Journal of Military Medicine
2023, Volume 25, Issue 5
Pages: 2046-2055
10.30491/JMM.2023.1006462.1046

Investigating the Effect of Aerobic Exercise and Supplementation with Pumpkin Seed Oil and White Pea Extract on the Expression of MT-1, MT-2, and cGPDH Genes in the Liver Tissue of Male Rats

Ali Dashti Khoidak [1], Abbass Ghanbari-Niak [1*], Khadijeh Nasiri [1], Mohammad Hassan Dashti Khoydaki [2], Nader HamedChaman [1]

[1] *Department of Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, University of Mazandaran, Iran*
[2] *Department of Sports Physiology, Payame Noor University, Tehran, Iran*

Received: 20 June 2023 **Accepted:** 18 November 2023

Abstract

Background and Aim: The lack of micronutrients, including iron and zinc, are one of the major concerns of today that can negatively affect sports performance. Therefore, the purpose of this research is to investigate the effect of aerobic exercise and supplementation with pumpkin seed oil and white pea extract on the gene expression levels of MT-1, MT-2, and cGPDH in the liver tissue of male rats.

Methods: In this experimental research, 36 male Wistar rats with a weight range of 130 to 150 g were randomly divided into six groups: saline control, saline training, pumpkin seed oil control, training + pumpkin seed oil, Control pea, and training + pea. The training groups participated in the aerobic training with an intensity of 25 m/min, 5 days a week, for total time of 6 weeks. Twenty-four hours after the last training session, the liver tissue of rats was extracted and kept at -80 °C for the subsequent measurement changes of MT-1, MT-2, and cGPDH genes gene expression levels through real-time PCR method as well as zinc and Iron levels through ICP-EOS technique in the liver tissue. Statistical analysis of data was done with SPSS software and one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test.

Results: Six weeks of training + pumpkin seed oil supplementation significantly increased gene expression of MT-1, MT-2, as well as zinc and iron levels in liver tissue in comparison to the control group ($P \leq 0.05$). Also, the amount of liver zinc and iron in the training group + pumpkin oil was significantly higher compared to the training group + pea group ($P \leq 0.05$). On the other hand, there was no difference in the expression level of the GPDH gene in liver tissue among the groups ($P \leq 0.05$).

Conclusion: The results of the present study showed that the use of supplements containing zinc increases the amount of zinc and subsequently increases zinc transporters. However, pumpkin supplement is more effective in MT1, and MT2 gene expression compared to chickpea supplement.

Keywords: Metallothionein, Exercise, Pumpkin Seed Oil, Pea Extract, cGPDH.

[*]Corresponding author: **Abbass Ghanbari-Niak,** Email: ghanbara@umz.ac.ir

مجله طب نظامی
دوره ۲۵، شماره ۵، آذر و دی ۱۴۰۲
صفحات: ۲۰۵۵-۲۰۴۶
10.30491/JMM.2023.1006462.1046

بررسی اثر تمرین هوازی و مکمل‌یاری با روغن تخم کدو و عصاره نخود سفید بر بیان ژن MT-1، MT-2 و cGPDH در بافت کبد موش‌های صحرایی نر

علی دشتی خویدکی[۱]، عباس قنبری-نیاکی[۱]*، خدیجه نصیری[۱]، محمد حسن دشتی خویدکی[۲]، نادر حامد چمن[۱]

[۱] گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، ایران
[۲] گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: فقدان‌ریزمغذی‌ها، از جمله آهن و روی از نگرانی‌های جامع امروزی محسوب می‌شوند که می‌تواند بر عملکرد ورزشی اثر منفی بگذارد. از این‌رو هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی اثر تمرین هوازی به همراه مکمل‌یاری با روغن تخم کدو و عصاره نخود سفید بر بیان ژن MT-1، MT-2 و cGPDH در بافت کبد رت‌های صحرایی‌نر بود.

روش‌ها: در این پژوهش تجربی، تعداد ۳۶ سر رت صحرایی نر با نژاد ویستار در دامنه وزنی ۱۳۰ تا ۱۵۰ گرم، به‌صورت تصادفی به شش گروه کنترل سالین، تمرین سالین، کنترل روغن تخم کدو، تمرین + روغن تخم کدو، کنترل نخود و تمرین + نخود تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی با شدت ۲۵ متر بر دقیقه، ۵ روز در هفته و به مدت ۶ هفته شرکت کردند. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین بافت کبد رت‌ها استخراج و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و میزان تغییرات بیان ژن MT-1، MT-2 و cGPDH با استفاده از روش Real time PCR و سطوح روی و آهن کبدی توسط تکنیک ICP-EOS تعیین گردید. تحلیل آماری داده‌ها با نرم افزار SPSS و از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

یافته‌ها: مصرف ۶ هفته روغن تخم کدو به همراه تمرینات هوازی موجب افزایش مقادیر بیان ژن MT-2 و سطوح روی و آهن کبدی نسبت به گروه کنترل گردید ($P\leq$۰/۰۵). همچنین سطوح کبدی روی و آهن در گروه تمرین + روغن تخم کدو نسبت به گروه تمرین + نخود افزایش معنادار داشته است ($P\leq$۰/۰۵). از طرفی، تفاوتی در میزان بیان ژن GPDH بافت کبدی در بین گروه‌ها مشاهده نشد ($P\leq$۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که مصرف مکمل حاوی روی باعث افزایش مقادیر روی و متعاقب آن افزایش انتقال‌دهنده‌های روی می‌شود. با این حال مکمل کدو اثربخشی بیشتری در بیان ژن MT1 و MT2 نسبت به مکمل نخود را نشان داد.

کلیدواژه‌ها: متالوتیونین، تمرین، روغن تخم کدو، عصاره نخود، cGPDH.

*نویسنده مسئول: **عباس قنبری-نیاکی.** پست الکترونیک: ghanbara@umz.ac.ir
دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۳/۳۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۸/۲۷

مقدمه

بخشی از متابویسم بدن متأثر از عوامل مغذی غیرانرژی‌زاست که از آن به عنوان ریزمغذی نام می‌برند. ریزمغذی‌ها موادی هستند که در فرآیندهای بیولوژیکی فراوانی از جمله عملکرد ورزشکاران، متابولیسم پروتئین، التهاب، انتقال اکسیژن، تنظیم ریتم‌های قلبی، متابولیسم استخوان و عملکرد ایمنی نقش داشته و بخش جدایی‌ناپذیر از برخی آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و ناقلین درگیر در متابولیسم می‌باشد (۱،۲). فقدان این ریزمغذی‌ها، از جمله آهن و روی از نگرانی‌های جامع امروزی هستند که می‌توانند بر عملکرد ورزشی تأثیر منفی بگذارند (۲). با این حال از محتوای تام بعضی از ریز مغذی‌های موجود در بدن، تنها بخش کوچکی از آن در فرآیند سوخت و ساز شرکت می‌کند و کبد نقش مهمی در این فرآیند ایفا می‌کند (۳). به علاوه مکانیسم بافری برای حفظ غلظت برخی از ریز مغذی‌ها در سیتوزول مهم است که با پروتئین‌های سیتوزولی از جمله متالوتیونین (MT) تعدیل می‌شود (۴).

