

## تأثیر ۶ هفته تمرین هوازی همراه با مصرف مکمل کوئرستین بر بیان ژن های AMPK و NRF-1 میتوکندریایی هیپوکامپ در رت های نر دیابتی

رها محمدی<sup>۱</sup>، لطفعلی بلبلی<sup>۲\*</sup>، محمدجواد پوروقار<sup>۳</sup>، رقیه افرونده<sup>۴</sup>

۱-دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران  
۲-استاد فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران  
۳-دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران  
۴-دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

یافته / دوره ۲۴ / شماره ۴ / پاییز ۱۴۰۱ / مسلسل ۹۴

### چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۹/۱ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳

مقدمه: شایع ترین عارضه ی عصبی هایپرگلیسمی نوروپاتی است که به تغییراتی در سیستم اعصاب مرکزی منجر می شود. از این رو، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین هوازی همراه با مصرف مکمل کوئرستین بر بیان ژن های **Ampk** و **Nrf-1** میتوکندریایی هیپوکامپ رت های نر دیابتی بود.

مواد و روش ها: پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده که به روش آزمایشگاهی انجام شد. بدین ترتیب تعداد ۳۵ رت نر نژاد ویستار به ۵ گروه ( $n=7$ ): کنترل سالم، کنترل دیابت، تمرین دیابت، تمرین دیابت مکمل کوئرستین و مکمل کوئرستین تقسیم شدند. در طول دوره، به گروه های مکمل و دیابتی مکمل بعد از القای دیابت،  $15\text{mg/kg}$  کوئرستین در روز تزریق شد. برای گروه های تمرینی ۶ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط روی نوار گردان به اجرا درآمد. جهت بررسی بیان ژن های **Ampk** و **Nrf-1** میتوکندریایی، ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین بافت هیپوکامپ جدا شد. برای تحلیل داده ها از نرم افزار آماری SPSS 23 و آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی با سطح معناداری  $0.05$  استفاده گردید.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان داد که پس از ۶ هفته تمرین هوازی میزان بیان ژن **Ampk** و **Nrf-1** میتوکندریایی در گروه دیابت تمرین مکمل نسبت به کنترل دیابت، دیابت تمرین و مکمل کوئرستین افزایش معنادار ( $P < 0.05$ ) داشته و تنها برای **Ampk** در گروه دیابت تمرین نسبت به گروه دیابت کنترل و کوئرستین افزایش معنادار وجود داشت ( $P < 0.05$ ).

بحث و نتیجه گیری: به نظر می رسد که ۶ هفته تمرین هوازی همراه با مکمل کوئرستین می تواند بر بیان ژن **Ampk** و **Nrf-1** میتوکندریایی بافت هیپوکامپ اثر مثبتی داشته و باعث افزایش آن در شرایط بیماری دیابت شود. واژه های کلیدی: تمرین هوازی، کوئرستین، **Ampk**، **Nrf-1**، میتوکندری.

\*آدرس مکاتبه: اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی.

پست الکترونیک: L\_bolboli@uma.ac.ir

## مقدمه

دیابت ملیتوس (DM) با مشخصه‌ی اصلی افزایش قند خون (هایپرگلیسمی) به علت عدم تأثیر انسولین یا نقص در ترشح انسولین شناخته شده است (۱). از جمله عوارض بیماری DM تأثیر منفی بر سیستم عصبی مرکزی و اختلال در یادگیری و حافظه است که از آثار نقص در هیپوکامپ می‌باشد، چنانچه در این راستا شواهد نشان می‌دهد که دیابت خطر آتروفی مغز و در نتیجه بیماری آلزایمر (AD: Alzheimers Disease) را افزایش می‌دهد (۲). در تحقیقات مطرح شده است که شیوع آلزایمر در افراد دیابتی ۱/۵ برابر بیشتر از افراد غیر دیابتی است (۳). آسیب به بافت هیپوکامپ در اثر استرس اکسایشی نتیجه‌ی عدم توازن بین تولید و خنثی‌سازی گونه‌های آنتی‌اکسیدانی است که این خود ناشی از افزایش تولید گونه‌های اکسیژن و نیتروژن و یا دفاع ناکافی آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۴). با افزایش استرس اکسیداتیو در بیماری DM، فعالیت آنزیم‌ها، عملکرد و ساختار اندام‌ها، اندامک‌ها و پروتئین‌های بافت‌های مختلف از جمله مغز دست‌خوش تغییراتی می‌شود (۵،۶). از جمله‌ی این اندامک‌ها میتوکندری بوده که جایگاه اصلی سنتز گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS: Reactive Oxygen Species) است.

