

## ترکیب مصرف کورکومین و تمرین شنا بیوژنز میتوکندریایی را پس از مصرف افراطی اتانول در بافت هیپوکامپ رت‌های نر افزایش می‌دهد

فواد فیض‌الهی<sup>1</sup>، محمدعلی آذربایجانی<sup>2</sup>، محمد ناصحی<sup>3</sup>، مقصود پیری<sup>2</sup>

- 1- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، تهران، ایران
- 2- نویسنده مسئول: استاد فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، تهران، ایران  
پست الکترونیکی: m\_azarbayjani@iauctb.ac.ir
- 3- گروه زیست‌شناسی (فیزیولوژی جانوری)، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 96/12/16

تاریخ پذیرش: 97/3/21

### چکیده

**سابقه و هدف:** یکی از شیوه‌های رایج مصرف اتانول، مصرف افراطی آن می‌باشد که با وجود پرهیز، مصرف آن با اختلالات رفتاری طولانی مدتی همراه است. بنابراین، یافتن روش‌هایی که بتواند در زمانی کوتاه این اختلالات را بهبود بخشد، از اهمیت زیادی برخوردار است. این مطالعه با هدف بررسی اثر کورکومین و تمرین شنا پس از مصرف افراطی اتانول بر بیوژنز میتوکندریایی بافت هیپوکامپ رت‌های نر انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در یک کارآزمایی تجربی، رت‌های نر نژاد ویستار (200-250 گرم) به مدت 4 روز و هر هشت ساعت یک بار اتانول/دکستروز دریافت کردند. پس از گذشت شش روز پرهیز از مصرف، رت‌های گروه اتانول به صورت تصادفی در چهار گروه شامل: (1) کنترل؛ (2) تمرین شنا؛ (3) کورکومین؛ و (4) تمرین شنا-کورکومین قرار گرفتند. گروهی از رت‌ها نیز که دکستروز دریافت کرده بودند، به عنوان کنترل اتانول در یک دوره کاملاً مشابه مورد بررسی قرار گرفتند. پس از مداخلات، ژن‌های PGC-1 $\alpha$  و TFAM در بافت هیپوکامپ مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** پس از دوره 20 روزه پرهیز از مصرف اتانول، سطوح PGC-1 $\alpha$  به حالت اول بازنگشته بود. علیرغم اثر تمرین بر افزایش PGC-1 $\alpha$  ( $p<0/05$ )، کورکومین نتوانست آن را به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل تغییر دهد. ترکیب کورکومین و شنا به صورت معنی‌داری سطوح ژن‌های PGC-1 $\alpha$  و TFAM را در بافت هیپوکامپ افزایش داد ( $p<0/01$ ).

**نتیجه‌گیری:** ترکیب همزمان کورکومین و تمرین شنا در مدت 2 هفته اثر سینرژیستی داشته و موجب بهبود سطوح ژن‌های PGC-1 $\alpha$  و TFAM شد و ممکن است باعث افزایش بیوژنز میتوکندریایی در بافت هیپوکامپ پس از مصرف افراطی اتانول شود.

**واژگان کلیدی:** کورکومین، تمرین شنا، بیوژنز میتوکندریایی، هیپوکامپ، مصرف افراطی اتانول

### • مقدمه

اکسیژن ROS (Reactive Oxygen Species) داخل سلولی را افزایش می‌دهد (4) و از آنجا که میتوکندری منبع مهم تولید ROS در بیشتر سلول‌ها می‌باشد (5)، ممکن است در این تغییرات نقش داشته باشد. گزارش شده مصرف اتانول به صورت حاد و مزمن باعث اختلال متابولیسم انرژی میتوکندری شده و منجر به کاهش تولید ATP و افزایش تولید ROS و مرگ سلولی در برابر عوامل استرس اکسیداتیو می‌شود (4). اتانول سطح cAMP (Cyclic adenosine monophosphate) داخل سلولی را کاهش داده، بنابراین باعث کاهش بیوژنز میتوکندریایی می‌شود (6). لذا ممکن است عواملی که بتواند

اتانول یک ماده روان گردان شایع است که با بیماری‌های مختلف به ویژه اختلالات سیستم عصبی مرکزی در ارتباط است (1). به نظر می‌رسد این اختلالات به الگوی مصرف آن وابسته باشد. مصرف افراطی اتانول (Binge ethanol drinking)، تغییرات قابل توجهی در ساختار مغز به ویژه در بافت هیپوکامپ ایجاد می‌کند که این تغییرات در اثر نروژنراسیون (neurodegeneration)، اختلال عملکرد میتوکندریایی و اختلال هموستاز ردوکس (redox) داخل سلولی بوده و باعث تغییرات رفتاری از جمله اختلال در یادگیری و حافظه می‌شود (2, 3). اتانول تولید گونه‌های فعال

با توجه به مطالب بیان شده می‌توان گفت که مصرف افراطی اتانول باعث مختل شدن بیوژنز میتوکندریایی در هیپوکامپ می‌شود و تمرین و کورکومین هرکدام به صورت جداگانه توانایی این را دارند که این اختلال را بهبود بخشند. در مطالعه ای نشان داده شده کورکومین اثرات فعالیت جسمانی بر بیوژنز میتوکندریایی عضلات اسکلتی را افزایش می‌دهد (10). اما به نظر می‌رسد تاکنون تحقیقی انجام نشده باشد که به صورت همزمان اثر کورکومین و تمرین بر بیوژنز میتوکندریایی پس از مصرف افراطی اتانول را در بافت هیپوکامپ بررسی کرده باشد. لذا این تحقیق با هدف بررسی اثر کورکومین و تمرین شنا پس از مصرف افراطی اتانول بر بیوژنز میتوکندریایی بافت هیپوکامپ رت‌های نر انجام گرفت.

