University of Birjand

Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport Research Paper

Spring 2022, 10(21), 8-18

Received: Aug 20, 2020 Accepted: Dec 24, 2020

Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport

The effects of high and moderate intensity interval training on skeletal muscle of TFAM and NRF1 in type 2 diabetic male rats

Elma Tabari[1], Hamid Mohebbi[2*]

1. PhD Student of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran.

2. Full Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Guilan, Guilan, Iran.

Abstract

Background and Aim: It is well recognized that mitochondrial transcription factor A (TFAM) and nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) are the key regulators of mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation. This study investigated whether 12 weeks of interval training with high (HIIT) and moderate (MIIT) intensity influences the key regulatory molecules of mitochondrial biogenesis (TFAM and NRF-1) of skeletal muscle in type 2 diabetic male rats. **Materials and Methods**: Forty male rats (age: 8 weeks, weight: 180±20 g) were divided into two groups: high fat diet (HFD) including 32 rats, and standard diet (C) including 8 rats. After inducing type 2 diabetes via Streptozotocin, 8 diabetic rats (D) and 8 rats in group C were sacrificed and the remaining 24 rats were randomly assigned to three groups including diabetic control (DC), MIIT, and HIIT. The MIIT protocol includes 13 bouts of 4-minute activity with an equivalent intensity of 60-65% VO_{2max} and the HIIT protocol includes 10 bouts of 4-minute activity with the equivalent intensity of 85-90% VO_{2max} with 2 minute active rest periods that was performed for 12 weeks, and 5 sessions per week. Western blotting was used to measure the levels of TFAM and NRF1 proteins; and the parametric and non-parametric tests were used to analyze the data at the $p\leq0.05$ level. **Results**: The results showed that TFAM and RNF-1 protein levels were significantly decreased in the D group compared to the C group ($p<0.01$). Indeed, exercise training resulted in an insignificant increase in protein levels of NRF-1 compared to the DC group ($p>0.05$); while HIIT and MIIT had no significant effect on protein levels of TFAM ($p>0.05$). **Conclusion:** It seems that the HIIT and MIIT programs improve mitochondrial respiration but have no effect on mitochondrial biogenesis in type 2 diabetic rats. However, further research is needed for definite results.

Keywords: Type 2 diabetes, Intensity of exercise training, Mitochondrial biogenesis, Mitochondrial respiration.

Cite this article:

Tabari, E., & Mohebbi, H. (2022). The effects of high and moderate intensity interval training on skeletal muscle of TFAM and NRF1 in type 2 diabetic male rats. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport, 10***(21), 8-18.**

***Coressponding Author, Addres: Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran;**

Email: mohebbi@gulian.ac.ir

https://doi.org/10.22077/jpsbs.2020.3640.1579

نشریه مطالعات کاربردی علوم‌زیستی در ورزش
مقاله پژوهشی
بهار ۱۴۰۱، دوره ۱۰، شماره ۲۱، ص ۱۸-۸
تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۰۴
دانشگاه بیرجند
نشریه مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش

اثر تمرینات تناوبی با شدت بالا و متوسط بر TFAM و NRF-1 عضله اسکلتی در رت های نر دیابتی نوع دو

الما تبری[۱]، حمید محبی[۲*]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: بخوبی مشخص شده است که عامل نسخه برداری A میتوکندری (TFAM) و عامل تنفسی هسته ای-۱ (NRF-1) تنظیم کننده های کلیدی بایوژنز میتوکندری و فسفوریلاسیون اکسیداتیو هستند. این مطالعه اثر ۱۲ هفته تمرینات تناوبی با شدت بالا (HIIT) و متوسط (MIIT) را بر مولکول های تنظیمی بایوژنز میتوکندری (TFAM و NRF-1) عضله اسکلتی رت های نر دیابتی نوع دو بررسی کرد. **روش تحقیق:** تعداد ۴۰ سر رت نر (سن: ۸ هفته، وزن: ۲۰±۱۸۰ گرم) به دو گروه رژیم غذای پر چرب (HFD) شامل ۳۲ سر و رژیم غذای استاندارد (C) شامل ۸ سر تقسیم شدند. پس از القاء دیابت نوع دو از طریق استروپتوزوتوسین در رت های چاق، ۸ سر رت دیابتی (D) و ۸ سر رت گروه C کشته شدند و ۲۴ سر رت باقیمانده به طور تصادفی به سه گروه کنترل دیابتی (DC)، گروهMIIT ، و گروه HIIT تقسیم گردیدند. برنامه MIIT شامل ۱۳ وهله فعالیت ۴ دقیقه‌ای با شدت ۷۰-۶۵ درصد VO_{2max} و برنامه HIIT شامل اجرای ۱۰ وهله فعالیت ۴ دقیقه‌ای با شدت ۹۰-۸۵ درصد VO_{2max} با دوره‌های استراحتی فعال دو دقیقه‌ای بودند که به مدت ۱۲ هفته با تکرار ۵ جلسه در هفته، به اجرا در آمدند. از روش وسترن بلات برای اندازه گیری مقادیر پروتئین های TFAM و NRF1 و از آزمون های پارامتریک و ناپارامتریک برای تحلیل داده ها در سطح معنی داری $p\leq ۰/۰۵$ استفاده شد. **یافته‌ها:** سطوح پروتئینی TFAM و NRF1 پس از القاء دیابت نسبت به گروه C به طور معنی داری کاهش یافت ($p<۰/۰۱$). هر دو برنامه HIIT و MIIT منجر به افزایش غیر معنی دار سطوح پروتئینی NRF-1 نسبت به گروه DC شدند ($p>۰/۰۵$)؛ ضمن آن که HIIT بر TFAM اثر معنی داری نداشت ($p>۰/۰۵$). **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد برنامه های HIIT و MIIT منجر به بهبود تنفس میتوکندریایی می شوند، اما اثری بر بایوژنز میتوکندری ندارند؛ با این وجود بررسی های بیشتر در این زمینه ضروری است.

واژهای کلیدی: دیابت نوع دو، شدت تمرین ورزشی، بایوژنز میتوکندری، تنفس میتوکندری.

