

## Effect of Continuous Aerobic Training with Citrus Aurantium L. on Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinases Gene Expression in the Liver Tissue of the Elderly Rats

Zinab Shykhosslami<sup>1</sup> , Ahmad Abdi<sup>1\*</sup> , Seyed Ali Hosseini<sup>2</sup>, Alireza Barari<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept of Sports Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

<sup>2</sup> Dept of Sports Physiology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

### Article Info

#### Article type:

Research article

#### Article History:

Received: 06 March 2021

Revised: 15 March 2021

Accepted: 28 August 2021

#### \* Correspondence to:

Ahmad Abdi Dept of Sports Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Email: a.abdi58@gmail.com

### ABSTRACT

**Introduction:** Aging impairs the function of genes involved in hepatic metabolisms, such as Mitogen-activated protein kinase (AMPK) and Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K). Exercise and Citrus Aurantium (CA) have a beneficial effect on improving metabolic factors in aging. This study aimed to investigate the effect of aerobic training (T) with consumption of CA on the AMPK and PI3K gene expression levels in the liver tissue of elderly rats.

**Material & Methods:** In this experimental study, 25 elderly female rats were divided into five groups of five animals per group. The groups included 1) control, 2) sham, 3) CA, 4) T, and 5) T+CA. Over the course of eight weeks, the T groups ran on the treadmill three sessions per week at 65% to 75% of the maximum running speed for 15 min in the first week to 31 min in the eighth week. The supplement groups also received 300 mg/kg/day of CA extract peritoneal. After 48 h of the last training session and CA consumption, AMPK and PI3K gene expression levels in the liver tissue were measured by the real-time PCR method.

(Ethic code: IR.IAU.M.REC.1399.032)

**Findings:** AMPK expression was significantly increased in CA (P=0.043), T (P=0.025,) and T+CA (P=0.009) groups, compared to the control group. Moreover, a significant increase in the PI3K expression was observed in the T+CA (P=0.031) group, compared to the control group.

**Discussion & Conclusion:** The results of the present study showed that T and CA might improve liver cell function in elderly rats by increasing the expression of AMPK and PI3K genes.

**Keywords:** AMPK, Citrus aurantium, Liver metabolism, PI3K

### ➤ How to cite this paper

Shykhosslami Z, Abdi A, Hosseini S A, Barari A. Effect of Continuous Aerobic Training with Citrus Aurantium L. on Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinases Gene Expression in the Liver Tissue of the Elderly Rats. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;29(6): 82-89.

## اثر تمرین هوازی تداومی همراه با مصرف بهار نارنج بر بیان ژن پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن و فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز بافت کبد رت‌های سالمند

زینب شیخ‌الاسلامی<sup>۱</sup> ID، احمد عبدی<sup>۱\*</sup> ID، سید علی حسینی<sup>۲</sup>، علیرضا برای<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

<sup>۲</sup> گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

#### نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۶

تاریخ داوری: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۶

#### نویسنده مسئول:

احمد عبدی

گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد

آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد

اسلامی، آمل، ایران

Email:

a.abdi58@gmail.com

**مقدمه:** سالمندی باعث اختلال در عملکرد ژن‌های درگیر در متابولیسم کبدی از قبیل پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) و فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز (PI3K) می‌شود. فعالیت‌های بدنی و بهار نارنج (CA) تأثیر مفیدی در بهبود عوامل متابولیکی در سالمندی دارند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تمرین هوازی (T) همراه با دریافت CA بر بیان ژن AMPK و PI3K در بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۲۵ سر موش صحرایی ماده سالمند در پنج گروه ۵ سری شامل ۱. کنترل، ۲. شم، ۳. CA، ۴. T، ۵. T+CA قرار گرفتند. در مدت هشت هفته، گروه‌های تمرینی به میزان سه جلسه در هفته، با شدت ۶۵ تا ۷۵ درصد بیشینه سرعت دویدن به مدت ۱۵ دقیقه در هفته اول تا ۳۱ دقیقه در هفته هشتم روی نوار گردان دویدند؛ همچنین گروه‌های دریافت کننده مکمل، روزانه ۳۰۰ mg/kg عصاره CA به صورت صفاقی دریافت کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و مصرف CA، سطوح بیان ژنی AMPK و PI3K در بافت کبد به روش real-time PCR اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** بیان AMPK در گروه‌های CA ( $P=0.043$ )، T ( $P=0.025$ ) و T+CA ( $P=0.009$ ) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت؛ همچنین افزایش معناداری در بیان PI3K در گروه T+CA ( $P=0.031$ ) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج پژوهش حاضر نشان داد که T و CA احتمالاً با افزایش در میزان بیان ژن AMPK و PI3K، باعث بهبود عملکرد سلول‌های کبدی در موش‌های سالمند می‌شوند.

**واژه‌های کلیدی:** بهار نارنج، تمرین، متابولیسم کبد، AMPK، PI3K

◀ **استناد:** شیخ‌الاسلامی، زینب؛ عبدی، احمد؛ حسینی، سید علی؛ برای، علیرضا. اثر تمرین هوازی تداومی همراه با مصرف بهار نارنج بر بیان ژن پروتئین

کیناز فعال شده با میتوژن و فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز بافت کبد رت‌های سالمند. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، اسفند ۱۴۰۰؛ ۲۹(۶): ۸۹-۸۲.

