMCID:PMC7277356]