



## تأثیر ورزش هوازی و مصرف عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک بر شاخص‌های آتروفی عضلانی در رت‌های دیابتی نوع ۲

**معراج مژده:** گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
**مقصود پیری:** گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (\* نویسنده مسئول) [M.peeri@iauctb.ac.ir](mailto:M.peeri@iauctb.ac.ir)  
**محمد علی آذربایجانی:** گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

دیابت،  
تمرین هوازی،  
عصاره خارخاسک،  
آتروفی عضلانی،  
فشار اکسیداتیو

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۰

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۰۳/۰۷

**زمینه و هدف:** آتروفی عضلات در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ باعث کاهش عملکرد عضلانی، عدم توانایی انجام فعالیت‌های روزمره و کاهش کیفیت زندگی می‌شود. هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر ورزش هوازی و مصرف عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک بر شاخص‌های آتروفی عضلانی در رت‌های دیابتی نوع ۲ بود.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، ۴۲ سر رت نر ویستار به‌طور تصادفی در ۷ گروه قرار گرفتند. دگزامتازون (۷۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم در روز) به صورت داخل صفاقی به رت‌ها تزریق شد. رت‌ها با استفاده از تزریق درون صفاقی نیکوتین آمید-استریتوزوتوسین (دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، دیابتی نوع ۲ شدند. رت‌ها در گروه‌های مکمل، عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک با دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز به روش گاواژ دریافت کردند. تمرین هوازی روی تردمیل با سرعت ۲۳ متر در دقیقه، ۳۰ دقیقه در روز، ۵ روز در هفته و به مدت هشت هفته اجرا گردید. ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، حیوانات فدا شده و عضله نعلی موش‌ها جمع‌آوری شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که تمرین هوازی، عصاره خارخاسک و مداخله ترکیبی عصاره خارخاسک با تمرین هوازی منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های Atrogin-1 ( $p=0/001$ )، MURF-1 ( $p=0/001$ ) و MiR-29b ( $p=0/001$ )، همچنین افزایش معنی‌دار سطوح متیل گوانین ( $p=0/001$ ) و تعادل اکسیدانت-پرواکسیدانت (PAB) ( $p=0/001$ ) در رت‌های نر ویستار قرار گرفته در معرض دگزا متازون شد.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد مداخله ترکیبی عصاره خارخاسک با تمرین هوازی می‌تواند از طریق کاهش بیان ژن‌های درگیر در آتروفی عضلانی به بهبود شرایط طی دیابت کمک نماید.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی ندارد.

شيوه استناد به این مقاله:

Mojdeh M, Peeri M, Azarbayjani MA. The Effect of Aerobic Training and Tribulus Terrestris Hydroalcoholic Extract Consumption on Muscle Atrophy Indices in Type 2 Diabetic Rats. Razi J Med Sci. 2022;29(3):37-48.

\*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.



Original Article

## The Effect of Aerobic Training and Tribulus Terrestris Hydroalcoholic Extract Consumption on Muscle Atrophy Indices in Type 2 Diabetic Rats

**Meraj Mojdeh:** Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Maghsoud Peeri:** Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (\*Corresponding author) [m.peeri@iauctb.ac.ir](mailto:m.peeri@iauctb.ac.ir)

**Mohammad Ali Azarbayjani:** Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** Diabetes is one of the most common metabolic diseases worldwide. The disease affects millions of people around the world and its prevalence is increasing rapidly. Muscle atrophy eventually leads to changes in intracellular signaling pathways that are involved in maintaining a balance between protein synthesis and breakdown. Muscle atrophy in patients with type 2 diabetes reduces muscle function, interrupts daily activities, and reduces the quality of life. The aim of this study was to evaluate the effect of aerobic training and Tribulus terrestris hydroalcoholic extract consumption on Muscle Atrophy Indices in type 2 diabetic rats.

**Methods:** This experimental research was performed with 42 male Wistar rats that were randomly divided into seven groups. Dexamethasone (750 µg/kg/day) was injected intraperitoneally into rats. Rats were type 2 diabetic using peritoneal injection nicotinamide-STZ (60 µg/kg). Rats in supplemented groups received Tribulus terrestris hydroalcoholic extract with doses of 5 and 10 mg per day by gavage method. Aerobic training was performed on a treadmill at a speed of 23 m/min, 30 min/day, 5 days/week for eight weeks. 24 hours after the last training session, rat soleus muscle was collected. 24 hours after the last training session, the mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine [90 mg / kg] and xylazine [10 mg / kg], then a sample of horseshoe muscle tissue was collected. Horseshoe muscle tissue was isolated and after washing with PBS solution was immediately frozen in liquid nitrogen (-196 ° C) and then stored at -80 ° C. Concentration of 6-methylguanine using DLdevelop ELISA kit from Canada with detection range of 1000-125 pg / ml, sensitivity 27 pg / ml and coefficient of variation of 10-12%, expression level of Atrogin-1, MURF-1 and MiR-29b was measured by Real-time PCR and PAB horseshoe tissue was measured by immunoassay. Shapiro-Wilk test was used to ensure the normal distribution of variables. Two-way analysis of variance and Bonferroni post hoc test were used to compare the mean changes of the studied factors in the groups. Significance level was considered  $p \leq 0.05$  in all cases. All statistical operations were performed with SPSS software version 23.

**Results:** The results showed that aerobic training, Tribulus extract and combined intervention of Tribulus extract with aerobic training resulted in a significant decrease in the expression genes of Atrogin-1 ( $p=0.001$ ), MURF-1 ( $p=0.001$ ) and MiR-29b ( $p=0.001$ ), as well as a significant increase in methyl guanine ( $p=0.001$ ) and oxidant-prooxidant balance (PAB) ( $p=0.001$ ) levels in male wistar rats exposed to dexamethasone. Therefore, administration of Tribulus terrestris extract along

### Keywords

Diabetes,  
Aerobic training,  
Tribulus terrestris,  
Muscle Atrophy,  
Oxidative stress

Received: 09/04/2022

Published: 28/05/2022

with aerobic exercise may be useful and effective due to the antioxidant effects of Tribulus terrestris and aerobic exercise, as well as their effect on the elimination of destructive metabolites and the expression of genes involved in muscle atrophy in diabetes. One of the limitations of the present study is the lack of measurement of other factors related to oxidative stress in skeletal muscle. Measuring signaling pathways such as PKC pathway regulation can also more clearly show the effects of physical activity on the transcription factors involved in skeletal muscle atrophy in people with diabetes. However, more research is needed in this area.

