

## اثر تمرین تناوبی همراه با مصرف بهارنارنج بر بیان ژن‌های AMPK و PI3K در کبد موش‌های صحرائی سالمند ماده

سپیده رضوی<sup>۱</sup>، پروانه نظرعلی<sup>۲</sup>، رستم علی زاده<sup>۳</sup>، نجمه رضایی نژاد<sup>۴</sup>

۱- کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه الزهراء (س)، تهران، ایران  
۲- نویسنده مسئول: استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه الزهراء (س)، تهران، ایران. پست الکترونیکی: p.nazarali@alzahra.ac.ir  
۳- دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران  
۴- دکتری فیزیولوژی ورزش، آموزش و پرورش منطقه یک تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۵

### چکیده

**سابقه و هدف:** افزایش سن یک عامل خطر اصلی در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها، از جمله بیماری‌های متابولیک مرتبط با کبد است. هدف از این پژوهش بررسی اثر تمرین تناوبی همراه با مصرف بهارنارنج بر بیان ژن‌های AMPK و PI3K در کبد موش‌های صحرائی سالمند ماده بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۳۰ سر موش صحرائی ماده سالمند (۱۶-۱۸ ماهه و وزن ۲۷۰-۳۲۰ گرم) در پنج گروه مساوی (۱) کنترل (۲) شم (نرمال سالین) (۳) بهارنارنج (۴) تمرین تناوبی هوازی (۵) تمرین تناوبی هوازی-بهارنارنج قرار گرفتند. تمرینات تناوبی با شدت ۸۵ درصد تا ۱۱۰ درصد  $VO_{2max}$  و سرعت ۱۵-۲۵ متر در دقیقه به مدت ۸ هفته اجرا شد. عصاره بهارنارنج (۳۰۰ mg/kg/day) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. بیان AMPK و PI3K بافت کبد به روش Real Time PCR اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد بیان AMPK کبدی در گروه‌های بهارنارنج ( $P=0/014$ )، تمرین تناوبی هوازی ( $P=0/001$ ) و تمرین تناوبی هوازی - بهارنارنج ( $P=0/001$ ) نسبت به گروه کنترل بالاتر بود. همچنین بین بیان PI3K کبدی در گروه تمرین تناوبی هوازی - بهارنارنج نسبت به گروه‌های کنترل ( $P=0/001$ )، بهارنارنج ( $P=0/001$ ) و تمرین تناوبی هوازی ( $P=0/013$ ) بالاتر بود.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرین تناوبی و مصرف بهارنارنج به طور همزمان اثر مطلوبی بر بیان ژن‌های متابولیکی بافت کبد در شرایط سالمندی دارند؛ ولی با توجه به گستردگی مسیرهای متابولیکی پژوهش‌های بیشتری در ارتباط با اثر این دو مداخله نیاز است.

**واژگان کلیدی:** سالمندی، تمرین تناوبی شدید، بهارنارنج، کبد

### • مقدمه

AMPK/Akt، گلیکوژن سنتاز کیناز- $\beta$  GSK-3 (Glycogen synthase kinase3) به سلول‌های بتای پانکراس آسیب وارد می‌کند که در انتها به نقص عملکرد انسولین منجر می‌شود (۳)، اما فعال سازی AMPK در کبد به تحریک اکسیداسیون اسیدهای چرب، مهار لیپوژنز، تولید گلوکز و سنتز پروتئین کمک می‌کند؛ بنابراین فعال سازی AMPK ممکن است از طریق سیگنالینگ و اثرات متابولیکی و بیان ژنی، یک استراتژی جدید برای مدیریت اختلالات متابولیک کبدی مرتبط با سالمندی فراهم کند (۴). همچنین مطالعات نشان می‌دهند که فسفواینوزیتید-۳ کیناز PI3K

افزایش سن دوره‌ای از زندگی به شمار می‌رود که خطر بیماری‌های متابولیک مرتبط با کبد در آن افزایش می‌یابد. با توجه به نقش کبد در کنترل متابولیسم بدن شناختن عملکرد پروتئین‌هایی مانند پروتئین کیناز فعال شده توسط AMP (AMP-activated protein kinase) (AMPK) به عنوان یک محرک متابولیکی حائز اهمیت است (۱). علاوه بر این بررسی‌ها نشان می‌دهد که در سالمندی ریسک خطر ابتلا به بیماری‌های کبدی مرتبط با کبد در زنان بیشتر است (۲). افزایش سن، با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) (ROS)، اختلال در عملکرد پروتئین‌های متابولیکی مانند

(۱۳). در این زمینه محققین نشان داده‌اند که مصرف بهار نارنج موجب بهبود متابولیسم چربی ها، کاهش میزان نکرز و آپوپتوز در بافت کبد متعاقب مسمومیت کبدی می‌گردد (۱۴). همچنین عصاره بهار نارنج و مواد مؤثره آن مانند p-Synephrine منجر به بهبود گلوکونئوز و کاهش استرس اکسیداتیو در بافت کبد موش‌های صحرایی گردید (۱۵).

مطالعات نشان می‌دهند که تمرینات ورزشی اثرات مطلوبی بر مسیرهای متابولیکی دارند و سازگاری‌های متفاوتی ایجاد می‌کنند؛ با این حال شرایط سالمندی به عنوان دوره‌ای پیش‌رونده بشمار می‌رود که اختلالات متابولیکی در این شرایط به طور روز شمار افراد را ناتوان می‌کند و کیفیت زندگی آنها را کاهش می‌دهد. علاوه بر این به نظر می‌رسد اخیراً توجه محققین حوزه تغذیه ورزشی به استفاده از گیاهان دارویی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای اثر بخشی بیشتر در شرایط اختلالات متابولیکی جلب شده است. در این زمینه محققین اشاره نموده‌اند که تمرینات تداومی همراه با بهار نارنج اثر هم افزایی بر AMPK در بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند دارد (۱۶)؛ همچنین تمرینات استقامتی دارای اثر هم افزایی بر بهبود اتوفازای و سنتز پروتئین در بافت عضله موش‌های صحرایی سالمند دارند (۱۷). همچنین ارجمندی و همکاران (۱۳۹۷) اثر مطلوب همزمان تمرینات ترکیبی و بهار نارنج را بر نیمرخ چربی زنان چاق را گزارش کرده‌اند.