متالوتیونین‌های پستانداران پروتئین‌های کوچک غنی از سیستئین هستند که در چهار ایزوفرم اصلی (MT1-MT4) وجود دارند که در هموستاز روی (II) و مس (I) شرکت می‌کنند (۵،۶). همچنین متالوتیونین‌ها اثرات منفی یون‌های فلزی سمی مانند سرب (II) و جیوه (II) را بر سلول‌ها محدود می‌کنند (۶،۷). آن‌ها در واکنش‌های ردوکس متعددی شرکت می‌کنند که از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند. متالوتیونین‌ها بیشتر در سیتوزول وجود دارند، اما در هسته، میتوکندری و محیط خارج سلولی نیز یافت شده‌اند. MT1 و MT2 فاقد ویژگی بافتی هستند و در انواع سلول‌ها در سطوح و نسبت‌های مختلف بیان می‌شوند (۸).

ازسوی دیگر سیگنال‌دهی متالوتیونین روی داخل سلولی تعدادی از آنزیم‌های سلولی، از جمله GPD1 را مورد هدف قرار می‌دهد. GPD1 یک آنزیم وابسته به NAD+/NADH در سیتوزول است. نشان داد شده است که روی یک اثر مهاری قوی و برگشت‌پذیر بر فعالیت آنزیمی GPDH دارد. GPD1، گلیسرول ۳- فسفات دهیدروژناز سیتوزولی (cGPDH)، نیز نامیده می‌شود (۹). cGPDH در مسیر گلیکولیتیک و بیوسنتز تری گلیسرید موجب ایجاد ارتباط قوی بین متابولیسم کربوهیدرات و چربی شده است (۱۰). با این حال، ژن‌های بافری در سطح رونویسی و پس از ترجمه تنظیم می‌شوند. در حالی که برخی از این ژن‌ها با مصرف روی و آهن در مکمل‌های غذایی تنظیم می‌شوند (۱۱)؛ یکی از این مکمل‌های غذایی نخود می‌باشد. نُخود یا نَخود با نام علمی Cicer arietinum از دانه‌های خوراکی است. دانه نخود به طور متوسط حدود (۰/۵ mg/۱۰۰ g) آهن، (۴/۱ mg/۱۰۰ g) روی، (۱۳۸ mg/۱۰۰ g) منیزیوم و (۱۶۰ mg/۱۰۰ g) کلسیم را فراهم می‌کند. تقریباً صد گرم از دانه نخود می‌تواند نیازهای غذایی روزانه عنصر روی را جبران کند (۱۲). مکمل غذایی دیگر، روغن تخم کدو با نام علمی (Cucurbita pepo L.) است. تخم کدو تخم کاغذی از خانواده Cucurbitaceae به شمار می‌آید. این روغن بسته به غلظتش به رنگ سبز تیره یا قرمز است. اما وقتی رنگ آن قهوه‌ای می‌شود مزه‌ای تلخ می‌گیرد. مطالعات اتنوفارکولوژیکی نشان می‌دهد که تخم کدو در بسیاری از کشورها برای درمان بیماری‌های بی‌شمار، ضد دیابتی و آنتی اکسیدان استفاده می‌شود. دانه و روغن تخم کدو منابع غنی از پروتئین‌ها محسوب می‌شوند و به‌طور متوسط حدود (۴/۴۶ mg/۱۰۰ g) آهن، (۱۳/۸۶ mg/۱۰۰ g) روی و (۱۰/۹ mg/۱۰۰ g) کلسیم را فراهم می‌آورد (۱۳).

از طرفی دیگر ، فعالیت ورزشی به عنوان یک مداخله استرس‌زا بر غلظت روی و آهن در گردش خون تأثیر می‌گذارد. کاهش سطح روی و آهن ممکن است منجر به کاهش غلظت آن‌ها شود. از آنجایی که روی و آهن برای فعالیت چندین آنزیم در متابولیسم انرژی مورد نیاز است، کاهش این یون‌ها ممکن است ظرفیت استقامتی فرد ورزشکار را کاهش دهد (۱۴). بنابراین استرس ناشی از فعالیت ورزشی شدید در انسان ممکن است به‌طور مشابه باعث تغییرات در متابولیسم روی و آهن شود و پیامدهای قابل توجهی در عملکرد ورزشی داشته باشد (۱۵). با توجه به مشاهده مکرر هیپوزینسمی (Hypozincemia) ناشی از فعالیت ورزشی و مقادیر بالقوه بالای عنصر روی و آهن که می‌تواند از طریق تعریق از بین برود، ممکن است در شرایط ورزش طولانی و قرار گرفتن در معرض گرما به مکمل روی و آهن نیاز وجود داشته باشد (۱۶). همچنین وضعیت روی و آهن در عملکردهای فیزیولوژیکی مربوط به ورزش و فعالیت بدنی نقش مهمی را ایفا می‌کند و تغییرات مهم در غلظت روی و آهن به‌دنبال یک دوره تمرین هوازی حاکی از ارتباط بین متابولیسم روی و آهن و عملکردهای مرتبط با ورزش است. روی و آهن به‌طور گسترده‌ای در کلیه اعضای بدن و بافت‌ها توزیع می‌شوند، به طوری که کبد با تنظیم مخزن روی و آهن که به سرعت قابل تبادل با پلاسما و سایر بافت‌ها است، نقش مهمی را در متابولیسم روی و آهن سیستماتیک ایفا می‌کند (۱۷). همچنین کبد به عنوان ارگان اصلی درگیر در متابولیسم روی و آهن، نقش مهمی در حفظ هموستاز سیستمیک روی و آهن دارد. آزادسازی روی و آهن از سلول‌های کبدی به‌طور متفاوتی تنظیم می‌شود و تغییرات در وضعیت روی و آهن به‌طور مستقیم بر بیان ژن بافری روی و آهن و کمبود آن‌ها بر عملکردهای مختلف کبد و در نهایت بر فرآیندهای متابولیکی در سایر اندام‌ها تأثیر می‌گذارد (۱۸).