### • مواد و روش‌ها

**حیوانات:** دریک کارآزمایی تجربی 40 سر رت نر نژاد ویستار از حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی تهران خریداری شد. وزن این موش‌ها در هنگام خریداری 200-250 گرم بود و 4 سر موش در هر قفس با دما ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ )، رطوبت (40-60%) و چرخه تاریکی روشنایی (12 ساعت روشنایی، 12 ساعت تاریکی؛ که روشنایی از ساعت 7:00 صبح شروع می‌شد) ثابت، نگهداری شدند. بجز دوره مصرف اتانول، آزمودنی‌ها به صورت آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. همچنین برای عادت کردن به محقق و دست‌آموز شدن و سازگاری با محیط نگهداری، مداخله حداقل تا یک هفته پس از خریداری حیوانات اجرا نشد. تمامی مداخله‌ها در فاز روشنایی بین ساعت 9:00 صبح تا 2:00 بعد از ظهر اجرا شد. پروتکل تجربی اجرا شده در این مطالعه بر مبنای دستورالعمل کمیته تحقیقات و اخلاق دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران صورت گرفت که بر اساس راهنمای مؤسسه ملی بهداشت، مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications No. 80-23)) با تاکید بر استفاده از کمترین حیوان مورد نیاز و به حداقل رساندن آزار و درد در مراحل مختلف اجرای مطالعه، طراحی و اجرا شد.

**مصرف اتانول و چگونگی ترک آن:** در طول دوره مصرف اتانول، غذا از قفس حیوانات حذف شد اما آب در دسترس آن‌ها وجود داشت. اتانول از طریق گاوآژ مستقیم به داخل معده با توجه به پروتکل Majchrowicz تجویز شد (15). در این روش رت‌ها هر 8 ساعت یک بار و به مدت 4 روز با اتانول گاوآژ می‌شدند (25 w/v) اتانول در مکمل وانیلی شرکت

بیوژنز میتوکندریایی را افزایش دهد، تا حدودی این عوامل را خنثی کند.

PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha Transcription Co-activator) خانواده کوآکتیوینورونویسی (Family) بوده و نقش مهمی در تنظیم بیوژنز میتوکندریایی و حفظ عملکرد و یکپارچگی نورون‌ها ایفا می‌کند (7، 8). بنابراین، عواملی که غلظت PGC-1 $\alpha$  را افزایش دهند از طریق افزایش بیوژنز میتوکندریایی می‌توانند آثار سوء مصرف افراطی اتانول در هیپوکامپ را بهبود بخشند. افزایش PGC-1 $\alpha$  رونویسی عامل تنفس هسته ای (Nuclear respiratory factor) 1 و 2 (NRF1 و NRF2) را تحریک کرده و منجر به افزایش بیان عامل رونویسی میتوکندریایی (TFAM) A (Mitochondrial transcription factor A) و سایر زیر واحدهای میتوکندریایی زنجیره انتقال الکترون می‌شود (7). TFAM ژن هدف NRF1 است که نقش مهمی را در انسجام واکنش‌های متقابل بین میتوکندری و هسته ایفا می‌کند (8). این ژن نیز یک فاکتور رونویسی میتوکندری است که فعال کننده کلیدی در رونویسی میتوکندری می‌باشد (8).

در این زمینه، عوامل مختلفی مانند فعالیت بدنی و ترکیبات فیتوشیمیایی بر بیان بسیاری از ژن‌ها تأثیر دارند. نشان داده شده فعالیت بدنی بیوژنز میتوکندریایی را در بافت مغز افزایش می‌دهد (9). فعالیت بدنی بیان PGC-1 $\alpha$  را از طریق مسیر گیرنده بتا آدرنرژیک / cAMP افزایش می‌دهد (7). از طرف دیگر نشان داده شده برخی پلی فنول‌ها cAMP (Polyphenols) را فعال می‌کنند و در حال حاضر به عنوان القا کننده ذاتی بیوژنز میتوکندریایی تحت بررسی هستند (10). یکی از این پلی فنول‌ها کورکومین است که می‌تواند از آسیب ناشی از ایسکمی-خون‌رسانی مجدد مغزی جلوگیری نموده و بیوژنز میتوکندریایی را افزایش دهد (11، 12). گزارش شده فعالیت‌های آنتی اکسیدانی کورکومین از سایر پلی فنول‌ها مانند رسوراترول (resveratrol) که به خوبی مطالعه شده‌اند، قوی تر است (13) لذا ممکن است بتواند اثرات مصرف افراطی اتانول را خنثی کند. در این راستا نشان داده شده استفاده طولانی مدت از کورکومین به عنوان مکمل غذایی در موش سوری، بیان پروتئین PGC-1 $\alpha$  را افزایش داده و پتانسیل غشای میتوکندریایی (MMP mitochondrial membrane potential) و سطوح ATP در مغز را بهبود بخشیده است (14).

