

## Research Paper

# The Effect of Periodic Exercise and Resveratrol Supplementation on the Expression of Pparg Coactivator-1 Alpha and Pyruvate Dehydrogenase Kinase Genes in Gastrocnemius Muscle of Old Rats With Type 2 Diabetes



Ali Salehi<sup>1</sup>, \*Hajar Abbaszadeh<sup>1</sup>, Parvin Farzanegi<sup>1</sup>

1. Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.



**Citation** Salehi A, Abbaszadeh H, Farzanegi P. [The Effect of Periodic Exercise and Resveratrol Supplementation on the Expression of Pparg Coactivator-1 Alpha and Pyruvate Dehydrogenase Kinase Genes in Gastrocnemius Muscle of Old Rats With Type 2 Diabetes (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2020; 26(1):68-81. <https://doi.org/10.32598/hms.26.1.3145.1>

**doi** <https://doi.org/10.32598/hms.26.1.3145.1>



**Received:** 26 May 2019

**Accepted:** 12 Oct 2019

**Available Online:** 01 Jan 2020

### Key words:

Periodic exercise, Resveratrol, PDK4, PGC-1 $\alpha$ , Type II diabetes

## ABSTRACT

**Aims** Type 2 diabetes is the result of complex interactions between genetic and environmental factors that affect fat and glucose metabolism. The purpose of this study was to determine the effect of periodic exercise and resveratrol supplement on the expression levels of Pparg Coactivator 1-Alpha (PGC-1 $\alpha$ ) and Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDK4) genes in gastrocnemius muscle of old rats with type 2 diabetes.

**Methods & Materials** 42 male rats (mean age= 40-50 weeks; mean body weight= 250-300 g) were randomly divided into 6 groups: healthy-control, diabetic-control, Diabetic+Periodic Exercise, Diabetic+Supplement, Diabetic+Periodic Exercise+Supplement and Saline. The type 2 diabetes was induced by intraperitoneal injection of Streptozotocin (50 mg/kg body weight). The exercise protocol consisted of 10 sets of 1-min activities at 50% intensity and a 2-min rest period between sets, and each week the speed was increased by 2 meters per minute. The exercises were performed for eight weeks. Resveratrol supplement was injected intraperitoneally daily at a dose of 20 mg/kg body weight. The expressions of PDK4 and PGC-1 $\alpha$  in the gastrocnemius muscle were measured by real time Polymerase Chain Reaction (PCR) method.

**Findings** highest expression level of PDK4 and PGC-1 $\alpha$  genes in gastrocnemius muscle was observed in the diabetic group received both periodic exercise and Resveratrol supplement and the lowest level was reported in the diabetic-control and saline groups.

**Conclusion** The combination of resveratrol supplementation and periodic exercise can have beneficial effects on PDK4 and PGC-1 $\alpha$  expression levels in the gastrocnemius muscle of old rats with type 2 diabetes and reduce the risks of diabetes-related complications.

## Extended Abstract

### 1. Introduction

Diabetes mellitus is the most common metabolic disease [2]. In diabetic patients, metabolic flexibility is impaired. Today, in addition to various sports exercises, other non-pharmacological solutions of plant origin

have been considered for the management of diabetes [13, 14]. Wang et al. [12] found that those who did not exercise had a 2.2-fold increase in the expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDK4) following resistance exercise and symmetric endurance exercise compared to single-mode endurance exercise. Sin et al. [19], by reviewing the anti-glycemic mechanism of Resveratrol in skeletal muscle of aged and diabetic patients, confirmed the changes in the expression of

#### \* Corresponding Author:

Hajar Abbaszadeh, PhD.

**Address:** Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

**Tel:** +98 (911) 2163511

**E-mail:** h.abaszade61@gmail.com

PDK4 through the Pparg Coactivator-1 Alpha (PGC-1 $\alpha$ ) pathway following Resveratrol consumption. The aim of present study was to examine the effect of periodic exercise and resveratrol supplementation on the expression of PDK4 and PGC-1 $\alpha$  genes in gastrocnemius muscle of old rats with type 2 diabetes.

## 2. Methods and Materials

This is an experimental study conducted in 2018 in the research center of Islamic Azad University of Sari branch. 42 male rats (mean age=40-50 weeks; mean body weight=250-300 g) were randomly divided into 6 groups: healthy-control, diabetic-control, Diabetic+Periodic Exercise, Diabetic+Supplement, Diabetic+Periodic Exercise+Supplement, and Saline. The type 2 diabetes was induced by intraperitoneal injection of Streptozotocin (50 mg/kg body weight).

The exercise protocol consisted of 10 sets of 1-min activities at 50% intensity and a 2-min rest period between sets, and each week the speed was increased by 2 meters per minute. The exercises were performed for eight weeks. Resveratrol supplement was injected intraperitoneally daily at a dose of 20 mg/kg body weight. The expressions of PDK4 and PGC-1 $\alpha$  in the gastrocnemius muscle were measured by real time Polymerase Chain Reaction (PCR) method. After quantification, gene expression values were analyzed using 2- $\Delta\Delta C_t$  formula.

## 3. Results

According to the results shown in Figure 1, the highest expression level of PDK4 gene in gastrocnemius muscle was observed in the diabetic group received both periodic exercise and Resveratrol supplement and the lowest level was reported in the diabetic-control and saline groups. The increase in PDK4 level in the rats treated with a combination of resveratrol and periodic exercise was significantly higher than that of those received resveratrol and periodic exercise alone ( $P < 0.001$ ). The results also show that the highest expression of PGC-1 $\alpha$  gene was in the diabetic group received both periodic exercise and Resveratrol supplement and its lowest levels in the diabetic-control group (Figure 2). The increase in PGC-1 $\alpha$  level in the rats treated with a combination of resveratrol and periodic exercise was significantly higher than that of those received resveratrol and periodic exercise alone ( $P < 0.001$ ).

## 4. Discussion

A number of previous studies have shown that diabetes is associated with an increase in the concentration of PDK4, a decrease in its gene expression, and its poor function [9, 11, 24]. In the present study, we found that the expression of the PDK4 gene in diabetic rats increased after administration of resveratrol to the gastrocnemius muscle tissue. Similarly, previous studies have shown that resveratrol supplementation can improve the complications of muscle aging and insulin resistance [13, 19].