سامانه‌ای چشمگیری داشته باشد (۶). سیگنالینگ AMPK در بسیاری از بافت‌ها با افزایش سن کاهش می‌یابد که باعث برهم خوردن هومئوستاز سلولی و عملکرد میتوکندری می‌شود (۶). در کبد موش‌ها، پیری با افزایش فسفوریلاسیون و فعالیت AMPK همراه است. با وجود این، مسیرهای پایین‌دستی فعال نمی‌شود که نشان‌دهنده اختلال کلی در مسیر AMPK است (۷).

فعالیت بدنی برای بهبود عملکرد اندام‌های بدن در افراد سالمند بسیار مهم است. نشان داده شد که تمرین روی تردمیل با سرعت ۲۰ درصد بیشترین سرعت به مدت چهار هفته و چهار جلسه در هفته، قادر به بازسازی کبد آسیب‌دیده ناشی از مصرف فروکتوز در موش‌های صحرایی به وضعیت پیش از القای پیری می‌شود (۸). در مطالعه دیگری نیز نشان داده شد که هشت هفته تمرین شنا به مدت یک ساعت در روز و پنج جلسه در هفته، سبب فعال کردن مسیر سیگنالینگ لپتین-AMPK-استیل‌کوآ کربوکسیلاز (leptin-AMPK-ACC) و بهبود وضعیت متابولیسم کبد در موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ می‌گردد (۹). علاوه بر فعالیت ورزشی، به موازات افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی کشورها به‌ویژه در حوزه گروه‌های خاص، کاربرد درمان‌های غیردارویی از جمله درمان‌ها و شیوه‌های پیشگیرانه طب سنتی و مکمل روزبه‌روز اهمیت بیشتری یافته است که از مهم‌ترین این روش‌ها می‌توان به اصلاح رژیم غذایی، استفاده از گیاهان دارویی و اصلاح سبک زندگی اشاره کرد (۱۰). بهار نارنج (CA: Citrus aurantium) پتانسیل درمانی فراوانی دارد. این آثار بیولوژیکی درمانی شامل آثار ضدسرطان، ضد حساسیت، ضدچربی، ضدباکتری، آنتی‌اکسیدان، دفع سموم و ضددیابت است. از نظر فتوشیمیایی، CA سرشار از پی-سینفرین (p-synephrine)، آلکالوئید (Alkaloid) و متابولیت‌های ثانویه مؤثر بر سلامتی است (۱۱). با توجه به کاهش فرایندهای فیزیولوژیکی در اثر پیری و تأثیر پیری بر

پیر شدن جمعیت یکی از بزرگ‌ترین تغییرات جمعیتی در قرن بیستم است. طبق آمار پیش‌بینی‌شده توسط سازمان بهداشت جهانی، تعداد افراد سالمند بالای ۶۰ سال در سال ۲۰۲۵ به ۲/۱ میلیارد نفر می‌رسد که ۷۰ درصد آن در کشورهای درحال توسعه زندگی می‌کنند (۱). در ایران نیز، جمعیت بالای ۶۰ سال تا پایان سال ۲۰۲۰ حدود ۱۰ میلیون نفر بود که تا سال ۲۰۵۰، به بیش از ۲۶ میلیون نفر خواهد رسید (۲). سالمندی باعث اختلال در مسیرهای متابولیسمی در کبد می‌شود و پیر شدن سلول‌های کبدی باعث تغییر در بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم گلوکز، چربی و پروتئین‌های کبدی از قبیل پروتئین کیناز بی/فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز (PI3K/Akt: Phosphatidylinositol 3-kinases/Protein kinase B) پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوزن (MAPK: Mitogen-activated protein kinase) فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا از لنفوسیت‌های بی فعال‌شده (NF-κB: Nuclear Factor Kappa B) فاکتور رشدی تغییردهنده بتا (TGFβ: Transforming growth factor beta) فاکتور رشد شبه‌انسولین ۱- (IGF1: Insulin-like Growth Factor-1) و کلسیم/آدنوزین منوفسفات حلقوی (Ca/cAMP: Calcium/Cyclic adenosine monophosphate) می‌گردد (۳). پروتئین کیناز فعال‌شده با AMP (AMPK: AMP-activated protein kinase) به‌عنوان حسگر وضعیت انرژی سلولی است که به تنظیم تعادل انرژی و دریافت کالری کمک می‌کند (۳). به نظر می‌رسد AMPK می‌تواند باعث تنظیم PI3K و AKT شود (۴). مسیرهای حساس به مواد مغذی بر آثار تغذیه بر سالمندی تأثیر می‌گذارد و نقش مهمی در تنظیم فرایند پیری دارد. مسیرهای اصلی حساس به مواد مغذی شامل هدف پستانداری راپاماسین (mTOR)، سیرتوئین، AMPK مسیرهای سیگنالینگ فاکتور رشد انسولینی و انسولین است (۵). کبد نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های سامانمند به تغذیه دارد؛ بنابراین، تغییرات وابسته به سن در مسیرهای حساس به تغذیه در کبد می‌تواند آثار

تمرینی و تزریق CA، موش‌های صحرایی به وسیله کتامین و زایلوزین بیهوش گردیدند و بافت کبد پس از استخراج، در تانک ازت قرار داده شد و برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژنی AMPK و PI3K به آزمایشگاه منتقل گردید. سطوح بیان ژنی AMPK و PI3K به روش real-time PCR مدل Stepe One ساخت کشور ایتالیا اندازه‌گیری شد.