ساعت مشخصی (ساعت 11) شنا می‌کردند که جمعاً 10 جلسه شد. برنامه تمرین شنا از 20 دقیقه در روز شروع شد و پس از 3 جلسه زمان آن به یک ساعت در روز رسید. پس از آن در 7 جلسه بعدی به مدت یک ساعت ادامه پیدا کرد. پس از هر جلسه شنا، حیوانات با حوله خشک شده و به داخل قفس‌هایشان انتقال داده می‌شدند. این برنامه تمرینی در استخری که دمای آب قابلیت تنظیم داشت و روی 20-22 درجه سانتی‌گراد تنظیم شده بود، انجام شد.

**بافت برداری و بیان ژن:** پس از دوره دو هفته‌ای مداخلات، حیوانات با ترکیبی از کتامین-زالایزین (به ترتیب 87 و 13 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (16)) بیهوش شده و بافت مغز آن‌ها برداشته شد. سپس با استفاده از دستگاه ماتریکس، محل هیپوکامپ مشخص شده و بعد از برش دادن مغز، هیپوکامپ حیوانات در داخل میکروتیوب‌های 1/5 میلی‌لیتری قرار گرفته و به تانک نیتروژن منتقل شدند. سپس بافت‌های برداشته شده به فریزر -80 درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند و تا زمان تجزیه و تحلیل ژن‌ها در فریزر نگه داشته شدند. برای بررسی بیان ژن در بافت هیپوکامپ از روش Real-Time PCR استفاده گردید.

**روش‌های آماری:** از آزمون شاپیرو-ویلک جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها و از آزمون لوین جهت بررسی همگنی واریانس‌ها استفاده شد. سپس برای مقایسه ژن‌های PGC-1 $\alpha$  و TFAM در گروه‌های مختلف، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. در صورت معنی‌دار بودن آزمون تحلیل واریانس، آزمون پیگیری توکی جهت مشخص شدن محل اختلاف مورد استفاده قرار گرفت. برای تحلیل‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه 21 استفاده شد و سطح معنی‌داری 0/05 بود.

#### • یافته‌ها

توزیع داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک و تجانس واریانس با آزمون لوین انجام شد ( $P > 0/05$ ). آزمون تحلیل واریانس یک طرفه برای PGC-1 $\alpha$  نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها بود ( $F_{4,15} = 9/038, P \leq 0/001, \eta^2 = 0/705$ ). برای مشخص شدن محل اختلاف بین گروه‌ها از آزمون پیگیری توکی استفاده شد. مقایسه گروه‌ها در شکل 1 نشان داده شده است.

همان‌طور که در شکل نشان داده شده میانگین PGC-1 $\alpha$  گروهی که اتانول دریافت کرده بود نسبت به گروه دکستروز به صورت معنی‌داری کمتر بود ( $P < 0/05$ ). میانگین گروهی که پس از دریافت اتانول به مدت دو هفته شنا کرده و کورکومین

انشور 25% ethanol w/v in vanilla Ensure<sup>TM</sup>; Abbot (Laboratories, Columbus, OH) دوز اولیه گاوژ برای هر حیوان 5 گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بود؛ برای دوزهای بعدی بر اساس مقیاس 6 نقطه‌ای رفتار وابستگی، تجویز اتانول صورت گرفت (0=طبیعی؛ 1=کم تحرکی؛ 2=آتاکسی یا عدم تعادل یا ناهماهنگی حرکتی؛ 3=آتاکسی+شکم کشیدن و/یا تأخیر در رفلکس ایستادن؛ 4=عدم وجود رفلکس سرپا ایستادن؛ 5=عدم وجود رفلکس پلک زدن چشم). برای دوزهای بعدی به گونه‌ای تجویز شد که موش‌هایی که نمرات بالاتری در مقیاس داشتند، اتانول کمتری دریافت می‌کردند (میزان افزایش یا کاهش باتوجه به مقیاس 6 نقطه‌ای، 1 گرم نسبت به دوز اولیه بود. بیشترین دوز مصرفی 7 گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز بود). پس از اتمام این دوره 4 روزه، حیوانات دوباره به صورت آزاد به غذا دسترسی داشتند و از آنجا که ممکن بود انجام فعالیت در دوره پس از ترک بافت مغز را بیشتر تخریب کند (15)، حیوانات به مدت 6 روز بدون هیچ مداخله‌ای در داخل قفس‌هایشان قرار گرفتند و از روز هفتم در گروه‌های مختلف مداخله (1- اتانول، 2- اتانول و شنا، 3- اتانول و کورکومین، 4- اتانول و کورکومین و شنا) قرار گرفتند. یک گروه به عنوان گروه سالم نیز به جای اتانول دکستروز را در دوره مشابه و به صورت ایزوکالریک دریافت کردند (گروه دکستروز، روزانه به صورت گاوژهای مشابه، دکستروز را به مقداری معادل کالریک 5 گرم الکل به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را در ترکیب با مکمل وانیلی (dextrose w/vanilla Ensure<sup>TM</sup>) دریافت کردند).

**تجویز کورکومین:** پس از تهیه کورکومین شرکت مرک آلمان (820354)، از آنجا که در آب یا نرمال‌سالین قابل حل نبود، از حلال DMSO (دی‌متیل سولفوکساید) با غلظت 10% استفاده شد. برای حیواناتی که کورکومین دریافت می‌کردند، به صورت روزانه و داخل صفاقی تزریق صورت می‌گرفت. میزان دوز کورکومین 50 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن حیوانات بود که پس از ترک اتانول و به مدت 2 هفته برای حیوانات تجویز شد. مصرف کورکومین 5 بار در هفته بود که معادل جلسات شنا کردن بوده و در مجموع 10 بار به صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. برای خنثی‌سازی اثرات حلال، دوز مشابه حلال به همه حیوانات گروه‌های دیگر و در زمان مشابه تزریق شد.