**Table 1.** Primer sequences used to match PDK4 and PGC-1 $\alpha$  genes

Gene	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
GAPDH	AAGTTCAACGGCAGTCAAGG	CATACTCAGCACCAGCATCACC
PDK4	GAGTTGTGTAGGTTAGGTGG	AAATATGAAGAGGTGTTGGTGG
PGC-1 $\alpha$	CGGAAATCATATCCAACCAGAT	TGAGGACCGCTAGCAAGTTTGC

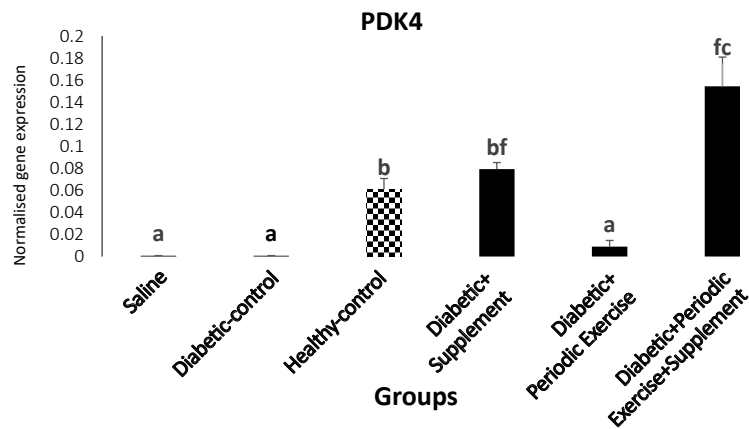
GAPDH= Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Table 2.** Kruskal-Wallis test results for PGC-1 $\alpha$  and PDK4 gene expressions in the gastrocnemius muscle

Variables	Chi-Square	df	P
PDK4 expression	37.782	7	0.001*
PGC-1 $\alpha$ expression	35.503	7	0.001*

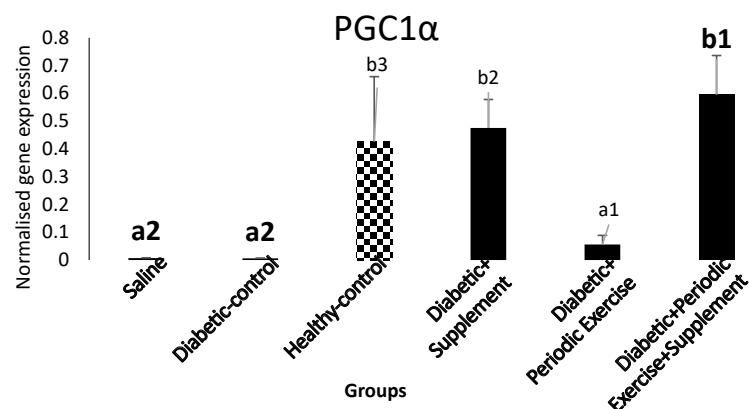
Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences



Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Figure 1.** Comparison of the mean PDK4 mRNA expression levels by Real time PCR method

There was no significant difference in mean PDK4 mRNA levels in groups with the same symptom ( $P>0.05$ ). The mean PDK4 mRNA expression levels in groups were as  $fc>bf>b>a$ .



Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Figure 2.** Comparison of the mean PGC-1α mRNA expression levels by Real time PCR method

There was no significant difference in mean PGC-1α mRNA levels in groups with the same symptom ( $P>0.05$ ). The mean PGC-1α mRNA expression levels in groups were as  $b1>b2>b3>a1>a2$ .

Resveratrol supplementation can also increase the transactivation of PDK4 in response to decreased protein content of PDK4 [19]. In the present study, it was also observed that mRNA expression of PDK4 was higher in the resveratrol supplementation+periodic exercise group than in diabetic and saline groups. Wang et al. showed that after exercise, mRNAs associated with PGC-1α and PDK4 increased 5-8 times in both types of muscle fibers [12].

In the present study, changes in PGC-1α gene expression were consistent with the results of PDK4 gene. We suggest that a combination of resveratrol and periodic exercise be further studied as an effective way to

improve glucose uptake in gastrocnemius muscles of older rats with type 2 diabetes.

## 5. Conclusion

The combination of resveratrol supplementation and periodic exercise can have beneficial effects on PDK4 and PGC-1α expression levels in the gastrocnemius muscle of old rats with type 2 diabetes and reduce the risks of diabetes-related complications.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Animal Care and Use Committee of Islamic Azad University of Sari branch (Ethical Code: IR.IAU.SARI.REC.1397.011). All ethical principles governing animal experiments were fully met.

### Funding

The present paper was extracted from the PhD dissertation of the first author, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari.

### Authors' contributions

Conceptualization, investigation, writing – review & editing, supervision: All Authors; Methodology, writing – original draft, resources: Ali Salehi, Hajar Abbaszadeh; Funding acquisition: Ali Salehi.

### Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

### Acknowledgements

The authors would like to thank the animal laboratory staff of Islamic Azad University of Sari branch for their valuable cooperation.

This Page Intentionally Left Blank

## اثر تمرین تناوبی و رزوراترول بر بیان ژن های PDK4 و PGC-1 $\alpha$ در عضله دوقلوی موش های مسن مبتلا به دیابت نوع ۲

علی صالحی<sup>۱</sup>، \*هاجر عباسزاده<sup>۱</sup>، پروین فرزانه<sup>۱</sup>

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

### چکیده

تاریخ دریافت: ۰۵ خرداد ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۲۰ مهر ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۱ دی ۱۳۹۸

**اهداف:** دیابت نوع ۲ نتیجه کنش های پیچیده بین شاخص های ژنتیکی و محیطی عمل کننده روی متابولیسم چربی و گلوکز است. هدف پژوهش حاضر تعیین اثر تمرین تناوبی و رزوراترول بر بیان ژن PDK4 و PGC-1 $\alpha$  در عضله دوقلوی موش های مسن مبتلا به دیابت نوع ۲ بود.

**مواد و روش ها:** ۴۲ سر موش نر (میانگین سنی ۴۰ تا ۵۰ هفته و میانگین وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم) به شش گروه: کنترل - سالم، کنترل - دیابتی، دیابتی + تمرین تناوبی، دیابتی + مکمل، دیابتی + تمرین / تناوبی + مکمل و سالمین تقسیم شدند. نحوه دیابتی کردن موش ها، تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین یا دز ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بود. تمرین شامل ۱۰ ست فعالیت یک دقیقه ای با شدت ۵۰ درصد و دو دقیقه استراحت بین ست ها بود و هر هفته دو متر در دقیقه به سرعت افزوده می شد. تمرینات به مدت هشت هفته انجام شد. رزوراترول روزانه با دز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی به موش ها تزریق شد. بیان ژن PDK4 و PGC-1 $\alpha$  در بافت عضله دوقلو به روش Real time PCR اندازه گیری شد.

**یافته ها:** نتایج نشان می دهد که بیشترین بیان ژن PDK4 و PGC-1 $\alpha$  در عضله دوقلو در گروه مکمل + تمرین تناوبی و کمترین سطوح آن در گروه کنترل - دیابتی و سالمین وجود دارد.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که ترکیبی از رزوراترول و تمرین تناوبی می تواند اثرات مفیدی بر بیان ژن PDK4 و PGC-1 $\alpha$  در عضله دوقلوی موش های مسن مبتلا به دیابت نوع ۲ داشته و در نتیجه خطرات ناشی از عوارض دیابت را کاهش دهد.

### کلیدواژه ها:

تمرین تناوبی، رزوراترول، PDK4، PGC-1 $\alpha$ ، دیابت نوع دو

### مقدمه

در کنترل مصرف سوپسترا درگیر است و باعث تغییر اکسیداسیون سوپسترا از کربوهیدرات ها به سمت چربی ها می شود [۴، ۵].