**Conclusion:** The results of the present study showed that aerobic exercise significantly reduced the expression of Atrogin-1, MURF-1 and MiR-29b genes as well as significantly increased levels of O-6-methyl guanine-DNA-methyltransferase and oxidant-prooxidant (PAB) balance in rats. Became type 2 diabetic. Diabetes is widely and closely related to oxidative stress due to the intensification of the formation of oxygen free radicals. Various studies have shown that high blood sugar is associated with increased oxidative stress and this leads to many complications of the disease. In summary, the results of the present study showed that aerobic exercise, Tribulus terrestris extract and combined intervention of Tribulus terrestris extract with aerobic exercise reduced the expression of genes involved in muscle atrophy, as well as increased oxidant-prooxidant balance in male Wistar rats exposed to dexamethasone. Therefore, according to the results, it seems that the combined intervention of Tribulus terrestris extract with aerobic exercise can help improve the condition during diabetes by reducing the expression of genes involved in muscle atrophy. It is suggested that in the future, a study be conducted on the effect of different doses of Tribulus terrestris extract and exercise on signaling pathways affecting muscle atrophy in type 2 diabetic subjects. It seems that the combined intervention of Tribulus terrestris extract with aerobic exercise can help improve the condition during diabetes by reducing the expression of genes involved in muscle atrophy.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Mojdeh M, Peeri M, Azarbayjani MA. The Effect of Aerobic Training and Tribulus Terrestris Hydroalcoholic Extract Consumption on Muscle Atrophy Indices in Type 2 Diabetic Rats. Razi J Med Sci. 2022;29(3):37-48.

**\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.**

## مقدمه

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های متابولیکی در سراسر جهان است. این بیماری میلیون‌ها نفر در سراسر جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و شیوع آن به سرعت در حال افزایش است (۱). شواهد حاکی از آن است که دیابت با توسعه عوارض ثانویه در اندام‌های مختلف به‌ویژه آتروفی عضلات اسکلتی همراه است (۲). آتروفی عضله ناشی از عدم تعادل در سنتز و تخریب پروتئین‌های انقباضی است که می‌تواند طی شرایط مختلف از جمله دیابت نوع ۲ تشدید شود (۳). آتروفی عضلانی در نهایت منجر به تغییر مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی می‌شود که در حفظ تعادل بین سنتز و تجزیه پروتئین نقش دارند (۴). مسیرهای پروبیوتیک مانند یوبی کوئیتین-پروتئوزوم، لیزوزوم-توفاژی و کاسپاز-۳ مسئول تخریب پروتئین در عضلات هستند و به این ترتیب به آتروفی عضلانی کمک می‌کنند (۵).

مشخص شده است که ژن‌های مختلفی که به‌طور کلی آتروژن نامیده می‌شوند، در آتروفی عضلانی نقش دارند. MuRF1 و Atrogin-1 از جمله این اتروژن‌ها و جزء کلیدی سیستم یوبی کوئیتین-پروتئوزوم هستند که توسط عوامل رونویسی مربوط به آتروفی فعال می‌شوند (۶). MuRF1 و Atrogin-1 به عنوان دو لیگاز E3 ubiquitin و یوبی کوئیتین عضلانی شناسایی شدند که در عضله اسکلتی تحت شرایط آتروفی عضلانی افزایش می‌یابند (۷). مطالعات نشان داده‌اند که القا دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین (STZ) در جوندگان با افزایش Atrogin-1 و MuRF1 mRNA در عضله اسکلتی همراه است که حاکی از نقش احتمالی لیگاز E3 در آتروفی عضلانی اسکلتی ناشی از دیابت می‌باشد (۸). آتروفی عضلانی ناشی از دیابت موجب تغییر در متابولیسم پروتئین و ساختار عضله اسکلتی می‌شود (۹). از طرفی، مشخص شده است که برخی از microRNAs به عنوان مولکول‌های تنظیم‌کننده فرآیند رونویسی در آتروفی عضلات اسکلتی نقش دارند. در همین راستا، گزارش شده است که miR-29 با افزایش آتروفی عضلات اسکلتی در پاسخ به محرک‌های مختلف آتروفیک همراه است (۱۰، ۱۱). روش‌های مختلفی برای کاهش آتروفی عضلات اسکلتی پیشنهاد شده است. نشان داده شده است که تمرینات ورزشی منظم به کاهش آتروفی

عضلات اسکلتی کمک می‌کنند. لیو و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند تمرینات ورزشی با شدت متوسط به مدت ۸ هفته مانع از کاهش توده عضلانی در موش‌های دیابتی نوع ۲ شد. همچنین مهار Murf-1 در موش‌های دیابتی نوع ۲ به دنبال تمرین مشاهده شد. افزایش سطوح miR-29 نیز متعاقب تمرین گزارش گردید (۱۲). با این حال، گانکالویس و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که ۸ هفته تمرین هوازی تأثیر معنی‌داری بر Murf-1 و MAFBx/Atrogin-1 در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی نداشت (۱۳). افزون بر این، تغییرات شرایط ردوکس سلول‌های نرمال ممکن است باعث ایجاد اثرات سمی از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیدها شود که می‌تواند به‌طور بالقوه منجر به آسیب پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA سلول شود (۱۴). یکی از مراحل ترمیم DNA برداشت متیل از اتم O6-methylguanine ایجاد شده تحت تأثیر عوامل آلکیله کننده می‌باشد (۱۵). اثرات مثبت تمرین بدنی بر بهبود نسبت پرواکسیدان‌ها-آنتی اکسیدان‌ها و عوامل درگیر در بیوژنز میتوکندریایی نشان شده است (۱۶). با این حال، نتایج یوسف پور و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد ۸ هفته تمرین تناوبی شدید بر میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی بافت کبدی موش‌های صحرایی تأثیر نداشت (۱۷).