**پروتکل تمرین:** شش روز پس از ترک اتانول، در روز هفتم، به مدت 2 هفته حیوانات گروه‌های تمرینی به تمرین شنا پرداختند. حیوانات 5 جلسه در هفته و هر جلسه در رأس

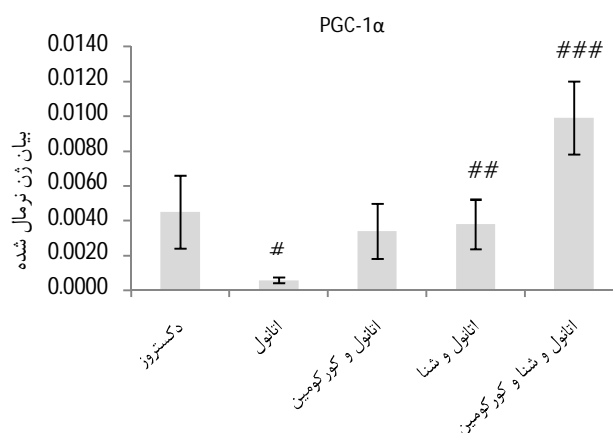
## • بحث

یکی از بخش‌های این مطالعه به بررسی اثر مصرف افراطی اتانول بر بیوژنز میتوکندریایی بافت هیپوکامپ در رت‌های نر پرداخت. نتایج نشان داد که پس از گذشت 20 روز از ترک اتانول، ژن PGC-1 $\alpha$  به صورت معنی‌داری در گروه اتانول کمتر از گروه دکستروز بود. ما در این مطالعه بیان PGC-1 $\alpha$  را بررسی کردیم زیرا اغلب به عنوان تنظیم کننده اصلی بیوژنز میتوکندریایی در نظر گرفته شده است (17). نشان داده شده که PGC-1 $\alpha$  عامل‌های نسخه برداری زیادی در ارتباط با گیرنده‌های هسته‌ای و غیر هسته‌ای همراه با متابولیسم را فعال کرده (18) و به مقدار زیادی در بافت چربی قهوه‌ای، عضله اسکلتی و مغز بیان شده است (17). همسو با نتایج به دست آمده در این تحقیق، Liu و همکاران (2014) نشان دادند که اتانول بیان PGC-1 $\alpha$  را از طریق مداخله در مسیر cAMP-CREB در سلول‌های عصبی سرکوب می‌کند (6).

در واقع بخشی از هماهنگی ژن‌ها که به وسیله PGC-1 $\alpha$  صورت می‌گیرد، شامل بیان TFAM می‌شود، که سطوح و بیان mtDNA (Mitochondrial DNA) را افزایش می‌دهد (19). در تحقیق حاضر پس از گذشت 20 روز از ترک اتانول، علیرغم مقدار بیشتر TFAM در گروه دکستروز نسبت به گروه اتانول، اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نگردید. ممکن است گذشت زمان باعث شده باشد تا حدودی اختلالات بهبود یابند. در گذشته نشان داده شده است که اگرچه ممکن است اختلالات رفتاری بهبود پیدا نکنند، اما بسیاری از اختلالات ناشی از مصرف افراطی اتانول با گذر زمان و پرهیز از مصرف به حالت اول بازگردد (15). از طرف دیگر عوامل مختلفی ممکن است PGC-1 $\alpha$  را تحت تأثیر قرار دهند. در واقع ممکن است PGC-1 $\alpha$  تحت تأثیر اصلاح پس-ترجمه‌ای (post-translational modification) شامل استیلیشن (acetylation) (که معمولاً فعالیت را مهار می‌کند)، فسفریلاسیون تعدیل شده با p38 MAP کیناز (فعالیت را با کاهش پیوند با پروتئین سرکوبگر p160MBP، به همان اندازه با افزایش نیمه عمر PGC-1 $\alpha$ ، افزایش می‌دهد)، و متیلاسیون آرژینین قرار گیرد (10). لذا ممکن است PGC-1 $\alpha$  و TFAM الگوی کاملاً یکسانی نداشته باشند.

همچنین در این مطالعه اثر کورکومین بر بیوژنز میتوکندریایی پس از مصرف افراطی اتانول بررسی شد و مشاهده گردید که علیرغم بهبود جزئی، مصرف 50 میلی گرم کورکومین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، نمی‌تواند به صورت معنی‌داری PGC-1 $\alpha$  و TFAM را افزایش دهد. متأسفانه

دریافت کرده بودند ( $P < 0/001$ )، و گروهی که پس از دریافت اتانول شنا کرده بودند ( $P < 0/05$ ) به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه اتانول بود.