PDK4 به وفور در جزایر پانکراس، قلب و عضله اسکلتی یافت می شود؛ چراکه این بافت ها مصرف گلوکز بالا و نرخ اکسیداسیون اسید چرب بالایی دارند [۶، ۷]. فراهم بودن PDK4 به طور ویژه در عضله و کبد برای پاسخ به ناشتایی و فعالیت ورزشی مهم است. از طرفی، مطالعات اخیر نشان دادند که فعال سازی PPAR $\alpha$  یک هدف شناخته شده برای PGC-1 $\alpha$ ، موجب بیان PDK4 می شود. به طور قابل توجهی، PGC-1 $\alpha$  توسط ناشتایی و فعالیت ورزشی فعال می شود. PGC-1 $\alpha$  یک مولکول متصل (سواچ) است که چندین عامل کلیدی در برنامه های سازگار با

اگرچه پیری یک بیماری نیست، ولی عامل خطر برای اکثر بیماری های مزمن در نظر گرفته می شود [۱]. تغییرات مرتبط با سن و بی تحرکی و تغییرات در ترکیب بدنی، عوامل ایجاد بیماری های متابولیکی هستند. بیماری دیابت شیرین شایع ترین بیماری متابولیکی است [۲]. این بیماری یک مشکل بهداشتی در سراسر جهان است که حدود یک تا دو درصد افراد جامعه بدان مبتلا هستند و سبب ازکارافتادگی و مرگ و میر فراوان می شود [۳، ۴]. در افراد دیابتی، انعطاف پذیری متابولیکی دچار اختلال می شود. انعطاف پذیری متابولیکی، ظرفیت یک سیستم برای تنظیم اکسیداسیون منابع انرژی (عمدتا گلوکز و اسیدهای چرب) بر اساس میزان دسترسی به این مواد سوختی است. PDK4<sup>۲</sup> آنزیمی است که

3. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha (PPAR $\alpha$ )
4. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Coactivator (PGC)-1alpha (PGC-1 $\alpha$ )

1. Metabolic Flexibility
2. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4)

\* نویسنده مسئول:

دکتر هاجر عباسزاده

نشانی: ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه فیزیولوژی ورزشی.

تلفن: ۲۱۶۳۵۱۱ (۹۱۱) +۹۸

پست الکترونیکی: h.abaszade61@gmail.com

از جمله این مواد رزوراترول<sup>۸</sup> است که در گیاهان بنفش و قرمز رنگ به خصوص در پوست انگور قرمز و خانواده توت‌ها وجود دارد [۱۵]. رزوراترول یک ترکیب پلی‌فنول است و در پاسخ به حمله پاتوژن‌ها و استرس محیطی در گیاهان تولید می‌شود [۱۷]. این ماده یک فیتوآلکسین طبیعی است که حداقل در ۲۷ گونه گیاهی یافت می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که رزوراترول دارای اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضددیابتی است [۱۸]. سین و همکاران با مروری بر مکانیسم آنتی‌گلیسمی رزوراترول در عضلات اسکلتی افراد مسن و بیماران دیابتی، تغییرات بیان PDK4 از مسیر PGC-1 $\alpha$  را تحت مصرف رزوراترول تأیید کردند [۱۹]؛ بنابراین با توجه به مطالب بیان‌شده، محقق به دنبال پاسخ به این سؤال است که آیا تمرین تناوبی به همراه مکمل رزوراترول بر بیان ژن PDK4 و PGC-1 $\alpha$  بافت عضله دوقلو در موش‌های دیابتی تأثیری دارد؟

### مواد و روش‌ها

با توجه به کنترل بیشتری که روی آزمودنی‌های حیوانی صورت می‌گیرد، پژوهش از نوع تجربی است. آزمودنی‌ها در طی مراحل پژوهش در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف به ابعاد ۱۵×۱۵×۳۰ سانتی‌متر ساخت شرکت رازی راد، با دمای محیط ۲۰±۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۰±۵ درصد به همراه تهویه مناسب و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ نگهداری شدند. غذای مورد نیاز آن‌ها که از شرکت خوراک دام به‌پرور کرج به صورت پلت تهیه شد و آب مورد نیاز آن‌ها به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آنان قرار گرفت. جامعه آماری شامل ۴۲ سر موش صحرایی نر مسن (با میانگین سنی ۴۰ تا ۵۰ هفته‌ای) بود که تکثیر آن‌ها در مرکز پژوهش دانشگاه آزاد واحد ساری انجام شد. میانگین وزنی آن‌ها ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم بود به طور تصادفی به شش گروه تقسیم شدند که شامل گروه‌های کنترل - سالم، کنترل - دیابتی، دیابتی + تمرین تناوبی، دیابتی + مکمل، دیابتی + تمرین / تناوبی + مکمل و سالی (تزریق محلول سالیین برای کنترل اثر تزریق) بودند.

قبل از شروع پروتکل اصلی، آزمودنی‌های قرار گرفته در گروه تمرین و گروه مکمل + تمرین به منظور آشنایی با چگونگی فعالیت توسط تردمیل، در یک هفته طی پنج جلسه، به مدت پنج دقیقه با سرعت ۸-۱۰ متر بر دقیقه با شیب صفر فعالیت داشتند. پروتکل تمرین تناوبی شامل ۱۰ ست یک‌دقیقه‌ای با شدت ۵۰ درصد و دو دقیقه استراحت بین ست‌ها بود و با سرعت ۱۴ متر در دقیقه شروع و هر هفته دو متر در دقیقه به سرعت افزوده می‌شد. تمرینات هفته‌ای سه جلسه و به مدت هشت هفته انجام شد [۲۰]. نحوه دیابتی کردن موش‌ها به این صورت بود که به دلیل

ترموژنیک در چربی قهوه‌ای را به راه می‌اندازد، شامل تحریک مصرف سوخت، اکسیداسیون میتوکندریایی اسید چرب و تولید گرما از طریق بیان پروتئین جفت نشده (UCP-1)<sup>۵</sup>. همزمان با فعال‌سازی بیان UCP-1، بیان PGC-1 $\alpha$  برای پیشروی تمایز به سمت دودمان چربی قهوه‌ای کافی است.

PGC-1 $\alpha$  اغلب به یک لیگاند پروتئینی برای ERRها<sup>۶</sup> برمی‌گردد. شواهد اخیر نشان می‌دهند که ERRها با PGC-1 $\alpha$  برای تنظیم بیان ژن میتوکندریایی شریک هستند و این گیرنده‌های هسته‌ای به عنوان واسطه‌های مهم در عملکرد و متابولیسم میتوکندریایی دخالت می‌کنند. کشف PGC-1 $\alpha$  نقطه عطفی در فهم اساس مولکولی سازگاری‌های ناشی از فعالیت ورزشی در بیوزن و عملکرد میتوکندریایی و تنظیم متابولیسم سوبسترای عضله اسکلتی را نشان می‌دهد [۸].