گیاه خارخاسک با نام علمی تریبولوس ترستریس (*Tribulus terrestris*) یک گیاه بوته ای بومی مناطق گرمسیری کویری و حاره است که حاوی آلکالوئید، پلی فنلها، فلاونوئیدها و مواد معدنی مانند کلسیم، فسفر، آهن، سدیم، پتاسیم، گوگرد، ازت و کلر قندهایی مانند گلوکز، آرابینوز و همچنین ساپونینهای استروئیدی و اسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید است (۱۸). مشخص شده عصاره گیاه خارخاسک دارای خاصیت هیپوگلیسمیک و هیپولیپیدمیک در مدل تجربی دیابت قندی القاء شده توسط استرپتوزوتوسین می‌باشد (۱۹). تجویز خوراکی خارخاسک می‌تواند برخی از شاخص‌های پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو بافت مغزی را در موش‌های صحرایی دیابتی کاهش دهد و در جلوگیری از برخی بیماری‌های عصبی ناشی از تشدید استرس اکسیداتیو مؤثر می‌باشد (۲۰). با این حال تاکنون اثرات این گیاه بر آسیب‌های اکسایشی عضلات

اسکلتی بررسی نشده است.

کاهش کیفی عضلات در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ باعث کاهش عملکرد عضلانی، عدم توانایی انجام فعالیت‌های روزمره و کاهش کیفیت زندگی می‌شود و در نهایت ممکن است خطر مرگ و میر زودرس را افزایش دهد (۲). فعالیت‌های بدنی منظم برای بهبود سلامت انسان مهم است به طوری که فعالیت بدنی منظم جزء ضروری از یک شیوه زندگی سالم است و به پیشگیری و درمان بیماری‌های مزمن مانند بیماری دیابت می‌کند. همانطور که ذکر شد، عدم تعادل بین عوامل پرواکسیدانت و آنتی اکسیدانت باعث افزایش مارکرهای استرس اکسیداتیو خواهد شد از طرفی آنروفی عضلانی همراه با عدم فعالیت می‌تواند ظرفیت انجام فعالیت‌های زندگی روزمره و کیفیت زندگی را در بیماران دیابتی تحت تأثیر قرار دهد. نتایج پژوهش‌ها در زمینه تأثیر تمرین بر عوامل آنروفی عضلانی متناقض می‌باشد همچنین تاکنون پژوهشی به تأثیر همزمان تمرین هوازی و مصرف عصاره گیاه خارخاسک بر شاخص‌های آنروفی عضلانی در آزمودنی‌های دیابتی نپرداخته است. بنابراین پژوهش حاضر قصد دارد به بررسی این سوال بپردازد که آیا ۸ هفته تمرین هوازی و مصرف عصاره گیاه خارخاسک بر شاخص‌های آنروفی عضلانی در رت‌های دیابتی نوع ۲ تأثیر دارد؟

## روش کار

در یک مطالعه تجربی ۴۲ سر رت نر نژاد ویستار از موسسه انستیتو پاستور تهران شدند. پس از انتقال رت‌ها به حیوان خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، رت‌ها به مدت یک هفته جهت تطابق با محیط جدید، بدون دریافت هیچ نوع مداخله‌ای در قفس‌های ویژه نگهداری شدند. پس از یک هفته آشنایی با محیط جدید، رت‌ها به صورت تصادفی به ۷ گروه شامل (۱) کنترل (مسموم شده با دگزامتازون بدون دریافت عصاره گیاه خارخاسک)، (۲) تمرین هوازی، (۳) تمرین هوازی - عصاره گیاه خارخاسک ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز، (۴) تمرین هوازی - عصاره گیاه خارخاسک ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز، (۵) عصاره گیاه خارخاسک ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز، (۶)

عصاره گیاه خارخاسک ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز، (۷) کنترل سالم (هر گروه ۶ سر رت) تقسیم شدند. گروه‌های مورد مطالعه در قفسه‌های مخصوص جوندگان از جنس PVC با درپوش توری فلزی که کف آن‌ها با تراشه‌های تمیز چوب پوشانده شده بود، تقسیم شدند. دمای اتاق ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت معادل ۵۰-۴۰ درصد، سیکل روشنایی - تاریکی ۱۲:۱۲ بود و همگی به شکل آزادانه به غذای استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی و آب دسترسی داشتند. کلیه اصول اخلاقی مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی (برابر پروتکل هلیسنکی ۲۰۰۶) و مطالعات انسانی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت.

**القای دیابت نوع ۲:** در این مطالعه برای القای دیابت نوع ۲، از روش تزریق درون صفاقی نیکوتین آمید - STZ با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استفاده شد. ۷۲ ساعت پس از القای دیابت، غلظت گلوکز خون با استفاده از نمونه‌های خونی جمع‌آوری شده از دم حیوانات و با استفاده از گلوکومتر (مدل mini-۱، ۰.۱ ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد. قند خون بالای ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی لیتر به عنوان معیاری برای اطمینان از ابتلای موش‌ها به دیابت نوع ۲ در نظر گرفته شد (۲۱).

## القاء آنروفی عضلانی از طریق تزریق

**دگزامتازون:** دگزامتازون (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) به صورت داخل صفاقی بین ساعت ۱۰ تا ۱۱ صبح (گروه‌های ۱ تا ۶) به رت‌ها تزریق شد. دوز و دوره درمان دگزامتازون بر اساس روش فاپی و همکاران (۲۰۱۹) اجرا شد (۲۲).

**آماده‌سازی عصاره:** موش‌ها در گروه‌های مکمل، عصاره هیدروالکلی گیاه خارخاسک با دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز به روش گاواژ دریافت کردند (۲۳).

**برنامه تمرینی:** گروه‌های تمرین پس از آشناسازی ۵ روزه، تمرینات هوازی روی تردمیل با سرعت ۲۳ متر در دقیقه، ۳۰ دقیقه در روز، ۵ روز در هفته و به مدت هشت هفته انجام دادند. پروتکل تمرین ورزشی حاضر بین ساعت ۶.۰۰ و ۸.۰۰ صبح اجرا شد (۲۴).