بنابراین با توجه به اینکه غلظت روی و آهن سلولی نیاز به ایجاد شیب سلولی گسترده و فعال دارد، توزیع سلولی روی و آهن در اندامک‌ها باید به طور دقیقی انجام شود تا غلظت روی و آهن مورد نیاز منابع سلولی را تأمین کرده (۱۹) و هموستاز طبیعی سلول که نیاز به حمل و نقل و ذخیره‌سازی مناسب روی دارد را حفظ کند (۲۰). از این رو با توجه به محدود بودن داده‌ها در مورد مداخلات تغذیه‌ای و ورزش بر بیان MT-1، MT-2 و cGPDH در سطح

RNA برای کبد، در این مطالعه اثرات تمرین و مکمل‌یاری با روغن تخم کدو و عصاره نخود سفید بر بیان این متغیرها و همچنین محتوای آهن و روی کبد مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها

تحقیق از نوع تجربی بود و ۳۶ سر رت صحرایی نژاد ویستار نر به‌صورت تصادفی به شش گروه کنترل سالین، تمرین سالین، کنترل روغن تخم کدو، تمرین روغن تخم کدو، کنترل نخود و تمرین نخود تقسیم شدند.

حیوانات

تعداد ۳۶ رت صحرایی نر نژاد ویستار در سن هشت هفتگی با میانگین وزن بدنی ۱۳۰ تا ۱۵۰ گرم از دانشگاه علوم پزشکی بابل تهیه و در محیطی بامیانگین دمای ۱/۴ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵ ± ۵۵ درصد و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص ازجنس پلی کربنات در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران نگهداری شدند. وزن رت‌ها در ابتدا و پایان پژوهش و پیش از تشریح اندازه‌گیری شدند. تغذیه با بسته‌های مواد غذایی رت‌ها که به صورت استاندارد (حاوی دانه‌های جویدنی شامل کلسیم و فسفر) تهیه شده بود انجام گرفت. همچنین آن‌ها به آب دسترسی آزاد داشتند. غذای آزمودنی‌های این پژوهش، تولید شرکت خوراک دام پرور بود.

تمامی مراحل نگهداری و کشتار رت‌ها براساس دستورالعمل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. آب مصرفی رت‌ها در طول دوره پژوهش بر اساس میانگین مایعات مصرفی هر چهار حیوان در یک قفس و در ۲۴ ساعت ثبت گردید (۱۶). همچنین، کلیه قوانین و نحوه رفتار با حیوانات (آشناسازی، تمرین، بیهوشی و کشتن حیوان) بر اساس انجمن بین المللی ارزیابی و اعتباربخشی مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی و تائید کمیته اخلاق شورای پژوهشی دانشگاه مازندران رعایت گردید.

پروتکل تمرینی

قبل از اجرای برنامه تمرینی آزمودنی‌ها به مدت یک هفته با محیط و نحوه فعالیت با نوارگردان آشنا شدند. برنامه آشنایی شامل ۵ جلسه راه رفتن و دویدن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و شیب صفر و مطابق با پروتکل تمرینی اجرا شد. برای تحریک به دویدن، شوک الکتریکی ملایمی در عقب دستگاه تعبیه شد. برای جلوگیری از اثر احتمالی شوک الکتریکی بر یافته‌های پژوهش در مرحله آشناسازی حیوانات با فعالیت روی نوارگردان به روش شرطی‌سازی با صدا به حیوانات آموزش داده شد تا از نزدیک شدن و استراحت در بخش انتهایی دستگاه خودداری شود. طول دوره تمرین رت‌ها ۶ هفته بود، که پروتکل تمرین ورزشی پژوهش در مطالعه حاضر به صورت برنامه تمرینی با شدت متوسط از دو پروتکل اصلاح شده Howarth و همکاران (۲۱) و قنبری نیاکی (۲۲) است. برنامه تمرینی شامل ۶۰ دقیقه دویدن در روز بر روی تردمیل (با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه)، ۵ روز در هفته به مدت ۶ هفته بود. این پروتکل ورزشی بر اساس حداکثر اکسیژن مصرفی ۶۵٪ یک سطح با شدت متوسط در نظر گرفته شد (۱۶). آزمودنی‌ها در تمام طول هفته به غیر از روز پنج‌شنبه و جمعه تمرین می‌کردند. آزمودنی‌ها برنامه تمرینی را با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه شروع و با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه به پایان رساندند. به غیر از زمان فعالیت اصلی، ۵ دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه برای سرد کردن در نظر گرفته شد. گروه‌های کنترل نیز برای برابر کردن شرایط و عدم بی‌تحرکی، ۲ بار در هفته به مدت ۱۰ دقیقه و سرعت ۱۰ متر بر دقیقه فعالیت انجام دادند.

نحوه تهیه و خوراندن روغن تخم کدو و نخود سفید

کدو تخم کاغذی از منطقه بروجن که برداشت آن از شهریور شروع می‌شود، تهیه شد. نوع خاصی از کدو تنبل که تخمه‌های آن دارای یک پوشش کاملاً شفاف است و بیشتر برای مصارف درمانی استفاده می‌شود. بعد از خارج کردن تخمه‌ها و خشک کردن آن به صورت طبیعی، تخم‌های کدو برای روغن‌گیری فرستاده شد. در حدود ۳ کیلو تخم کدوی خشک تقریباً یک کیلو و ۱۰۰ گرم روغن استحصال شد. کدوهای تهیه شده بر دو نوع بودند:

۱. تخم آن سبز بود (پوست نداشت) که دارای پوست سفت تر، گوشت کمتر و زیر پوستهٔ سبز بودند.

۲. تخم آن سفید بود (یعنی پوست داشت) و دارای پوست نازک‌تر (پوست بیرونی کدو) و گوشت بیشتر بودند.

همچنین بهترین و مرغوب‌ترین نخود نیز از روستای سامله تهیه شد. کشت آن به صورت دیم است که در منطقه از نظر رنگ و پخت از بهترین نوع آن است. سپس با آسیاب به آرد نخود تبدیل شد.

بعد از تهیهٔ مکمل‌ها، روغن دانه کدو تنبل با دز ۴ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن و آرد نخود نیز به میزان ۲ گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن در روز از طریق حل شدن در سالین به مدت شش هفته به صورت گاواژ خوراکی مصرف گردید. گروه‌های کنترل نیز در هفته یک بار سالین با همان نسبت محاسبه شده دریافت کردند تا استرس گاواژ همسان‌سازی شده باشد. هر هفته وزن‌گیری مجدد برای تعیین مقدار دقیق دز به ازای هر کیلوگرم وزن بدن انجام شد (۲۳،۲۴).