نسخه‌برداری از ژن‌های صرفه‌جو مانند PDK4 در اواخر تمرین با فشار کم و طولانی‌مدت افزایش می‌یابد. عمل این ژن کاهش پایدار در اکسیداسیون کربوهیدرات حین این‌گونه تمرینات است و باعث کاهش در میزان استفاده از گلوکز و گلیکوژن می‌شود [۹]. در گذشته این موضوع آشکار بود که ورزش باعث بهبود جذب گلوکز در عضله اسکلتی بیماران دیابتی می‌شود. به دنبال فعالیت، پروتئین‌هایی مانند آدنوزین مونوفسفات کیناز ایجاد می‌شود تا بتوانند جذب گلوکز را افزایش دهند [۹-۱۱].

از طرفی دیگر، بیان PDK4 در عضله اسکلتی در پاسخ به همه پروتکل‌های تمرینی افزایش می‌یابد، اما این افزایش در تمرینات استقامتی در مقایسه با تمرینات تک‌جلسه‌ای بیشتر است. برای مثال، وانگ و همکاران دریافتند که در افراد تمرین‌نکرده پاسخ ۲/۲ برابری در بیان PDK4 متعاقب تمرینات مقاومتی و تمرین استقامتی متقارن<sup>۷</sup> نسبت به تمرین استقامتی تک‌جلسه‌ای بروز می‌یابد [۱۲].

امروزه برای مدیریت بیماری دیابت، علاوه بر انجام تمرینات مختلف ورزشی، راهکارهای غیردارویی دیگری نیز با منشأ گیاهی مورد توجه قرار گرفته است [۱۳، ۱۴]. مواد بیولوژیک با منشأ گیاهی شاخه‌ای از فارماکوتراپی مدرن بیماری‌ها را تشکیل می‌دهند. اگرچه عوامل دارویی متنوعی برای درمان انواع بیماری‌ها وجود دارد، اما اغلب بیماران قادر به تحمل اثرات جانبی داروهای شیمیایی نیستند و از سوی دیگر اکثر گیاهان اثرات جانبی بسیار اندکی بر روی بیماران به جای می‌گذارند. بنابراین در سال‌های اخیر، ترکیب استفاده از داروهای گیاهی در کنار پرداختن به فعالیت بدنی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است.

5. Uncoupling protein-1

6. Estrogen-related receptor alpha

7. Concurrent endurance

8. Resveratrol

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت همسان سازی ژن های PDK4 و PGC-1α

Reverse primer ۵'-۳'	Forward primer ۵'-۳'	ژن
CATACTCAGCACCAGCATCACC	AAGTTCACGGCACAGTCAAGG	GAPDH
AAATATGAAGAGGTGTTGGTGG	GAGTTGTGTGTAGGTTAGGTGG	PDK4
TGAGGACCGCTAGCAAGTTTGC	CGAAATCATATCCAACCAGAT	PGC-1α

## افق دانش

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار نمایش داده شدند. بررسی طبیعی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک و بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین انجام شد. با توجه به طبیعی نبودن توزیع داده‌ها، جهت بررسی تغییرات بین گروه‌ها از آزمون کروسکال والیس استفاده شد. سطح معناداری در نظر گرفته شده ۰/۰۵ بود و از نسخه ۲۳ نرم افزار SPSS استفاده شد.

## یافته‌ها

نتایج آزمون کروسکال والیس برای بیان ژن PDK4 عضله دوقلو در گروه‌های مختلف، در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. ارزش کای اسکوئر محاسبه شده (۳۷/۷۸۲) و معنادار بودن آن در سطح  $P < 0/01$ ، بیانگر وجود تفاوت معنی دار بیان ژن PDK4 عضله دوقلو در بین گروه‌های مختلف پژوهش است. بیشترین بیان ژن PDK4 عضله دوقلو در گروه تناوبی + دیابت + رزوراترول و کمترین سطوح آن در گروه کنترل - دیابتی مشاهده شد (تصویر شماره ۱).

میانگین بیان ژن PDK4 عضله دوقلو در موش‌های مسن مبتلا به دیابت نوع ۲ کاهش معنی داری در گروه‌های کنترل - دیابت در مقایسه با سایر گروه‌ها داشته است. در اینجا تفاوت معنی داری در بیان ژن PDK4 بین گروه‌های رزوراترول و کنترل - سالم نبود (تصویر شماره ۱ با علامت‌های مشابه،  $P > 0/05$ ). اختلاف معنی داری میان گروه‌های کنترل - دیابت و تناوبی نیز مشاهده نشد. در حالی که ترکیب رزوراترول + تمرین تناوبی موجب یک افزایش معنی داری در بیان ژن PDK4 در مقایسه با گروه‌های دیگر شد ( $P < 0/001$ ). بیان ژن PDK4 در گروه‌های رزوراترول و تمرین تناوبی بیشتر از گروه کنترل - دیابت بود ( $P < 0/01$ ). افزایش سطوح PDK4 در موش‌های تحت درمان با ترکیبی از رزوراترول و تمرین تناوبی به طور معنی داری بیشتر از رزوراترول و تمرین تنها بود ( $P < 0/001$ ). همچنین این تفاوت بین گروه کنترل با گروه رزوراترول معنی دار بوده است (تصویر شماره ۱).

همچنین، نتایج آزمون کروسکال والیس برای بیان ژن PGC-1α عضله دوقلو در گروه‌های مختلف در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. ارزش کای اسکوئر محاسبه شده (۳۵/۵۰۳) و معنادار بودن آن در سطح  $P < 0/001$ ،

مسن بودن موش‌ها داروی استریتوزوتوسین<sup>۱</sup> با دوز ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی به آنان تزریق شد و با بررسی نمونه خون از گوشه چشم و گلوکز ناشتایی بیش از ۲۵۰ میلی گرم بر دسی لیتر از دیابتی بودن مطمئن شدیم [۲۱].

مکمل رزوراترول در گروه‌های مکمل و مکمل + تمرین، روزانه با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی به آنان تزریق می‌شد [۲۲، ۲۱، ۱۸].

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و پس از ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتایی، آزمودنی‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین و زایلازین بیهوش شدند و نمونه‌گیری‌های بافتی صورت گرفت. بافت عضله دوقلوی آن‌ها جدا و در محیط منفی ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس به آزمایشگاه ارسال شد. مطالعات بیان ژن PDK4 و PGC-1α در بافت عضله دوقلو به روش Real time PCR<sup>۲</sup> سنجش و پس از کمی سازی، مقادیر بیان ژن با استفاده از فرمول  $\Delta\Delta Ct-2$  تجزیه و تحلیل شد.