*نویسنده مسئول، آدرس: گیلان، رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی؛
پست الکترونیک: mohebbi@gulian.ac.ir

https://doi.org/10.22077/jpsbs.2020.3640.1579

مقدمه

دیابت نوع دو و چاقی با افزایش مقاومت به انسولین و بیماری های مرتبط با آن از جمله بیماری های قلبی-عروقی همراه است (فلگال[1] و دیگران، ۲۰۱۰؛ هوتومسیگل[2]، ۲۰۰۶) و با طیف وسیعی از اختلالات متابولیکی مانند هیپرانسولینمی[3]، اختلال در برداشت گلوگز و اختلال میتوکندریایی مشخص می‌شود (اچکاردت[4] و دیگران، ۲۰۱۴). در سطح مولکولی، کاهش ظرفیت اکسیداتیو چربی و نیز کاهش متابولیسم میتوکندری، زمینه ساز گسترش مقاومت به انسولین می باشد (لاول[5] و دیگران، ۲۰۰۵). در واقع، اختلال در عملکرد میتوکندری در سبب شناسی مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو درگیر می باشد (لاول و دیگران، ۲۰۰۵).

عامل فعال کننده مشترک گیرنده گاما یک آلفای فعال شده با تکثیر کننده پراکسی زوم[6] (PGC-1α) یک عامل رونویسی است که نقش مهمی در تنظیم عملکرد میتوکندری و ظرفیت اکسیداتیو (ونتورا-کلاپیر[7]، ۲۰۰۸) از طریق تقویت بیان پروتئین های مسئول رونویسی ژن ها و DNA میتوکندری؛ ایفا می کند (لین[8] و دیگران، ۲۰۰۵). اگرچه PGC-1α با کنترل رونویسی ژن ها، تاثیر زیادی بر بایوژنز میتوکندریایی[9] دارد، به تنهایی نمی تواند این نقش را ایفا نماید. بایوژنز میتوکندریایی با افزایش رونویسی DNA میتوکندری آغاز می شود (گلیزر[10] و دیگران، ۲۰۰۵). این فرآیند عمدتا توسط بیان ژن عامل نسخه برداری A میتوکندری (TFAM) تنظیم می شود که بیان ژن میتوکندری را از طریق تعامل مستقیم با ژنوم میتوکندری همراه با عوامل اختصاصی رونویسی میتوکندری TFB1M[11] و TFB2M[12] تنظیم می کند (گلیزر و دیگران، ۲۰۰۵). به طور خاص، TFAM بیان شده در هسته، مسئول سنتز پروتئین‌های زنجیره انتقال الکترونی میتوکندری است که اهداف پایین دست عوامل تنفسی هسته ای- ۱ و ۲[13] (NRF-1,2) هستند (اسکارپولا[14] و دیگران، ۲۰۰۲). NRFs باعث افزایش بایوژنز میتوکندری از طریق القاء TFAM می شوند که رونویسی mtDNA[15] و بیان mtRNA[16] و همچنین القاء TFBs[17] را به دنبال دارد (گلیزر و دیگران، ۲۰۰۵). در حقیقت، TFAM و NRF1 نقش محوری در تنظیم بایوژنز میتوکندری ایفا می کنند.

یکی از مهم‌ترین عوامل برای افزایش خطر ابتلا به بیماری دیابت نوع دو و مقاومت به انسولین، عدم فعالیت بدنی منظم می باشد؛ در حالی که انجام فعالیت ورزشی می‌تواند از بروز این بیماری جلوگیری کرده و یا آن را به تاخیر اندازد (گودیر[18] و دیگران، ۱۹۹۸)؛ بهبودی که عمدتا ناشی از سازگاری القا شده در عضلات اسکلتی نشات می‌گیرد (نوآکس[19] و دیگران، ۲۰۱۲). در عضله اسکلتی، سازگاری به فعالیت ورزشی منجر به افزایش محتوی پروتئین های درگیر در سیگنالینگ انسولین و متابولیسم گلوکز می شود (فروسیگ[20] و دیگران، ۲۰۰۷). علاوه بر این، فعالیت ورزشی می تواند منجر به تحریک بایوژنز برای افزایش محتوی و کیفیت میتوکندری شود (هی- موگنسن[21] و دیگران، ۲۰۱۰). نتایج یک مطالعه حیوانی نشان داده است که تمرین ورزشی می تواند منجر به تغییرات قابل توجهی در بازتولید میتوکندریایی شود (دینگ[22] و دیگران، ۲۰۱۰). نشان داده شده که میزان پروتئین PGC-1α و TFAM در نتیجه تمرین ورزشی (لیوبیسیک[23] و دیگران، ۲۰۱۰) به طور پیوسته افزایش می یابد و باعث افزایش تعداد کپی های mtDNA می شود. با این حال، پاسخ مسیرهای سیگنالینگ به تمرینات ورزشی، به مولفه های تمرینی از جمله شدت فعالیت ورزشی (که مهم ترین مولفه در تنظیم و فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگی عضله اسکلتی است) بستگی دارد. بر این اساس، در دهه اخیر اجرای تمرینات ورزشی تناوبی با شدت های بالا[24] (HIIT) به منظور دست یابی به سازگاری های زیاد در مدت زمان کمتر، نسبت به اجرای تمرینات تداومی با شدت متوسط؛ مورد توجه بیشتری قرار گرفته است (بورگامستور[25] و دیگران، ۲۰۰۸). در این راستا، پروتکل HIT (به عنوان مثال، ۴ تا ۶ وهله فعالیت ۳۰ ثانیه ای با شدت فوق بیشینه) به عنوان جایگزینی برای تمرینات تداومی سنتی [۴۰ تا ۶۰ دقیقه فعالیت با حداکثر ۶۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی[26] (Vo_{2max})] معرفی گردیده است (بیشاپ[27] و دیگران، ۲۰۱۹). شکل جایگزین و جدیدتری از HIT که بیشتر مورد توجه تحقیقات قرار گرفته است، شامل اجرای وهله های فعالیت ورزشی با شدت بالا و زیر حداکثر (به عنوان مثال، ۸۰

1. Flegal
2. Hotamisligil
3. Hyperinsulinemia
4. Eckardt
5. Lowell
6. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator -1alpha
7. Ventura-Clapier
8. Lin
9. Mitochondrial biogenesis
10. Gleyzer
11. Transcription factor B1, mitochondrial
12. Transcription factor B2, mitochondrial
13. Nuclear respiratory factor2 ,1
14. Scarpulla
15. Mitochondrial DNA
16. mitochondrial RNA
17. Transcription factor binding site
18. Goodyear
19. Noakes
20. Frøsig
21. Hey-Mogensen
22. Ding
23. Ljubicic
24. High intensity interval training
25. Burgomaster
26. Maximal oxygen consumption
27. Bishop