برای بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت کبد طبق پروتکل شرکت سازنده (سینژن، ایران) انجام گرفت؛ سپس با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با کمک رابطه زیر، غلظت و درجه خلوص نمونه RNA به صورت کمی به دست آمد:

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \epsilon \times d/1000$$

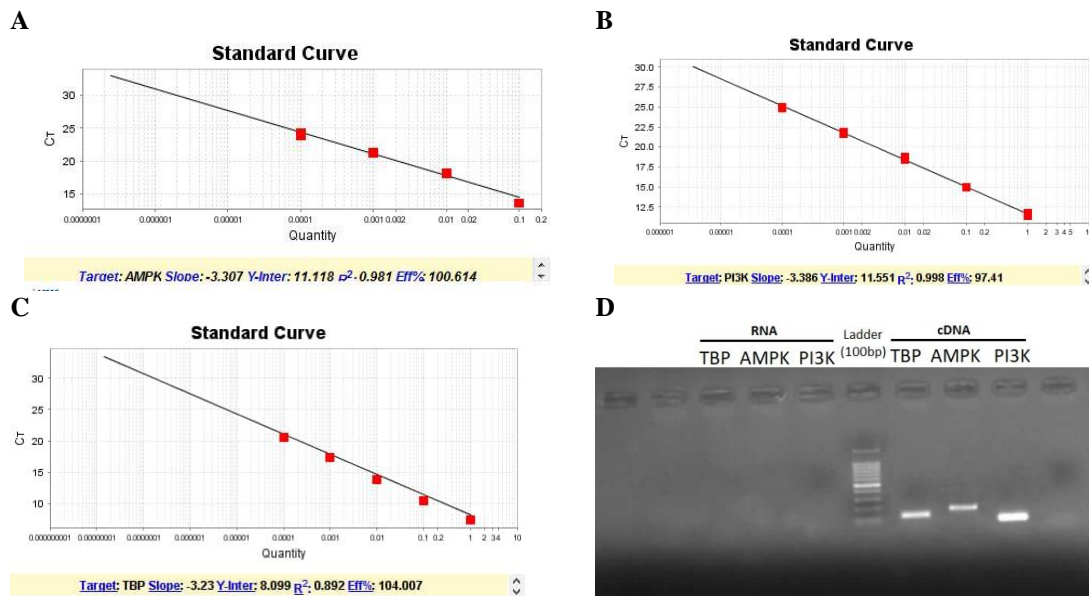
پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بسیار بالا، از همه نمونه‌های مطالعه شده مراحل سنتز cDNA بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت (شکل شماره ۱) و سپس cDNA سنتز شده برای انجام واکنش رونویسی معکوس استفاده شد. ابتدا پرایمرهای طراحی شده مربوط به ژن‌ها بررسی گردید و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام پذیرفت. توالی پرایمرهای AMPK و PI3K همراه ژن کنترل در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

پروتکل T: در ابتدا برای برآورد بیشینه سرعت دویدن، آزمون عملکرد ورزشی مدرج با شیب صفر درجه اجرا شد. برای انجام این آزمون، ابتدا موش‌های صحرایی با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه شروع به دویدن کردند و در ادامه، سرعت نوار گردان به‌ازای هر ۱ دقیقه یک متر اضافه شد. این روند تا وقتی ادامه داشت که موش‌های صحرایی دیگر قادر به دویدن نبودند (واماندگی). پس از تعیین بیشینه سرعت دویدن، موش‌ها ابتدا به مدت ۵ دقیقه با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد سرعت بیشینه روی نوار گردان گرم می‌کردند؛ سپس با شدت ۶۵ درصد سرعت بیشینه در هفته اول، ۷۰ درصد