با توجه به در دسترس بودن بهار نارنج به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و اطلاعات محدود در ارتباط اثر همزمان انواع تمرینات استقامتی همراه با این مکمل گیاهی بر ژن‌های حساسیت انسولینی، نتایج این مطالعه می‌تواند به کسب اطلاعات بیشتر و ارائه راهکارهای بالینی مطلوب‌تر در جامعه سالمندی منجر شود. از این رو تحقیق حاضر قصد دارد به بررسی اثر تمرین تناوبی همراه با مصرف بهارنارنج بر بیان ژن‌های AMPK و PI3K در بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند ماده پردازد.

#### • مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر، یک مطالعه تجربی است که در آن امکان کنترل عوامل تأثیر گذار بر نتایج تحقیق بوده است. طرح تحقیق از نوع پس‌آزمون با گروه کنترل است. در این مطالعه تعداد ۳۰ سر موش صحرایی ماده سالمند ۱۸-۱۶ ماه و میانگین وزن در محدوده ۲۷۰ الی ۳۲۰ گرم داشتند از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت خریداری و جهت سازگاری به مدت یک هفته در آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی این واحد دانشگاهی نگهداری

(Phosphoinositide 3-kinase - PI3K) خانواده‌ای از لیپیدها و پروتئین کینازها هستند که در سیگنال‌های درون‌سلولی منتقل می‌شوند و در تنظیم انواع گسترده‌ای از فرآیندهای بیولوژیکی از جمله متابولیسم سلول نقش دارند (۵)، PI3K به‌عنوان پروتئین کلیدی در سیگنالینگ انسولین شناخته شده و با افزایش گلوکز مصرفی، سنتز گلیکوژن را به واسطه مهار GSK3 $\beta$  و فعال سازی Akt/PKB افزایش می‌دهد (۶).

از سویی با توجه به نیاز مبرم به ارائه راهکارهای غیر دارویی و غیر تهاجمی در پیشگیری و یا درمان بیماری‌های اختلال متابولیک در سالمندان، فعالیت‌های ورزشی به عنوان یکی از روش‌های مطلوب و کاربردی در سلامت سالمندان گزارش شده است (۷). فعالیت ورزشی یک عامل مهم در پیشگیری و درمان بیماری‌های متابولیک و اختلال کبدی است. کسب پرست و همکاران (۱۳۹۹) گزارش کردند که شش هفته تمرینات هوازی دویدن روی تردمیل منجر به افزایش بیان AKT1/ PI3K و حساسیت انسولین در سلول‌های بافت کبدی موش‌های صحرایی نژاد ویستار چاق می‌شود (۸). همچنین Yi و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که تمرین مزمن موجب افزایش مقادیر AMPK کبدی در موش‌های صحرایی دیابتی گردید (۹). Bao و همکاران (۲۰۲۰) تنظیم افزایشی PI3K را پس از تمرین هوازی در موش‌های مسن را مشاهده کردند (۱۰). با این حال، نتایج Machrina و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که با توجه به نوع و شدت تمرین، بیان ژن mRNA AMPK $\alpha$ 1 در گروه تمرین تداومی با شدت متوسط و ژن mRNA AMPK $\alpha$ 2 در گروه تمرین شدید، بالاتر بود. انواع مختلف تمرینات هوازی با شدت متوسط تا شدید اثرات متفاوتی بر ژن‌های متابولیک کبد داشت (۱۱). همچنین تمرینات تناوبی روش نوینی از تمرینات ورزشی هستند که گزارش‌ها حاکی از اثرات مفید آن بر بهبود ترکیب بدنی در شرایط سالمندی (۷) و بهبود سیرتوئین‌ها به عنوان عاملی برای فعال‌سازی بیوژنز میتوکندریایی در کبد در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌باشد (۱۲). با این حال مکانیسم سلولی مولکولی این نوع تمرین ورزشی در شدت‌های بالا بر محور AMPK و PI3K هنوز به خوبی شناخته نشده است.

همچنین علاوه بر تمرین‌های ورزشی، استفاده از برخی گیاهان دارویی به‌منظور ایجاد سازگاری‌های بهینه، می‌تواند در پیشگیری و کنترل بیماری در سالمندی نقش بسزایی ایفا کند. بهارنارنج از جمله گیاهان دارویی می‌باشد که فلاونوئیدهای موجود در آن موجب بهبود شاخص‌های متابولیک می‌شود

تعیین حداکثر سرعت دویدن؛ گروه‌های تمرین تناوبی هوازی با شدت ۸۵ تا ۱۱۰ درصد  $VO_{2max}$  که معادل ۷ تلاش ۱ دقیقه ای و سرعت ۳۱ متر بر دقیقه و استراحت فعال بین اینتروال‌ها با ۶ تلاش و سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در هفته اول انجام شد که تدریجاً با افزایش متوسط ۲ متر بر دقیقه در هفته به ۱۰ تلاش ۱ دقیقه ای با سرعت ۴۵ متر بر دقیقه و استراحت فعال با ۹ تلاش ۱ دقیقه ای (بین اینتروال‌ها) با سرعت ۲۳ متر بر دقیقه در هفته ی هشتم رسید (۲۰).

**روش نمونه‌گیری بافت و اندازه‌گیری متغیرها:** پس از سازگار شدن نمونه‌ها با محیط آزمایشگاه و آشنایی با نحوه راه رفتن و دویدن روی نوار گردان و همچنین اعمال متغیرهای مستقل تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی) پس از القای بیهوشی با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین ۱۰ درصد و با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۲ درصد و با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم (۲۱)، بیهوش شدند. پس از اطمینان از بیهوشی توسط متخصصین از طریق بررسی تست‌های درد، حفره شکمی موش‌های صحرایی شکافته شد و بافت کبد به دقت جدا گردید، در ادامه بافت کبد به وسیله ترازوی کرن ساخت کشور آلمان با دقت  $0.001$  گرم وزن گردید و برای بررسی متغیرهای بافتی مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت کبد موش‌های صحرایی نمونه‌برداری شده و پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب‌های  $1/8$  حاوی مایع RNAlater™ با نسبت ۲۰ درصد غوطه‌ور گردیده و جهت انجام آزمایش‌های ژنتیک به آزمایشگاه انتقال داده شد. اندازه‌گیری بیان ژن AMPK و PI3K در بافت کبد به‌وسیله تکنیک Real time-PCR سنجش و پس از کمی‌سازی مقادیر بیان ژن با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  تجزیه و تحلیل شد.