تا ۹۰ درصد (Vo_{2max}) با تعداد ۴ تا ۵ تکرار و مدت زمان ۲ تا ۴ دقیقه می باشد (بیشاپ و دیگران، ۲۰۱۹). به خوبی مشخص شده است که صرف نظر از نوع HIIT، این نوع برنامه تمرین محرکی قوی و کارآمد برای افزایش ظرفیت اکسیداسیون عضله اسکلتی و بهبود حساسیت به انسولین است (بیشاپ و دیگران، ۲۰۱۹). از سوی دیگر، مطالعات انجام شده گزارش کرده اند که تمرینات ورزشی نقش موثری در فعال سازی عوامل بالا دست بایوژنز میتوکندریایی از جمله پروتئین کیناز فعال شده توسط AMP [1] (AMPK) و یا سیرتوئین-۱ [2] (SIRT1) دارند. در همین راستا، افزایش در مقادیر پروتئین PGC-1α و AMPK/SIRT1 به دنبال HIIT در بافت های مختلفی شامل عضله اسکلتی، بافت چربی و مغز گزارش شده است (لیتل [3] و دیگران، ۲۰۱۰؛ خلفی [4] و دیگران، ۲۰۲۰؛ استینر [5] و دیگران، ۲۰۱۱). همچنین، اجرای HIIT منجر به فعال سازی مسیرهای سینگنالینگ AMPK و P38MAPK می شود، دو کینازی که نقش محوری در تنظیم PGC-1α و بایوژنز میتوکندری ایفا می کنند (بارتلت [6] و دیگران، ۲۰۱۲). با این حال، اطلاعات بسیار محدودی در زمینه تاثیر شدت تمرین بر مولفه های دیگر بایوژنز میتوکندری از جمله TFAM و NRF1 در نمونه های دیابتی وجود دارد. بنابراین، هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر HIIT و تمرین تناوبی با شدت متوسط (MIIT) بر TFAM و NRF-1 عضله اسکلتی در رت های نر دیابتی نوع دو می باشد.

روش تحقیق

روش تحقیق حاضر از نوع تجربی با طرح پس آزمون با گروه کنترل بود. برای این منظور تعداد ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار ۸ هفته ای با محدوده وزنی ۲۰±۱۸۰ گرم از مؤسسه پاستور ایران خریداری شد. تمامی مداخلات حیوانی مطابق با دستورالعمل های اخلاقی مؤسسات ملی برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مورد تائید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گیلان با کد IR.GUMS.REC.1397.060 انجام شد. پس از دو هفته سازگاری با محیط جدید، رت ها به طور تصادفی به دو گروه کنترل سالم (C) شامل ۸ سر، و گروه رژیم غذای پر چرب (HFD) شامل ۳۲ سر تقسیم شدند. سپس گروه HFD به مدت ۱۰ هفته رژیم غذایی پرچرب (ساخت انستیتو سرم سازی رازی) و گروه کنترل سالم غذای استاندارد (ساخت انستیتو سرم سازی رازی) را مصرف کردند. رژیم غذایی استاندارد شامل ۱۰ درصد چربی، ۷۰ درصد کربوهیدرات و ۲۰ درصد پروتئین بود؛ در حالی که رژیم غذایی پرچرب ۶۰ درصد چربی، ۲۰ درصد کربوهیدرات و ۲۰ درصد پروتئین را شامل می‌شد. پس از اتمام ۱۰ هفته مصرف رژیم غذایی پرچرب، دیابت با تزریق تک‌دوز استرپتوزوتوسین [7] (STZ) حل‌شده در بافر سدیم سیترات [8] با PH =۴/۵ به مقدار ۳۰ میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن که به روش درون صفاقی (IP) تزریق شد؛ القاء گردید. برای تائید دیابت، ۹۶ ساعت پس از تزریق، با ایجاد جراحت کوچک در دم حیوانات یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتر قرار گرفت و توسط دستگاه گلوکومتر نوار خوانده شد. سطوح گلوکز خون بالاتر از ۳۰۰ میلی گرم در دسی لیتر، به‌عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته شد (هولمس [9] و دیگران، ۲۰۱۵). پس از اطمینان از القاء دیابت نوع دو، تعداد ۸ سر رت گروه کنترل سالم (C) و ۸ سر رت از گروه دیابتی (D) پس از ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه کشته شدند (بافت برداری و نمونه گیری مرحله اول). در ادامه، ۳۲ سر رت دیابتی شده به صورت تصادفی به سه گروه برنامه HIIT، گروه برنامهMIIT و گروه کنترل دیابتی (DC) تقسیم شدند. گروه های HIIT و MIIT به مدت ۱۲ هفته، ۵ جلسه در هفته به فعالیت ورزشی مختص گروه خود پرداختند. در طی ۱۲ هفته، گروه کنترل هیچ نوع فعالیتی نداشتند. رت‌های گروه‌های C و D پس از القاء دیابت نوع دو و رت‌های گروه‌های HIIT، MICT و DC پس از ۱۲ هفته پروتکل‌های تمرین؛ با استفاده از ترکیب داروی کتامین- زایلازین [10] به نسبت ۷۵ میلی گرم/کیلوگرم کتامین و ۱۰ میلی گرم/کیلوگرم زایلازین بی‌هوش شدند، نمونه‌های خونی آن ها جمع‌آوری گردید و در لوله های فاقد محلول EDTA [11] ریخته شد. سرم نمونه های خونی با سانتریفیوژ جدا گردید و سپس عضله نعلی با دقت برداشته شد، در سرم فیزیولوژیک شستشو داده شد و بلافاصله به میکروتیوب منتقل گردید و برای استفاده در ادامه مراحل آزمایش های بیوشیمیایی؛ به فریزر دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. وزن بدن رت ها در طول مداخله هر هفته کنترل شد.