عملکرد کبد، به نظر می‌رسد فعالیت‌های بدنی و CA تأثیر مفیدی بر بهبود عملکرد متابولیکی در افراد مسن دارد. با وجود این، اثر فعالیت ورزشی و CA بر مسیر AMPK و PI3K در بافت کبد موش‌های صحرایی و اینکه می‌تواند سوخت‌وساز کبدی را تحت تأثیر قرار دهد، ناشناخته است؛ همچنین فرض محقق این است که اثر همزمان تمرین هوازی (T) و CA تأثیر بهتری بر مسیر متابولیکی کبد نسبت به اثر هر کدام به تنهایی دارد و می‌تواند آسیب‌ها و تغییرات ناشی از پیر شدن را به تأخیر بیندازد و یا تعدیل کند. با وجود این، سازوکارهای سلولی فعالیت ورزشی و CA به خوبی شناسایی نشده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر T همراه با CA بر سطوح بیان ژنی AMPK و PI3K در بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۲۵ سر موش صحرایی ماده سالمند با میانگین سنی ۱۴ ماهه و میانگین وزنی ۲۷۰-۳۲۰ خریداری و به آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت انتقال داده شد. همه موش‌های صحرایی به مدت یک هفته برای سازگاری با محیط جدید، در شرایط استاندارد همراه با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری گردیدند. در ادامه، موش‌های صحرایی در پنج گروه ۵ سری شامل ۱. کنترل، ۲. شم، ۳. بهارنارنج (CA)، ۴. تمرین هوازی (T) و ۵. تمرین هوازی همراه با مصرف بهارنارنج (T+CA) قرار گرفتند. در مدت هشت هفته، گروه‌های ۴ و ۵ به میزان سه جلسه در هفته با شدت ۶۵ تا ۷۵ درصد بیشترین سرعت دویدن به مدت ۱۵ دقیقه در هفته اول تا ۳۱ دقیقه در هفته هشتم، روی نوار گردان دویدند (۱۲). گروه‌های ۳ و ۵ روزانه ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره CA به صورت صفاقی دریافت کردند (۱۳)؛ همچنین گروه ۲ در طول دوره تحقیق، روزانه ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم حلال عصاره CA (نرمال سالین) را به صورت صفاقی دریافت نمودند. در پایان دوره تحقیق، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه



**شکل شماره ۱.** نمودارهای استاندارد و ژل الکتروفورز، منحنی استاندارد ژن‌های (A) AMPK، (B) PI3K و ژن کنترل TBP (C). ژل الکتروفورز تکثیر PCR ژن‌های TBP، AMPK و PI3K در حضور RNA استخراج شده و cDNA که نشان‌دهنده تکثیر نشدن ژن‌ها در حضور RNA استخراج شده (وجود نداشتن DNA ژنومی در نمونه استخراج RNA) و تکثیر ژن‌ها در نمونه cDNA است (D).

**جدول شماره ۱.** توالی پرایمرهای AMPK و PI3K به همراه ژن کنترل

Genes	Primer Sequences	Sizes (Bp)
TBP	Forward: 5'-GCGGGGTCATGAAATCCAGT -3' Reverse: 5'-AGTGATGTGGGGACAAAACGA -3'	147
AMPK	Forward: 5'- ACTATCAAAGACATACGAGAGCA -3' Reverse: 5'- CTTGAGGGTCACCACTGTATAA -3'	181
PI3K	Forward: 5'-AGAGTTTCCTGGGCATCAATAA -3' Reverse: 5'-CTAACGCAGACATCCTGGAAT-3'	127

ترازوی دیجیتال توزین و به بالن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر متصل به کلونجر اضافه گردید. عمل استخراج به مدت ۴ ساعت انجام و عطرمایه جمع‌آوری شده به وسیله سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری شد و عطرمایه تهیه‌شده تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۳).

تجزیه و تحلیل یافته‌ها: پس از تأیید توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون لون، برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS vol.21 صورت گرفت و سطح معناداری آزمون‌ها  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

سرعت بیشینه در هفته دوم، ۷۵ درصد سرعت بیشینه از هفته سوم به بعد تمرین تداومی را انجام می‌دادند (۱۲). تمرین تداومی در این تحقیق با ۶۵ درصد  $VO_{2max}$  که معادل سرعت ۲۰ متر/دقیقه و زمان ۱۵ دقیقه در هفته اول شروع شد که به تدریج به سرعت ۲۵ متر/دقیقه و زمان ۳۱ دقیقه در هفته هشتم رسید. شروع تمرین با گرم کردن به مدت ۳ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه و ۲ دقیقه با شدت ۱۵ متر و سرد کردن به مدت ۱ دقیقه با شدت ۱۵ متر در دقیقه ۲ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه به پایان رسید. در پایان، موش‌ها ۵ دقیقه سرد کردن را با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد سرعت بیشینه انجام می‌دادند.

روش تهیه عصاره CA: برای تهیه عصاره CA، ابتدا مقدار ۵۰ گرم از نمونه پودر شده گیاه مدنظر توسط

## یافته ها

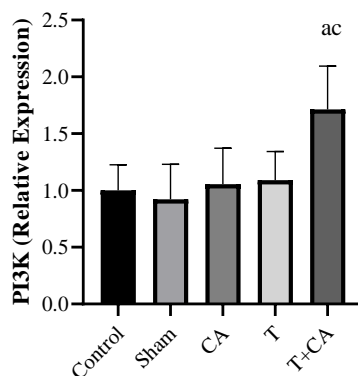
نتایج مربوط به وزن نمونه‌ها در گروه‌های مختلف پژوهش در جدول شماره ۲ آورده شده است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معناداری در میزان تغییرات بیان AMPK بافت کبد میان گروه‌های مختلف وجود دارد ( $P=0.002$ ,  $F=7.532$ ) (شکل شماره ۲). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد میان گروه‌های Control