پس از نمونه‌گیری از موش‌های صحرایی بافت کبد آن‌ها خارج شد و تا زمان فرار سیدن انجام کار استخراج RNA در فریزر منفی ۸۰ درجه نگه‌داری شد. پس از آن برای بررسی بیان ژن‌های اتوفژی و التهابی ابتدا با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA (FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini) (Kit- Cat No: FATRK001) ساخت کشور هنگ‌کنگ، کل محتویات RNA سلول (total RNA) استخراج شد. اولین مرحله برای استخراج RNA از سلول‌های حیوانی، از بین بردن دیواره‌ی سلول‌ها با کمک یک بافر لیزکننده به نام RB Buffer می‌باشد. ۳۵۰  $\mu$ l از RB Buffer به نمونه (رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ) اضافه شد (از قبل به ازای هر ۱

شدند. پس از طی دوره سازگاری موش‌های صحرایی به گروه‌های (۱) کنترل (C)، (۲) شام/حلال بهار نارنج (Sh)، (۳) مصرف بهار نارنج (CA)، (۴) تمرین تناوبی هوازی (T) و (۵) تمرین تناوبی هوازی + بهار نارنج (T+CA) تقسیم شدند. این نکته قابل ذکر است که گروه Sh به عنوان حلال بهار نارنج و همچنین تأثیر تزریق عصاره به صورت درون صفاقی به مدت هشت هفته در نظر گرفته شد. همچنین براساس بیانیه‌های سینکی در مطالعه بر روی حیوانات با توجه به حفظ زیست و آسایش حیوانات آزمایشگاهی، در این مطالعه حداقل نمونه که جهت اجرا و نتیجه‌گیری صحیح مطالعه لازم بود، گزینش شد. همچنین در طی مدت مطالعه شرایط مناسب تغذیه، چرخه روشنایی تاریکی (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی)، رطوبت  $65 \pm 5$  درصد و درجه حرارت  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، دسترسی آزادانه به آب و غذا رعایت شد. علاوه بر رعایت شرایط حمل و نقل، نگهداری و تغذیه مناسب که ملزومات تحقیق است، برای رعایت اصول اخلاقی و به حداقل رساندن در حیوان ضمن رعایت دوز مناسب محلول کتامین و زایلازین، تزریق و جراحی توسط فرد متخصص صورت گرفت.

**نحوه تهیه و مصرف بهار نارنج:** جهت تهیه عصاره بهار نارنج، ابتدا مقدار ۵۰ گرم از نمونه پودر شده گیاه مورد نظر توسط ترازوی دیجیتال با دقت  $0.1$  گرم توزین و به بالن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر متصل به کلونجر اضافه شد. عمل استخراج به مدت ۴ ساعت انجام و اسانس جمع‌آوری شده، به‌وسیله سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری شد و اسانس تهیه شده تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۸). در این مطالعه، عصاره بهار نارنج ( $300 \text{ mg/kg/day}$ ) به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۱۸، ۱۹).

**پروتکل تمرین تناوبی هوازی:** ابتدا برای آشنا سازی با نوارگردان موش‌های صحرایی به مدت یک هفته، ۵ دقیقه در روز با سرعت ۸ متر بر دقیقه، برای سه روز بر روی نوارگردان راه رفتند. در ادامه برای بدست آوردن سرعت بیشینه موش‌های صحرایی ابتدا برای مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه گرم کردند، سپس به ازای هر ۳ دقیقه دو متر به سرعت نوار گردان اضافه شد تا سرعت به ۱۸ متر بر دقیقه رسید، پس از آن به ازای هر ۲ دقیقه ۳ متر بر دقیقه به سرعت موش‌های صحرایی افزوده شد تا موش‌های صحرایی به واماندگی برسند. این نکته قابل ذکر است که واماندگی در موش‌های صحرایی به حالتی اطلاق گردید که موش‌های صحرایی از فرط خستگی توان ادامه دویدن نداشته باشند و در فاصله یک دقیقه سه بار متوالی به انتهای نوارگردان برخورد نمایند، در ادامه پس از

DNA ژنومی از ۲۵ نانوگرم cDNA و ۲۵ نانوگرم RNA در تیوب‌های جداگانه از واکنش PCR و به کارگیری از ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده شد. تکثیر cDNA و مشاهده باند مورد انتظار توسط پرایمر اختصاصی و عدم تکثیر RNA پس از واکنش PCR نمایانگر عدم تکثیر DNA ژنومی می‌باشد. سپس برای هر یک از پرایمرها کارایی PCR اندازه‌گیری و منحنی استاندارد برای آن‌ها رسم گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است.

### روش آماری

برای اطمینان از طبیعی بودن توزیع متغیرها، از آزمون شاپیرو ویلک استفاده شد. بعد از این که طبیعی بودن توزیع داده‌ها مشخص گردید، جهت بررسی مقایسه میانگین تغییرات سطح بیان ژن گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه برای تغییرات درون گروهی و آزمون تعقیبی توکی برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری در همه موارد  $P \leq 0.05$  در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری و ترسیم نمودارها با نرم‌افزارهای GraphPad Prism 8.3.2 به اجرا درآمد.