تجمع ROS منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود که گزارش شده عامل اصلی در بیماری آلزایمر است (۷،۸). میتوکندری‌ها نسبت به استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر می‌باشند (۸) و از آنجایی که مغز انرژی زیادی مصرف می‌نماید، بنابراین هر گونه آسیب به میتوکندری در سلول‌های مغزی می‌تواند نتایج ناگواری را به همراه داشته باشد (۹). مطالعات زیادی ارتباط بین فعالیت میتوکندری و فعالیت مغز را بیان می‌نمایند زیرا، یک محصول فعالیت میتوکندری استرس اکسیداتیو است که با تخریب نورونی و به‌ویژه بیماری AD مرتبط می‌باشد

(۱۰). در دوره‌ی این بیماری، کاهش چشمگیری در تعداد میتوکندری‌های سالم رخ می‌دهد (۱۱)، ضمن اینکه تغییر در ساختار میتوکندری و آنزیم‌هایش، محل و تحرک آن‌ها نیز در این بیماری مشاهده می‌شود (۱۰). بنابراین، بایوژنز میتوکندری، فرآیندی که طی آن با قرارگیری در شرایط مناسب توده‌ی میتوکندریایی سلول افزایش می‌یابد (۱۲)، در بیماری DM حائز اهمیت واقع می‌شود. از جمله شاخص‌هایی که در بایوژنز میتوکندری می‌تواند مورد توجه قرار گیرند دو شاخص Ampk و Nrf-1 میتوکندریایی است. در این راستا، رایج‌ترین فاکتورهای رونویسی که پروموتور ژن‌های میتوکندری را فعال می‌کنند ژن‌هایی هم‌چون ژن فاکتور هسته‌ای Nrf-1 و Nrf-2 را شامل می‌شود (۱۳). Nrf-1 نقش مهم در هماهنگی بیان ژن میتوکندری و هسته را دارد و در نهایت باعث بیان ژن‌های Tfam و TFB-1M می‌شود (۱۴). علاوه بر این، در حفظ هموستاز انرژی مسیرهای بیولوژیکی درگیر هستند که برای درمان‌های دارویی و مبارزه با مقاومت به انسولین و اختلالات متابولیکی هدف‌گذاری شده‌اند. از جمله این عوامل در این مسیرها Ampk است که به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در تنظیم متابولیسم شناخته می‌شود (۱۵). فعال‌سازی این مسیر بنا به نوع بافت اثرات متفاوتی را دارد، چنانچه در بافت قلبی موجب فعال‌سازی و جابجایی انتقال‌دهنده گلوکز، برداشت آن و بایوژنز میتوکندری می‌شود (۱۶) و در بافت‌های دیگر اثرات گوناگون دیگری را دارد.

به‌نظر می‌رسد که فعالیت‌های ورزشی، نقش ویژه‌ای در بهبود عملکرد انسولین، تنظیم قند خون، متابولیسم پروتئین‌ها و چربی‌ها، جلوگیری از عوارض دیابت، بهبود انعطاف‌پذیری و قدرت عضلات و اثرات مفیدی بر دستگاه عصبی مرکزی داشته باشد (۱۷). به‌خصوص تمرینات ورزشی هوازی، چرا که

سرطانی آن می‌شود (۲۵). اخیراً نشان داده شده است که مصرف مکمل کوئرستین می‌تواند از میتوکندری‌های مغزی در برابر استرس اکسیداتیو محافظت کرده و باعث بهبود عملکرد میتوکندریایی شود و در واقع مانع از آتروفی شود (۲۶، ۲۲). بدین ترتیب، به دلیل اینکه در رابطه با تأثیر همزمان مصرف کوئرستین و تمرین ورزشی هوازی بر سازگاری‌های سلولی - مولکولی از قبیل آنزیم‌های میتوکندری هیپوکامپ در شرایط بیماری دیابت خلا تحقیقاتی وجود دارد، از این رو، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ۶ تمرین هوازی به همراه مصرف مکمل کوئرستین بر بیان ژن‌های *Nrf-1* و *Ampk* میتوکندری هیپوکامپ رت‌های نر دیابتی بود.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده که به همراه گروه کنترل به روش آزمایشگاهی انجام شد. بدین ترتیب از خانه حیوانات دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز ۳۵ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار تهیه شد. کد اخلاق در پژوهش تحقیق حاضر IR.SSRC.REC.1401.097 است. پس از انتقال حیوانات به محیط آزمایشگاه، به صورت گروه‌های ۲ و ۳ تایی در قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات شفاف قرار داده شدند. دمای محیط  $24 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و چرخه تاریکی - روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته بود. در دوره تحقیق، حیوانات به غذا و آب به صورت آزاد دسترسی داشتند. در طول مرحله، به منظور آشنایی رت‌ها با شرایط آزمایشگاه و نوارگردان، حیوانات ۵ روز در هفته با سرعت ۱۰-۵ متر در دقیقه و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند و با چگونگی دویدن بر روی تردمیل آشنا شدند، پس از دوره‌ی آشنایی آزمودنی‌ها ۷ سر رت به صورت تصادفی بعنوان (۱) گروه کنترل سالم انتخاب شده و ماباقی نیز جهت القای دیابت با استرپتوزوتوسین

مطالعات گسترده‌ای نشان داده‌اند این نوع از تمرینات موجب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های میتوکندری و افزایش حداکثر اکسیژن مصرفی میتوکندری می‌شود (۱۸، ۱۹). چنانچه می‌بینیم در مطالعه برنجیان و همکاران (۱۳۹۵) به بررسی تأثیر یک دوره برنامه تمرین تناوبی شدید بر بایوژنز میتوکندریایی بافت ریه پرداختند و نتایج نشان داد که یک دوره تمرین تناوبی شدید (۹ هفته‌ای) باعث افزایش بیان *Nrf-1* در بافت ریه و احتمالاً بایوژنز میتوکندریایی می‌شود (۲۰) و یا در مطالعه Wang و همکاران (۲۰۲۰) که به بررسی تأثیر یک دوره ۱۶ هفته‌ای تمرین ورزشی هوازی بر سطوح *α1* PGC- و *Ampk* قلب موش‌های صحرایی دیابتی پرداخته شد. در پایان نتایج نشان داد که ۱۶ هفته تمرین استقامتی بر بیان پروتئین‌های *PGC-α1* و *Ampk* اثر مثبت دارد و باعث افزایش میزان آن‌ها شده است (۲۱).