نحوه اجرای برنامه HIIT: برنامه HIIT مورد استفاده، برنامه تمرینی تعدیل‌شده مطالعه هافستاد و دیگران (۲۰۱۳) بود که به مدت ۱۲ هفته و ۵ جلسه در هفته بر روی نوارگردان (شیب صفر درجه) به اجرا درآمد. این برنامه شامل اجرای ۱۰ وهله فعالیت ۴ دقیقه ای با شدت ۹۰-۸۵ درصد VO_{2max} و با دوره‌های استراحتی فعال دو دقیقه‌ای بود. به صورت

1. AMP-activated protein kinase
2. Sirtuin 1
3. Little
4. Khalafi
5. Steiner
6. Bartlett
7. Streptozotocin
8. Sodium citrate buffer
9. Holmes
10. Ketamine–Xylazine
11. Ethylenediaminetetraacetic acid

پیش رونده تا هفته دهم سرعت نوارگردان افزایش یافت و دو هفته پایانی (یازدهم و دوازدهم) سرعت نوارگردان حفظ شد. بر این اساس، سرعت نوارگردان از ۲۵ متر بر دقیقه در هفته اول به ۳۴ متر بر دقیقه در هفته دهم رسید و دو هفته پایانی این سرعت حفظ شد. همچنین، دوره های استراحت فعال از سرعت ۱۱ متر بر دقیقه در هفته اول، به سرعت ۱۶ متر بر دقیقه در هفته دهم رسید و دو هفته پایانی این سرعت حفظ گردید. لازم به ذکر است که ۱۰ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن در ابتدا و انتهای هر جلسه تمرینی در نظر گرفته شد (هافستاد[1] و دیگران، ۲۰۱۱؛ هافستاد و دیگران، ۲۰۱۳)

نحوه اجرای برنامه MIIT: پروتکل MIIT مورد استفاده در مطالعه حاضر، نمونه تعدیل‌شده برنامه تمرینی مطالعه هافستاد و دیگران (۲۰۱۳) بود که به مدت ۱۲ هفته و ۵ جلسه در هفته بر روی نوارگردان (شیب صفر درجه) شامل اجرای ۱۳ وهله فعالیت ۴ دقیقه ای با شدت ۷۰-۶۵ درصد VO_{2max} و با دوره‌های استراحتی فعال دو دقیقه‌ای به اجرا درآمد. مسافت طی شده با برنامه HIIT همسان شد و به صورت پیش رونده تا هفته دهم هر هفته سرعت نوارگردان افزایش یافت. بر این اساس، سرعت نوارگردان در هفته اول از ۱۶ متر به ۲۵ متر بر دقیقه در هفته دهم رسید و دو هفته پایانی (یازدهم و دوازدهم)، سرعت نوارگردان حفظ گردید (هافستاد و دیگران، ۲۰۱۱؛ هافستاد و دیگران ۲۰۱۳).

اندازه‌گیری متغیرهای بیوشیمیایی: برای سنجش انسولین از روش الایزا[2] ساندویچی و کیت الایزا انسولین ساخت شرکت MyBioSource با حساسیت ۰/۰۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر با شماره کاتالوگ MBS724709 مطابق با روش درج‌شده در بروشور کیت؛ استفاده شد. گلوکز با استفاده از کیت گلوکز (شرکت پارس آزمون، ایران) به روش گلوکز اکسیداز[3] با حساسیت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. به منظور تخمین مقاومت به انسولین، مدل هومئوستاز ارزیابی مقاومت به انسولین (HOMA-IR) به صورت نسبت انسولین ناشتا (میکرو واحد بر میلی‌لیتر) × گلوکز ناشتا (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)÷ ۲۴۳۰ به کار گرفته شد.

در مطالعه حاضر روش وسترن بلات هم بکار گرفته شد. برای استخراج پروتئین های عضله نعلی از بافر RIPA حاوی ۰/۰۵ میلی مولار بافر تریس (PH برابر ۸)، ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد EGTA، یک درصد SDS به اضافه ۰/۱ درصد آنتی پروتئاز کوکتایل[4] استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی گرم بافت در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر حاوی آنتی پروتئاز توسط یک هموژنایزر دستی هموژن گردید و نیم ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس در یک سانتریفیوژ یخچال دار (bo, sw14rfroil) با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه، دمای چهار درجه سانتی گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی جمع‌آوری شد و غلظت پروتئین آن با کیت تعیین کننده پروتئین Bio-Rad (در طول موج ۵۹۵ نانومتر) اندازه‌گیری گردید. در نهایت، در ۲۰ درجه زیر صفر فریزر و نگهداری شد. سپس هموژن به دست آمده به نسبت ۱:۱ با نمونه لودینگ بافر ۵۰ میلی مول تریس-کلرید هیدروژن[5]، دو درصد سدیم دو دسیل سولفات، ۱۰ درصد گلیسرول، ۵ درصد بتا- مرکاپتواتانول[6] و ۰/۰۰۵ درصد برموفنول آبی[7] مخلوط گردید. سپس نمونه ها به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد تا تمام پروتئین ها کاملاً دناتوره[8] شوند. پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل SDS-polyacryl-amide جدا شده و به غشای نیترو سلولز منتقل شدند. غشا به مدت ۱ ساعت در ۵ درصد BSA در تری بافر سالین[9] و ۰/۱ درصد (Tween 20 TBST) مسدود شد و در آنتی‌بادی اولیه (۱: ۵۰۰) انکوبه شد. انکوباسیون در آنتی‌بادی ثانویه روز بعد به مدت یک ساعت در دمای اتاق در چهار درصد TBST انجام شد. پروتئین‌ها با یک واکنش شیمیایی لومینسانس[10] (ECL) و با تجزیه و تحلیل densitometry با نرم افزار Image J اندازه‌گیری شدند. آنتی‌بادی ای اولیه و ثانویه شامل TFAM (sc23588, SANTA CRUZ), NRF-1 (sc101102, SANTA CRUZ), beta actin (sc32233, SANTA CRUZ), goat anti-rabbit IgG-HPR (sc2004, SANTA CRUZ), Goat anti-mouse (sc2005, SANTA CRUZ) مورد استفاده قرار گرفتند.