بافت برداری و سنجش‌های بافتی: ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، موش‌ها به‌وسیله تزریق درون صفاقی کتامین ۹۰ mg/kg و زایلازین ۱۰ mg/kg بی‌هوش شده، سپس نمونه بافت عضله نعلی موش‌ها جمع‌آوری شد. بافت عضله نعلی رت‌ها جدا شده و بعد از شستن با محلول PBS بدون فاصله در نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) منجمد شده و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. میزان غلظت 6-methylguanin با استفاده از کیت الیزا شرکت DLdevelop کشور کانادا با دامنه تشخیص ۵۰۰۰-۱۲۵ پیکوگرم بر میلی لیتر، حساسیت ۲۷ پیکوگرم بر میلی لیتر و ضریب تغییرات ۱۰-۱۲٪، میزان بیان ژن Atrogin-1، MURF-1 و MiR-29b با استفاده از روش Real-time PCR و PAB بافت عضله نعلی با

استفاده از روش ایمونوسنجی اندازه‌گیری شد.

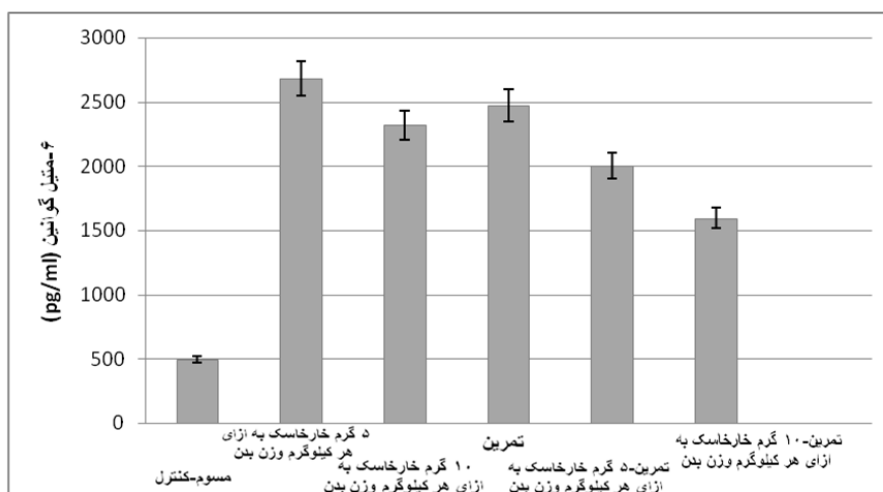
نتایج نشان می‌دهد تمرین ( $\mu=0/834$ ،  $P=0/001$ )، عصاره گیاه خارخاسک ( $\mu=0/903$ ،  $F=150/320$ ) و تعامل تمرین و عصاره گیاه خارخاسک ( $\mu=0/953$ ،  $F=139/781$ ،  $P=0/001$ ) اثر معنی‌داری بر میزان Atrogin-1 عضله نعلی داشت. میزان Atrogin-1 عضله نعلی بین گروه عصاره خارخاسک با دوز ۵ و ۱۰ گرم تفاوت معنی‌داری داشت ( $P=0/001$ )، همچنین میزان Atrogin-1 عضله نعلی با دوز ۵ و ۱۰ گرم به‌طور معناداری کمتر از گروه کنترل بود ( $P=0/0001$ ) (شکل ۲).

**روش آماری:** برای اطمینان از طبیعی بودن توزیع متغیرها، از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. جهت بررسی مقایسه میانگین تغییرات عوامل مورد بررسی در گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس دو طرفه و آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. سطح معنی‌داری در همه موارد  $p \leq 0/05$  در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با نرم‌افزارهای SPSS با نسخه ۲۳ به اجرا درآمد.

نتایج نشان می‌دهد تمرین ( $\mu=0/873$ ،  $P=0/001$ )، عصاره گیاه خارخاسک ( $\mu=0/911$ ،  $F=206/476$ ) و تعامل تمرین و عصاره گیاه خارخاسک ( $\mu=0/981$ ،  $F=152/666$ ،  $P=0/001$ ) اثر معنی‌داری بر میزان MURF-1 عضله نعلی داشت. میزان MURF-1 عضله نعلی بین گروه عصاره

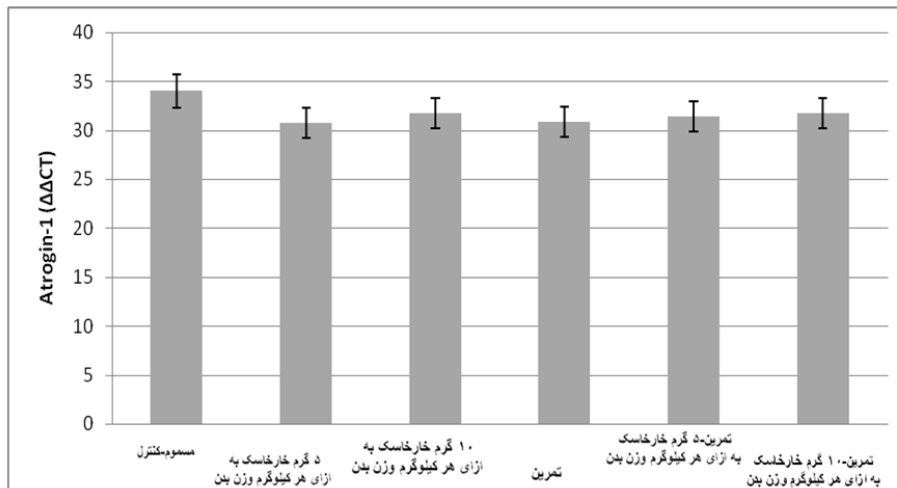
## یافته‌ها

نتایج نشان می‌دهد تمرین ( $\mu=0/626$ ،  $P=0/001$ )،

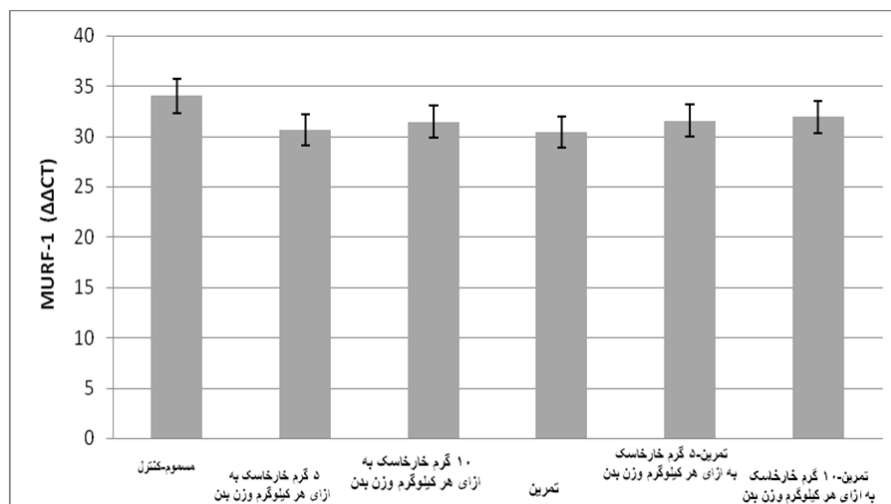


شکل ۱- غلظت متیل گوانین بافت عضله نعلی در گروه‌های مورد مطالعه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.