مطالعات نشان داده‌اند که در ایجاد مقاومت به انسولین و عوارض ناشی از آن آسیب‌های اکسیداتیو دخیل بوده (۲۲) لذا، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌شود که از جمله‌ی آن‌ها مکمل کوئرستین (Quercetin) است که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی شناخته شده است و از مهم‌ترین پلی‌فنول‌های تغذیه‌ای بوده که می‌تواند بر تولید انرژی و عملکرد زنجیره‌ی انتقال الکترون، بایوژنز و تعدیل نقص میتوکندریایی تأثیر بگذارد (۲۳). این گیاه از مهم‌ترین ترکیبات خانواده فلاونوئیدها به‌شمار می‌رود و یک محصول پلی‌فنلی و یکی از مشتقات گیاهی با فرمول شیمیایی *C15H10O7* است (۲۴). کوئرستین بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در میان سایر فلاونوئیدها دارد و مهم‌ترین خاصیت آن خاصیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی آن است که باعث خواص مفید مانند خاصیت ضد باکتریایی، آنتی‌ویروسی و ضد

جهت یکنواخت کردن سازگاری‌های به‌دست آمده، مدت و سرعت در هفته‌ی پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شدند. همچنین در این پروتکل، برای گرم کردن و برای سرد کردن هر کدام به صورت مجزا ۳ دقیقه زمان در نظر گرفته شد (۳۰). پروتکل تمرینی فزآینده روی نوارگردان بدون شیب در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. نمایش عددی پروتکل در هفته‌های مختلف تمرین

هفته‌ها	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
مدت	۱۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۳۰
تمرین (دقیقه)						
سرعت	۱۰	۱۰	۱۵	۱۵	۱۸	۱۸
نوارگردان (متر بر دقیقه)						

### بافت برداری و اندازه‌گیری GPX و SOD

بعد از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین روز تمرینی، رت‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از  $1\text{-}75\text{ ml/kg}$  کتامین و  $1\text{-}5\text{ ml/kg}$  زایلازین بیهوش شدند و در ادامه بافت هیپوکامپ در شرایط استریل از آن‌ها جدا شد. پس از استخراج، هیپوکامپ به سرعت داخل نیتروژن مایع قرار داده شد و در فریزر  $-70^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد منجمد شده و تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی در آنجا نگهداری شدند. استخراج RNA براساس روش ارائه شده شرکت و با استفاده از کیت تجاری TRIZOL صورت پذیرفت. میزان سطوح غلظت و خلوص نمونه‌های RNA پس از قرائت جذب آن‌ها در طول موج  $260\text{ nm}$  و نیز محاسبه کردن نسبت جذب  $260/280$  با استفاده از اسپکتروفوتومتر بیوفتومتر مشخص گردید. بدین ترتیب، نمونه‌هایی که نسبت جذب آن‌ها بیش از  $1/8$  بود جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. سنتز cDNA نیز بوسیله کیت تجاری AmpliSence انجام شد. به منظور تأیید بیان ژن‌های مورد بررسی، ابتدا واکنش روی

(STZ: Streptozotocin) مورد استفاده قرار گرفتند. بدین ترتیب بعد از ۱۲ ساعت محرومیت غذایی، برای القای دیابت به حیوانات  $60\text{ mg/kg}$  محلول استرپتوزوسین (Sigma S0130-1G USA) تهیه شده در بافر سترات تازه  $0/1$  مولار با  $\text{PH} = 5,4$  تزریق درون صفاقی صورت گرفت (۲۷). مدت زمان ۷۲ ساعت پس از تزریق، بر روی ورید دم یک جراحی ایجاد گردید و یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار گرفت و بوسیله دستگاه گلوکومتر (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) اندازه‌گیری شد و رت‌هایی که قند خون آن‌ها  $250\text{ mg/dl}$  یا بالاتر از آن باشد، به‌عنوان گروه دیابتی در نظر گرفته شدند (۲۷). میزان قند خون رت‌ها به‌طور منظم هر دو هفته یک‌بار اندازه‌گیری شد تا از عدم بازگشت گلوکز خون اطمینان حاصل شود (۲۸). لازم به ذکر است که به رت‌های غیر دیابتی معادل حجمی بافر سترات تزریق شد (۲۸). در ادامه نیز رت‌های دیابتی شده با STZ به صورت تصادفی در ۴ گروه ۷ تایی: ۲- گروه کنترل دیابت، ۳- گروه مکمل کوئرستین، ۴- گروه دیابت تمرینی و ۵- دیابت تمرینی به همراه مکمل کوئرستین تقسیم شدند. در طول دوره، به گروه‌های دیابتی تمرینی مکمل و مکمل کوئرستین بعد از القای دیابت، ۱۵ میلی‌گرم کوئرستین به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن در روز تزریق شد (۲۷).