با CA ( $P=0.043$ )، T ( $P=0.025$ ) و T+CA ( $P=0.009$ )، همچنین میان گروه Sham با CA ( $P=0.049$ )، T ( $P=0.029$ ) و T+CA ( $P=0.010$ ) تفاوت معناداری وجود دارد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تفاوت معناداری در میزان تغییرات بیان AMPK بافت کبد میان گروه T و CA وجود ندارد ( $P=0.998$ ). همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت

جدول شماره ۲: نتایج وزن در گروه‌های مختلف

متغیر + گروه	پیش آزمون	پس آزمون
کنترل	۲۵۲/۲۶±۷۴/۱۷	۲۸۱/۳۱±۱۷/۷۷
شم	۲۶۵/۱۷±۴۵/۶۷	۲۶۱/۱۷±۴۵/۶۷
بهارنارنج	۲۸۸/۲۰±۴۸/۸۵	۲۹۸/۲۰±۵۲/۲۰
تمرین	۲۷۴/۲۶±۷۴/۱۷	۲۷۲/۳۱±۱۷/۷۷
تمرین+بهارنارنج	۲۷۴/۱۵±۲۲/۳۲	۲۵۰/۱۸±۲۷/۴۹



شکل شماره ۳. تغییرات بیان PI3K بافت کبدی در گروه‌های

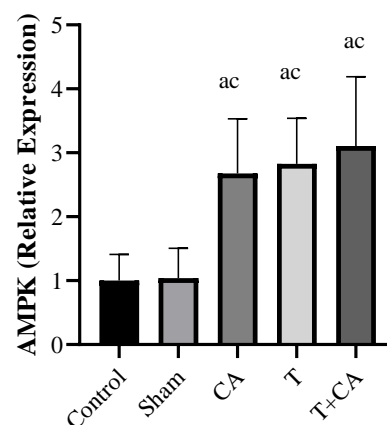
مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح  $P<0.05$ ).

تفاوت با Control، c، تفاوت با گروه Sham

تغییرات بیان PI3K بافت کبد میان گروه T و CA وجود ندارد ( $P=0.0978$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که T و CA به صورت مجزا و در ترکیب باهم، سبب افزایش معناداری در بیان AMPK کبدی موش‌های سالمند شده است. با وجود این،



شکل شماره ۲. تغییرات بیان AMPK بافت کبدی در گروه‌های

مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح  $P<0.05$ ).

تفاوت با Control، c، تفاوت با گروه Sham

معناداری در میزان تغییرات بیان PI3K بافت کبد میان گروه‌های مختلف وجود دارد ( $P=0.015$ ,  $F=4.421$ ) (شکل شماره ۳). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد میان گروه‌های Control با T+CA ( $P=0.031$ ) و Sham با T+CA ( $P=0.016$ ) تفاوت معناداری هست. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تفاوت معناداری در میزان

افزایش PI3K کبدی تنها در گروه T+CA معنی دار شد. در مطالعات پیشین نشان داده شد که میزان AMPK عضله اسکلتی انسان در حین فعالیت ورزشی افزایش می یابد (۱۴). ماروسی و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند که پس از ۱۵ هفته تمرین هوایی طولانی مدت ورزشی، سطوح p-AMPK و گیرنده فعال کننده تکثیر پروکسیزوم گاما هم فعال ساز آلفا-۱ (PGC-1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) بافت هیپوکامپ موش های مسن افزایش می یابد (۱۵). فعالیت ورزشی اکسیداسیون لیپیدها را تحریک می کند و سنتز لیپیدها را داخل کبد مهار می نماید که این فرایند به واسطه فعال سازی مسیر AMPK انجام می شود. این آنزیم با افزایش نسبت AMP به ATP در بافت ها، تحریک و فعال می گردد و این افزایش نتیجه ای از محرک فیزیولوژیکی فعالیت ورزشی است. شرط اصلی و لازم برای فعال سازی مسیر AMPK هنگام فعالیت ورزشی، کاهش و نبودن استروئیل کوآ دی استراز-۱ (SCD-1: Stearoyl-CoA desaturase-1) کبدی است. نشان داده شد که فعالیت SCD-1 در کبد موش ها پس از فعالیت ورزشی، به طور چشمگیری کاهش می یابد (۱۶). فعال شدن AMPK در کبد باعث سنتز لیپیدها می شود که این عمل از طریق غیرفعال کردن آنزیم ACC، فعال کردن آنزیم مالونیل کوآ دکربوکسیلاز (Malonyl-CoA decarboxylase deficiency) و مهار بیان ژن آنزیم های لیپوژنیک از قبیل ACC و اسید چرب سنتاز (Fatty acid synthase) صورت می گیرد (۱۶). همسو با این پژوهش نشان داده شد که تمرین شنا به صورت حاد (یک و نیم ساعت) و مزمن (یک ساعت در روز، هشت هفته و هر هفته ۵ جلسه) موجب افزایش فسفوریلاسیون و بیان AMPK و PI3K در رت های دیابتی مسن می شود (۱۷).