سنجش متغیرها

برای بررسی تغییرات بیان ژن‌های MT-1، MT-2 و cGPDH بافت کبدی، رت‌ها در حدود ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ ساعت ناشتایی با تزریق زایلازین و کتامین بی‌هوش شدند و نمونه‌های بافت کبد رت‌ها استخراج و بافت نمونه هر حیوان بلافاصله در تیوب وارد محلول نیتروژن مایع شد و نمونه در آزمایشگاه تا زمان انجام آزمایشات ارزیابی مقدار تغییرات بیان ژن در فریزر ۸۰- درجه نگهداری شدند. فرآیند لیز بافتی جهت

جدول-۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

نام ژن	توالی	شماره دسترسی	طول محصول (جفت باز)
MT-1	F-5'-GAACTGCAAATGCACCTCCT-3' R-5'-ACTTGTCCGAGGCACCTTT-3'	NM_138826.4	۱۰۴
MT-2	F-5´-ACAGATGGATCCTGCTCCTG-3´ R-5´-CACTTGTCCGAAGCCTCTTT-3´	NM_001137564.2	۱۴۶
GPDH1	F-5'- ATCAACACGCAACACGAGAA- 3' R-5'-CAAAAACCAGGATGTCAGCAC -3'	NM_022215.2	۱۱۵
β-Actin	F-5'-GTGTGACGTTGACATCCGTAAAGAC-3' R-5'-TGCTAGGAGCCAGGGCAGTAAT-3'	NM_031144.3	۱۱۹

استخراج RNA توسط ازت مایع انجام گرفت که نمونه‌ها را در ازت منجمد کرده و با استفاده از هاون اقدام به خرد کردن بافت شد. پس از لیز بافت، مقدار ۷۰۰ میکرولیتر آب استریل با استفاده از کیت کیازول روی نمونه لیز شده ریخته سپس با پیپتاژ ترکیب شدند. غلظت و خلوص RNA استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتر نانودراپ بررسی شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و غلظت آن بر اساس ضریب دقت برحسب ng/µl به دست آمد. پس از تیمار RNA استخراج شده با DNaseI به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی DNA، از روی RNA، با استفاده از کیت کیازول و پرایمرهای Oligo dT و رندوم هگزامر، cDNA ساخته شد. آغازگرهایی که برای انجام real-time PCR مورد نیاز بودند، پس از طراحی در نرم‌افزار آنلاین Primer3، در صفحه Primer BLAST موجود در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفته و تایید شدند. در ادامه توالی آغازگرها توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) سنتز شدند. (جدول ۱). تعیین کمیت نسبی در real-time PCR به وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع نور فلورسنس، در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین انجام گرفت. طی این مرحله، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نمونه‌های cDNA برای ژن‌های MT-1، MT-2 و GPDH1 و ژن رفرنس Beta actin با استفاده از کیت سایبرگرین شرکت Ampliqon (دانمارک) در دستگاه Rotor gene Corbett 6000 انجام شد.

پس از اتمام واکنش و بررسی مقادیر مربوط به سیکل آستانه (C_T) حاصل از هر تیمار، میانگین C_T برای تکرارهای ژن‌های اختصاصی فوق و β-Actin (ژن مرجع) در این مطالعه محاسبه شد و در ادامه، توسط نسبت بیان هر یک از ژن های اختصاصی فوق به β-Actin (ژن مرجع) محاسبه شد. میزان بیان ژن‌های مورد نظر با روش لیواک ($2^{-\Delta\Delta CT}$) محاسبه شد.

اندازه‌گیری روی و آهن در بافت کبد

تمام ظروف مورد استفاده در جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل نمونه بافت کبد در حمام HNO^3 10% (v/v) به مدت حداقل ۲۴ ساعت توسط اتوکلاو ضدعفونی شدند و سپس با استفاده از آب دوبار تقطیر و توسط سیستم تصفیه شسته شدند.

هضم نمونه با استفاده از معرف‌های زیر به دست آمد: ۶۵٪ اسید نیتریک و ۳۰٪ هیدروژن در هر اکسید. محلول چند عنصری حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد (۲۵) و به سرم اضافه شد. در نهایت، مقادیر سرمی با استفاده از تکنیک ICP-EOS در آزمایشگاه اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از آمار توصیفی برای دسته‌بندی و تجزیه و تحلیل اولیه داده‌ها و جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف- اسمرینوف (K-S) استفاده شد. برای تحلیل آماری داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی (Tukey) استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده و اختلاف بین گروه‌ها با در نظر گرفتن $P<۰/۰۵$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. کلیه آنالیزها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد.