شکل ۲- میزان بیان ژن Atrogin-1 عضله نعلی در گروه‌های مورد مطالعه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

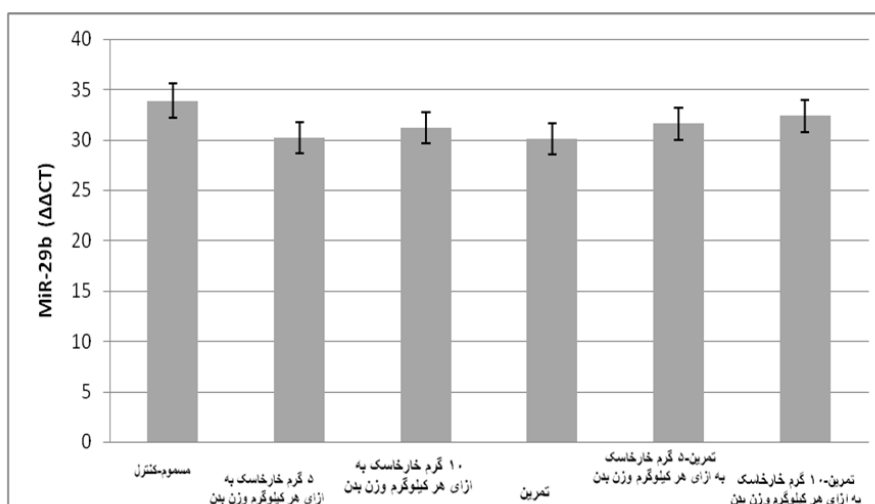


شکل ۳- بیان ژن MURF-1 بافت عضله نعلی در گروه‌های مورد مطالعه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

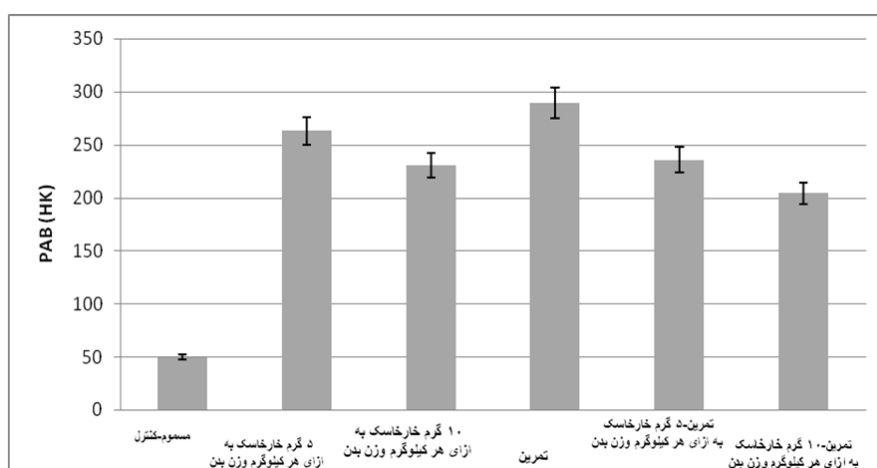
بود ( $P=0/0001$ ) (شکل ۴). نتایج نشان می‌دهد تمرین ( $\mu=0/975$ ,  $P=0/001$ ), عصاره گیاه خارخاسک ( $\mu=0/978$ ,  $F=1183/204$ ), و تعامل تمرین و عصاره گیاه خارخاسک ( $\mu=0/994$ ,  $F=662/237$ ,  $P=0/001$ ) اثر معنی‌داری بر میزان PAB عضله نعلی داشت. میزان PAB عضله نعلی بین گروه عصاره خارخاسک با دوز ۵ و ۱۰ گرم تفاوت معنی‌داری داشت ( $P=0/001$ ). همچنین میزان PAB عضله نعلی با دوز ۵ و ۱۰ گرم به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل بود ( $P=0/0001$ ) (شکل ۵).

خارخاسک با دوز ۵ و ۱۰ گرم تفاوت معنی‌داری داشت ( $P=0/001$ ). همچنین میزان MURF-1 عضله نعلی با دوز ۵ و ۱۰ گرم به‌طور معناداری کمتر از گروه کنترل بود ( $P=0/0001$ ) (شکل ۳).

نتایج نشان می‌دهد تمرین ( $\mu=0/807$ ,  $P=0/001$ ), عصاره گیاه خارخاسک ( $\mu=0/957$ ,  $F=125/769$ ), و تعامل تمرین و عصاره گیاه خارخاسک ( $\mu=0/993$ ,  $F=2098/553$ ,  $P=0/001$ ) اثر معنی‌داری بر میزان MiR-29b عضله نعلی داشت. میزان MiR-29b عضله نعلی بین گروه عصاره خارخاسک با دوز ۵ و ۱۰ گرم تفاوت معنی‌داری داشت ( $P=0/001$ ). همچنین میزان MiR-29b عضله نعلی با دوز ۵ و ۱۰ گرم به‌طور معناداری کمتر از گروه کنترل



شکل ۴- بیان MiR-29b بافت عضله نعلی در گروه‌های مورد مطالعه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.