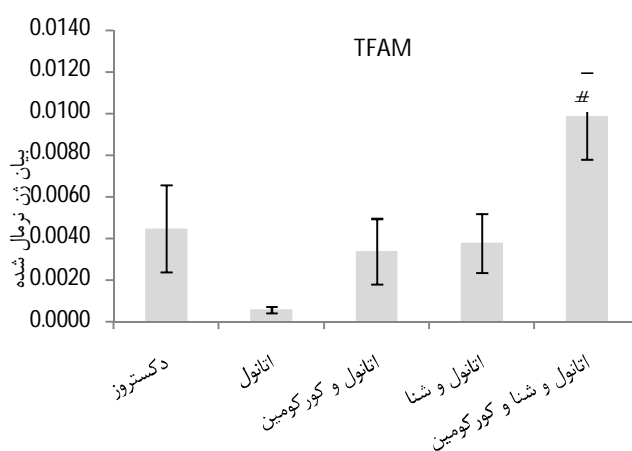
شکل 1. مقایسه میانگین و خطای استاندارد میانگین PGC-1 $\alpha$  بافت

هیپوکامپ در گروه‌های مختلف

گروه‌ها پس از دوره 4 روزه گاوژ اتانول/دکستروز، 6 روز دوره پرهیز داشتند و در روز هفتم به مدت دو هفته مداخلات شامل کورکومین و شنا را دریافت کردند.  $P < 0/05$  نشان دهنده اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه دکستروز.  $##P < 0/05$ ،  $###P < 0/001$  نشان دهنده اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه اتانول.

آزمون تحلیل واریانس نشان داد TFAM در گروه‌ها، اختلاف معنی‌داری داشت ( $F_{4,15} = 4/348$ )،  $P < 0/05$ ،  $\eta^2 = 0/536$ ). نتایج آزمون پیگیری توکی در شکل 2 نشان داده شده است.

همان طور که مشاهده می‌شود بیان ژن TFAM در گروه ترکیبی به شکل معنی‌داری بالاتر از گروه اتانول بود ( $P < 0/01$ ). اما تمرین شنا و کورکومین به تنهایی نتوانستند اختلاف معنی‌داری با گروه اتانول ایجاد کنند ( $P > 0/05$ ).



شکل 2. مقایسه میانگین و خطای استاندارد میانگین TFAM در بافت

هیپوکامپ گروه‌های مختلف

گروه‌ها پس از دوره 4 روزه گاوژ اتانول/دکستروز، 6 روز دوره پرهیز داشتند و در روز هفتم به مدت دو هفته مداخلات شامل کورکومین و شنا را دریافت کردند.  $P < 0/01$  نشان دهنده اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه اتانول

بیوژنز میتوکندریایی را در عضلات اسکلتی موش‌های مسن بهبود می‌بخشد (23). در تحقیق هالینگ رت‌ها بر روی رانینگ ویل فعالیت داشتند که با تحقیق حاضر که رت‌ها شنا کردند متفاوت بود. همچنین آن‌ها بر روی موش‌های مسن مطالعه کرده بودند. با این وجود با نتایج تحقیق حاضر که نشان داد فعالیت ورزشی می‌تواند PGC-1 $\alpha$  را افزایش دهد در یک راستا بود. Steiner و همکارانش (2011) بیان داشتند که فعالیت ورزشی بیوژنز میتوکندریایی را در بافت مغز افزایش می‌دهد (9). آن‌ها بیان داشتند که هردوی تمرینات حاد و مزمن می‌توانند بیان PGC-1 $\alpha$  را افزایش دهند که با افزایش پروتئین‌های میتوکندریایی همراه بوده است (9). عظیمی و همکاران (2018) بیان کردند که فعالیت ورزشی بر روی ترمیم می‌تواند از طریق بیش تنظیمی مسیر PGC-1 $\alpha$ /FND5/BDNF اختلالات رفتاری مربوط به هیپوکامپ را بهبود بخشد (24). بهرحال به دلیل تفاوت در اختلال (الکل در برابر سن، دیابت و ...) نمی‌توان به راحتی نتایج تحقیقات را مقایسه کرد.

TFAM در گروهی که پس از دریافت اتانول تمرین کرده بودند، با وجود تغییرات مثبت نتوانست اختلاف معنی‌دار با گروه اتانول ایجاد کند. این درحالی است که نشان داده شده است که فعالیت ورزشی بیوژنز میتوکندریایی در عضلات اسکلتی را افزایش داده و از طریق فعال سازی مسیرهای پیام رسان مانند PGC-1 $\alpha$  و TFAM اکسیداسیون لیپیدی را بهبود می‌بخشد (25). همچنین بیان شده است که هرکدام از PGC-1 $\alpha$  و TFAM نقش مهمی در بیوژنز میتوکندریایی ایفا می‌کنند و بیان هردوی آن‌ها در هیپوکامپ با فعالیت ورزشی تحت تأثیر قرار گرفته است (26). در توجیه این عامل می‌توان به مدت تمرین اشاره کرد. شاید مدت تمرین شنا در این تحقیق به اندازه کافی نبوده باشد که بتواند باعث تغییرات ژنی شود. ما تمرین را به مدت 2 هفته انتخاب کردیم. همچنین الگوی تمرینی که شامل شدت، مدت، زمان و ... می‌شود می‌تواند تأثیر گذار باشد. در اکثر تحقیقات از رانینگ ویل استفاده شده است که الگوی اختیاری دارد (26). ما در این تحقیق از شنا استفاده کردیم که تا حدود زیادی الگوی آن متفاوت است و علیرغم اینکه رت‌ها ذاتاً شناگرند، به دلیل اینکه تاحدودی حالت اجباری دارد (27) ممکن است بافت مغز را به گونه مختلفی تحت تأثیر قرار دهد.