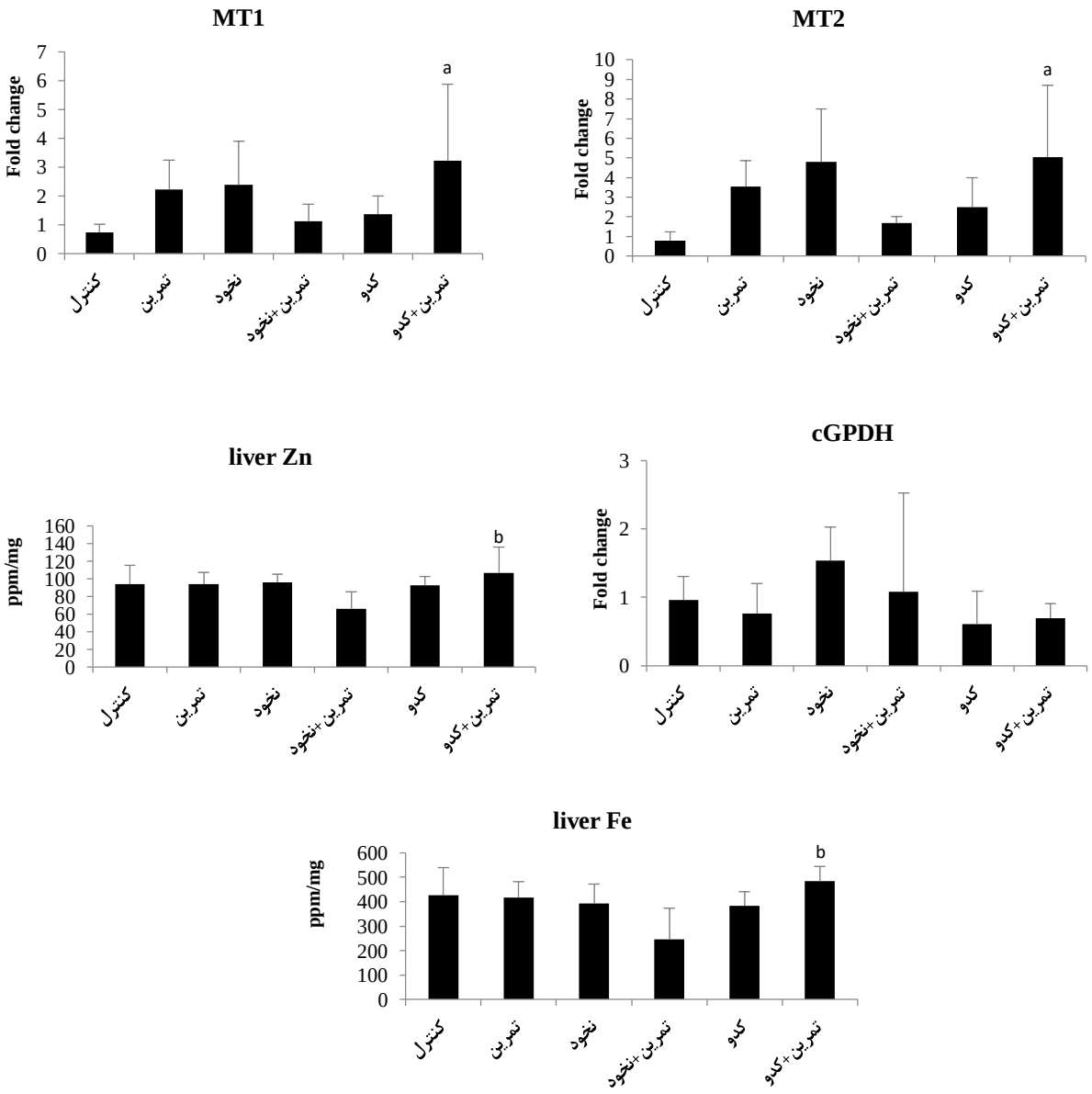
نتایج

نتایج آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که اختلاف معناداری بین ۶ گروه پژوهش در بیان ژن‌های MT-1، MT-2، روی و آهن در بافت کبد رت صحرایی وجود دارد ولی cGPDH معنادار نبود (جدول ۲).

جدول-۲. میانگین ± انحراف معیار آزمون تحلیل واریانس یک طرفه متغیرهای پژوهش

	کنترل	تمرین	عصاره نخود	تمرین و نخود	روغن کدو	تمرین + روغن کدو	معنی‌داری
Metallothionein 1 (MT-1)	۰/۲۹۷±۰/۷۲۷	۱/۰۲۶±۲/۲۲۱	۱/۵۲۲±۲/۳۸۳	۰/۵۸۲±۱/۱۳	۰/۶۳۳±۱/۳۷	۲/۶۵۲±۳/۲۱۴	*۰/۰۳۷
Metallothionein 2 (MT-2)	۰/۴۴۴±۰/۸	۱/۳۱۴±۳/۵۴۳	۲/۶۸۹±۴/۷۹۶	۰/۳۳۲±۱/۶۸۶	۱/۴۸۷±۲/۵	۳/۶۶۹±۵/۰۲۶	*۰/۰۱۴
cGPDH	۰/۳۵±۰/۹۵۷	۰/۴۴۲±۰/۷۶۱	۰/۴۹۴±۱/۵۳۵	۱/۴۴۴±۱/۰۸۱	۰/۴۸۴±۰/۶۱	۰/۲۱۱±۰/۶۹۵	۰/۳۴
آهن کبدی	۱۱۳/۷۲±۴۲۶/۵	۶۴±۴۱۷/۵	۷۹/۸±۳۹۳/۳۷	۱۲۷/۱±۲۴۶/۸۸	۵۹/۲±۳۸۲/۷۱	۵۹/۵±۴۸۵/۳۱	*۰/۰۱۹
روی کبدی	۲۱/۴۲±۹۴/۲۳	۱۳/۸۵±۹۳/۷۳	۹/۴۳±۹۵/۷	۱۹/۳۲±۶۶/۰۱	۹/۸۱±۹۲/۸	۲۹/۱۳±۱۰۶/۶	*۰/۰۲۴

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف از استاندارد گزارش شده است. *معنی‌داری در سطح ($P\leq۰/۰۵$)



نمودار-۱. نتایج آزمون توکی بر بیان ژن MT1، MT2، cGPDH و سطوح بافتی روی و آهن در بافت کبد در پاسخ به تمرین و دو نوع مکمل. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. سطح معنی داری ≥ ۰/۰۵ گزارش شده است. [a] در مقایسه با گروه کنترل، [b] در مقایسه بین گروه تمرین+کدو و تمرین+نخود.

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تغییرات مقدار MT-1 در آزمودنی‌های گروه تمرین + روغن کدو نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار داشته است (P = ۰/۰۳۹). مقایسه تغییرات مقدار MT-2 در آزمودنی‌های گروه تمرین + روغن کدو نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار داشته است (P = ۰/۰۳). همچنین مقایسه تغییرات مقدار روی و آهن کبد در آزمودنی‌های گروه تمرین + روغن کدو نسبت به گروه تمرین + عصاره نخود افزایش معنادار داشته است (به ترتیب P = ۰/۰۱۰ و P = ۰/۰۱۹). به منظور تبیین بیشتر و درک بهتر این تغییرات در نمودار ۱ نمایش داده شده است.

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد تفاوت بیان ژن MT-1 و MT-2 بافت کبد در بین گروه‌ها معنادار بود. همچنین نتایج مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که تغییرات مقدار MT-1 در آزمودنی‌های گروه تمرین + روغن کدو نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است که این افزایش معنادار بوده است. متاسفانه مطالعه‌ای که تاثیر این دو مکمل را بر روی MT-1 و MT-2 بررسی کرده باشد، یافت نشد و تنها برخی مطالعات محدود اثر آن را بر مقدار روی و سایر انتقال‌دهنده‌های خانواده MT نشان دادند. تا به امروز، مطالعه‌ای به‌طور شفاف، انتقال روی را تحت استرس ورزشی و روغن کدو و عصاره نخود در شبکه سلولی بررسی نکرده است. MT-1 و MT-2 به طور قابل‌توجهی توسط تمرین حاد و مزمن تنظیم می‌شوند (۲۶). از نظر فیزیولوژیکی ثابت شده است که اتصال روی به MTs، مرتبط است. چندین مطالعه شواهد قوی برای حمایت از این ایده ارائه کرده‌اند که MTها به عنوان جانشین

روی برای تنظیم بیان ژن و فعالیت پروتئین‌ها، مانند متالوپروتئین‌ها و فاکتورهای رونویسی وابسته به فلز، عمل می‌کنند و نیز اتصال روی به MTها از نظر ترمودینامیکی پایدار است و MTها را به یک مخزن روی ایده‌آل در داخل بدن تبدیل می‌کند (۲۷).

نتایج حاصل از مطالعات تائید می‌کند، بیان ژن MT در طول مصرف مکمل روی افزایش می‌یابد. در تحقیقی که از دز بالای مکمل روی (۵۰ میلی‌گرم روی در روز) استفاده شده بود، افزایش قابل‌توجهی در MT در طول دوره مداخله مشاهده شد و دز پایین‌تر روی (۱۵ میلی‌گرم در روز) با مدت کوتاه‌تر (۱۰ روز) پاسخ‌های مشابهی را در بیان ژن MT و زیر مجموعه‌های آن ایجاد کرد (۲۸). علاوه بر این، بیان ژن MT به دریافت روی در رژیم غذایی پاسخ مثبت می‌دهد؛ مطالعات نشان می‌دهد روابط متعدد بین بیان ژن‌های ناقل روی و MT در ابتدا و در طول مصرف مکمل روی وجود دارند (۲۸). بنابراین مصرف روغن کدو که در مطالعه حاضر باعث افزایش بیان ژن MT-1 و MT-2 شده می‌تواند نشان‌دهنده مقدار بالای روی در این روغن نسبت به دانه نخود باشد (۱۳) که افزایش MT-1 و MT-2 در گروه تمرین همراه با مصرف روغن تخم کدو با کنترل منطقی به نظر می‌رسد.