شکل ۵- میزان PAB بافت عضله نعلی در گروه‌های مورد مطالعه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

## بحث

ورزش موقتی است و این یافته مربوط به القای برخی سازگاری‌های سلامت ویژه شرایط ردوکس می‌باشد به طوری که سازگاری سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن نتیجه تمرینات ورزشی است (۲۸). این سازگاری متعاقب تمرینات موجب تعادل در بافت‌های مختلف بدن به ویژه عضلات اسکلتی می‌شود و احتمالاً اثر مثبتی بر تنظیم بیان ژن‌های درگیر در آتروفی عضله اسکلتی داشته باشد. همچنین در خصوص سازوکارهای موثر بر تغییرات بیان ژن Atrogin-1 و MuRF1 در عضله گزارش شده که بیان این ژن‌ها توسط دو عامل رونویسی تنظیم می‌شود: FoxO و NF-κB. یافته‌ها نشان می‌دهند که افزایش در فعالیت NF-κB برای افزایش ناشی از IκKB در رونویسی MuRF1 ضروری است و تغییرات توده عضلانی ناشی از فعال شدن

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین هوایی موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن Atrogin-1، MURF-1 و MiR-29b همچنین افزایش معنی‌دار سطوح A-6-متیل گوانین-DNA-متیل ترانسفراز و تعادل اکسیدانت-پرواکسیدانت (PAB) در رت‌های دیابتی نوع ۲ شد. دیابت ارتباط گسترده و نزدیکی با استرس اکسیداتیو ناشی از تشدید تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که افزایش قندخون با افزایش استرس اکسیداتیو همراه می‌باشد و همین موضوع بسیاری از عوارض بیماری را به دنبال دارد (۲۶، ۲۵). مطالعات نشان می‌دهند که یک سبک زندگی سالم با فعالیت بدنی منظم به کنترل وضعیت اکسیداتیو در افراد دیابتی کمک می‌کند (۲۷). ROS ناشی از



پنج جلسه در هفته تمرین کردند. نتایج آنها نشان داد که هیچ گونه تغییری در وضعیت فاکتورهای آتروفی مانند MuRF1 ایجاد نشده است (۳۸). احتمالاً عدم همخوانی نتایج این تحقیق با یافته فوق، نوع آزمودنی‌ها و همچنین مدت انجام پروتکل تمرین باشد در پژوهش آن‌ها بیان ژن MuRF1 در موش‌های سالم و در پژوهش حاضر بیان ژن MuRF1 در رت‌های دیابتی نوع ۲ اندازه‌گیری شد. همچنین یافته‌های گانکالویس و همکاران نشان داد که ۸ هفته تمرین (دویدن روی تردمیل) تأثیر معنی‌داری بر Murf-1 و MAFBx/Atrogin-1 در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی سالم نداشت (۳۹). تناقض با یافته‌های فوق احتمالاً به سالم بودن آزمودنی‌ها مربوط می‌باشد به طوری که در پژوهش حاضر نمونه‌های دیابتی مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این، عدم تغییر معنادار بیان miR-29b در پاسخ به تمرینات شنای هوازی کم شدت طولانی مدت در رت‌های ماده نشان داده شده است (۴۰). دلیل تناقض با یافته‌های فوق احتمالاً به نوع شدت کم تمرین مربوط می‌باشد.

همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که عصاره گیاه خارخاسک موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن Atrogin-1، MURF-1 و MiR-29b همچنین افزایش معنی‌دار سطوح ۶-متیل‌گوانین-DNA-متیل ترانسفراز و تعادل اکسیدانت-پرواکسیدانت (PAB) در رت‌های دیابتی نوع ۲ شد. تشدید استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش مهمی در پاتوژنز دیابت دارند. کاهش دادن این تغییرات در دیابت نوع ۲ با استفاده از مواد مؤثره گیاهی با خاصیت ضددیابتی و آنتی‌اکسیدانتی از اهمیت بالینی زیادی برخوردار است (۴۱). ترکیبات شیمیایی اصلی گیاه خارخاسک شامل ساپونین‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، استرول و تروستروسین‌های E و A می‌باشد و آثار فارماکولوژیک میوه‌ی این گیاه را به این ترکیبات نسبت می‌دهند. محققان نشان دادند که خارخاسک می‌تواند موجب افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی در بدن و تشدید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گردند و موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شود (۴۲). وجود ساپونین‌ها و هم‌چنین ترکیبات فنولی در عصاره‌ی این

MuRF1 به فعال شدن NF- $\kappa$ B نسبت داده شده است (۲۹). فاکتور رونویسی FoxO نیز در تحلیل عضلانی درگیرند و احتمالاً لیگازهای یونیکون لاین MuRF1 و Atrogin-1 را منعکس می‌کنند (۳۰). التهاب سبب افزایش فعالیت MAPK p38 از طریق NF- $\kappa$ B می‌شود که این عوامل می‌تواند مسئول بیان آتروژن‌ها و تجزیه پروتئین‌ها (آتروفی) باشد (۳۱). همچنین، مطالعاتی که روی سلول‌های جوندگان با استفاده از تکنیک‌های دارویی و یا مهار ژن بر روی آتروفی یا هایپرتروفی صورت گرفته است، نشان داده‌اند که تنظیم رونویسی MurF1 توسط مسیر سیگنالینگ وابسته به AKT FoxO انجام می‌شود (۳۲). پاسخ Atrogin-1 به فعالیت ورزشی نیز می‌تواند تحت تأثیر عوامل گوناگونی از جمله شدت و مدت فعالیت و یا تأثیر فعالیت‌های تکراری تغییر کند (۳۳). miR-29 در عضلات اسکلتی موش‌های تغذیه شده با رژیم غذایی با چربی بالا و در مدل‌های حیوانی دیابتی چاق، تنظیم مثبت می‌شود (۳۴-۳۶). برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که تنظیم بیان miR-29 در بافت‌های مقاوم به انسولین در مدل‌های جوندگان دیابتی چاق و عضله اسکلتی بیماران مبتلا به نوع دیابت ۲ مختل می‌شود (۳۶، ۳۷). بنابراین احتمالاً تمرینات هوازی در پژوهش حاضر از طریق بهبود مقاومت به انسولین منجر به کاهش بیان شده است هر چند در پژوهش حاضر مقاوت به انسولین اندازه‌گیری نشد که از محدودیت‌های این پژوهش به شمار می‌رود. همچنین سطوح اسیدهای چرب گردش خون در هر دو بیمار مبتلا به دیابت نوع ۲ و مدل جوندگان دیابتی چاق افزایش می‌یابد و می‌تواند بر بیان ژن در بافت‌های محیطی مانند عضلات اسکلتی اثر بگذارد (۳۷). نشان داده شده است که پالمیتات بیان miR-29 در سلول‌های عضلات اسکلتی انسان را افزایش می‌دهد (۳۴). بنابراین این احتمال وجود دارد که در پژوهش حاضر کاهش سطح اسیدهای چرب گردش خون متعاقب تمرین هوازی عامل اثر گذار بر کاهش بیان miR-29 در رت‌های دیابتی باشد. از طرفی، مخالف با یافته‌های احقیق حاضر، هالوی و همکاران تأثیر تمرین تداومی استقامتی و تناوبی با شدت بالا به مدت چهار هفته بر روی تردمیل بر روی فاکتورهای آتروفی عضلانی در موش‌های صحرایی را بررسی کردند. موش‌ها

خارخاسك با تمرين هوازي مي تواند از طريق كاهش بيان ژن هاي درگير در آتروفي عضلاني به بهبود شرايط طي ديابت كمك نمايد. پيشنهاده مي شود در آينده مطالعه اي در زمينه تاثير دوزهاي مختلف عصاره خارخاسك و تمرين روي مسيرهاي سيگنال دهی اثرگذار بر آتروفي عضلاني آزمودنی های دیابتی نوع ۲ انجام گیرد.