علاوه بر این، نشان داده شد که افزایش فعالیت AMPK به علت اختلالات در وضعیت انرژی بافت است. این پاسخ سازگارانه برای افزایش نیاز به انرژی، باعث فعال شدن فرایندهای آنابولیک می شود. با تغییر در سطح انرژی درون سلولی، AMPK به افزایش نسبت AMP به ATP پاسخ می دهد که این تغییرات ممکن است ناشی از گرسنگی، فعالیت ورزشی و یا انقباض عضلانی باشد (۲۱). مطالعه روی پستانداران نشان می دهد که AMPK و AAK-2 نقش مهمی در تنظیم طول عمر دارند. تنظیم افزایشی AMPK و AAK-2 و فعال شدن آن باعث افزایش طول عمر در برخی حیوانات می شود (۲۲). در موش هایی که AMPK $\alpha$ 2 مهار شد، هم سلامت و هم طول عمر حیوان به خطر افتاد (۲۳). به نظر می رسد در پستانداران فعال سازی AMPK به ویژه پس از فعالیت ورزشی (۲۴)، تأثیر مفیدی بر سلامت و طول عمر داشته باشد.

از دیگر نتایج پژوهش حاضر افزایش AMPK به دنبال مصرف CA بود. در همین باره، پارک و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که CA باعث افزایش فسفوریلاسیون AMPK $\alpha$  در سلول های چربی 3T3-L1 و هم در سلول های چربی قهوه ای می شود (۲۵). نارنژین (Naringin) و پی-سینفرین نیز از اجزای اصلی CA است (۱۱). مطالعات سوی و همکاران

افزایش PI3K کبدی تنها در گروه T+CA معنی دار شد. در مطالعات پیشین نشان داده شد که میزان AMPK عضله اسکلتی انسان در حین فعالیت ورزشی افزایش می یابد (۱۴). ماروسی و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند که پس از ۱۵ هفته تمرین هوایی طولانی مدت ورزشی، سطوح p-AMPK و گیرنده فعال کننده تکثیر پروکسیزوم گاما هم فعال ساز آلفا-۱ (PGC-1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) بافت هیپوکامپ موش های مسن افزایش می یابد (۱۵). فعالیت ورزشی اکسیداسیون لیپیدها را تحریک می کند و سنتز لیپیدها را داخل کبد مهار می نماید که این فرایند به واسطه فعال سازی مسیر AMPK انجام می شود. این آنزیم با افزایش نسبت AMP به ATP در بافت ها، تحریک و فعال می گردد و این افزایش نتیجه ای از محرک فیزیولوژیکی فعالیت ورزشی است. شرط اصلی و لازم برای فعال سازی مسیر AMPK هنگام فعالیت ورزشی، کاهش و نبودن استروئیل کوآ دی استراز-۱ (SCD-1: Stearoyl-CoA desaturase-1) کبدی است. نشان داده شد که فعالیت SCD-1 در کبد موش ها پس از فعالیت ورزشی، به طور چشمگیری کاهش می یابد (۱۶). فعال شدن AMPK در کبد باعث سنتز لیپیدها می شود که این عمل از طریق غیرفعال کردن آنزیم ACC، فعال کردن آنزیم مالونیل کوآ دکربوکسیلاز (Malonyl-CoA decarboxylase deficiency) و مهار بیان ژن آنزیم های لیپوژنیک از قبیل ACC و اسید چرب سنتاز (Fatty acid synthase) صورت می گیرد (۱۶). همسو با این پژوهش نشان داده شد که تمرین شنا به صورت حاد (یک و نیم ساعت) و مزمن (یک ساعت در روز، هشت هفته و هر هفته ۵ جلسه) موجب افزایش فسفوریلاسیون و بیان AMPK و PI3K در رت های دیابتی مسن می شود (۱۷). با وجود این، در پژوهش حاضر میزان افزایش بیان PI3K به دنبال T معنادار نشد. پژوهش های دیگری نیز نشان دادند که پنج دقیقه تحریک الکتریکی بر فعالیت



متابولیسم کبدی هستند، استفاده از T و مصرف CA می‌تواند باعث بهبود عملکرد کبدی وضعیت متابولیکی شود. به‌رحال، سازوکار سلولی اثر T و CA بر سالمندی به‌خوبی شناسایی نشده است و به پژوهش‌های بیشتری نیاز دارد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به اندازه‌گیری نکردن سطوح پروتئینی متغیرهای مطالعه‌شده اشاره کرد؛ از این‌رو پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی به بررسی اثر T همراه مصرف CA بر سطوح پروتئینی پرداخته شود؛ همچنین با توجه به آثار T و CA بر متابولیسم بافت کبد موش‌های سالمند توصیه می‌شود از T و مکمل CA به‌عنوان یک روش درمانی مناسب برای کنترل و جلوگیری از آسیب متابولیکی کبدی در نمونه‌های مسن استفاده گردد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که T و CA با تغییراتی که در سطح AMPK به‌وجود آورد، روش مناسبی برای بهبود عملکرد سلول‌های کبدی در حیوانات سالمند باشد. با وجود این، اثر T و CA به‌تنهایی بر بیان PI3K معنادار نشد؛ اما T و CA در ترکیب باهم باعث افزایش معنادار در بیان متغیرهای مطالعه‌شده گردید.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله املی و با تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت با کد IR.IAU.M.REC.1399.032 انجام شده است. بدین‌وسیله، نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحدهای دانشگاهی اعلام می‌دارند.