در پژوهش حاضر تفاوت معناداری در سطوح MTهای تحقیق با تمرین مشاهده نشد. این نتایج نشان می‌دهد که توزیع MTها، در کبد با تمرین تغییر نمی‌کند. نتایج پراکنده‌ای در مورد تغییرات در سطوح MTها، در کبد افراد تحت تمرین گزارش شده است. در مطالعه‌ای که روی رت‌ها انجام شد، گزارش شد که سطوح MTها، در کبد با تمرینات شنا افزایش می‌یابد، در حالی که در مطالعه دیگری برروی رت‌ها، سطوح MTها، در کبد کاهش می‌یابد، ولی سطوح MTها در قلب و ماهیچه افزایش می‌یابد. این بدان معناست که توزیع مجدد سطوح MTها، در کبد همراه با تمرین، سطوح آن‌ها را به بافت‌های فعال‌تر مانند قلب و عضله افزایش می‌دهد (۲۹) و نیاز است سطوح MTها، در بافت‌هایی که میزان متابولیسم بالایی در طول تمرین دارند، افزایش و سطوح MTها و روی از کبد به سایر اندام‌ها منتقل شود (۳۰).

این مطالعه نشان داد که که سطوح MT-1 و MT-2 و مقدار روی در کبد با تمرین تغییر قابل توجهی نداشت و عدم وجود تغییر در سطوح متغییرهای این مطالعه می‌تواند نتیجه تفاوت در مدت و نوع تمرین انجام شده باشد. با این وجود احتمالا مکانیسمی که می توان دلیل این تفاوت باشد نوع بافت و میزان استرسی که تمرین می‌تواند بر بافت کبد وارد کند، باشد و از آنجایی که در تحقیق حاضر دوره شش هفته‌ای و بر سازگاری‌های تمرینی متمرکز بوده، می‌تواند دلیلی بر تناقض یافته‌ها و معنادار نبودن سطوح MTها و روی با تمرین باشد.

نتایج نشان داد تفاوت محتوای روی و آهن بافت کبد در بین گروه‌ها معنی‌دار بود. همچنین نتایج مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که تغییرات مقدار روی و آهن بافت کبد در آزمودنی‌های گروه تمرین + روغن کدو نسبت به گروه گروه تمرین + نخود افزایش داشته است که این افزایش معنادار بوده است. متاسفانه مطالعه‌ای که تاثیر این دو مکمل را بر روی محتوای روی و آهن بافت کبد بررسی کرده باشد، یافت نشد و تنها برخی مطالعات محدود اثر آن را بر مقدار روی و آهن کبد نشان دادند. تا به امروز، مطالعه‌ای به‌طور شفاف، محتوای روی و آهن بافت کبد را تحت استرس ورزشی و روغن کدو و عصاره نخود در شبکه سلولی بررسی نکرده است ولی مطالعه‌ایی محتوای روی و آهن کبد در رت‌های با مکمل روی و آهن همراه با فعالیت بدنی کم و بالا را مورد بررسی قرار داد و نشان داد محتوای روی و آهن کبد در رت‌های با فعالیت بدنی کم و بالا به‌ترتیب ۱۵ درصد و ۳۰ درصد بیشتر از گروه کنترل بود (۳۱). همچنین افزایش قابل توجه ۱۸ درصدی در سطح عناصر کمیاب در حیوانات مکمل روی و آهن با فعالیت بدنی کم در مقایسه با مقادیر گروه کنترل مشاهده شد (۳۱). بنابراین مدت زمان و دز عصاره نخود ارائه شده در مطالعه حاضر ممکن است دارای مقدار مناسبی از روی و آهن نبوده و برای افزایش غلظت روی و آهن، کافی نباشد و بر خلاف آن مصرف روغن کدو در طول مطالعه حاضر که باعث افزایش محتوای روی و آهن بافت کبد شده می‌تواند نشان‌دهنده مقدار روی و آهن بالا در این عصاره باشد و همان‌طور که مطالعات، بالاتر بودن روی و آهن مکمل روغن تخم کدو (۱۳) نسبت به دانه نخود را نشان می‌دهد، افزایش محتوای روی و آهن بافت کبد در گروه تمرین همراه با مصرف کدو با کنترل منطقی به نظر می‌رسد. دلیل دیگر این اختلاف را می‌توان به فیتات نسبت داد. نخود با داشتن فیتات و تانن که به ترتیب با مواد معدنی مانند آهن، روی و پروتئین متصل می‌شود، شناخته می‌شود که متعاقباً، قابلیت دسترسی و قابلیت هضم را افزایش می‌دهد (۱۳).

همچنین فیتات، یک شلاتور قوی روی و آهن که معمولاً در رژیم غذایی انسان وجود دارد، ممکن است کمپلکس‌های نامحلول با روی و آهن تشکیل دهد که قابل جذب نباشد. در این بین به دلیل عدم وجود آنزیم هیدرولیز کننده فیتات، روی در دستگاه گوارش قابل جذب نبود. علاوه بر این، سایر مواد معدنی مانند آهن، کلسیم و مس در مواد غذایی برای انتقال‌دهنده‌های معدنی دو ظرفیتی غیر اختصاصی رقابت می‌کنند که بر جذب روی تأثیر می‌گذارد. لیگاندهای گیاهی غیرقابل هضم مانند فیتات، برخی فیبرهای غذایی، لیگنین و محصولات حاصل از واکنش‌های میلارد روی را متصل می‌کنند، جذب آن را مهار می‌کنند و بنابراین بر خطر کمبود روی و آهن (اولیه) در رژیم غذایی تأثیر می‌گذارند. بر خلاف آن مصرف روغن کدو در طول مطالعه حاضر که باعث افزایش بیان ژن محتوای روی بافت کبد شده می‌تواند نشان‌دهنده مقدار روی بالا در این روغن باشد و همانطور که مطالعات، بالاتر بودن روی مکمل روغن تخم کدو (۱۳) نسبت به دانه نخود را نشان می‌دهد، افزایش محتوای روی بافت کبد در گروه تمرین همراه با مصرف کدو با کنترل منطقی به نظر می‌رسد.