### پروتکل پژوهش

پروتکل تمرینی تحقیق حاضر براساس مطالعه Coskun و همکاران بود، بدین ترتیب تمرین هوازی با شدت متوسط (۵۰ تا ۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) به اجرا درآمد (۲۹). در این برنامه گروه‌های تمرینی در معرض تمرین نوارگردان حیوانی (مدل آذرخش) به مدت ۶ هفته و برای ۵ جلسه در هفته مورد تمرین ورزشی با شدت متوسط قرار گرفتند. مدت و سرعت تمرینی روی نوارگردان به تدریج افزایش یافت.

( $P=0/001$ ) بین پنج گروه تفاوت معنادار وجود دارد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که دیابت باعث افزایش گلوکز خون در گروه‌های دیابتی شده است که این نتیجه از مقایسه گروه کنترل دیابت با کنترل سالم به دست آمد ( $P=0/001$ ). شش هفته تمرین استقامتی به تنهایی و همراه با مصرف مکمل کوئرستین باعث کنترل سطوح خون موش‌های دیابتی به ترتیب با سطح معناداری ( $P=0/001$ ) و ( $P=0/001$ ) نسبت به گروه کنترل دیابت می‌شود. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که پس از ۶ هفته تمرین استقامتی میزان بیان ژن *Ampk* در گروه تمرین دیابت مکمل نسبت به دیابت کنترل، مکمل کوئرستین و دیابت تمرین به ترتیب با سطح معناداری ( $P=0/001$ )، ( $P=0/001$ ) و ( $P=0/001$ ) افزایش معناداری داشته است و در گروه دیابت تمرین نسبت به دیابت کنترل و مکمل کوئرستین نیز به ترتیب با سطح معناداری ( $P=0/001$ ) و ( $P=0/001$ ) افزایش معناداری دیده شد. نتایج آزمون تعقیبی توکی برای *Nrf-1* نشان داد که تنها در گروه تمرین دیابت مکمل نسبت به دیابت کنترل ( $P=0/001$ )، مکمل کوئرستین ( $P=0/001$ ) و دیابت تمرین ( $P=0/001$ ) افزایش معناداری وجود دارد.

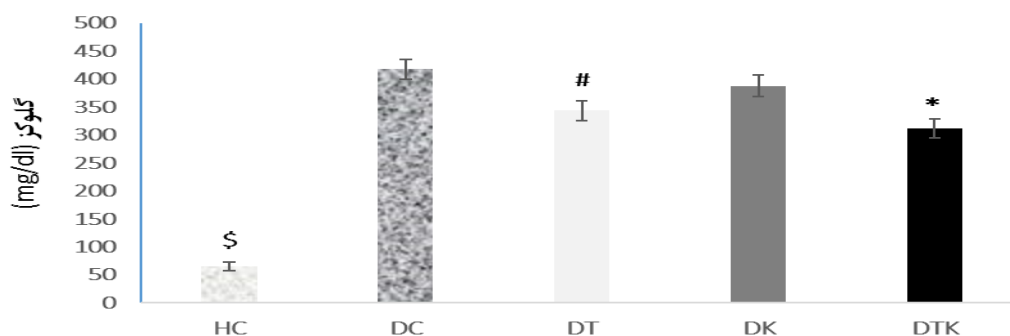
بافت‌های انتخابی انجام شد و پس از آن برای بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها از آزمون PCR در زمان حقیقی استفاده شد. همچنین، برای طراحی پروب و پرایمر، نرم افزار Beacon designer TM7/01 به کار گرفته شد. برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها، روش مقایسه‌ای  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و کیت تجاری *qPCR Probe Master* Bioneer به کار گرفته شد. مقادیر مقایسه‌ای بیان ژن *Ampk* و *Nrf-1* در مقایسه با بیان *GAPDH* در هر بافت توسط نرم افزار ژن، ارزیابی و براساس رابطه  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  گزارش گردید.

### آنالیز آماری

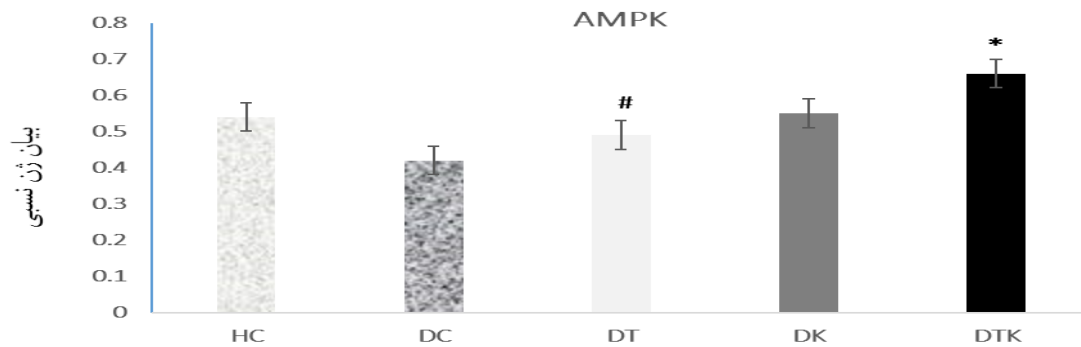
تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها و مقایسه گروه‌ها، به ترتیب از آزمون شاپیرو-ویلک (تحت سطح معناداری ۰/۱) و آزمون تحلیل واریانس یک طرفه با آزمون تعقیبی توکی (با سطح معناداری ۰/۰۵) استفاده شد.