میلی لیتر ۱۰ میکرولیتر  $\beta$ -mercaptoethanol به بافر اضافه شده است) و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد Filter Column درون Collection Tube قرار گرفت و مخلوط نمونه به Filter Column انتقال داده شد و با دور 14000 rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژگردید. بعد از سانتریفیوژ محلول روشن از Collection Tube به یک تیوب میکرو سانتریفیوژ جدید انتقال یافت. سپس هم حجم آن یعنی 350  $\mu$ l اتانول ۷۰٪ به آن اضافه گردید سپس به خوبی ورتکس شد. ترکیب ابتدا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ قرار گرفت. بعد از آن به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ قرار گرفت. در آخر به منظور از کار افتادن آنزیم RT، تیوب‌های واکنش را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. سننتر cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز (K1621) Real-time جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از Allele IDv7.8 طراحی PCR تمام پرایمرها توسط نرم افزار TBP (TATA box-binding protein) به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (۲۳). تمام پرایمرها به صورت اتصال اگزون-اگزون طراحی شد. جهت اطمینان از عدم تکثیر

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

Genes	Primer Sequences	Gene ID	Tm(°C)	Sizes (Bp)
TBP	Forward: 5'-GCGGGTCATGAAATCCAGT-3' Reverse: 5'-AGTGATGTGGGGACAAAACGA-3'	117526	60	147
AMPK	Forward: 5'-ACTATCAAAGACATACGAGAGCA-3' Reverse: 5'-CTTGAGGGTCACCACTGTATAA-3'	78975	60	181
PI3K	Forward: 5'-AGAGTTTCTGGGCATCAATAA-3' Reverse: 5'-CTAACGCAGACATCCTGGAAT-3'	298947	60	127

### • یافته‌ها

هوازی ( $p=0.001$ ) و گروه تمرین تناوبی هوازی - بهارنارنج ( $p=0.001$ ) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن AMPK بافت کبدی بین گروه‌های بهارنارنج، تمرین تناوبی هوازی و تمرین تناوبی هوازی - بهارنارنج مشاهده نشد (شکل ۱).

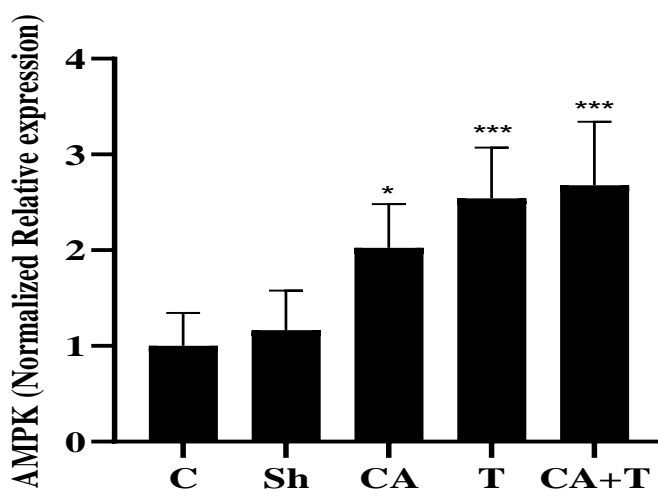
بیان PI3K بافت کبدی در گروه تمرین تناوبی هوازی - بهارنارنج نسبت به گروه‌های کنترل ( $p=0.001$ )، بهارنارنج ( $p=0.001$ ) و تمرین تناوبی هوازی ( $p=0.013$ ) افزایش معنی‌داری داشت. تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن AMPK بافت کبدی بین سایر گروه‌ها مشاهده نشد (شکل ۲).

ابتدا سطوح وزن موش‌های صحرایی در پیش‌آزمون و پس‌آزمون گروه‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. در ادامه نتایج آزمون آنالیز واریانس یک راهه نشان داد بین میانگین تغییرات بیان ژن AMPK ( $F=14/614$ ؛  $p=0.0001$ )، PI3K ( $F=14/81$ ؛  $p=0.0001$ ) بافت کبدی در گروه‌های مختلف تمرین تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بیان AMPK بافت کبدی در گروه‌های بهارنارنج ( $p=0.014$ )، گروه تمرین تناوبی

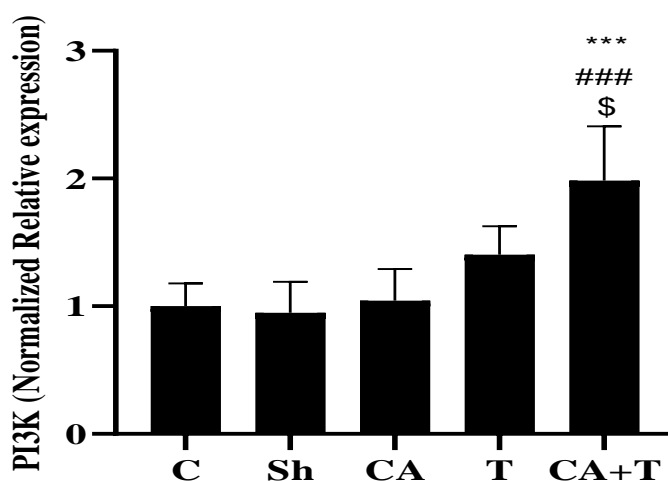
جدول ۲. سطوح وزن موش‌های صحرایی در پیش‌آزمون و پس‌آزمون گروه‌ها

گروه	متغیر	وزن (گرم)	
		پس‌آزمون	پیش‌آزمون
کنترل	وزن کبد (گرم)	۲۸۱/۱۷ ± ۳۱/۷۷	۲۵۲/۷۴ ± ۲۶/۱۷
شم		۲۶۱/۴۵ ± ۱۷/۶۷	۲۶۵/۴۵ ± ۱۷/۶۷
بهارنارنج		۲۹۸/۵۲ ± ۲۰/۲۰	۲۸۸/۴۸ ± ۲۰/۸۵
تمرین تناوبی هوازی		۲۳۸/۷۸ ± ۲۷/۰۸	۲۶۲/۸۷ ± ۱۳/۸۵
تمرین تناوبی هوازی - بهارنارنج		۲۶۵/۴۸ ± ۳۵/۴۴	۲۸۶/۳۶ ± ۲۷/۵۴



شکل ۱. میانگین تغییرات بیان ژن AMPK بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند ماده در گروه‌های مختلف

C: گروه کنترل، Sh: گروه شم، CA: گروه بهار نارنج، T: تمرین تناوبی هوازی، CA+T: تمرین تناوبی هوازی+بهار نارنج

\* ( $P \leq 0.05$ ) و \*\*\* ( $P \leq 0.001$ ) تفاوت معنی دار نسبت به گروه C و Sh

شکل ۲. میانگین تغییرات بیان ژن PI3K بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند ماده در گروه‌های مختلف

C: گروه کنترل، Sh: گروه شم، CA: گروه بهار نارنج، T: تمرین تناوبی هوازی، CA+T: تمرین تناوبی هوازی+بهار نارنج