نتایج نشان داد تفاوت بیان ژن GPDH سیتوپلاسمی بافت کبد در بین گروه‌ها معنادار نبود. متاسفانه مطالعه‌ای مبنی بر مطالعه تاثیر این دو مکمل بر GPDH سیتوپلاسمی یافت نشد. حتی مطالعه‌ای که به‌طور شفاف GPDH را تحت استرس ورزشی و رژیم غذایی بررسی کرده باشد نیز وجود نداشت. گلوکز از کربوهیدرات‌های موجود در رژیم غذایی به عنوان منبع انرژی در بسیاری از اندام‌ها استفاده می‌شود. با این حال، هنگامی که منبع انرژی خارجی قطع می‌شود، به عنوان مثال در طول روزه‌داری، کربوهیدرات‌های حفظ شده در کبد و پیش‌سازهای گلیکوژنیک مشتق شده از سایر اندام‌ها برای حفظ سطح گلوکز خون استفاده می‌شوند. GPDHc یک آنزیم وابسته به NAD+/NADH موجود در سیتوزول، تبدیل برگشت‌پذیر گلیسرول-۳- فسفات (G3P) به دی هیدروکسی استون فسفات (DHAP) را کاتالیز می‌کند. از آنجایی که GPDHc یکی از سوبستراهای مورد استفاده برای گلوکونئوژنز در کبد است تبدیل G3P به DHAP توسط GPDH1 برای حفظ سطح گلوکز خون در طول روزه‌داری ضروری است (۱۰) و از آنجایی که عنصر روی، نقش اصلی را در عملکرد سلولی و بعضی از اندامک‌ها و آنزیم‌های سلولی از جمله GPDH ایفا می‌کند و در بعضی فرآیندهای سلولی، از جمله انتقال اکسیژن تنفسی از طریق هموگلوبین و میوگلوبین، سیتوکروم‌ها در زنجیره انتقال الکترون، دهیدروژنازهای مرتبط با NADH میتوکندری، دهیدروژناز سوکسینیک و فعالیت آلفا گلیسروفسفات اکسیداز درگیر است و هیچ اتفاق نظری کلی در مورد مکان بیوشیمیایی که در آن کمبود روی برای عملکرد آن مضر است وجود ندارد (۳۲) که می‌تواند نتایج تحقیق حاضر را توجیه کند. همچنین عدم وجود تغییر در سطوح GPDH این مطالعه می‌تواند نتیجه تفاوت در مدت زمان و نوع تمرین انجام شده باشد (۲۹). با این وجود احتمالا یکی دیگر از مکانیسم‌هایی هم که می‌تواند دلیل این تفاوت باشد نوع بافت و میزان استرسی که تمرین می‌تواند بر آن بافت‌ها وارد کند. از آنجایی که تحقیق حاضر بر دوره شش هفته‌ای متمرکز بوده، احتمالا دلیلی بر معنادار نبودن سطوح GPDH با تمرین و مکمل باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که احتمال می‌رود استفاده از مکمل حاوی روی باعث افزایش مقدار روی و متعاقب آن افزایش انتقال‌دهنده‌های روی شود. برخی از انتقال دهنده‌ها بیان رونویسی و پس از رونویسی خود را در پاسخ به نوسانات روی تغییر می‌دهند. با این حال مکمل کدو اثربخشی بیشتری در بیان ژن MT1 و MT2 در مقابل مکمل نخود دارد. بنابراین استفاده از مکمل سرشار از روی نیز در بیان انتقال‌دهنده‌ها بی‌تاثیر نیست. اگرچه در مورد ورزش و استفاده از مکمل‌های حاوی روی جهت افزایش بیان ناقلان روی تحقیقات جدیدی انجام نشده است، اما برجستگی این موضوع به‌طور پیوسته در حال افزایش است. از آنجایی‌که جهش‌ها و اختلالات رخ داده در ناقل‌های روی باعث ایجاد مشکلات سلامتی در بدن می‌شود، این امر به توسعه رویکردهای جدید در مورد حل مشکلات بهداشتی و سلامتی کمک خواهد کرد و تمرینات ورزشی در راستای تغییرات بیان ناقلان روی، حاکی از متعادل نگهداشتن مقدار روی و آهن سیتوپلاسمی در شرایط نرمال هستند. همچنین با وجود اینکه تغیرات GPDH معنادار نبود ولی می‌تواند نقش مهمی در متابولیسم سلولی و چرخه سلولی داشته باشد.

نکات بالینی کاربردی برای جوامع نظامی

- از آنجایی که فعالیت بدنی موجب کاهش سطوح بافتی ریزمغذی‌های روی و آهن در بافت‌های متابولیکی شده و متعاقبا موجب کاهش عملکرد می‌گردد؛ لذا مصرف مکمل روغن تخم کدو موجب بازیابی منابع روی و آهن کبدی شده و موجب حفظ عملکرد می‌شود؛ از این‌رو توصیه می‌شود بهره‌مندی از مکمل‌های غذایی نظیر روغن تخم کدو در کنار فعالیت ورزشی برای حفظ عملکرد پایوران نظامی رسته عملیات مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی: این مقاله حاصل پایان نامه دکتری مصوب در دانشگاه مازندران است. به این وسیله پژوهشگران از تمام افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری داشته‌اند، قدردانی می‌نمایند. این تحقیق دارای مصوبه اخلاق در پژوهش با شناسه IR.UMZ.REC.1401.078 است.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Zhao N, Gao J, Enns CA, Knutson MD. ZRT/IRT-like protein 14 (ZIP14) promotes the cellular assimilation of iron from transferrin. Journal of Biological Chemistry. 2010;285(42):32141-50. doi:10.1074/jbc.M110.143248
2. Kotze MJ, Van Velden DP, Van Rensburg SJ, Erasmus R. Pathogenic mechanisms underlying iron deficiency and iron overload: New insights for clinical application. Ejifcc. 2009;20(2):108-23.
3. Husain H, Ahmad R. Role of Zinc in Liver Pathology. Microbial Biofertilizers and Micronutrient Availability: Springer, Cham; 2022. pp. 101-13. doi:10.1007/978-3-030-76609-2_5
4. Liu X, Qu H, Zheng Y, Liao Q, Zhang L, Liao X,