در گروهی که پس از ترک اتانول به مدت 2 هفته به صورت همزمان هم تمرین شنا انجام داده و هم کورکومین دریافت کرده بودند، ژن‌های PGC-1 $\alpha$  و TFAM به صورت

تحقیقات محدودی در این زمینه انجام شده است. Liu و همکاران (2014) به مدت 5 روز قبل از ایسکمی، به صورت داخل صفاقی کورکومین را برای رت‌های اسپراگو-داولی با دوز کم (50 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) یا زیاد (100 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) تجویز کردند. نتایج نشان داد که کورکومین در یک الگوی وابسته به دوز، اثرات محافظت نرونی را از طریق افزایش بیوژنز میتوکندریایی باعث می‌شود (11). از آنجا که نژاد رت‌ها، نوع اختلال و عوارض آن، و مدت تجویز کورکومین متفاوت بود، نتایج باید با احتیاط مقایسه شوند. با این وجود، نتایج Liu و همکاران مبنی بر این که دوز 50 میلی گرم خیلی تأثیر گذار نیست، با نتایج ما همسو بود. فهیم و العسکری (2017) به مدت 6 هفته و به صورت روزانه کورکومین را با دوز 200 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به رت‌های دیابتی دادند و اثرات محافظت نرونی آن بر بافت هیپوکامپ را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که کورکومین از طریق خواص آنتی اکسیدانی، ضد آپوپتوزی و ضد التهابی می‌تواند هیپوکامپ را در مقابل عوارض دیابت محافظت کند (20). صرف نظر از بررسی هیپوکامپ، نوع اختلال آزمودنی‌ها (الکل در مقابل دیابت)، نحوه تجویز، دوره و دوز مصرفی کورکومین در دو مطالعه متفاوت بود. لذا می‌توان تناقض در نتایج را به این موارد مربوط دانست.

در واقع ما سعی کردیم که کمترین دوز اثر گذار کورکومین را تجویز کنیم. عطایی و همکاران اثر حفاظت نرونی کورکومین بر اختلال شناختی و استرس اکسیداتیو مغز رت‌هایی که هموسیستئین دریافت کرده بودند، نشان دادند. آنها بیان کردند که تجویز دوز 45 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن کورکومین به مدت 10 روز به صورت داخل صفاقی می‌تواند اختلال حافظه و یادگیری را از طریق حفاظت از سیستم عصبی در مقابل استرس اکسیداتیو بهبود بخشد (21). بهرحال، تجویز دوز 50 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در مدت 2 هفته نتوانست ژن‌های PGC-1 $\alpha$  و TFAM را افزایش دهد.

در بخشی دیگر، تمرین شنا به مدت 2 هفته پس از تجویز افراطی اتانول، ژن PGC-1 $\alpha$  را نسبت به گروه اتانول افزایش داد. در این راستا نشان داده شده که فعالیت بدنی یک القا کننده قوی بیوژنز میتوکندریایی در بدن انسان بوده است (17). فعالیت بدنی نسبت AMP/ATP عضله و پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) را افزایش می‌دهد که باعث افزایش میتوکندری‌ها می‌شود (22). هالینگ و همکاران (2017) بیان کردند که فعالیت ورزشی از طریق PGC-1 $\alpha$

ناشی از آن باعث بهبود مغز بیماران شود، اهمیت زیادی دارد. در این تحقیق از دوز کم اما اثر گذار کورکومین همراه با تمرین شنا استفاده شده است. در مدت دو هفته با ترکیب شنا و دوز 50 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن کورکومین مشاهده شد که عواملی که نقش اصلی در افزایش بیوژنز میتوکندریایی دارند، افزایش می‌یابند. بدیهی است یافتن راه‌هایی که بتواند به افرادی که درگیر اختلالات ناشی از مصرف الکل هستند کمک کند، اهمیت زیادی دارد. همچنین به نظر می‌رسد برای هرگونه نتیجه‌گیری در خصوص نقش کمکی کورکومین و شنا در بهبود اختلالات رفتاری ناشی از اتانول در بافت هیپوکامپ، نیاز به بررسی بیشتری باشد.

باتوجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان بیان داشت که کورکومین یا شنا به تنهایی نمی‌توانند در مدت دو هفته بر بیان PGC-1 $\alpha$  و TFAM بافت هیپوکامپ رت‌ها پس از مصرف افراطی اتانول اثر داشته باشند اما زمانی که این دو مداخله با یکدیگر ترکیب شوند پتانسیل افزایش بیوژنز میتوکندریایی را داشته و به عبارت دیگر می‌توانند بر بیان این دوژن اثرگذار بر بیوژنز میتوکندریایی اثر سینرژیستی اعمال نمایند.

در پایان، از آنجا که ممکن است دوزهای مختلف کورکومین و انواع مختلف تمرین‌سازی‌های مختلفی در مغز ایجاد کنند و به دلیل اهمیت بیوژنز میتوکندریایی در مغز و بافت هیپوکامپ آن که ممکن است به فرایندهای شناختی و مخصوصاً حافظه کمک کند، مطالعاتی در این زمینه پیشنهاد می‌شود. پیشنهاد می‌شود که سطوح ATP تولید شده که بازتابی از فعالیت دقیق تر میتوکندری می‌باشد، پس از این مداخلات بررسی شود. همچنین از آنجا که شنا به دلیل اجباری بودن ممکن است بر تغییرات ژنی در مغز اثرگذار باشد، پیشنهاد می‌شود از روش‌های تمرینی دیگری به غیر از شنا که استرس کمتری به حیوان وارد می‌کند استفاده شود.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین و کارکنان آزمایشگاه گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، به دلیل همکاری جهت انجام این مطالعه، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. لازم به ذکر است که این مقاله حاصل بخشی از رساله دکتری در رشته فیزیولوژی ورزشی می‌باشد که در گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی به تصویب رسیده است.