### ( $P \leq 0.001$ ) تفاوت معنی دار نسبت به گروه C و Sh#### ( $P \leq 0.001$ ) تفاوت معنی دار نسبت به گروه CA\$ ( $P \leq 0.05$ ) تفاوت معنی دار نسبت به گروه T

## • بحث

یافته‌های پژوهش ما نشان می‌دهد بیان AMPK بافت کبدی در گروه‌های بهارنارنج، تمرین تناوبی هوازی و تمرین تناوبی هوازی - بهارنارنج نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. بیان PI3K بافت کبدی در گروه تمرین تناوبی هوازی - بهارنارنج نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد. یافته‌های مطالعه اخیر با نتایج برخی تحقیقات قبلی همخوان می‌باشد (۲۲، ۱۰-۸). از آنجایی که مطالعات قبلی بر روی نمونه‌های با اختلالات متابولیک همچون چاقی و دیابتی نوع ۲ انجام شده است، به نظر می‌رسد تمرین می‌تواند به بهبود شاخص‌های متابولیک در نمونه‌های مبتلا به بیماری‌های متابولیک کمک کند که این نتایج در مطالعه اخیر بر روی نمونه‌های سالمند نیز حاصل شده است. در این زمینه، نزدیکترین مطالعه با مطالعه حاضر نشان داد که تمرین تداومی و مصرف بهارنارنج موجب بهبود افزایش AMPK گردید؛ همچنین PI3K تنها در گروه تمرین تداومی و مصرف بهارنارنج مشاهده گردید (۱۶)؛ اما در مقایسه اندازه اثر و سطح معنی‌داری می‌توان مشاهده نمود که تمرین تناوبی هوازی اثر بخشی بیشتری داشته است. لذا نوع تمرین تناوبی و برتری آن نسبت به تمرین تداومی در مقایسه تحقیق ما با تحقیق شیخ الاسلامی و همکاران مشهود است. علاوه بر این تمرین هوازی بلند مدت نیز موجب کاهش  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$ ،  $NF-\kappa B$  و افزایش SIRT-1، PGC-1 $\alpha$  و AMPK عضله اسکلتی در موش‌های صحرایی میانسال گردید (۲۳). از این رو با توجه به تأثیر سالمندی بر اختلال متابولیکی بر اهمیت ورزش در طول زندگی برای تأمین سلامتی در سالمندان تأکید شده است (۲۴) با افزایش سن، تمرین می‌تواند از طریق فعال شدن AMPK، بهبود متابولیسم را افزایش دهد (۲۶، ۲۵). فعالیت ورزشی منظم باعث افزایش فعالیت AMPK شده و به بیوزنر میتوکندری، هموستاز انرژی، تنظیم مجدد و متابولیسم گلوکز کمک می‌کند. AMPK باعث افزایش بیان mRNA PPAR $\alpha$  می‌شود و منجر به تنظیم مولکولی اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌شود (۲۷). در سنین بالاتر معمولاً میزان ترشح انسولین، آتروفی عضلات و تغییرات هومودینامیکی کاهش می‌یابد که همه این‌ها پیامدهایی در روند گلوکز مصرفی از طریق سیگنالینگ انسولین دارد. (۲۸) خانواده‌ای از پروتئین‌ها به نام sestrins به استرس پاسخ می‌دهند و ممکن است مکانیسمی باشد که تأثیرات ورزش را بر فسفوریلاسیون AMPK واسطه می‌کند. (۲۹) هماهنگی کافی این مکانیسم‌ها توسط AMPK برخی از جنبه‌های پیری مانند تخریب بافت و

رشد تومور در سنین بالا را کاهش می‌دهد. (۳۰) مکانیسم دیگری که در افزایش میزان AMPK با ورزش دخیل است، افزایش محتوای کلسیم درون سلولی ( $Ca^{2+}$ ) از طریق دپلاریزاسیون غشا، القای فسفوریلاسیون پروتئین کیناز وابسته به کلسیم/ کالمودولین (CaMKK) است که می‌تواند AMPK را فسفوریله و فعال کند. (۳۱) علاوه بر این، استرس شبکه آندوپلاسمی در پاسخ به انقباض ناشی از تمرین، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را افزایش می‌دهد که منجر به فعال شدن CaMKK می‌شود. (۳۲) افزایش دما نیز ممکن است در فعال‌سازی AMPK در حین تمرین نقش داشته باشد. (۳۳) میزان AMPK در پاسخ به ورزش به میزان AMP مستقل از مدت و شدت تمرین نیز بستگی دارد. افزایش میزان AMP هنگامی که ورزش تا خستگی انجام می‌شود احتمالاً بیشتر است (۳۴). در تحقیق حاضر تمرین تناوبی با شدت بالا انجام شد بنابراین افزایش بیان AMPK بافت کبد توجیه‌پذیر است. اگرچه بحث بر روی اثرات تمرین بر بیان ژن AMPK در کبد موش‌های سالمند متمرکز است، اما همبستگی با AMPK و نتایج مثبت در سایر بافت‌های متابولیکی مانند عضله اسکلتی، بافت چربی، اندوتلیوم و هیپوکامپ وجود دارد. علاوه بر این، AMPK همچنین به مداخلات تمرین در این بافت‌ها پاسخ می‌دهد (۳۷-۳۵). بنابراین مسیر AMPK از طریق نقش مثبت آن در گلوکز مصرفی، واسطه مهمی در هموستاز گلوکز است و بر مکانیسم‌های وابسته به انسولین، مستقل از انسولین تأثیر می‌گذارد. مخالف با یافته‌های مطالعه اخیر، در یک مطالعه Coffey و همکاران (۲۰۰۶) افراد تمرین کرده قدرتی و استقامتی را بر سر سی کردند و نشان دادند که فسفوریلاسیون AMPK پس از دوچرخه‌سواری در گروه تمرین کرده قدرتی، افزایش یافت، اما در گروه تمرین کرده استقامتی تغییر معنی‌داری رخ نداد (۳۸). در تحقیق فوق آزمودنی‌های تمرین کرده مورد بررسی قرار گرفتند که ممکن است علت تناقض نتایج باشد. PI3K نقش مهمی در تنظیم متابولیسم در بافت‌های مختلف بدن دارد. در خصوص مکانیسم‌های مؤثر بر تغییرات PI3K گزارش شده که بیان بالای گیرنده‌های IGF-1 یا IGF، PI3K (p110 $\alpha$ ) را فعال می‌کند. هنگامی که گیرنده‌های انسولین فعال می‌شوند، سوپرسترای گیرنده انسولین (IRS) را فسفوریله می‌کنند سپس به پروتئین PI3K متصل می‌شوند و باعث فعال شدن PKC، Akt و مولکول سیگنال پاییندستی AS160 می‌شود. این عمل باعث جابجایی ناقل گلوکز نوع ۴ (GLUT4) می‌شود و به سلول‌های عضلانی اجازه می‌دهد تا