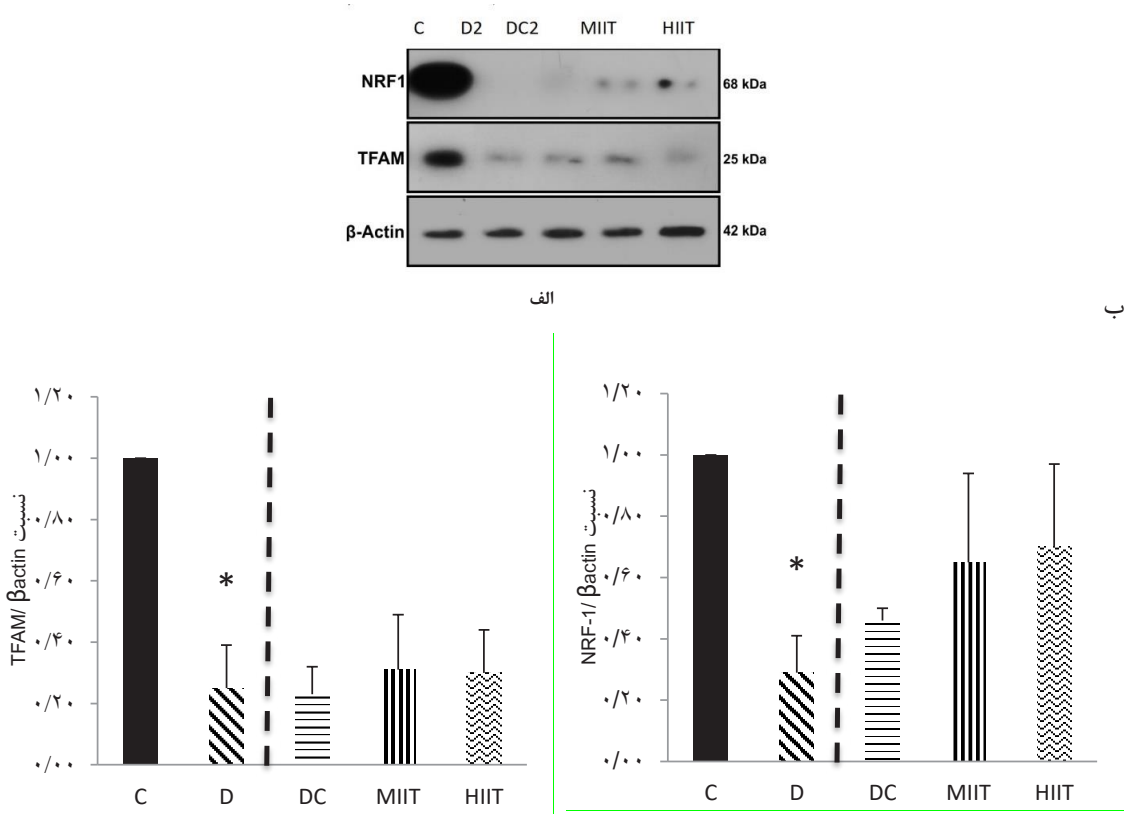
روش های آماری: از میانگین و انحراف استاندارد برای گزارش توصیفی داده ها استفاده شد. پس از بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها با آزمون شاپیرو - ویلک[11]، برای بررسی متغیرهای با توزیع طبیعی از آزمون های t مستقل و تحلیل واریانس یک سویه[12]؛ و برای بررسی متغیرهای با توزیع غیر طبیعی، از آزمون های یومن – ویتنی[13] و کروسکال-والیس[14] استفاده گردید. اطلاعات موردنیاز پس از جمع‌آوری، توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ در سطح معنی داری $p\leq ۰/۰۵$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

1. Hafstad
2. Enzyme-linked immuno_sorbent assay
3. Glucose oxidase
4. Protease inhibitor cocktail
5. Tris hydrochloride
6. Beta-mercaptoethanol
7. Bromothymol blue
8. Denature
9. Tris-buffered saline
10. Luminescense
11. Shapiro - Wilk
12. One-way analysis of variance
13. Mann-Whitney U test
14. Kruskall Walis test

یافته‌ها

تاثیر دیابت نوع دو بر سطوح پروتئینی TFAM و NRF-1: تحلیل داده ها نشان داد که القاء دیابت نوع دو منجر به کاهش معنی دار سطوح پروتئینی TFAM (p<۰/۰۱، t=۱۱/۱۲) و NRF-1 (p<۰/۰۱، z=۲/۷۸) عضله نعلی نسبت به گروه C می شود (شکل ۱).

تاثیر تمرینات ورزشی بر سطوح پروتئینی TFAM و NRF-1: بر اساس نتایج آزمون ANOVA و کروسکال – والیس، اگرچه تفاوت معنی داری بین گروه های تحقیق در مورد TFAM (p>۰/۰۵، F=۰/۵۲) و NRF1 (p>۰/۰۵، Chi-=۳/۰۷ square) وجود نداشت؛ با این وجود HIIT منجر به افزایش غیر معنی‌داری ~۱/۵ برابری و MIIT منجر به افزایش ~۱/۴ برابری NRF-1 نسبت به گروه DC شد. به علاوه، تغییرات معنی‌داری در TFAM به دنبال هر دو برنامه تمرینی به اجرا در آمده مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱. بررسی تغییرات سطوح پروتئینی TFAM (الف) و NRF1 (ب). C نشانه گروه کنترل سالم، D: دیابتی نوع دو، DC: کنترل دیابتی، MIIT: تمرین تناوبی با شدت متوسط، HIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا. * نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه C در سطح p<۰/۰۵.

بحث

یافته های پژوهش حاضر نشان داد که القاء دیابت نوع دو (با ترکیب رژیم غذایی پرچرب و تزریق داروی STZ) منجر به کاهش قابل توجه سطوح پروتئینی TFAM و NRF1 عضله اسکلتی می شود. مطالعات انجام شده قبلی نشان داده اند که اختلالات متابولیکی مانند چاقی، مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو؛ با اختلال در عملکرد میتوکندری، کاهش محتوای میتوکندری (ریتوو[1] و دیگران، ۲۰۱۰) و کاهش نشانگرهای بایوژنز میتوکندریایی (موتها[2] و دیگران، ۲۰۰۳) در عضله اسکلتی همراه است. علاوه بر این، کاهش ژن‌های درگیر در فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی در نمونه‌های حیوانی مبتلا به دیابت نوع دو گزارش شده است (پیترسن[3] و دیگران ۲۰۰۵). در تأیید مطالعات قبلی، یافته های مطالعه حاضر نشان داد که القا دیابت نوع دو منجر به کاهش مارکرهای درگیر در بایوژنز میتوکندریایی از جمله کاهش در NRF-1 و TFAM می شود. اگرچه در حال حاضر مشخص نیست که اختلال در میتوکندری عضله اسکلتی باعث مقاومت به انسولین می شود یا خیر (هولسزی[4] و دیگران، ۲۰۰۹)؛ و این که اختلال در تنظیم بایوژنز میتوکندریایی در عضله اسکلتی ممکن است در پاتوژنز دیابت نوع دو هم نقش داشته باشد؟؛ افزایش عملکرد میتوکندری می تواند از نظر درمانی برای دیابت

1. Ritov
2. Mootha
3. Petersen
4. Holloszy

نـوع دو بسـیار حائـز اهمیـت باشـد (کایکینـی[1] و دیگـران، ۲۰۱۷).