معنی‌داری بیشتر از گروه اتانول بود. همان‌طور که نتایج نشان داد، هم شنا و هم کورکومین به تنهایی توانستند تا حدودی PGC-1 $\alpha$  و TFAM را علیرغم غیر معنی‌دار بودن، تغییر دهند. به نظر می‌رسد که ترکیب همزمان این مداخلات اثر هم‌افزایی داشته و بتواند بیوژنز میتوکندریایی را افزایش دهد. هم کورکومین و هم تمرین می‌توانند از راه فعال‌سازی مسیر cAMP/PKA/LKB-1/AMPK/ PGC-1 $\alpha$  باعث فعال‌سازی بیوژنز میتوکندریایی شوند (10). حمیده و همکاران (2015) بیان کردند که کورکومین اثرات فعالیت ورزشی بر بیوژنز میتوکندریایی عضلات اسکلتی را با افزایش سطوح cAMP افزایش می‌دهد (10). آن‌ها رت‌های نر نژاد ویستار را در سن 10 هفتگی با دوزهای 50 و 100 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت 28 روز درمان کردند. رت‌های آن‌ها سالم بودند و بیوژنز میتوکندریایی را در عضلات اسکلتی بررسی کردند. علیرغم تفاوت‌های بافت عضله و بافت مغز، با نتایج مطالعه حاضر در یک راستا بود.

متأسفانه به نظر می‌رسد مطالعاتی که به صورت همزمان اثر کورکومین و شنا را بر بیوژنز میتوکندریایی در بافت هیپوکامپ بررسی کرده باشند و بتوان نتایج آن را مقایسه کرده و مکانیزم‌های موجود را مورد بحث قرار داد، وجود ندارد. Engel و همکاران (2016) از جهت دیگر تداخل اتانول و فعالیت ورزشی را بررسی کردند (28). آن‌ها اتانول را به صورت داخل صفاقی پس از تمرین به رت‌ها تزریق کردند و بیوژنز میتوکندریایی را بررسی کردند. آن‌ها بیان کردند که تمرین می‌تواند تا 2/5 برابر فعالیت PGC-1 $\alpha$  را افزایش دهد که این افزایش با تزریق اتانول مهار می‌شود. به نظر می‌رسد می‌توان در آینده اثر محافظتی تجویز همزمان کورکومین و تمرین شنا را قبل از تجویز اتانول بر بیوژنز میتوکندریایی بافت هیپوکامپ بررسی کرد.

علیرغم آمارهای غیر دقیق و نامطمئن در خصوص مصرف اتانول در ایران، ما در این تحقیق یکی از الگوهای مصرف اتانول که به نظر می‌رسد در بین جوانان شایعتر است، استفاده کردیم. این الگو باعث اختلال رفتاری شده (29) و ممکن است تا حدودی این اختلال، ناشی از کاهش بیوژنز میتوکندریایی در بافت هیپوکامپ باشد (15). شواهد روز افزونی نشان داده‌اند که اختلال عملکردی میتوکندریایی نقش اصلی را در بیماری‌هایی مانند بیماری‌های نروژنراتیو دارد (12). لذا توجه به عواملی که بتواند پس از مصرف افراطی اتانول و اختلالات