### تقدير و تشكر

اين مقاله برگرفته از رساله دوره دکتری گرایش فیزیولوژی ورزشی است که با تایید کمیته اخلاق با شماره IR.SSRC.REC.1399.027 در پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی تأیید و در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز اجرا گردید. بدین وسیله از کلیه ی افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری داشته اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

### References

1. Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*. 2015;(6):850–867.
2. Perry BD, Caldwell MK, Brennan-Speranza TC, Sbaraglia M, Jerums G, Garnham A, et al. Muscle atrophy in patients with Type 2 Diabetes Mellitus: roles of inflammatory pathways, physical activity and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2016;(22):94–109.
3. Lambertucci AC, Lambertucci RH, Hirabara SM, Curi R, Moriscot AS, et al. Glutamine supplementation stimulates protein-synthetic and inhibits protein-degradative signaling pathways in skeletal muscle of diabetic rats. *PLoS One*. 2012;(7):e50390.
4. Hulmi JJ, Silvennoinen M, Lehti M, Kivela R, Kainulainen H. Altered REDD1, myostatin, and Akt/mTOR/FoxO/MAPK signaling in streptozotocin- induced diabetic muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;(302):307–315.
5. Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;(45):2121–2129.
6. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in

گياه به آن خاصیت آنتی اکسیدانی می دهد (۴۳). مشخص شده است که ساپونین های مشتق از گياه خارخاسك از طريق فعال نمودن مسير سيگنالینگ PKC موجب کاهش آسیب سلولی می شوند (۴۴). همچنين بخشی از اثرات سودمند اين گياه در تحقيق حاضر را می توان به اثرات کاهش استرس اکسیداتیو آن به علت دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی و تقویت کنندگی سیستم حذف رادیکال های آزاد اکسیژن نسبت داد که احتمالاً از این نظر بسیار مشابه ویتامین E عمل می نماید (۴۵). بخش دیگر از اثر سودمند خارخاسك در بررسی حاضر را می توان به اثر هیپوگلیسمیک آن نسبت داد که از طریق کاهش سطح محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون موجب کاهش استرس اکسیداتیو می شود (۴۶). در نهایت، مداخله ترکیبی عصاره خارخاسك با تمرين هوازي منجر به کاهش بيان ژن Atrogin-1, MURF-1 و MiR-29b همچنين افزايش سطوح متیل گوآنین و تعادل اکسیدانت-پرواکسیدانت عضله نعلی رت های دیابتی نوع ۲ شد. بنابراین احتمالاً تجویز عصاره خارخاسك به همراه تمرين هوازي به دليل اثرات آنتی اکسیدانی خارخاسك و تمرين هوازي هم چنین تاثير آنها بر حذف متابولیت های مخرب و تاثير بر بيان ژن های درگير در آتروفي عضلاني طی ديابت می تواند مفيد و موثر باشد. از جمله محدودیت های پژوهش حاضر می توان به عدم اندازه گیری دیگر فاکتورهای مرتبط با استرس اکسیداتیو در عضلات اسکلتی اشاره کرد. اندازه گیری مسيرهاي پیام رسانی همچون تنظیم مسير PKC نیز می تواند اثرات فعالیت بدنی بر عوامل رونویسی درگير در آتروفي عضله اسکلتی در افراد مبتلا به ديابت را به طور روشن تری نشان دهد. به هرحال پژوهش های بیشتری در این زمینه مورد نیاز می باشد.

### نتیجه گیری

به طور خلاصه، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرين هوازي، عصاره خارخاسك و مداخله ترکیبی عصاره خارخاسك با تمرين هوازي منجر به کاهش بيان ژن های درگير در آتروفي عضلاني، همچنين افزايش تعادل اکسیدانت-پرواکسیدانت در رت های نر ویستار قرار گرفته در معرض دگزا متازون شد. بنابراین با توجه به نتایج، به نظر می رسد مداخله ترکیبی عصاره