et al. Mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase promotes skeletal muscle regeneration. EMBO Molecular Medicine. 2018;10(12):e9390. doi:10.15252/emmm.201809390
5. Krezel A, Maret W. The bioinorganic chemistry of mammalian metallothioneins. Chemical Reviews. 2021;121(23):14594-648. doi:10.1021/acs.chemrev.1c00371
6. Krężel A, Maret W. The functions of metamorphic metallothioneins in zinc and copper metabolism. International Journal of Molecular Sciences. 2017; 18(6):1237. doi:10.3390/ijms18061237
7. Freisinger E, Vašák M. Cadmium in metallothioneins. Cadmium: From Toxicity to Essentiality. 2013:339-71. doi:10.1007/978-94-007-5179-8_11
8. Pomorski A, Drozd A, Kocyła A, Krężel A. From methodological limitations to the function of metallothioneins-a guide to approaches for determining weak, moderate, and tight affinity zinc sites. Metallomics. 2023;15(5):mfad027. doi:10.1093/mtomcs/mfad027
9. Zheng Y, Qu H, Xiong X, Wang Y, Liu X, Zhang L, et al. Deficiency of mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase contributes to hepatic steatosis. Hepatology. 2019;70(1):84-97. doi:10.1002/hep.30507
10. Sato T, Yoshida Y, Morita A, Mori N, Miura S. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 deficiency induces compensatory amino acid metabolism during fasting in mice. Metabolism. 2016; 65(11):1646-56. doi:10.1016/j.metabol.2016.08.005
11. Guthrie GJ, Aydemir TB, Troche C, Martin AB, Chang SM, Cousins RJ. Influence of ZIP14 (slc39A14) on intestinal zinc processing and barrier function. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2015;308 (3):G171-8. doi:10.1152/ajpgi.00021.2014
12. Jukanti AK, Gaur PM, Gowda CL, Chibbar RN. Nutritional quality and health benefits of chickpea (Cicer arietinum L.): a review. British Journal of Nutrition. 2012;108(S1):S11-26. doi:10.1017/S0007114512000797
13. El-Mehiry HF, Tag Al Deen RI. The Effect of Pumpkin Seed Oil on Zinc Deficient-Induced Reproductive Disorders in Male Rats. 2015;1(2): 170-97. [In Arabic] doi:10.21608/JSEZU.2015.237659
14. Baltaci AK, Gokbel H, Mogulkoc R, Okudan N, Ucok K, Halifeoglu I. The effects of exercise and zinc deficiency on some elements in rats. Biological Trace Element Research. 2010;134:79-83. doi:10.1007/s12011-009-8452-4
15. Zavros A, Andreou E, Aphamis G, Bogdanis GC, Sakkas GK, Roupa Z, et al. The Effects of Zinc and Selenium Co-Supplementation on Resting Metabolic Rate, Thyroid Function, Physical Fitness, and Functional Capacity in Overweight and Obese People under a Hypocaloric Diet: A Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Trial. Nutrients. 2023;15(14):3133. doi:10.3390/nu15143133
16. Dashti A, Ghanbari-Niaki A, Nasiri K, Dashty H. Zinc Transporters in the Livers of Healthy Male Wistar Rats: An Investigation of the Effects of Aerobic Exercise and Supplementation with Pumpkin Seed and White Pea. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2024;26(1):e137982. doi:10.5812/zjrms-137982
17. Chu A, Petocz P, Samman S. Zinc status at baseline is not related to acute changes in serum zinc concentration following bouts of running or cycling. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2018;50:105-10. doi:10.1016/j.jtemb.2018.06.004
18. Grüngreiff K, Reinhold D, Wedemeyer H. The role of zinc in liver cirrhosis. Annals of hepatology. 2016;15(1):7-16.
19. Sekler I, Sensi SL, Hershfinkel M, Silverman WF. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. Molecular Medicine. 2007;13(7):337-43. doi.org/10.2119/2007-00037.Sekler
20. Olgar Y, Ozdemir S, Turan B. Induction of endoplasmic reticulum stress and changes in expression levels of Zn 2+-transporters in hypertrophic rat heart. Molecular and Cellular Biochemistry. 2018;440:209-19. doi:10.1007/s11010-017-3168-9
21. Howarth FC, Almugaddum FA, Qureshi MA, Ljubisavijevic M. Effects of varying intensity exercise on shortening and intracellular calcium in ventricular myocytes from streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Molecular and Cellular Biochemistry. 2008;317:161-7. doi:10.1007/s11010-008-9844-z
22. Ghanbari Niaki A. Effect of an interval progressive (pyramidal) aerobic training on lipid and lipoprotein profiles in San Shou Athletes. The International Journal of Humanities. 2007;12(1):97-110. [In Persian]
23. Rouag M, Berrouague S, Djaber N, Khaldi T, Boumendjel M, Taibi F, et al. Pumpkin seed oil alleviates oxidative stress and liver damage induced by sodium nitrate in adult rats: biochemical and histological approach. African Health Sciences. 2020;20(1):413-25. doi:10.4314/ahs.v20i1.48
24. Radić I, Nestorović V, Mijović M, Tatalović NR, Joksimović B, Lukić V, et al. The effects of whey and pumpkin seed oil on blood biochemical parameters of liver function and lipid profile in rats chronically drinking low concentrations of ethanol. Archives of Biological Sciences. 2018;70(3):531-41. doi:10.2298/ABS180320014R
25. Júnior AD, Korn MD. Effects of furosemide administration on the concentration of essential and toxic elements in Wistar rats by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2018;48:25-9. doi:10.1016/j.jtemb.2018.02.029
26. Lee B, Kim SK, Shin YJ, Son YH, Yang JW, Lee SM, et al. Genome-wide analysis of a cellular exercise model based on electrical pulse stimulation. Scientific Reports. 2022;12(1):21251. doi:10.1038/s41598-022-25758-2
27. Ruttkay-Nedecky B, Nejdl L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, et al. The role of metallothionein in oxidative stress. International

Journal of Molecular Sciences. 2013;14(3):6044-66. doi:10.3390/ijms14036044
28. Hennigar SR, Kelley AM, Anderson BJ, Armstrong NJ, McClung HL, Berryman CE, et al. Sensitivity and reliability of zinc transporter and metallothionein gene expression in peripheral blood mononuclear cells as indicators of zinc status: Responses to ex vivo zinc exposure and habitual zinc intake in humans. British Journal of Nutrition. 2021;125(4):361-8. doi:10.1017/S0007114520002810
29. Kaptanoğlu B, Turgut G, Genç O, Enli Y, Karabulut I, Zencir M, et al. Effects of acute exercise on the levels of iron, magnesium, and uric acid in liver and spleen tissues. Biological Trace Element Research. 2003;91:173-7. doi:10.1385/BTER:91:2:173
30. Waller MF, Haymes EM. The effects of heat and exercise on sweat iron loss. Medicine and Science in Sports and Exercise. 1996;28(2):197-203. doi:10.1097/00005768-199602000-00007
31. Skalny AA, Medvedeva YS, Alchinova IB, Gatiatulina ER, Radysh IV, Karganov MY, et al. Zinc supplementation modifies trace element status in exercised rats. Journal of applied Biomedicine. 2017;15(1):39-47. doi:10.1016/j.jab.2016.09.007
32. Liu HY, Gale JR, Reynolds IJ, Weiss JH, Aizenman E. The multifaceted roles of zinc in neuronal mitochondrial dysfunction. Biomedicines. 2021;9(5):489. doi:10.3390/biomedicines9050489