### یافته‌ها

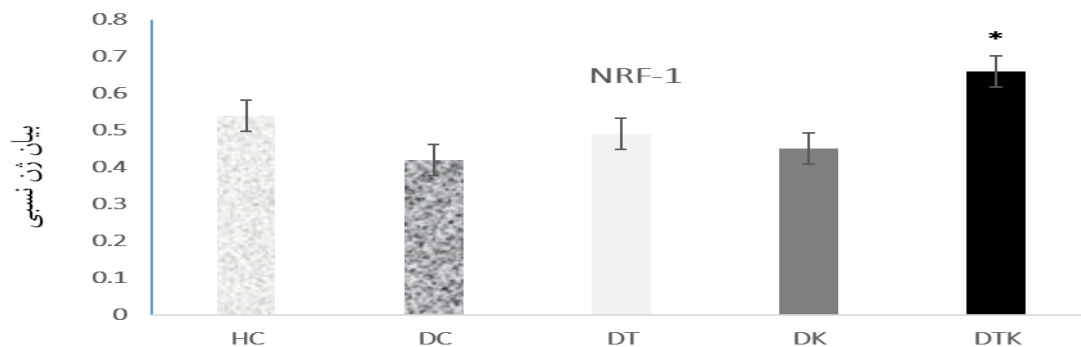
آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که برای هر سه شاخص گلوکز، *Ampk* و *Nrf-1* به ترتیب با سطح معناداری ( $P=0/001$ )، ( $P=0/001$ ) و ( $P=0/001$ )



نمودار ۱. سطح سرمی گلوکز ناشتا ( $Mean \pm SD$ ) در موش‌های صحرایی گروه‌های مختلف پس از ۶ هفته تمرین استقامتی. \* تفاوت معنادار بین گروه دیابت تمرین مکمل نسبت به مکمل کوئرستین و دیابت کنترل و # نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه دیابت تمرین نسبت به گروه دیابت کنترل و مکمل کوئرستین. و \$ نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه کنترل سالم نسبت به گروه دیابت کنترل، تمرین مکمل کوئرستین، کوئرستین و تمرین است. علائم اختصاری: HC: سالم کنترل، DC: کنترل دیابت، DT: تمرین دیابت، DK: مکمل دیابت و DTK: مکمل دیابت تمرین.



نمودار ۲. میزان بیان ژن آنزیم AMPK بافت هیپوکامپ پس از شش هفته تمرین استقامتی بر اساس آزمون آماری تحلیل واریانس یک راهه. \* نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه تمرین مکمل با گروه‌های کنترل دیابت، مکمل کوئرستین و دیابت تمرین و # نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه دیابت تمرین نسبت به گروه دیابت کنترل و مکمل کوئرستین. علائم اختصاری: HC: سالم کنترل، DC: کنترل دیابت، DT: تمرین دیابت، DK: مکمل دیابت و DTK: مکمل دیابت تمرین.



نمودار ۳. میزان بیان ژن آنزیم NRF-1 بافت هیپوکامپ پس از شش هفته تمرین استقامتی بر اساس آزمون آماری تحلیل واریانس یک راهه. \* نشان - دهنده تفاوت معنادار بین گروه تمرین مکمل با گروه‌های کنترل دیابت، مکمل کوئرستین و دیابت تمرین. علائم اختصاری: HC: سالم کنترل، DC: کنترل دیابت، DT: تمرین دیابت، DK: مکمل دیابت و DTK: مکمل دیابت تمرین.

دیابت نسبت به گروه کنترل دیابت و مکمل کوئرستین دیده شد. درمورد تغییرات سطوح گلوکز، گروه مکمل کوئرستین زمانی که با گروه کنترل دیابت مقایسه می‌شود اگرچه تغییرات معناداری مشاهده نمی‌شود اما، شاهد کاهش چشمگیری در این گروه هستیم که علت اصلی آن می‌تواند فلاونوئیدهای کوئرستین باشد. به این دلیل که مشخص شده است فلاونوئیدهای مختلف قادرند قند خون را کاهش دهند و ترشح انسولین و حساسیت به آن را مخصوصاً در بیماری دیابت افزایش دهند (۳۱،۳۲) که ناشی از نقش کوئرستین در ایجاد تعادل بین سیستم آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسایشی است (۳۳).

## بحث و نتیجه‌گیری

هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین استقامتی به همراه مصرف مکمل کوئرستین بر بیان ژن‌های Ampk و Nrf-1 میتوکندریایی هیپوکامپ رت‌های نر دیابتی بود. نتایج نشان داد بیماری دیابت باعث افزایش سطوح قند خون و کاهش بیان ژن Ampk و Nrf-1 در هیپوکامپ موش‌های دیابتی شده است اما، خوشبختانه اجرای ۶ هفته تمرین استقامتی همراه با مصرف مکمل کوئرستین باعث کنترل سطوح گلوکز خون موش‌های دیابتی و افزایش بیان ژن‌های Ampk و Nrf-1 در بافت هیپوکامپ حیوانات شده است. تنها برای شاخص Ampk کاهش معناداری در گروه تمرین