عامـل PGC-1α بـه عنـوان تنظیـم کننـده اصلـی بیوژنـز میتوکندریایـی در تعامـل بـا NRF-1، NRF-2 وTFAM عمـل مـی کنـد (هـوک و دیگـران، ۲۰۰۹) و افزایـش آن بـا بهبـود در رونویسـی NRF-1 و NRF-2؛ منجـر بـه افزایـش واحدهـای میتوکندریایـی کـد گـذاری شـده هسـته ای، بـرای مجموعـه زنجیـره انتقـال الکتـرون مـی گـردد (اسـکرپولا[2]، ۲۰۰۲) احتمالاً تغییـرات وابسـته بـه جـذب گلوکـز و مصـرف آن در عضلـه اسـکلتی در پاسـخ بـه تمریـن ورزشـی، سـازوکاری بـرای بهبـود مقاومـت بـه انسـولین و کاهـش گلوکـز سـرمی ایجـاد می‌کنـد. بـه عـلاوه، ممکـن اسـت بهبـود در عملکـرد میتوکنـدری و همچنیـن بیوژنـز میتوکندریایـی بـه دنبـال تمرینـات ورزشـی، دلیـل دیگـری بـر بهبـود مقاومـت بـه انسـولین تلقـی شـود؛ بـه طـوری کـه مطالعـات قبلـی در ایـن زمینـه تنظیـم کاهشـی PGC-1α را دلیـل بـر توسـعه مقاومـت بـه انسـولین گـزارش کرده‌انـد (لیانـگ و وارد[3]، ۲۰۰۶). بـر طبـق شـواهد موجـود، چاقـی ناشـی از رژیـم غذایـی پـر چـرب در رت هـای صحرایـی، منجـر بـه کاهـش چشـمگیر محتـوی پروتئیـن PGC-1α و همچنیـن کاهـش محتـوی میتوکنـدری در بافـت چربـی شـده و در مقابـل، اجـرای دو برنامـه تمرینـات تناوبـی بـا شـدت بـالا و متوسـط، افزایـش محتـوای میتوکنـدری و بیـان پروتئیـن PGC-1α را در پـی دارد (خلفـی و دیگـران، ۲۰۱۸). بنابرایـن، افزایـش بیـان PGC-1α بـه واسـطه تنظیـم متابولیسـم درون سـلولی، ممکـن اسـت بـه بهبـود مقاومـت بـه انسـولین در نمونـه هـای چـاق و یـا دیابتـی منجـر شـود.

یافتـه هـای پژوهـش حاضـر نشـان داد کـه تمرینـات ورزشـی تناوبـی مسـتقل از شـدت تمریـن، اثـرات محـدودی بـر افزایـش NRF1 دارنـد و موجـب تغییـرات قابـل توجه در TFAM نمی‌شـوند. ایـن در حالـی اسـت کـه مطالعـات انجـام شـده قبلـی نشـان داده‌انـد کـه تمرینـات ورزشـی بـا الگـوی وابسـته بـه شـدت تمریـن، محرکـی مؤثـر بـرای بهبـود بایوژنـز میتوکندریایـی و افزایـش PGC-1α (حداقـل در نمونـه هـای سـالم) مـی باشـد. در ایـن راسـتا، مطالعـات انسـانی افزایـش محتـوی پروتئینـی و بیـان ژن هسـته ای PGC-1α را در عضلـه اسـکلتی گـزارش کـرده انـد (جیبـالا[4] و دیگـران، ۲۰۰۶). همچنیـن، در مطالعـات قبلـی بـر روی رت هـای صحرایـی نـر، افزایـش مقادیـر پروتئینـی PGC-1α طبـق یـک الگـوی وابسـته بـه شـدت تمریـن، در عضـلات اسـکلتی نمونه‌هـای دیابتـی (تبـری و دیگـران، ۲۰۱۹) و بافـت چربـی زیرپوسـتی نمونـه هـای چـاق (خلفـی و دیگـران، ۲۰۱۸) مشـاهده شـده اسـت. بـا وجـود ایـن، اطلاعـات محـدود و همچنیـن ناهمسـویی در زمینـه اثـر تمریـن ورزشـی بـر سـایر نشـانگرهای بایوژنـز میتوکندریایـی وجـود دارد. بـر ایـن اسـاس، گـزارش شـده اسـت کـه محتـوای پروتئیـن TFAM پـس از شـدت هـای مختلف تمرینـات ورزشـی تغییـر نمی‌کنـد (گراناتـا[5] و دیگـران، ۲۰۱۶؛ پـری[6] و دیگـران، ۲۰۱۰). در مقابـل، مطالعـات دیگـری اظهـار داشـته انـد کـه تمریـن ورزشـی مـی توانـد مقادیـر پروتئیـن TFAM را افزایـش دهـد (ماریسـون[7] و دیگـران، ۲۰۱۵؛ لیتـل[8] و دیگـران ۲۰۱۰). مکانیسـم مسـئول و دلایـل سـازگاری هـا بـه روشـنی مشـخص نیسـت. در ارتبـاط بـا NRF-1، هیـچ تغییـری در مقادیـر mRNA و پروتئیـن NRF-1 بـه دنبـال یـک جلسـه تمریـن ورزشـی گـزارش نشـده اسـت (سـرویجتکال[9] و دیگـران، ۲۰۰۷؛ مندهـام[10] و دیگـران، ۲۰۱۵). ضمـن آن کـه نتایـج مشـابهی بـه دنبـال تمریـن ورزشـی بدسـت آمـده اسـت. لیتـل و دیگـران (۲۰۱۰) گـزارش کـرده انـد کـه مقادیـر پروتئیـن NRF-1 پـس از ۲ هفتـه HIIT بـدون تغییـر باقـی مـی مانـد. همیـن طـور نشـان داده شـده اسـت کـه PGC-1α بـا کمپلکـس TFAM در نوکلئوتیدهـای mtDNA همـراه اسـت و افزایـش PGC-1α هسـته‌ای و میـزان پروتئیـن تـام TFAM ممکـن اسـت در بایوژنـز میتوکندریایـی نقـش اساسـی داشـته باشـد (پـری و دیگـران، ۲۰۱۰). بـا ایـن حـال، نتایـج مـا نشـان داد کـه پروتئیـن TFAM پـس از هـر دو HIIT و MIIT بـدون تغییـر باقـی مـی مانـد. اگرچـه نتایجـی در مـورد mtDNA بدسـت نیامـد، امـا عـدم تغییـر در محتـوای پروتئیـن TFAM بعـد از تمریـن ورزشـی مطابـق بـا ایـن فرضیـه اسـت کـه بایوژنـز میتوکندریایـی بـه فعـال سـازی TFAM و تعامـل آن بـا p53 در داخـل میتوکنـدری بسـتگی دارد، نـه بـه فراوانـی خـود (گراناتـا و دیگـران، ۲۰۱۶). بنابرایـن، بـا توجـه بـه عـدم در دسـترس بـودن mtDNA، تنهـا بـا تغییـرات TFAM نمی‌تـوان نتیجـه گیـری دقیقـی از بایوژنـز میتوکندریایـی ارائـه کـرد. عـلاوه بـر ایـن،NRF-1 بیـان ژن‌هـای هسـته‌ای پروتئین‌هـای موجـود در زنجیـره انتقـال الکتـرون و فعالیـت زیـر واحـد ۵ سـیتوکروم C اکسـیداز[11] (COXIV) را رمزگـذاری مـی کنـد (اسـکرپولا و دیگـران، ۲۰۰۸). در واقـع، NRF-1 بـا اتصـال بـه عناصـر مؤثـر در پروموتـر[12] COXIV همـراه اسـت (ویرباسـیوس[13] و دیگـران، ۱۹۹۳). بنابرایـن، افزایـش NRF-1 بـه دنبـال تمرینـات تناوبـی، نشـان دهنـده نقـش موثـر ایـن نـوع تمرینـات در افزایـش تنفـس میتوکنـدری نسـبت بـه