کد اخلاق: IR.IAU.M.REC.1399.032

(۲۰۱۸) نشان داد که نارژین باعث فعال شدن AMPK در موش‌های چاق (C57BL/6J) می‌گردد (۲۶)؛ همچنین نشان داده شد که پی-سینفرین می‌تواند باعث فعال شدن AMPK در سلول‌های عضلات اسکلتی شود (۲۷). چوبی و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دادند که CA با فعال کردن سیگنال AMPK و فاکتور شبه‌هسته‌ای ۲ مشتق از اریترئید ۲ (Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)، سبب محافظت کبد در برابر آسیب ناشی از الکل می‌گردد (۲۸). محققان بر این باورند که CA با تعدیل اتوفاژی و مسیر سیگنال AMPK-mTOR آثار بیولوژیکی خود را روی سلول اعمال می‌کند (۲۹).

در پژوهش حاضر نشان داده شد که ترکیب T و CA باعث افزایش معنادار در بیان AMPK و PI3K کبدی موش‌های مسن شده است. اثر همزمان T و CA بر بیان AMPK و PI3K کبدی بررسی نشده است. با وجود این، شیخ‌الاسلامی و همکاران (۲۰۲۰) در پژوهشی نشان دادند که هشت هفته T و CA به‌تنهایی به بهبود سطوح بیان ژنی PGC-1 $\alpha$  در بافت کبد موش‌های صحرائی سالمند منجر شد. با وجود این، T همزمان با مصرف CA آثار بیشتری داشت (۳۰). به نظر می‌رسد T و CA به‌خوبی اثر خود را بر دستگاه متابولیک کبد اعمال می‌کنند، به‌طوری‌که ترکیب این دو مداخله نسبت به هرکدام، تأثیر بیشتری بر بیان AMPK و PI3K کبدی موش‌های مسن داشت. این نتایج نشان می‌دهد که T در کنار CA نسبت به هرکدام به‌تنهایی اثر بهتری برای کاهش عوارض ناشی از پیری بر متابولیسم کبدی داشته باشد. در مطالعه حاضر، ترکیب T با CA با آثار هم‌افزایی به بهبود بیان AMPK و PI3K منجر شده است؛ بنابراین، با توجه به اینکه افراد سالمند در معرض اختلالات

## References

- Collblack S, Bhushan A, Fritsch K. Integrating poverty and gender into health programs: a sourcebook for health professionals. *Nurs Health Sci* 2007;9:246-53. doi.10.1111/j.1442-2018.2007.00340.x.
- Sharifzadeh G, Moodi M, Akhbari H. [Investigating health status of older people supported by Imam]. *Iranian J Age* 2010;5:52-59. (Persian)
- Dzanko N, van Denderen BJ, Hevener AL, Jorgensen SB, Honeyman J, Galic S, et al. AMPK  $\beta$ 1 deletion reduces appetite, preventing obesity and hepatic insulin resistance. *J Biol Chem* 2010;285:115-22. doi.10.1074/jbc.M109.056762.
- Tao R, Gong J, Luo X, Zang M, Guo W, Wen R, et al. AMPK exerts dual regulatory effects on the PI3K pathway. *J Mol Sig* 2010;5:1-9. doi.10.1186/1750-2187-5-1.