کند (۴۰). از جمله اقدامات فیزیولوژیکی *Ampk* که موجب بهبود فرآیندهای کاتابولیکی می‌شود تولید بیشتر *ATP* است. سنتز پروتئین بخشی از فرآیندهایی است که منجر به مصرف *ATP* می‌شود. تمرین ورزشی باعث افزایش مصرف *ATP* می‌شود و مصرف *ATP* کاهش نسبت *AMP/ATP* و افزایش فعالیت هتروتیرمیریک *Ampk* را به دنبال دارد. نتیجه‌ی این واکنش‌ها، افزایش جابجایی *GLUT4* از درون سلول به سطح غشاء است. بدین ترتیب، آنزیم *Ampk* از طریق افزایش جابجایی بیان *GLUT4* به بهبود برداشت گلوکز کمک می‌کند (۴۱) که برای بیماری دیابت خیلی حائز اهمیت است. علاوه بر این، فعال‌سازی *Ampk* می‌تواند به‌طور مستقیم منجر به تنظیم فاکتورهای رونویسی مانند پروتئین *PGC-1 $\alpha$*  شود که از جمله شاخص‌های افزایش بایوژنز میتوکندریایی است. *PGC-1 $\alpha$*  خود نیز منجر به تنظیم بسیاری از پروتئین‌های داخل سولی از قبیل *Nrf-1* می‌شود (۴۲). بدین ترتیب، *Ampk* نقش غیرمستقیم خود در بایوژنز میتوکندریایی را این‌گونه ایفا می‌نماید. در مورد بررسی تاثیر تمرین ورزشی بر پروتئین *Nrf-1* تحقیقات محدودی صورت پذیرفته است. اما، شواهد این‌گونه نشان داده‌اند که این پروتئین سازگاری میتوکندری را افزایش داده که با افزایش تنفس سلولی (مصرف اکسیژن)، افزایش بیان واسطه‌های چرخه کربس و آنزیم‌های چرخه کربس، افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب و تغییرات مورفولوژیکی میتوکندری همراه است (۴۳). بنابراین، در شرایط بیماری دیابت که میزان بیان آن کاهش می‌یابد ظاهراً اجرای تمرینات ورزشی با شدت متوسط یک روش موثر برای افزایش سطوح بیان ژن آن است و از جمله دلایل توجیهی این است که تمرین استقامتی ظرفیت اکسیداتیو را افزایش می‌دهد (۴۴). در مورد تاثیر مکمل کوئرستین می‌توان این‌گونه بیان

از جمله شاخص‌های بایوژنز میتوکندریایی اندازه‌گیری شده در پژوهش حاضر میزان بیان ژن *Ampk* و *Nrf-1* در هیپوکامپ موش‌های دیابتی بود که نتایج نشان داد اجرای ۶ هفته تمرین استقامتی با و بدون مصرف مکمل باعث افزایش سطوح بیان ژن *Ampk* شده است و برای *Nrf-1* تنها اجرای ۶ هفته تمرین به همراه مکمل کوئرستین باعث افزایش سطوح آن شده است. لازم به ذکر است که اگرچه مصرف کوئرستین در گروه مکمل به‌تنهایی نسبت به گروه دیابت تاحدودی باعث بهبود بیان ژن آن‌ها شده است، اما این تغییرات معنادار نبوده‌اند. نتیجه‌ی تحقیق حاضر با مطالعه‌ی Joseph و همکاران (۲۰۲۲) (۳۴)، Sun همکاران (۲۰۱۹) (۳۶) و Liu، (۳۵) (۲۰۱۹) و همکاران (۲۰۱۹) (۳۷) هم‌سو است. اما، با دمیچی و همکاران (۲۰۱۹) (۳۸) و Sturgeon و همکاران (۲۰۱۵) (۳۹) ناهم‌سو است. در تحقیق Sturgeon به بررسی تاثیر تمرین ورزشی با شدت متوسط بر *Ampk* بافت قلب موش‌های صحرایی پرداخته شد و نتایج نشان داد که تغییر معناداری در سطوح این شاخص پس از اجرای تمرین ورزشی دیده نشده است. تبری و محبی (۲۰۲۰) در مطالعه‌ی نشان دادند که پس از ۱۲ هفته تمرین تناوبی با شدت متوسط و بالا سطوح *Nrf-1* را دچار تغییر نمی‌کند. این نشان‌دهنده‌ی این مطلب است که وضعیت و سن آزمودنی و نوع تمرین‌های ورزشی و عوامل آن مانند شدت، مدت، نوع تمرین، تکرار و ریکاوری می‌تواند بر نتایج تأثیرگذار باشد. تنظیم *Ampk* یکی از بزرگترین اهداف در مطالعات بیماری دیابت و سندروم متابولیک است، زیرا براساس شواهد اختلال در تنظیم *Ampk* نقش مهمی در توسعه مقاومت به انسولین و بیماری دیابت بازی می‌کند و فعال‌سازی *Ampk* چه از طریق دارویی و چه فیزیولوژیکی می‌تواند از مقاومت به انسولین جلوگیری

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری در گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشکده علوم تربیتی و روان شناسی دانشگاه محقق اردبیلی است. هزینه اجرای آن از محل اعتبار پژوهانه واحد پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی تامین شده است. صمیمانه از مسئولین و کسانی که در اجرای تحقیق ما را یاری نمودند سپاسگزاری می‌نماییم.