1. Kaikin
2. Hock
3. Liang and Ward
4. Gibala
5. Granata
6. Perry
7. Morrison
8. Little
9. Sriwijitkamol
10. Mendham
11. Cytochrome C Oxidase Subunit IV
12. Promoter
13. Virbasius

محتوای میتوکندری می باشد. این فرضیه با یافته های قبلی مبنی بر این که تغییرات ناشی از تمرین ورزشی در عملکرد تنفس میتوکندری بدون تغییر همزمان در محتوای میتوکندری (جاکوبس[1] و دیگران، ۲۰۱۳) حاصل می شود، و تغییرات در محتوای میتوکندری همیشه با افزایش عملکرد تنفس میتوکندری همراه نیست (مونترو[2] و دیگران، ۲۰۱۵)، همخوانی دارد.

نتیجه گیری: به طور کلی، تمرینات تناوبی (شدید و متوسط) نقش قابل توجهی در تغییرات مقادیر پروتئینی TFAM نداشتند و تنها منجر به افزایش غیر معنی داری NRF-1 شدند؛ تغییری که مستقل از شدت تمرینات تناوبی بود. احتمال می رود در صورت استفاده از تعداد نمونه بیشتر (به دلیل تعداد کم نمونه ها و عدم اندازه گیری mTDNA در مطالعه حاضر)؛ تمرینات تناوبی بتوانند منجر به بهبود تنفس میتوکندریایی شوند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد و پژوهش حاضر با هزینه نویسندگان صورت گرفته است.

قدردانی و تشکر

مقاله حاضر از طرح رساله دکتری تخصصی دانشکده علوم ورزشی دانشگاه گیلان استخراج شده است. بدینوسیله از زحمات کادر آزمایشگاه و همکاران تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Bartlett, J.D., Hwa Joo, C., Jeong, T.S., Louhelainen, J., Cochran, A.J., Gibala, M. J., ... & Morton, J.P. (2012). Matched work high-intensity interval and continuous running induce similar increases in PGC-1α mRNA, AMPK, p38, and p53 phosphorylation in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, *112***(7), 1135-1143.**

Bishop, D.J., Botella, J., Genders, A.J., Lee, M.J., Saner, N.J., Kuang, J., ... & Granata, C. (2019). High-intensity exercise and mitochondrial biogenesis: current controversies and future research directions. *Physiology, 34***(1), 56-70.**

Burgomaster, K.A., Howarth, K.R., Phillips, S.M., Rakobowchuk, M., MacDonald, M.J., McGee, S.L., & Gibala, M.J. (2008). Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *The Journal of Physiology, 586***(1), 151-160.**

Ding, H., Jiang, N., Liu, H., Liu, X., Liu, D., Zhao, F., ... & Zhang, Y. (2010). Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1800***(3), 250-256.**

Eckardt, K., Görgens, S.W., Raschke, S., & Eckel, J. (2014). Myokines in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia, 57***(6), 1087-1099.**

Flegal, K.M., Carroll, M.D., Ogden, C.L., & Curtin, L.R. (2010). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *Jama, 303***(3), 235-241.**

Friedman, R.L., Manly, S.P., McMahon, M., Kerr, I.M., & Stark, G.R. (1984). Transcriptional and post-transcriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. *Cell, 38***(3), 745-755.**

Frøsig, C., Rose, A.J., Treebak, J.T., Kiens, B., Richter, E.A., & Wojtaszewski, J.F. (2007). Effects of endurance exercise training on insulin signaling in human skeletal muscle: interactions at the level of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and AS160. *Diabetes, 56***(8), 2093-2102.**

Gibala, M.J., Little, J.P., Van Essen, M., Wilkin, G.P., Burgomaster, K.A., Safdar, A., ... & Tarnopolsky, M.A. (2006). Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *The Journal of Physiology, 575***(3), 901-911.**

1. Jacobs
2. Montero

Gleyzer, N., Vercauteren, K., & Scarpulla, R.C. (2005). Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Molecular and Cellular Biology, 25***(4), 1354-1366.**

Goodyear, L.J., & Kahn, B.B. (1998). Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annual Review of Medicine, 49***(1), 235-261.**

Granata, C., Oliveira, R.S., Little, J.P., Renner, K., & Bishop, D.J. (2016). Training intensity modulates changes in PGC-1α and p53 protein content and mitochondrial respiration, but not markers of mitochondrial content in human skeletal muscle. *The FASEB Journal, 30***(2), 959-970.**