5. Bitto A, Wang AM, Bennett CF, Kaerberlein M. Biochemical genetic pathways that modulate aging in multiple species. *Cold Spr Harb Pers Med* 2015;5:25114. doi.10.1101/cshperspect.a025114.
6. Reznick RM, Zong H, Li J, Morino K, Moore IK, Hannah JY, et al. Aging associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metab* 2007;5:151-6. doi.10.1016/j.cmet.2007.01.008.
7. Mulligan JD, Gonzalez AA, Kumar R, Davis AJ, Saube KW. Aging elevates basal adenosine monophosphate activated protein kinase activity and eliminates hypoxic activation of AMPK in mouse liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005;60:21-7. doi.10.1093/gerona/60.1.21.
8. Wasityastuti W, Habib NA, Sari DC, Arfian N. Effects of low and moderate treadmill exercise on liver of d-galactose-exposed aging Rat model *Physiol Rep* 2019;7:14279. doi.10.14814/phy2.14279.
9. Yi X, Cao S, Chang B, Zhao D, Gao H, Wan Y, et al. Effects of acute exercise and chronic exercise on the liver leptin Ampk Acc signaling pathway in rats with type 2 diabetes. *J Diabete Res* 2013;2013. doi.10.1155/2013/946432. Epub 2013 Dec 17.
10. Upchurch DM, Chyu L. Use of complementary and alternative medicine among American women. *Womens Health Issues* 2005;15:5-13. doi.10.1016/j.whi.2004.08.010.
11. Suntar I, Khan H, Patel S, Celano R, Rastrelli L. An overview on Citrus aurantium L. its functions as food ingredient and therapeutic agent. *Oxid Med Cell Long* 2018;2018:7864269. doi.10.1155/2018/786426.
12. Yazdanparast Chaharmahali B, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi Arkhazloo P. The effect of moderate and high intensity interval trainings on cardiac apoptosis in the old female Rats. *Rep Heal Care* 2018;4:26-35.
13. He W, Li Y, Liu M, Yu H, Chen Q, Chen Y, et al. Citrus aurantium L. and its flavonoids regulate TNBS induced inflammatory bowel disease through anti inflammation and suppressing isolated jejunum contraction. *Int J Mol Sci.* 2018;19:3057. doi.10.3390/ijms19103057.
14. Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakci C, Coste A, Lagouge M, et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab* 2010;11:213-9. doi.10.1016/j.cmet.2010.02.006.
15. Marosi K, Bori Z, Hart N, Sarga L, Koltai E, Radak Z, et al. Long term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging Rats. *Neuroscience* 2012;226:21-8. doi.10.1016/j.neuroscience.2012.09.001.
16. Nikroo H, Nematy M, Sima H, AttarzadeHosseini S, Pezeshki M, Esmailzadeh A, et al. [Therapeutic effects of aerobic exercise and low calorie diet on nonalcoholic steatohepatitis]. *Govaresh* 2013; 17:245-53. (Persian)
17. Cao S, Li B, Yi X, Chang B, Zhu B, Lian Z, et al. Effects of exercise on AMPK signaling and downstream components to PI3K in rat with type 2 diabetes. *PLos One* 2012;7:51709. doi.10.1371/journal.pone.0051709.
18. Goodyear LJ, Giorgino F, Balon TW, Condorelli G, Smith RJ. Effects of contractile activity on tyrosine phosphoproteins and PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1995;268:987-95. doi.10.1152/ajpendo.1995.268.5.E987.
19. Lin JY, Kuo WW, Baskaran R, Kuo CH, Chen YA, Chen WST, et al. Swimming exercise stimulates Igf1/Pi3k/Akt and Ampk/Sirt1/Pgc1 $\alpha$  survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus. *Aging* 2020;12:6852. doi.10.18632/aging.103046.
20. Sriwijitkamol A, Coletta DK, Wajcberg E, Balbontin GB, Reyna SM, Barrientes J, et al. Effect of acute exercise on Ampk signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes a time course and dose response study. *Diabetes* 2007;56:836-48. doi.10.2337/db06-1119.
21. Arad M, Seidman CE, Seidman J. AMP activated protein kinase in the heart role during health and disease. *Circ Res* 2007;100:474-88. doi.10.1161/01.RES.0000258446.23525.37.
22. Funakoshi M, Tsuda M, Muramatsu K, Hatsuda H, Morishita S, Aigaki T. A gain of function screen identifies wdb and lkb1 as lifespan extending genes in Drosophila. *Biochem Biophys Res Com* 2011;405:667-72. doi.10.1016/j.bbrc.2011.01.090.
23. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Flamez D, Mu J, et al. Physiological role of AMP-activated protein kinase insights from knockout mouse models. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:216-9. doi.10.1042/bst0310216.
24. Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise implications for human health and disease. *Biochem J* 2009;418:261-75. doi.10.1042/BJ20082055.
25. Park J, Kim HL, Jung Y, Ahn KS, Kwak HJ, Um JY. Bitter orange Citrus aurantium Linne improves obesity by regulating adipogenesis and thermogenesis through Ampk activation. *Nutrients* 2019;11:1988. doi.10.3390/nu11091988.
26. Sui GG, Xiao HB, Lu XY, Sun ZL. Naringin activates Ampk resulting in altered expression of Srebps and Pcsk9 and Ldlr to reduce body weight in obese C57bl/6J Mice. *J Agric Food Chem* 2018;66:8983-90. doi.10.1021/acs.jafc.8b02696.
27. Hong NY, Cui ZG, Kang HK, Lee DH, Lee YK, Park DB. P-Synephrine stimulates glucose consumption via Ampk in L6 skeletal muscle cells. *Biochem Biophys Res Com* 2012;418:720-4.
28. Choi BK, Kim TW, Lee DR, Jung WH, Lim JH, Jung JY, et al. A polymethoxy flavonoids rich Citrus aurantium extract ameliorates ethanol induced liver injury through modulation of Ampk and Nrf2 related signals in a binge drinking mouse model. *Phytherap Res* 2015;29:1577-84. doi.10.1002/ptr.5415.
29. Ramezannezhad P, Heidarisoreshjani S, Suhan T. Protective effects of some medicinal plants against myocardial hypoxia. *Int J Biolo Chem* 2019; 12:112-27. doi.10.26577/ijbch-2019-1-i13.
30. Shykholeslami Z, Abdi A, Barari A, Hosseini SA. The effect of aerobic training with Citrus aurantium L. on Sirt1 and Pgc1 $\alpha$  gene expression levels in the liver tissue of elderly Rats. *Jorjani Biomed J* 2019;7:57-65.