نمود که این مکمل از راه خاصیت آنتی‌اکسیدانی و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد موجب بازسازی بتای پانکراس می‌شود و از این راه با کاهش دادن گلوکز خون بر مسیر بایوژنز میتوکندری اعمال اثر می‌نماید. چراکه مشخص شده است کوئرستین قادر است با خاصیت ضد آنتی-اکسیدانی خود عملکرد سلول را تغییر دهد (۴۵). از جمله محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم اندازه‌گیری سایر متغیرهای درگیر در روند آنژیوژنز و میزان بیان پروتئینی شاخص‌های مذکور است.



## References

1. Calábria LK, Vieira da Costa A, da Silva Oliveira RJ, Ramos Deconte S, Nascimento R, de Carvalho WJ, et al. Myosins Are Differentially Expressed under Oxidative Stress in Chronic Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Brains. *ISRN Neurosci*. 2013; 2013:4239-31
2. Šerbedžija P, Madl JE, Ishii DN. Insulin and IGF-I prevent brain atrophy and DNA loss in diabetes. *Brain research*. 2009;1303:179-94.
3. Kim KS, Kim SK, Sung KM, Cho YW, Park SW. Management of type 2 diabetes mellitus in older adults. *Diabetes & metabolism journal*. 2012;36(5):336-44.
4. Seyfi Askshahr F, Khajehlandi M. The Effect of Moderate-Intensity Endurance Training on the Expression Level of Angiogenesis Factors and Cardiac Oxidative Stress in Rats. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2020;20(3):361-71. (In Persian)
5. Bolboli L, Khajehlandi M. The Effect of Six Weeks of Moderate-Intensity Endurance Training on Serum Levels of Klotho and Expression of the Fibroblast-23 Growth Factor Gene (FGF23) in the Hearts of Diabetic Rats: An Experimental Study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2021;20(4):371-86. (In Persian)
6. Wang B-n, Wu C-b, Chen Z-m, Zheng P-p, Liu Y-q, Xiong J, et al. DL-3-n-butylphthalide ameliorates diabetes-associated cognitive decline by enhancing PI3K/Akt signaling and suppressing oxidative stress. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2021;42(3):347-60.
7. Dumont M, Beal MF. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free radical biology and medicine*. 2011;51(5):1014-26.
8. Müller M, Cheung K-H, Foskett JK . Enhanced ROS generation mediated by Alzheimer's disease presenilin regulation of InsP3R Ca<sup>2+</sup> signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;14(7):1225-35.
9. Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to aging a. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1992;663(1):85-96.
10. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, et al. Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*. 2001;21(9):3017-23.
11. Grivennikova VG, Vinogradov AD. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2006;1757(5-6):553-61.
12. Dominy JE, Puigserver P. Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(7):a015008.
13. Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*. 2007;130(3):548-62.
14. Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription

- factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(4):1309-13.
15. Coughlan KA, Valentine RJ, Ruderman NB, Saha AK. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*. 2014;7:241.
  16. Carling D. AMPK signalling in health and disease. *Current opinion in cell biology*. 2017;45:31-7.
  17. Keshvari M, Rahmati M, Mirnasouri R, Chehelcheraghi F. Effects of endurance exercise and *Urtica dioica* on the functional, histological and molecular aspects of the hippocampus in STZ-Induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2020;256:112801. . (In Persian)
  18. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell metabolism*. 2013;17(2):162-84.
  19. Arabmomeni A, Mohebbi H, Riasi A, Marandi M. Effect of intermittent training on oxidative and glycolytic capacity in rat skeletal muscles. *SSU\_Journals*. 2014;22(5):1554-66(.In Persian)
  20. Berenjeian Tabrizi H, Mirdar S, Moghanibashi MM, Ansari Pirsaraei Z. The Effect of High-Intensity Interval Training on Mitochondrial Biogenesis of Lung Tissue. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2017;6(4):522-9. . (In Persian)
  21. Wang SY, Zhu S, Wu J, Zhang M, Xu Y, Xu W, et al. Exercise enhances cardiac function by improving mitochondrial dysfunction and maintaining energy homoeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy. *Journal of Molecular Medicine*. 2020;98(2):245-61.
  22. Huang EA, Gitelman SE. The effect of oral alpha-lipoic acid on oxidative stress in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes*. 2008;9(3pt2):69-73.
  23. Lakroun Z, Kebieche M, Lahouel A, Zama D ,Desor F, Soulimani R. Oxidative stress and brain mitochondria swelling induced by endosulfan and protective role of quercetin in rat. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015;22(10):7776-81.
  24. Arts MJ, Dallinga JS, Voss H-P, Haenen GR, Bast A .A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*. 2004;88(4):567-70.
  25. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003;189(1-2):41-54.
  26. Costa LG, Garrick JM, Roquè PJ, Pellacani C. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:2986796.
  27. Kilincarslan G, Donmez N. Effect of Quercetin Administration and Exercise on