در ابتدا، نمونه‌های عضلانی در بافر فسفات (pH 7/0) در دمای چهار درجه سانتی گراد با هموژنیزه کننده همگن شدند. کل RNAها از بافت عضله دوقلو از تمام موش‌ها با استفاده از کیت RNA-Plus (SinaClon RN7713) استخراج شدند. برای تخمین کمیّت و کیفیت RNAهای استخراج شده از روش اسپکتروفوتومتر ND-1000 Nanodrop (Thermo Sci., Newington NH) استفاده شد. ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت Thermo science آلمان طبق دستورالعمل شرکت سازنده در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت انجام شد. بیان ژن‌های مورد نظر با روش PCR Real-Time و با دستگاه (Amplicon) Real Q-PCR 29 Master Mix Kit (دائمارک) در ۴۰ سیکل انجام شد. سطوح mRNAها نسبت به مقدار mRNA GAPDH نرمال شدند. در جدول شماره ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده آورده شده است.

جهت طبقه‌بندی داده‌ها، از آمار توصیفی استفاده شد و

9. Streptozocin (STZ)

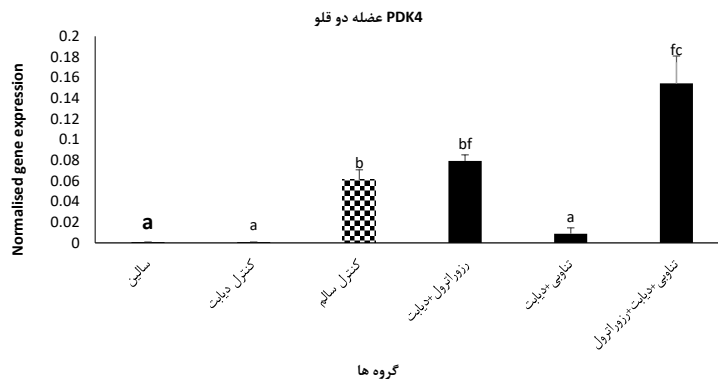
10. Real time polymerase chain reaction



جدول ۲. نتایج آزمون کروسکال والیس برای میزان بیان ژن PDK4 و PGC-1α عضله دوقلو

آماره	Chi-Square	df	P
بیان ژن PDK4 عضله دوقلو	۳۷/۷۸۲	۷	۰/۰۰۱*
بیان ژن PGC-1α عضله دوقلو	۳۵/۵۰۳	۷	۰/۰۰۱*

افتخ دانش



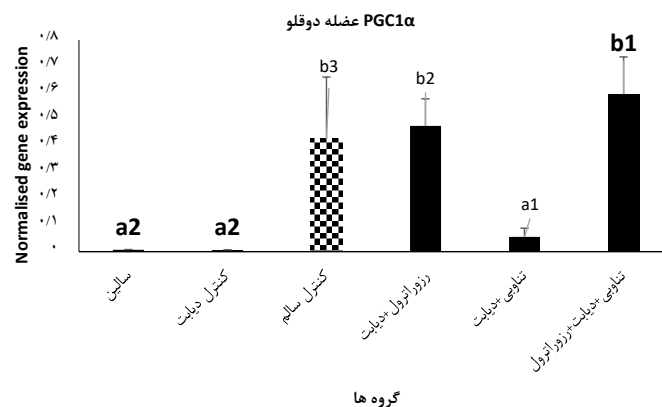
افتخ دانش

تصویر ۱. مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن PDK4 در عضله دوقلو که به وسیله Real time PCR مشخص شد. تفاوت معنی داری در سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن PDK4 در گروه‌های با علامت مشابه وجود نداشت. سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن PDK4 در گروه‌ها به ترتیب  $fc > bf > b > a$  بود. سطح معنی داری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

رزور اترویل + تمرین تناوبی و کنترل - سالم نبود (تصویر شماره ۲ با علامت مشابه (b)،  $P > 0/05$ ).

اختلاف معنی داری میان گروه‌های کنترل - دیابت و تناوبی نیز مشاهده نشد (تصویر شماره ۲ با علامت مشابه (a)،  $P > 0/05$ ). در حالی که گروه‌های رزور اترویل و رزور اترویل + تمرین تناوبی موجب یک افزایش معنی دار در بیان ژن PGC-1α در مقایسه با گروه‌های دیگر شدند ( $P < 0/001$ ). افزایش بیان ژن PGC-1α در موش‌های تحت درمان با ترکیبی از رزور اترویل و تمرین تناوبی

بیانگر وجود تفاوت معنی دار بیان ژن PGC-1α عضله دوقلو در بین گروه‌های مختلف پژوهش بود. نتایج نشان می‌دهد که بیشترین بیان ژن PGC-1α عضله دوقلو در گروه مکمل + تمرین تناوبی و کمترین سطوح آن در گروه کنترل - دیابت است. میانگین بیان ژن PGC-1α عضله دوقلو در موش‌های مسن مبتلا به دیابت نوع ۲ کاهش معنی داری در گروه کنترل - دیابت در مقایسه با سایر گروه‌ها داشته است. در اینجا تفاوت معنی داری در بیان ژن PGC-1α بین گروه‌های رزور اترویل،



افتخ دانش

تصویر ۲. مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن PGC-1α در عضله دوقلو که به وسیله Real time PCR مشخص شد. تفاوت معنی داری در سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن PGC-1α در گروه‌های با علامت مشابه وجود نداشت. سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن PGC-1α گروه‌ها به ترتیب  $a2 > a1$  بود. سطح معنی داری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

پلی فنول طبیعی در انگور قرمز، پروتئین سیرتوئین<sup>۱۴</sup> مرتبط با طول عمر را فعال می‌کند و علاوه بر تأثیرات مستمر آن در فرایندهای انرژی‌زایی میتوکندری، حساسیت انسولین را افزایش می‌دهد [۱۹]. چنین مزایایی می‌تواند به دلیل توانایی رزوراترول برای تحریک مسیرهای متابولیسم داخل سلولی باشد که باعث می‌شود سلول‌ها مؤثرتر از انسولین و گلوکز استفاده کنند و در نهایت منجر به کاهش سطح قند خون می‌شود [۱۳].

مطالعات قبلی گزارش کردند که مکمل رزوراترول می‌تواند موجب افزایش فعالیت نسخه‌برداری PDK4 عضله دوقلو در پاسخ به کاهش محتوای پروتئینی PDK4 شود [۱۹]. در مطالعه حاضر، ملاحظه شد که بیان mRNA از PDK4، در گروه‌های رزوراترول و تمرین تناوبی بالاتر از گروه‌های بیمار و سالین بود. مهم‌تر از همه، افزایش سطح mRNA مربوط به PDK4 در موش‌های درمان‌شده با ترکیبی از رزوراترول و تمرین به طور معنی‌داری بالاتر از موش‌هایی بود که فقط رزوراترول و یا تمرین داشتند.