## • References

- Room R, Babor T, Rehm J. Alcohol and public health. *Lancet*. 2005;365(9458):519-30.
- Crews FT, Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol*. 2009;44(2):115-27.
- Antonio AM, Druse MJ. Antioxidants prevent ethanol-associated apoptosis in fetal rhombencephalic neurons. *Brain Res*. 2008;1204:16-23.
- Bailey SM, Cunningham CC. Acute and chronic ethanol increases reactive oxygen species generation and decreases viability in fresh, isolated rat hepatocytes. *Hepatology*. 1998;28(5):1318-26.
- Brinkkoetter PT, Song H, Losel R, Schnetzke U, Gottmann U, Feng Y, et al. Hypothermic injury: the mitochondrial calcium, ATP and ROS love-hate triangle out of balance. *Cell Physiol Biochem*. 2008;22(1-4):195-204.
- Liu Z, Liu Y, Gao R, Li H, Dunn T, Wu P, et al. Ethanol suppresses PGC-1alpha expression by interfering with the cAMP-CREB pathway in neuronal cells. *PLoS One*. 2014;9(8):e104247.
- Irrcher I, Adhietty PJ, Sheehan T, Joseph AM, Hood DA. PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *American journal of physiology Cell physiology*. 2003;284(6):C1669-77.
- Wang C, Li Z, Lu Y, Du R, Katiyar S, Yang J, et al. Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(31):11567-72.
- Steiner JL, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Davis JM. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *J Appl Physiol* (1985). 2011;111(4):1066-71.
- Ray Hamidie RD, Yamada T, Ishizawa R, Saito Y, Masuda K. Curcumin treatment enhances the effect of exercise on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by increasing cAMP levels. *Metabolism: clinical and experimental*. 2015;64(10):1334-47. Epub 2015/08/19.
- Liu L, Zhang W, Wang L, Li Y, Tan B, Lu X, et al. Curcumin prevents cerebral ischemia reperfusion injury via increase of mitochondrial biogenesis. *Neurochemical research*. 2014;39(7):1322-31. Epub 2014/04/30.
- de Oliveira MR, Jardim FR, Setzer WN, Nabavi SM, Nabavi SF. Curcumin, mitochondrial biogenesis, and mitophagy: Exploring recent data and indicating future needs. *Biotechnol Adv*. 2016;34(5):813-26.
- Aftab N, Vieira A. Antioxidant activities of curcumin and combinations of this curcuminoid with other phytochemicals. *Phytother Res*. 2010;24(4):500-2.
- Gibellini L, Bianchini E, De Biasi S, Nasi M, Cossarizza A, Pinti M. Natural Compounds Modulating Mitochondrial Functions. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM. 2015;2015:527209. Epub 2015/07/15.
- Maynard ME, Leasure JL. Exercise enhances hippocampal recovery following binge ethanol exposure. *PLoS One*. 2013;8(9):e76644.
- Van Pelt LF. Ketamine and xylazine for surgical anesthesia in rats. *J Am Vet Med Assoc*. 1977;171(9):842-4.
- Onyango IG, Lu J, Rodova M, Lezi E, Crafter AB, Swerdlow RH. Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(1):228-34.
- Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*. 2006;116(3):615-22.
- Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem*. 2006;97(4):673-83.
- Faheem NM, El Askary A. Neuroprotective role of curcumin on the hippocampus against the structural and serological alterations of streptozotocin-induced diabetes in Sprague Dawley rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2017;20(6):690-9.
- Ataie A, Sabetkasaei M, Haghparast A, Moghaddam AH, Ataee R, Moghaddam SN. Curcumin exerts neuroprotective effects against homocysteine intracerebroventricular injection-induced cognitive impairment and oxidative stress in rat brain. *Journal of medicinal food*. 2010;13(4):821-6.
- Chabi B, Adhietty PJ, Ljubicic V, Hood DA. How is mitochondrial biogenesis affected in mitochondrial disease? *Med Sci Sports Exerc*. 2005;37(12):2102-10.
- Halling JF, Ringholm S, Olesen J, Prats C, Pilegaard H. Exercise training protects against aging-induced mitochondrial fragmentation in mouse skeletal muscle in a PGC-1alpha dependent manner. *Exp Gerontol*. 2017;96:1-6.
- Azimi M, Gharakhanlou R, Naghdi N, Khodadadi D, Heysieattalab S. Moderate treadmill exercise ameliorates amyloid-beta-induced learning and memory impairment, possibly via increasing AMPK activity and up-regulation of the PGC-1alpha/FNDC5/BDNF pathway. *Peptides*. 2018.
- Gusdon AM, Callio J, Distefano G, O'Doherty RM, Goodpaster BH, Coen PM, et al. Exercise increases mitochondrial complex I activity and DRP1 expression in the brains of aged mice. *Exp Gerontol*. 2017;90:1-13.
- Yan Z, Lira VA, Greene NP. Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exerc Sport Sci Rev*. 2012;40(3):159-64.
- O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behavioural brain research*. 2007; 276(2): 362-6.
- Amy L. Engel APK, R. Tomas Jimenez, Denver J. Coleman, and Jason M Blank. Effect of Post-Exercise Ethanol on Signaling Pathways Regulating Mitochondrial Biogenesis. *The FASEB Journal*. 2016;30(1).
- Robin RW, Long JC, Rasmussen JK, Albaugh B, Goldman D. Relationship of binge drinking to alcohol dependence, other psychiatric disorders, and behavioral problems in an American Indian tribe. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22(2):518-23.

## Combination of Curcumin and Swimming Training Enhances Mitochondrial Biogenesis in the Hippocampal Tissue After Binge Ethanol Drinking in Male Rats

Feizolahi F<sup>1</sup>, Azarbayjani MA<sup>\*2</sup>, Nasehi M<sup>3</sup>, Peeri M<sup>3</sup>

1- Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran

2- \*Corresponding author: Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran.  
Email: m\_azarbayjani@iauctb.ac.ir

3- Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences Branch, Faculty of Medical New technologies, Tehran, Iran.

4- Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran

Received 7 Mar, 2018

Accepted 11 Jun, 2018

**Background and Objectives:** One of the most common patterns of ethanol consumption is binge drinking, which is associated with long-term behavioral disorders. So the interventions causing to improve health conditions in a short-time can be very important. The purpose of this study was to investigate the effects of curcumin and swimming training after binge ethanol drinking on the mitochondrial biogenesis of the hippocampal tissue in male rats.

**Materials and Methods:** In an experimental study, Wistar male rats (200-250g) received ethanol/dextrose for four days every eight hours. After six days of avoidance, rats in the ethanol group were randomly divided into four groups: 1) control; 2) swimming training; 3) curcumin; 4) swimming training and curcumin. A dextrose group was also considered as ethanol control in a completely similar period. PGC-1 $\alpha$  and TFAM genes expression was measured in the hippocampal tissue.

**Results:** After 20 days of withdrawal, PGC-1 $\alpha$  expression was significantly less than that in the dextrose group. After two weeks, swimming training could but nocurcumin could not significantly increase PGC-1 $\alpha$  gene expression comparing to the control group. The combination of curcumin and swimming significantly increased the expression of PGC-1 $\alpha$  and TFAM genes in the hippocampus tissue.

**Discussion:** The results showed that combination of curcumin and swimming training could increase the expression of PGC-1 $\alpha$  and TFAM genes, and improved mitochondrial biogenesis in the rats' hippocampus after binge ethanol drinking.

**Keywords:** Curcumin, Swimming training, Mitochondrial biogenesis, Hippocampus, Binge ethanol drinking