- Plasma Cytokine Levels in Rats with STZ Induced Diabetes. *Bull Env Pharmacol Life Sci.* 2019;8:119-27.
28. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart, Lung and Circulation.* 2003;12(1):44-50.
  29. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological research.* 2002;23-117:(2)51;5.
  30. Chen S-R, Pan H-L. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *Journal of neurophysiology.* 2002;87(6):2726-33.
  31. Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International journal of molecular sciences.* 2010;11(4):1365-402.
  32. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical pharmacology.* 1983;32(7):1141-8.
  33. Roshanravan N, Askari SF, Fazelian S, Ayati MH, Namazi N. The roles of quercetin in diabetes mellitus and related metabolic disorders; special focus on the modulation of gut microbiota: A comprehensive review. *Critical Reviews* in Food Science and Nutrition. 2021;1-14 . (In Persian)
  34. Joseph JS, Fagbohun OF. Exercise increases the expression of glucose transport and lipid metabolism genes at optimum level time point 6 h post-exercise in rat skeletal muscle. *Comparative Clinical Pathology.* 2-27-022:1
  35. Sun XL, Lessard SJ, An D, Koh HJ, Esumi H, Hirshman MF, et al. Sucrose nonfermenting AMPK-related kinase (SNARK) regulates exercise-stimulated and ischemia-stimulated glucose transport in the heart. *Journal of cellular biochemistry.* 2019;120. 96-685:(1).
  36. Liu H-T, Pan S-S. Late exercise preconditioning promotes autophagy against exhaustive exercise-induced myocardial injury through the activation of the AMPK-mTOR-ULK1 pathway. *BioMed Research International.* 2019;2019.
  37. Damirchi A, Ebadi B. The effects of the intensity of interval training on mitochondrial dynamics-related proteins in the heart of male rats with myocardial infarction. *Journal of Applied Exercise Physiology.* 2019;14(28):159-72. . (In Persian)
  38. Dixit S. Can moderate intensity aerobic exercise be an effective and valuable therapy in preventing and controlling the pandemic of COVID-19? *Medical hypotheses.* 2020;143:109854.-
  39. Sturgeon K, Muthukumaran G, Ding D, Bajulaiye A, Ferrari V, Libonati JR.

- Moderate-intensity treadmill exercise training decreases murine cardiomyocyte cross-sectional area. *Physiological reports*. 2015;3(5):e12406.
40. Ahsan T. Metabolic Syndrome: An Overview. *Pakistan Journal of Medical Research*. 2015;54(1):1.
41. Qomi M, Arshadi S, Banayifar A, Kazemzadeh Y. The effect of eight weeks aerobic and resistance training on AMP-activated protein kinase (AMPK) gene expression in soleus muscle and insulin resistance of STZ-induced diabetic rat. *Journal of Medical Council of Islamic Republic of Iran*. 2019;37(2).
42. Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2012;23(9):459-66.
43. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999;98(1):115-24.
44. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 $\alpha$  gene in human skeletal muscle. *Wiley Online Library*; 2003.
45. De Sa Junior PL, Câmara DAD, Costa AS, Ruiz JLM, Levy D, Azevedo RA, et al. Apoptotic effect of eugenol involves G2/M phase abrogation accompanied by mitochondrial damage and clastogenic effect on cancer cell in vitro. *Phytomedicine*. 2016;23(7):725-35.

## Effect of Six Weeks of Aerobic Training with Quercetin Supplementation on the Expression of Mitochondrial AMPK and NRF-1 Genes in the Hippocampus of Diabetic Male Rats

**Mohammadi R<sup>1</sup>, Bolboli L<sup>2\*</sup>, Pourvaghar MJ<sup>3</sup>, Afroundeh R<sup>4</sup>**

1. Ph.D. Student in Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2. Professor of Sport Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, l\_bolboli@uma.ac.ir

3. Associate Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, University of Kashan, Kashan, Iran

4. Associated Professor of Sport Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: 2022/11/22 Accepted: 2023/3/4

### Abstract

**Background:** The most common neurological complication of hyperglycemia is neuropathy which leads to changes in the central nervous system. Therefore, this study aimed to investigate the effect of six weeks of aerobic exercise with quercetin supplementation on the expression of mitochondrial Ampk and Nrf-1 genes in the hippocampus of diabetic male rats.

**Materials and Methods:** This experimental study was performed by the laboratory method. Thus, 35 male Wistar rats were divided into five groups (n=7): Healthy Control, Diabetes Control, Diabetes Exercise, Diabetes Exercise Quercetin Supplement, and Quercetin Supplement. During the course, the supplement and diabetic groups were injected with 15 mg/kg of quercetin per day after induction of diabetes. For the training groups, six weeks of moderate-intensity aerobic exercise was performed on a revolving bar. To evaluate the expression of mitochondrial Ampk and Nrf-1 genes, hippocampal tissue was isolated 24 h after the last training session. The SPSS statistical software (version 23), one-way analysis of variance (ANOVA), and Tukey's post hoc test onther significance level of 0.05 were used to analyze the collected data.

**Result:** The findings of this study showed that after six weeks of aerobic exercise, the expression of mitochondrial Ampk and Nrf-1 genes in the exercise supplement diabetes group significantly increased (P<0.05) compared to diabetes control, exercise diabetes, and quercetin supplementation. A significant increase was observed only for Ampk in the exercise diabetic group compared to the diabetic control and quercetin diabetic groups (P<0.05).

**Conclusion:** It seems that six weeks of aerobic exercise with quercetin supplementation can positively affect the expression of mitochondrial Ampk and Nrf-1 genes in hippocampal tissue and increase it in diabetic conditions.

**Keywords:** Aerobic exercise, Ampk, Mitochondria, Nrf-1, Quercetin.

\***Citation:** Mohammadi R, Bolboli L, Pourvaghar MJ, Afroundeh R. Effect of Six Weeks of Aerobic Training with Quercetin Supplementation on the Expression of Mitochondrial AMPK and NRF-1 Genes in the Hippocampus of Diabetic Male Rats. *Yafte*. 2023; 24(4):58-70.