چندین مطالعه اثرات مثبت رزوراترول را در ترکیب با تمرینات متفاوت بر تنظیم متابولیسم گلوکز عضله در افراد مسن دیابتی نوع ۲ ارزیابی کردند [۲]. اخیراً یک مطالعه نشان داد که تمرین، رزوراترول و ترکیب این دو با افزایش بیان p-AMPK و SIRT1 اثرات حفاظتی بر روی سارکوپنی، به عنوان سندرم مرتبط با سن دارند [۲۶]. اثرات تنظیم‌کنندگی SIRT1 بر روی هومئوستاز انرژی در عضلات اسکلتی ممکن است نیاز به یک سیگنال فعال در مسیرهای بالایی داشته باشد که از طریق سنسور انرژی AMPK در پاسخ به تحریک رزوراترول تنظیم می‌شود [۱۹]. همچنین افزایش نیازهای انرژی مربوط به تمرین منجر به القای بیان ژن PGC-1 $\alpha$  عضلانی می‌شود که به نوبه خود موجب بیان ژن ERR $\alpha$  می‌شود. ERR $\alpha$  سپس به پروموتور ژن PDK4 متصل می‌شود، جایی که PGC-1 $\alpha$  به طور مستقیم با ERR $\alpha$  برای ایجاد بیان ژن PDK4 همکاری می‌کند [۹].

وانگ و همکاران نشان دادند که بعد از تمرین، mRNA مربوط به PDK4 و PGC-1 $\alpha$  در هر دو نوع تار، پنج تا هشت برابر افزایش می‌یابد [۱۲]. در تحقیق حاضر نیز تغییرات بیان ژن PGC-1 $\alpha$  همسو با نتایج ژن PDK4 بود. تفاوت معنی‌داری در میزان بیان نسبی ژن PGC-1 $\alpha$  عضله دوقلو بین گروه‌های مختلف مشاهده شد ( $P < 0.000$ ). نتایج نشان می‌دهد بیشترین بیان ژن PGC-1 $\alpha$  عضله نعلی و دوقلو در گروه رزوراترول + تمرین تناوبی و کمترین سطوح آن در گروه بیمار و سالین مشاهده شد. برخی تحقیقات نتایجی مخالف تحقیق حاضر را نشان دادند.

گزارش شده که تمرین با شدت بالا، موجب افزایش فراوانی mRNA PGC-1 نسبت به تمرین با شدت کم، با کالری یکسان، شده است و این امر با افزایش سیگنالینگ AMPK و بدون تفاوت

به طور معنی‌داری بیشتر از رزوراترول و تمرین تنها بود (تصویر شماره ۲،  $P < 0.001$ ).

## بحث

در این پژوهش، اثرات مثبت مکمل رزوراترول، تمرین تناوبی و ترکیب آن‌ها بر بیان ژن PDK4 و PGC-1 $\alpha$  در عضله دوقلوی موش‌های مسن مبتلا به دیابت نوع ۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیان ژن PDK4 در عضله دوقلوی موش‌های مسن مبتلا به دیابت نوع کاهش می‌یابد. احتمالاً، کاهش بیان ژن PDK4 به علت افزایش سطح پروتئین آن در افراد دیابتی است [۲۳]. تعدادی از مطالعات قبلی نشان دادند که دیابت همراه با افزایش غلظت PDK4، کاهش بیان ژن آن و عملکرد نامناسب ژن PDK4 است [۹، ۱۱، ۲۴]. PDK4ها توسط هورمون‌های انسولین، گلوکوکورتیکوئیدها، تیروئید و اسیدهای چرب تنظیم می‌شوند. شواهد جدیدی وجود دارد که در چندین اختلال متابولیکی، مانند دیابت، PDK فعالیت کمپلکس پیرووات دهیدروژناز<sup>۱۱</sup> را کاهش می‌دهد [۹، ۱۱].

با توجه به فعالیت تنظیم‌شده PDHa<sup>۱۲</sup> توسط انسولین، گزارش شده است که انسولین فعالیت PDP<sup>۱۳</sup> را افزایش می‌دهد و پروتئین PDK4 موجود در عضلات اسکلتی موش‌ها را کاهش می‌دهد [۲]. با توجه به این مشاهدات، دیده شده که دیابت نوع ۲ منجر به اختلال در تنظیم کاهنده انسولین در PDK4 عضله اسکلتی می‌شود که مهار PDH ناشی از PDK4 و مهار اکسیداسیون گلوکز را که ممکن است به مقاومت انسولینی منجر شود، نشان می‌دهد [۲].

پیشنهاد شده که تأثیر فعالیت نسخه‌برداری PDK4 در دیابت احتمالاً یک استراتژی درمانی بالقوه است [۴، ۲۵]. با توجه به نقش حیاتی این ژن در پاتوژنز دیابت، متابولیسم گلوکز و لیپید و مقاومت به انسولین، این ژن می‌تواند هدفی برای داروهای مختلف در محافظت از متابولیسم گلوکز عضلانی باشد.

در اینجا اثرات رزوراترول، تمرین تناوبی و ترکیب آن‌ها برای افزایش بیان ژن PDK4 در موش‌های دیابتی نوع ۲ مقایسه شد. در مطالعه حاضر، دریافتیم که بیان ژن PDK4 در موش‌های دیابتی پس از تجویز رزوراترول در بافت عضله دوقلو افزایش می‌یابد. به همین ترتیب، مطالعات قبلی نشان دادند که مکمل رزوراترول می‌تواند پیامدهای پیری عضلانی و مقاومت به انسولین را بهبود بخشد [۱۳، ۱۹].

شواهد جمع‌آوری‌شده نشان می‌دهد که رزوراترول، یک

11. Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDC)
12. Pyruvate dehydrogenase
13. Pyruvate dehydrogenase phosphatase

در فعالیت P38 MAPK همراه بوده است [۲۷].

PDK توسط مهارکننده‌های pan-PDK منجر به فعال‌سازی PDC می‌شود که انتخابگر تبدیل گلوکز به لاکتات هستند [۳۱].

تحقیق دیگری نیز نشان داد رونویسی نشانگرهای بالادستی بیوژنز میتوکندریایی (PPAR، PRC، PGC-1) پس از یک جلسه تمرینی کامل در افراد بسیار تمرین کرده بدون تفاوت بین نوع تمرین (سرعتی یا تناوبی) افزایش می‌یابد. جالب توجه است که mRNA مربوط به یک هدف پایین دست PGC-1 (Tfam) تنها پس از تمرین سرعتی افزایش یافت. رونویسی ژن در طی تمرین سرعتی وابسته به کار انجام شده است که احتمالاً مربوط به ضرورت فعال‌شدن سریع تارهای نوع ۲ است [۱۰].

به‌خوبی تأیید شده است که رزوراترول موجب افزایش انتقال / مصرف گلوکز در عضله اسکلتی می‌شود [۳۲]. نشان داده شده که عضله اسکلتی بیماران دیابتی افزایش پاسخ SIRT1 و GLUT4<sup>۱۵</sup> را در پاسخ به مکمل روزانه ۱۲ هفته‌ای با رزوراترول را نشان می‌دهد [۳۳]. همچنین گزارش شده است که مکمل ۱۶ ماهه رزوراترول باعث افزایش جذب گلوکز در عضله‌های تحریک‌شده با انسولین می‌شود [۳۴]. به هر حال، معلوم شده است که فعال‌شدن SIRT1 توسط رزوراترول ممکن است بیان موضعی غشایی GLUT4 را افزایش دهد و در نتیجه بهبود جذب گلوکز در عضله پیر را افزایش دهد. رزوراترول، یک پلی فنول طبیعی در انگور قرمز است که دارای اثرات ضدهیپرگلیسمی شامل تحریک جذب گلوکز و پیشگیری از تغییرات نامطلوب در سیگنالینگ انسولین در عضله اسکلتی می‌شود [۱۹].