- atrophy muscle cells. *Cell Metab.* 2007;6:472–483.
7. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(6):469-84.
  8. Dehoux M, Van Beneden R, Pasko N, Lause P, Verniers J, Underwood L, Ketelslegers JM, Thissen JP. Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogin-1/ MAFbx during fasting and diabetes. *Endocrinology.* 2004;(145):4806–4812.
  9. Sun Z, Liu L, Liu N, Liu Y. Muscular response and adaptation to diabetes mellitus. *Front Biosci* 2008;(13):4765–4794.
  10. Li J, Chan MC, Yu Y, Bei Y, Chen P, Zhou Q, et al. miR-29b contributes to multiple types of muscle atrophy. *Nat Commun.* 2017;(8):15201.
  11. Hu J, Kong M, Ye Y, Hong S, Cheng L, Jiang L. Serum miR-206 and other muscle-specific microRNAs as non-invasive biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *J Neurochem.* 2014;(129):877–883.
  12. Liu HW, Sue-Joan Chang Moderate Exercise Suppresses NF- $\kappa$ B Signaling and Activates the SIRT1-AMPK-PGC1 $\alpha$  Axis to Attenuate Muscle Loss in Diabetic db/db Mice *Front Physiol.* 2018;(9): 636-48.
  13. Gonçalves NG, Cavaletti SH, Pasqualucci CA, Arruda Martins M, Lin CJ. Fructose ingestion impairs expression of genes involved in skeletal muscle's adaptive response to aerobic exercise. *Genes Nutr.* 2017;12:33-44.
  14. Russell AP, Foletta VC, Snow RJ, Wadley GD. mitochondria: a major player in exercise, health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(4):1276-84.
  15. Aquilina G, Biondo R, Dogliotti E, Meuth M, Bignami M. Expression of the endogenous O6-methylguanine- DNA methyltransferase protects Chinese hamster ovary cells from spontaneous G:C to A: T transitions. *Cancer Res.*1992;52:6471-55.
  16. Siu PM, Pei XM, Teng BT, Benzie IF, Ying M, Wong SH. Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. *Exp Physiol.* 2011;96(9):889-906.
  17. Usefpor M, Ghasemnian AA, Rahmani A. The Effect of a period of high intensive interval training on total antioxidant capacity and level of liver tissue malondialdehyde in male Wistar rats. *SJKU.* 2017;22 (5):103-110.
  18. Chhatre S, Tanuja Nesari, Gauresh Somani,1 Divya Kanchan,1 and Sadhana Sathaye Phytopharmacological overview of Tribulus terrestris *Pharmacogn Rev.* 2014;8(15): 45–51.
  19. El-Tantawy WH, Hassanin LA. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of alcoholic extract of Tribulus alatus in streptozotocin-induced diabetic rats: a comparative study with T. terrestris. *Indian J Exp Biol.* 2007;45(9):785-90.
  20. Roghani M, Arbab-Soleymani S. The Effect of Oral Feeding of Tribulus Terrestris Fruit on Some Markers of Oxidative Stress in the Brain of Diabetic Rats. *JSSU.* 2013;21(2):127-135.
  21. Shirwaikar A, Rajendran K, Barik R. Effect of aqueous bark extract of Garuga pinnata Roxb. in streptozotocin-nicotinamide induced type-II diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol.* 2006;107(2):285-90.
  22. Fappi A, Neves JC, Sanches LN, Massaroto e Silva PV, Sikusawa GY, et al. Skeletal Muscle Response to Deflazacort, Dexamethasone and Methylprednisolone. *Cells.* 2019;8:406.
  23. Gauthaman K, Ganesan AP. The hormonal effects of Tribulus terrestris and its role in the management of male erectile dysfunction--an evaluation using primates, rabbit and rat. *Phytomedicine.* 2008;15(1):44-54.
  24. Mallikarjuna K, Shanmugam KR, Nishanth K, Wu MC, Hou CW, Kuo CH, et al. Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats. *Alcohol.* 2010; 44(6):523-9.
  25. Chang YC, Chuang LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res.* 2010;2(3):316-31.
  26. Descorbeth M, Anand-Srivastava MB. Role of oxidative stress in high-glucose- and diabetes-induced increased expression of Gq/11alpha proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(9):1395-405.
  27. Carraro E, Schilirò T, Biorci F, Romanazzi V, Degan R, Buonocore D, et al. Physical Activity, Lifestyle Factors and Oxidative Stress in Middle Age Healthy Subjects. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(6):62-74.
  28. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: The balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 2013;18:1208–1246.
  29. Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Beas-Zarate C, Pallàs M, Auladell C, et al. Role of JNK in neurodegenerative diseases. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences II.* 2012;37(2):15-28.
  30. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab.* 2007;6(5):376-385.
  31. Centeno C, Repici M, Chatton JY, Riederer BM, Bonny C, Nicod P, et al. Role of The JNK Pathway in NMDA-Mediated excitotoxicity of Cortical Neurons. *Cell Death Differ.* 2007;14:240-

- 253.
32. Antoniou X, Falconi M, Di Marino D, Borsello T. JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *J Alzheim Dis.* 2011;24:633-642.
33. Khoramshahi S, kordi M R, delfan M, gaeini A, safa M. Effect of Five Weeks of High-Intensity Interval Training on the Expression of miR-23a and Atrogin-1 in Gastrocnemius Muscles of Diabetic Male Rats. *Iran J Endocrinol Metab.* 2017;18(5):361-367.
34. Yang WM, Jeong HJ, Park SY, Lee W. Induction of miR-29a by saturated fatty acids impairs insulin signaling and glucose uptake through translational repression of IRS-1 in myocytes. *FEBS Lett.* 2014;588:2170-2176
35. Kurtz CL, Peck BC, Fannin EE. MicroRNA-29 fine-tunes the expression of key FOXA2-activated lipid metabolism genes and is dysregulated in animal models of insulin resistance and diabetes. *Diabetes.* 2014;63:3141-3148.
36. He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2007;21:2785-2794.
37. Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011;18:139-143.
38. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Simpson JA, Quadriatero J, Spriet LL. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. *PloS One.* 2015;10(3):1-16.
39. Gonçalves NG, Cavaletti SH, Pasqualucci CA, Arruda Martins M, Lin CJ. Fructose ingestion impairs expression of genes involved in skeletal muscle's adaptive response to aerobic exercise. *Genes Nutr.* 2017;8:12:33.
40. Soci UPR, Fernandes T, Hashimoto N Y. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genom.* 2011;43:665-73.
41. Prabhakar PK, Doble M. Mechanism of action of natural products used in the treatment of diabetes mellitus. *Chin J Integr Med.* 2011;17(8):563-74.
42. Kamboj P, Aggarwal M, Puri S, Singla SK. Effect of aqueous extract of *Tribulus terrestris* on oxalate-induced oxidative stress in rats. *Indian J Nephrol.* 2011;21(3):154-9.
43. Ivanova A, Serly J, Dinchev D, Ocsovszki I, Kostova I, Molnar J. Screening of some saponins and phenolic components of *Tribulus terrestris* and *Smilax excelsa* as MDR modulators. *In Vivo.* 2009;23(4):545-550.
44. Wang SS, Ji YS, Li H, Yang SJ. Mechanisms of gross saponins of *Tribulus terrestris* via activating PKCepsilon against myocardial apoptosis induced by oxidative stress. *Yao Xue Xue Bao.* 2009;44(2):134-9.
45. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Coenzyme q10 ameliorates neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy in rat. *J Mol Neurosci.* 2013;49(1):194-201.
46. Yan LG, Lu Y, Zheng SZ, Wang AY, Li MQ, Ruan JS, et al. Injectable caltrop fruit saponin protects against ischemia-reperfusion injury in rat brain. *Am J Chin Med.* 2011;39(2):325-33.