آزمایشگاهی در معرض پر نوشی الکل گردید (۴۰). همچنین مصرف بهار نارنج موجب بهبود مسیر متابولیکی مرتبط با AMPK $\alpha$ ، PPAR $\gamma$  گردید (۴۱). از این رو مطالعات نشان می‌دهند که بهار نارنج نیز از مسیرهای فعال سازی آدنیلات سیکلاز و افزایش cAMP موجب فسفریلاسیون AMPK می‌گردند و این امر با بهبود مسیرهای متابولیکی مرتبط همراه است (۴۱).

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد اثرات مفید بهار نارنج به همراه تمرین تناوبی بر بیان ژن‌های بهبود بخش حساسیت انسولینی در بافت کبد باعث هم‌افزایی نتایج می‌شود. به طوری که مطالعه شیخ‌الاسلامی نیز همانند مطالعه ما اثر هم‌افزایی تمرین و بهار نارنج را نشان داد (۱۶)؛ همچنین در مطالعه ای نیز محققین نشان دادند که تمرین استقامتی و مصرف بهار نارنج اثر هم‌افزایی در فعال سازی اتوفاژی و بهبود سنتر پروتئین در بافت عضله موش‌های صحرایی می‌گردد (۱۷). علاوه بر این در توجیه بالاتر بودن وزن کبد در گروه کنترل نسبت به سایر گروه‌ها به نظر می‌رسد استئاتوز کبدی موجب افزایش وزن کبد می‌گردد (۴۲)؛ اما در شرایط سالمندی و مصرف بهار نارنج وزن کاهش یافته است. ولی بررسی پاتولوژی و بافت‌شناسی دقیق‌تری در این زمینه مورد نیاز می‌باشد. در مجموع، مطالعات بیشتری برای شناسایی سازوکارهای تأثیر مکمل‌گیری بهار نارنج بر میزان بیان ژن‌های شاخص‌های متابولیک در بافت کبد طی سالمندی مورد نیاز است. از این رو عدم بررسی پاتولوژی و بافت‌شناسی کبد در این تحقیق از محدودیت‌های مطالعه حاضر است و پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی توسط محققین مورد ارزیابی قرار گیرد. تمرین هوازی از نقاط قوت تحقیق حاضر بود؛ چرا که این نوع تمرین پاسخ‌ها و سازگاری‌های متفاوتی نسبت به برنامه‌های تمرینی داشت. محدودیت‌هایی نیز در تحقیق حاضر وجود داشت که از جمله می‌توان به عدم اندازه‌گیری میزان آنزیم‌های عملکرد کبدی و نشانگرهای متابولیسم انسولین اشاره کرد. با توجه به ارتباط استرس متابولیک بافت کبد با شرایط اکسیداتیو پیشنهاد می‌شود در تحقیقی مشابه شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کبد آزمودنی‌های سالمند نیز بررسی شود. همچنین با تغییر دوز مصرفی بهار نارنج نیز ممکن است بتوان به نتایج روشن‌تری دست یافت. به هر حال تحقیقات بیشتری در این زمینه مورد نیاز می‌باشد.

گلوکز بیشتری جذب کنند از این رو متابولیسم گلوکز را تنظیم می‌کند؛ بنابراین، تغییرات در مسیر سیگنالینگ PI3K ارتباط نزدیک با مقاومت به انسولین (IR)، دیابت و بیماری‌های متابولیکی دارد (۳۹). برخی مطالعات قبلی روی آزمودنی‌های حیوانی افزایش PI3K متعاقب تمرینات هوازی را گزارش کرده‌اند. در همین زمینه نتایج کسب پرست و همکاران (۱۳۹۹) نشان داد که ۶ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان منجر به افزایش بیان PI3K و حساسیت انسولین در سلول‌های بافت کبد موش‌های صحرایی نژاد ویستار چاق شد (۸). احتمالاً عدم همخوانی نتایج این تحقیق با یافته فوق را بتوان به شرایط بیماری نمونه‌های مورد بررسی نسبت داد.

در مطالعه حاضر، مصرف بهار نارنج به‌تنهایی و تمرین تناوبی به همراه مصرف بهار نارنج با افزایش معنی‌دار بیان ژن AMPK بافت کبدی در موش‌های سالمند همراه بود با این حال افزایش معنی‌دار بیان ژن PI3K تنها در گروه تمرین تناوبی به همراه مصرف بهار نارنج مشاهده شد. این نتایج حاکی از آن است که احتمالاً مداخله تمرین تناوبی و مصرف بهار نارنج می‌تواند به بهبود تغییرات بیان ژن شاخص‌های متابولیک بافت کبد در موش‌های سالمند کمک کند. مکانیسمی که بهار نارنج یا فرآورده‌های بهار نارنج به‌وسیله آن باعث بهبود شرایط متابولیک می‌شود به‌طور کامل مورد تحقیق قرار نگرفته است. به نظر می‌رسد اثرات متابولیک بهار نارنج ناشی از ترکیبات فعال آن از جمله هسپریدین، نارینجین و نئوهسپریدین است که جزء دسته فلاوانون می‌باشند که منجر به تغییر بیان ژن‌های شاخص‌های متابولیک و در نتیجه منجر به بهبود شرایط متابولیک بافت کبد می‌شوند (۴۰). همان‌طور که ذکر شد یکی از فلاونوئیدهای موجود در بهار نارنج هسپرین (۴-متیوکسی-۳،۵،۷-تری‌هیدروکسی فلاونون) و نارنژین (۴،۵،۷-تری‌هیدروکسی فلاونون) می‌باشد. همخوان با نتایج مطالعه ما فلاونوئیدهای موجود در بهار نارنج موجب افزایش بیان شاخص‌های متابولیک می‌شود. گزارش شده است که هسپرین باعث افزایش فسفوریلاسیون AMPK می‌شود (۱۳). مهم‌ترین یافته تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تعامل تمرین تناوبی و مصرف بهار نارنج می‌تواند مزایای بیشتری نسبت به اعمال هر یک از آن‌ها به‌تنهایی داشته باشد. همسو با مطالعه حاضر Choi و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند روزانه ۵ گرم بر کیلوگرم از وزن بدن بهار نارنج موجب بهبود آسیب‌های کبدی و بهبود مسیر AMPK و NRF-2 در بافت کبد موش‌های

## نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه نتایج تحقیق ما نشان می‌دهد که تمرین تناوبی هوازی و مصرف بهارنارنج هم به تنهایی و هم به طور همزمان موجب افزایش بیان ژن‌های متابولیک بافت کبد در موش‌های سالمند شد. این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً مداخله حاضر می‌تواند مزایایی برای بافت کبد طی سالمندی به همراه داشته باشد؛ بنابراین تمرین تناوبی هوازی به همراه مصرف بهارنارنج می‌تواند به عنوان راهکار مناسبی برای بهبود شرایط متابولیک بافت کبد طی سالمندی مورد توجه قرار گیرد.

## سپاس‌گزاری

این تحقیق با تائید کمیته اخلاق با شماره IR.IAU.M.REC.1399.032 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت اجرا گردید. بدین‌وسیله از کلیه‌ی افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. هیچ‌گونه تعارض منافع در اجرای این پژوهش وجود نداشته است. پژوهش حاضر بدون بهره‌گیری از منابع مالی سازمان و نهادی به انجام رسیده است.

## References

- Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):774-85.
- Guy J, Peters MG. Liver disease in women: the influence of gender on epidemiology, natural history, and patient outcomes. *Gastroenterology & hepatology*. 2013;9(10):633.
- Entezari M, Hashemi D, Taheriazam A, Zabolian A, Mohammadi S, Fakhri F, et al. AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: A pre-clinical and clinical investigation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;146:112563.
- Mulligan JD, Gonzalez AA, Kumar R, Davis AJ, Saupé KW. Aging elevates basal adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activity and eliminates hypoxic activation of AMPK in mouse liver. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2005;60(1):21-7.
- Ghigo A, Laffargue M, Li M, Hirsch E. PI3K and calcium signaling in cardiovascular disease. *Circulation research*. 2017;121(3):282-92.
- Oudit GY, Sun H, Kerfant B-G, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;37(2):449-71.
- Hosseini SA, Salehi O, Keikhosravi F, Hassanpour G, Ardakani HD, Farkhaie F, et al. Mental health benefits of exercise and genistein in elderly rats. *Experimental aging research*. 2021:1-16.
- Kasb Parast M AS, Sohaili SH, Banaeifar AA. The Effect of Aerobic Exercises on AKT1/ PI3K Expression and Insulin Sensitivity in liver Hepatocyte of Obese Vistar Rats. *Sports Science Quarterly*. 2021;14(39):105-18.
- 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. *Journal of diabetes research*. 2013;2013.
- Bao C, Yang Z, Li Q, Cai Q, Li H, Shu B. Aerobic endurance exercise ameliorates renal vascular sclerosis in aged mice by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *DNA and cell biology*. 2020;39(2):310-20.
- Machrina Y, Pane YS, Lindarto D. The Expression of Liver Metabolic Enzymes AMPK $\alpha$ 1, AMPK $\alpha$ 2, and PGC-1 $\alpha$  due to Exercise in Type-2 Diabetes Mellitus Rat Model. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2020;8(A):629-32.
- Davari F, Alimanesh Z, Alimanesh Z, Salehi O, Hosseini SA. Effect of training and crocin supplementation on mitochondrial biogenesis and redox-sensitive transcription factors in liver tissue of type 2 diabetic rats. *Archives of physiology and biochemistry*. 2020:1-6.
- Afra HS, Zangoeei M, Meshkani R, Ghahremani MH, Ilbeigi D, Khedri A, et al. Hesperetin is a potent bioactivator that activates SIRT1-AMPK signaling pathway in HepG2 cells. *Journal of physiology and biochemistry*. 2019;75(2):125-33.
- Shu Y, He D, Li W, Wang M, Zhao S, Liu L, et al. Hepatoprotective effect of Citrus aurantium L. against APAP-induced liver injury by regulating liver lipid metabolism and apoptosis. *International journal of biological sciences*. 2020;16(5):752.
- Peixoto JS, Comar JF, Moreira CT, Soares AA, De Oliveira AL, Bracht A, et al. Effects of Citrus aurantium (bitter orange) fruit extracts and p-synephrine on metabolic fluxes in the rat liver. *Molecules*. 2012;17(5):5854-69.
- Shykholeslami Z, Abdi A, Hosseini SA, 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: Volume*. 2022;29(6).