وانگ و همکاران در بررسی اثر تمرین تداومی و متناوب بر روی PGC-1 $\alpha$ ، mRNA، و PDK4 در تارهای نوع ۱ و ۲ عضلات اسکلتی انسان به این نتایج رسیدند که بیان ژن‌های نشانگر متابولیسم اکسیداتیو در بین انواع تارها در زمان استراحت متفاوت نبود و بدون در نظر گرفتن تفاوت‌های نوع تار و طریقه تمرین، میزان mRNA مربوط به PGC-1 $\alpha$  و PDK4 در هر دو نوع تار ۱ و ۲ عضلانی بعد از تمرین شدید طولانی متناوب افزایش یافت. فعال‌سازی ژن ناشی از تمرین (افزایش برابر) با سطح پایه mRNA همبستگی معکوس داشت. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که تمرین طولانی (۹۰ دقیقه) بالای ۶۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی (Vo<sub>2</sub>max)، برای فعال‌کردن سیگنال زیستی میتوکندریایی (PGC-1 $\alpha$  mRNA) و ظرفیت اکسیداسیون چربی (PDK4 mRNA) در هر دو نوع تار کافی است.

بنابراین، یافته‌های ما نشان دادند که درمان ترکیبی با مکمل رزوراترول و تمرین تناوبی می‌تواند برای بهبود بیان PDK4 و PGC-1 $\alpha$  و نیز متابولیسم سلول‌های عضلانی آزمودنی‌های مسن مناسب‌تر باشد. گرچه رزوراترول دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است، ترکیب آن با تمرین تناوبی می‌تواند برای کاهش اختلالات ناشی از دیابت نوع ۲ مؤثرتر باشد. با این حال، تعداد کم موش‌ها در زیرگروه‌های پژوهش محدودیت مطالعه ما بود.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج ما نشان داد که ترکیبی از رزوراترول و تمرین تناوبی می‌تواند اثرات مفیدی بر بیان ژن PDK4 و PGC-1 $\alpha$  در عضله دوقلوی موش‌های مسن مبتلا به دیابت نوع ۲ داشته و در نتیجه خطرات ناشی از عوارض دیابت را کاهش دهد.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش توسط کمیته مراقبت از حیوانات و استفاده از آن در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تأیید شده است (شماره مجوز تصویب: R.IAU.SARI.REC.1397.8).

### حامی مالی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری آقای علی صالحی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، دانشکده علوم انسانی با کد ۲۰۸۲۱۴۰۴۹۷۱۰۰۷ است و با هزینه شخصی انجام شده است.

افراد مورد مطالعه در مطالعه آن‌ها افراد بی‌تحرك بودند و نتایج ممکن است برای افراد آموزش‌دیده استقامتی معتبر نباشد [۵]. این در حالی که تمرین مداوم با ۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی تنها تغییرات جزئی در PGC-1 $\alpha$  mRNA را ایجاد کرد [۲۸]. القای ژن بعد از تمرینات مداوم و متناوب هم در مقدار و هم در پاسخ خاص به نوع فیبر شبیه هم بود. در جریان پروتکل تناوبی، تنش متابولیکی کم و مشابه آن در طی تمرین تداومی است. دوره‌های طولانی تمرین با شدت زیاد با اختلال متابولیسم بیشتر، ممکن است یک پروتکل کارآمد در تحریک بیوژنز میتوکندری نسبت به پروتکل تناوبی باشد [۵].

درک تنظیم PDK4 مهم است؛ زیرا این فرصت را برای مداخله در درمان دیابت نوع ۲ را که در حال حاضر ۶ درصد از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار خود قرار داده و طبق گزارشات با سرعت پیشرفت می‌کند، فراهم می‌کند. در حال حاضر تنظیم PDK4 در درجه اول، در سطح بیان ژن و تعامل پروتئین PDK با عوامل آلوستریک مطالعه شده است. مطالعات نشان داده است که فعالیت PDK4 نیز با تعامل سوبسترای پروتئینی کمپلکس پیرووات دهیدروژناز (PDC) تنظیم می‌شود [۲۹]. این امر، همراه با این واقعیت است که ارتباط متقابل پروتئین - پروتئین نقش مهمی در تنظیم فعالیت‌های پروتئین هدف و هوموستاز سلولی را ایفا می‌کند [۳۰]. روچه و هیروماسا نشان دادند که مهار فعالیت

15. Glucose transporter type 4

### مشارکت نویسندگان

اجرای پروتکل: علی صالحی و هاجر عباسزاده؛ بازبینی نهایی مقاله: همه نویسندگان؛ ایده اصلی: علی صالحی؛ آنالیز داده‌ها: هاجر عباسزاده؛ اجرای مطالعه و تدوین دست‌نوشته: پروین فرزاتگی.

### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی ندارد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله، از مسئولان آزمایشگاه حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری به دلیل همکاری‌هایشان سپاسگزاری می‌کنند.