Hafstad, A.D., Boardman, N.T., Lund, J., Hagve, M., Khalid, A.M., Wisløff, U., ... & Aasum, E. (2011). High intensity interval training alters substrate utilization and reduces oxygen consumption in the heart. *Journal of Applied Physiology, 111***(5), 1235-1241.**

Hafstad, A.D., Lund, J., Hadler-Olsen, E., Höper, A.C., Larsen, T.S., & Aasum, E. (2013). High-and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. *Diabetes, 62***(7), 2287-2294.**

Hey-Mogensen, M., Højlund, K., Vind, B. F., Wang, L., Dela, F., Beck-Nielsen, H., ... & Sahlin, K. (2010). Effect of physical training on mitochondrial respiration and reactive oxygen species release in skeletal muscle in patients with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia, 53***(9), 1976-1985.**

Hock, M. B., & Kralli, A. (2009). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annual Review of Physiology, 71***, 177-203.**

Holloszy, J.O. (2009). Skeletal muscle "mitochondrial deficiency" does not mediate insulin resistance. *The American Journal of Clinical Nutrition, 89***(1), 463S-466S.**

Holmes, A., Coppey, L.J., Davidson, E.P., & Yorek, M.A. (2015). Rat models of diet-induced obesity and high fat/low dose streptozotocin type 2 diabetes: effect of reversal of high fat diet compared to treatment with enalapril or menhaden oil on glucose utilization and neuropathic endpoints. *Journal of Diabetes Research,* **2015.**

Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature, 444***(7121), 860-867.**

Jacobs, R.A., & Lundby, C. (2013). Mitochondria express enhanced quality as well as quantity in association with aerobic fitness across recreationally active individuals up to elite athletes. *Journal of Applied Physiology*, *114***(3), 344-350.**

Kaikini, A.A., Kanchan, D.M., Nerurkar, U.N., & Sathaye, S. (2017). Targeting mitochondrial dysfunction for the treatment of diabetic complications: pharmacological interventions through natural products. *Pharmacognosy Reviews, 11***(22), 128.**

Khalafi, M., Mohebbi, H., Symonds, M.E., Karimi, P., Akbari, A., Tabari, E., ... & Moghaddami, K. (2020). The impact of moderate-intensity continuous or high-intensity interval training on adipogenesis and browning of subcutaneous adipose tissue in obese male rats. *Nutrients, 12***(4), 925.**

Khalafi, M., Mohebbi, H., Karimi, P., Faridnia, M., & Tabari, E. (2018). The Effect of High Intensity Interval training and Moderate Intensity Continuous Training on Mitochondrial Content and PGC-1α of Subcutaneous Adipose Tissue in Male Rats with High Fat Diet Induced Obesity. *Journal of Sport Biosciences, 10***(3), 297-315. [Persian]**

Liang, H., & Ward, W. F. (2006). PGC-1α: a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education.30* **145-151 ,(4)**

Little, J. P., Safdar, A., Wilkin, G. P., Tarnopolsky, M. A., & Gibala, M. J. (2010). A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *The Journal of Physiology, 588***(6), 1011-1022.**

Little, J.P., Safdar, A., Bishop, D., Tarnopolsky, M.A., & Gibala, M.J. (2011). An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1α and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 300,* **1303-1310.**

Lin, J., Handschin, C., & Spiegelman, B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism, 1***(6), 361-370.**

Lowell, B.B., & Shulman, G.I. (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science, 307***(5708), 384-387.**

Mendham, A.E., Duffield, R., Coutts, A.J., Marino, F., Boyko, A., & Bishop, D.J. (2015). Rugby-specific small-sided games training is an effective alternative to stationary cycling at reducing clinical risk factors associated with the development of type 2 diabetes: a randomized, controlled trial. *PloS One, 10***(6), e0127548.**

Montero, D., Cathomen, A., Jacobs, R.A., Flück, D., de Leur, J., Keiser, S., ... & Lundby, C. (2015). Haematological rather than skeletal muscle adaptations contribute to the increase in peak oxygen uptake induced by moderate endurance training. *The Journal of Physiology, 593***(20), 4677-4688.**

Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., ... & Groop, L.C. (2003). PGC-1α responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics, 34***(3), 267-273.**

Morrison, D., Hughes, J., Della Gatta, P.A., Mason, S., Lamon, S., Russell, A.P., & Wadley, G.D. (2015). Vitamin C and E supplementation prevents some of the cellular adaptations to endurance-training in humans. *Free Radical Biology and Medicine, 89***, 852-862.**

Noakes, T., & Spedding, M. (2012). Run for your life. *Nature, 487***(7407), 295-296.**

Perry, C.G., Lally, J., Holloway, G.P., Heigenhauser, G.J., Bonen, A., & Spriet, L.L. (2010). Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology, 588***(23), 4795-4810.**

Petersen, K.F., Dufour, S., & Shulman, G.I. (2005). Decreased insulin-stimulated ATP synthesis and phosphate transport in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *PLoS Medicine, 2***(9), e233.**

Ritov, V.B., Menshikova, E.V., Azuma, K., Wood, R., Toledo, F.G., Goodpaster, B.H., ... & Kelley, D.E. (2010). Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 298***(1), E49-E58.**

Scarpulla, R.C. (2002). Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene, 286***(1), 81-89.**

Scarpulla, R.C. (2008). Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1147***, 321.**

Scarpulla, R. C. (2002). Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene, 286***(1), 81-89.**

Sriwijitkamol, A., Coletta, D.K., Wajcberg, E., Balbontin, G.B., Reyna, S.M., Barrientes, J., ... & Musi, N. (2007). Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. *Diabetes, 56***(3), 836-848.**

Steiner, J.L., Murphy, E.A., McClellan, J.L., Carmichael, M.D., & Davis, J.M. (2011). Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *Journal of Applied Physiology, 111***(4), 1066-1071.**

Tabari, E., Mohebbi, H., Karimi, P., Moghaddami, K., & Khalafi, M. (2019). The Effects of Interval Training Intensity on Skeletal Muscle PGC-1α in Type 2 Diabetic Male Rats. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism, 18***(4), 179-188. [Persian]**

Ventura-Clapier, R., Garnier, A., & Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1α. *Cardiovascular Research, 79***(2), 208-217.**

Virbasius, J. V., Virbasius, C. M.A., & Scarpulla, R.C. (1993). Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes & Development, 7***(3), 380-392.**