17. Hosseinpour Delavar S, Safikhani H, Azizi M. The Effect of Eight Weeks of Continuous and Interval Training with Citrus Aurantium Consumption on Autophagy Markers and MyoD Activation in the Muscle Tissue of Elderly Rats. *Elderly Health Journal*. 2021;7(2):71-8.
18. 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. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(10):3057.
19. Azadbakht M, Khoori V, Nayeb Pour S, Pourabook M, Fazelinejad S. The role of adrenoceptors in the electrophysiological effects of hydroalcoholic extract of Citrus bigaradia in experimental model of atrial fibrillation of isolated atrioventricular node of rabbits. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2009;18(68):1-10.
20. 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. *Report of Health Care*. 2018;4(1):26-35.
21. Asadbegy M, Mirazi N, Vatanchian M. Comparative study of Lotus corniculatus L. hydroethanolic extract and phenytoin ointment effects on rat skin wound healing: Morphometrical and histopathological studies. 2011.
22. Azarbayjani MA, Banaeifar A, Arshadi S. Effects of Aerobic Interval Training and Adenosine on the Expression of AMPK, PPAR $\gamma$  and A2B Receptor in the Liver of Rats Fed a High-Fat Diet. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2020;10(3):2655-64.
23. Oliveira NR, Marques SO, Luciano TF, Pauli JR, Moura LP, Caperuto E, et al. Treadmill training increases SIRT-1 and PGC-1 $\alpha$  protein levels and AMPK phosphorylation in quadriceps of middle-aged rats in an intensity-dependent manner. *Mediators of inflammation*. 2014;2014.
24. Cartee GD, Hepple RT, Bamman MM, Zierath JR. Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. *Cell metabolism*. 2016;23(6):1034-47.
25. Wang H, Sharma N, Arias EB, Cartee GD. Insulin signaling and glucose uptake in the soleus muscle of 30-month-old rats after calorie restriction with or without acute exercise. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. 2016;71(3):323-32.
26. da Silva Coqueiro R, de Jesus Soares T, Pereira R, Correia TML, Coqueiro DSO, Oliveira MV, et al. Therapeutic and preventive effects of exercise on cardiometabolic parameters in aging and obese rats. *Clinical nutrition ESPEN*. 2019;29:203-12.
27. Lee WJ, Kim M, Park H-S, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, et al. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR $\alpha$  and PGC-1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;340(1):291-5.
28. Basu R, Breda E, Oberg AL, Powell CC, Dalla Man C, Basu A, et al. Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance. *Diabetes*. 2003;52(7):1738-48.
29. Lee JH, Budanov AV, Karin M. Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging. *Cell metabolism*. 2013;18(6):792-801.
30. Salminen A, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing research reviews*. 2012;11(2):230-41.
31. Jeon S-M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48(7):e245-e.
32. Feng N, Wang B, Cai P, Zheng W, Zou H, Gu J, et al. ZEA-induced autophagy in TM4 cells was mediated by the release of Ca<sup>2+</sup> activates CaMKK $\beta$ -AMPK signaling pathway in the endoplasmic reticulum. *Toxicology letters*. 2020;323:1-9.
33. Koshinaka K, Kawamoto E, Abe N, Toshinai K, Nakazato M, Kawanaka K. Elevation of muscle temperature stimulates muscle glucose uptake in vivo and in vitro. *The Journal of Physiological Sciences*. 2013;63(6):409-18.
34. Morales-Alamo D, Calbet JA. AMPK signaling in skeletal muscle during exercise: Role of reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;98:68-77.
35. Chen Z, Yu J, Fu M, Dong R, Yang Y, Luo J, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition improves endothelial senescence by activating AMPK/SIRT1/Nrf2 signaling pathway. *Biochemical pharmacology*. 2020;177:113951.
36. 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(12):e51709.
37. Lin J-Y, Kuo W-W, Baskaran R, Kuo C-H, Chen Y-A, Chen WS-T, et al. Swimming exercise stimulates IGF1/PI3K/Akt and AMPK/SIRT1/PGC1 $\alpha$  survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(8):6852.
38. Coffey VG, Zhong Z, Shield A, Canny BJ, Chibalin AV, Zierath JR, et al. Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans. *The FASEB journal*. 2006;20(1):190-2.
39. Hoeger KM, editor. Exercise therapy in polycystic ovary syndrome. *Seminars in reproductive medicine*; 2008: © Thieme Medical Publishers.

40. 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. *Phytotherapy Research*. 2015;29(10):1577-84.
41. Park J, Kim H-L, Jung Y, Ahn KS, Kwak HJ, Um J-Y. Bitter orange (*Citrus aurantium* Linné) improves obesity by regulating adipogenesis and thermogenesis through AMPK activation. *Nutrients*. 2019;11(9):1988.
42. Simon G, Heckmann V, Tóth D, Pauka D, Petrus K, Molnár TF. The effect of hepatic steatosis and fibrosis on liver weight and dimensions. *Legal Medicine*. 2020;47:101781.

## Effects of Aerobic Interval Training with *Citrus aurantium* Consumption on Gene Expression of AMPK and PI3K in Liver Tissues of Elderly Rats

Razavi S<sup>1</sup>, Nazarali P<sup>\*2</sup>, Alizadeh R<sup>3</sup>, Rezaeinezhad N<sup>4</sup>

- 1- M.Sc. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
- 2- \*Corresponding author: Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran. Email: p.nazarali@alzahra.ac.ir
- 3- Associate professor, Department of Sports Science, School of Literature and Humanities, Ilam University, Ilam, Iran
- 4- PhD of Exercise Physiology, Tehran Education Office, Tehran, Iran

Received 10 Apr, 2022

Accepted 27 Jul, 2022

**Background and Objectives:** Aging is a major risk factor for several diseases, including liver-related metabolic disorders. The aim of this study was to assess effects of aerobic interval training with *Citrus aurantium* consumption on gene expression of AMPK and PI3K in liver tissues of elderly rats.

**Materials & Methods:** In this experimental study, 30 elderly female rats (16–18 months old) were divided to five equal groups of (1) control, (2) sham (normal saline), (3) *Citrus aurantium*, (4) aerobic interval training and (5) aerobic interval training and *Citrus aurantium*. Aerobic interval training was carried out for eight weeks with the intensity of 85–110% VO<sub>2</sub>max and speed of 25–15 m per min. *Citrus aurantium* extract (300 mg/kg/day) was injected to the animals intraperitoneally. Expression of AMPK and PI3K genes in liver tissues were assessed using real-time PCR. For data analysis, one-way analysis of variance followed by Bonferroni post-hoc test was used at  $p < 0.05$ .

**Results:** Results showed significant differences between the groups in expression of AMPK in liver tissues ( $F = 14.614$ ,  $p = 0.0001$ ); significant increases in *Citrus aurantium* group ( $p = 0.014$ ), aerobic interval training group ( $p = 0.0001$ ) and aerobic interval training and *Citrus aurantium* group ( $p = 0.0001$ ) were seen, compared to the control group. Similarly, expressions of PI3K in liver tissues of different groups were significantly different with ( $F = 18.151$ ,  $p = .0001$ ). Specifically, significant increases were seen in the aerobic interval training and *Citrus aurantium* group, compared to the control group ( $p = 0.001$ ), *Citrus aurantium* group ( $p = 0.001$ ) and aerobic interval training group ( $p = 0.013$ ).

**Conclusion:** It seems that aerobic interval training with *Citrus aurantium* consumption could help improve gene expression of the metabolic markers in liver tissues during the elderly.

**Keywords:** Aging, High-intensity interval training, *Citrus aurantium*, Liver