## References

- [1] Gray DWR, Titus N, Badet L. Islet cell transplantation for insulin-dependent diabetes mellitus: Perspectives from the present and prospects for the future. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2000; 2(6):1-28. [DOI:10.1017/S146239940001861] [PMID]
- [2] Biensø RS, Olesen J, Gliemann L, Schmidt JF, Matzen MS, Wojtaszewski JF, et al. Effects of exercise training on regulation of skeletal muscle glucose metabolism in elderly men. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2015; 70(7):866-72. [DOI:10.1093/gerona/glv012] [PMID]
- [3] Traub O, Van Bibber R. Role of nitric oxide in insulin-dependent diabetes mellitus-related vascular complications. *Western Journal of Medicine*. 1995; 162(5):439-45. [PMID] [PMCID]
- [4] Jeoung NH. Pyruvate dehydrogenase kinases: Therapeutic targets for diabetes and cancers. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2015; 39(3):188-97. [DOI:10.4093/dmj.2015.39.3.188] [PMID] [PMCID]
- [5] Wang L, Sahlin K. The effect of continuous and interval exercise on PGC-1 $\alpha$  and PDK4 mRNA in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *Acta Physiologica*. 2012; 204(4):525-32. [DOI:10.1111/j.1748-1716.2011.02354.x] [PMID]
- [6] Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical Journal*. 1998; 329(Pt 1):191-6. [DOI:10.1042/bj3290191] [PMID] [PMCID]
- [7] Zhang Sh, Hulver MW, McMillan RP, Cline MA, Gilbert ER. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutrition & Metabolism*. 2014; 11:10. [DOI:10.1186/1743-7075-11-10] [PMID] [PMCID]
- [8] Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*. 2003; 24(1):78-90. [DOI:10.1210/er.2002-0012] [PMID]
- [9] Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V, Kelly DP. PGC-1 $\alpha$  coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERR $\alpha$ : A mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25(24):10684-94. [DOI:10.1128/MCB.25.24.10684-10694.2005] [PMID] [PMCID]
- [10] Niklas P, Li W, Jens W, Michail T, Kent S. Mitochondrial gene expression in elite cyclists: Effects of high-intensity interval exercise. *European Journal of Applied Physiology*. 2010; 110(3):597-606. [DOI:10.1007/s00421-010-1544-1] [PMID]
- [11] Lee IK. The role of pyruvate dehydrogenase kinase in diabetes and obesity. *Diabetes & Metabolism Journal*. 2014; 38(3):181-6. [DOI:10.4093/dmj.2014.38.3.181] [PMID] [PMCID]
- [12] Wang L, Mascher H, Psilander N, Blomstrand E, Sahlin K. Resistance exercise enhances the molecular signaling of mitochondrial biogenesis induced by endurance exercise in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2011; 111(5):1335-44. [DOI:10.1152/jappphysiol.00086.2011] [PMID]
- [13] Movahed A. [Beneficial effects of resveratrol on reducing blood glucose and insulin resistance in T2DM (Persian)]. *Iranian South Medical Journal*. 2016; 19(1):155-66. [DOI:10.7508/ismj.1395.01.013]
- [14] Nasri S. [The effect of Resveratrol flavonoid on learning and memory in passive avoidance and Y maze in diabetic rat (Persian)]. *Iranian South Medical Journal*. 2014; 17(1):11-20. <http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-500-en.html>
- [15] Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M, Crowell JA, Perloff M, Booth TD, et al. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: Safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Research*. 2010; 70(22):9003-11. [DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-2364] [PMID] [PMCID]
- [16] Shang J, Chen LL, Xiao FX, Sun H, Ding HC, Xiao H. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2008; 29(6):698-706. [DOI:10.1111/j.1745-7254.2008.00807.x] [PMID]
- [17] Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: Activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. *European Journal of Pharmacology*. 2008; 591(1-3):66-72. [DOI:10.1016/j.ejphar.2008.06.067] [PMID]
- [18] Mohajeri D, Monadi AR, Mousavi Gh, Rezaei Saber AP. [Cardioprotective effect of resveratrol on isoproterenol-induced experimental myocardial infarction in rat (Persian)]. *Veterinary Clinical Pathology*. 2014; 8(3):537-48. <https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?ID=253770>
- [19] Sin TK, Yung BY, Siu PM. Modulation of SIRT1-Foxo1 signaling axis by resveratrol: Implications in skeletal muscle aging and insulin resistance. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015; 35(2):541-52. [DOI:10.1159/000369718] [PMID]
- [20] Linden MA, Fletcher JA, Matthew Morris E, Meers GM, Harold Laughlin M, Booth FW, et al. Treating NAFLD in OLETF rats with vigorous-intensity interval exercise training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2015; 47(3):556-67. [DOI:10.1249/MSS.0000000000000430] [PMID] [PMCID]
- [21] Mozafari M, Nekooeian AA, Panjeshahin MR, Zare HR. The effects of resveratrol in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension: A study of antihypertensive mechanisms. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2015; 40(2):152-60. [PMID] [PMCID]
- [22] Delaviz H, Davoudi P, Sharif Talebian Pour M, Rad P, Sadeghi H. [The effect of resveratrol on fetal heart tissue changes after preeclampsia induced by L-name in rats (Persian)]. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*. 2015; 23(7):669-78. <http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-3222-en.html>
- [23] Aminizadeh S, Habibi A, Marefati H, Shakerian S. [The role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4) on the expression of citrate synthase in the skeletal muscle After 4 weeks of endurance training in male wistar rats (Persian)]. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2017; 16(3):191-202. <http://journal.rums.ac.ir/article-1-3660-en.html>
- [24] Tao R, Xiong X, Harris RA, White MF, Dong XC. Genetic inactivation of pyruvate dehydrogenase kinases improves hepatic insulin resistance induced diabetes. *PLoS One*. 2013; 8(8):e71997. [DOI:10.1371/journal.pone.0071997] [PMID] [PMCID]
- [25] Dlamini Z, Ntlabati P, Mbita Z, Shoba-Zikhali L. Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 (PDK4) could be involved in a regulatory role in apoptosis and a link between apoptosis and insulin resistance. *Experimental and Molecular Pathology*. 2015; 98(3):574-84. [DOI:10.1016/j.yexmp.2015.03.022] [PMID]
- [26] Liao ZY, Chen JL, Xiao MH, Sun Y, Zhao YX, Pu D, et al. The effect of exercise, resveratrol or their combination on Sarcopenia in aged rats via regulation of AMPK/Sirt1 pathway. *Experimental Gerontology*. 2017; 98:177-83. [DOI:10.1016/j.exger.2017.08.032] [PMID]
- [27] Egan B, Carson BP, Garcia-Roves PM, Chibalin AV, Sarsfield FM, Barron N, et al. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human

- skeletal muscle. *The Journal of Physiology*. 2010; 588(Pt 10):1779-90. [DOI:10.1113/jphysiol.2010.188011] [PMID] [PMCID]
- [28] Nordsborg NB, Lundby C, Leick L, Pilegaard H. Relative workload determines exercise-induced increases in PGC-1 $\alpha$  mRNA. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2010; 42(8):1477-84. [DOI:10.1249/MSS.0b013e3181d2d21c] [PMID]
- [29] Connaughton S, Chowdhury F, Attia RR, Song S, Zhang Y, Elam MB, et al. Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase isoform 4 (PDK4) gene expression by glucocorticoids and insulin. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010; 315(1-2):159-67. [DOI:10.1016/j.mce.2009.08.011] [PMID] [PMCID]
- [30] Sugden MC, Holness MJ. Interactive regulation of the pyruvate dehydrogenase complex and the carnitine palmitoyltransferase system. *The FASEB Journal*. 1994; 8(1):54-61. [DOI:10.1096/fasebj.8.1.8299890] [PMID]
- [31] Roche TE, Baker JC, Yan X, Hiromasa Y, Gong X, Peng T, et al. Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2001; 70:33-54,IN1-IN2,55-75. [DOI:10.1016/S0079-6603(01)70013-X]
- [32] Minakawa M, Kawano A, Miura Y, Yagasaki K. Hypoglycemic effect of resveratrol in type 2 diabetic model db/db mice and its actions in cultured L6 myotubes and RIN-5F pancreatic  $\beta$ -cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2011; 48(3):237-44. [DOI:10.3164/jcbn.10-119] [PMID] [PMCID]
- [33] Goh KP, Lee HY, Lau DP, Supaat W, Chan YH, Koh AF. Effects of resveratrol in patients with type 2 diabetes mellitus on skeletal muscle SIRT1 expression and energy expenditure. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2014; 24(1):2-13. [DOI:10.1123/ijsnem.2013-0045] [PMID]
- [34] Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, et al. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS One*. 2008; 3(6):e2264. [DOI:10.1371/journal.pone.0002264] [PMID] [PMCID]