

## ***Effects of Ellagic Acid on Sirt1 and AMPK Gene Expression and Oxidative Stress in Aged Rat Hearts***

Mahdieh Nazari-Robati<sup>1,2</sup>

Niloufar Naghibi<sup>3</sup>

Asie Sadeghi<sup>4</sup>

Hanieh Qaderipour<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Applied Cellular and Molecular Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

<sup>2</sup> Department of Clinical Biochemistry, Afzalipour Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

<sup>3</sup> MSc in Clinical Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Afzalipour Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, Afzalipour Medical School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

<sup>5</sup> BSc Student in Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received February 24, 2026; Accepted July 19, 2026)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Impaired energy metabolism and oxidative stress contribute to structural and functional changes in ageing tissues, including the heart. Sirtuin 1 (SIRT1) and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) play important roles in regulating metabolic pathways and antioxidant responses. Ellagic acid is a natural polyphenolic compound with antioxidant properties. This study investigated the effects of ellagic acid on Sirt1 and AMPK-related gene expression, as well as oxidative stress markers, in the hearts of aged rats.

**Materials and methods:** In this experimental study, 14 male 25-month-old rats were randomly assigned to two groups: a control group and an ellagic acid-treated group. Ellagic acid was dissolved in normal saline containing 0.1% DMSO. The control group received the vehicle solution, whereas the treatment group received ellagic acid (30 mg/kg) by oral gavage for one month. After the treatment period, the animals were deeply anaesthetised, and heart tissues were collected. The expression levels of Sirt1 and AMPK-related genes were evaluated using real-time PCR. Additionally, oxidative stress markers, including malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and total antioxidant capacity (TAC), were measured in heart tissue.

**Results:** Ellagic acid treatment significantly increased the expression of Sirt1 and AMPK-related genes in the heart tissue of aged rats ( $P < 0.05$ ). In addition, SOD, CAT, and TAC levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ), whereas MDA levels were significantly decreased ( $P < 0.001$ ) compared with the control group.

**Conclusion:** Ellagic acid may exert protective effects on the aged heart by enhancing the expression of genes involved in metabolic regulation, including Sirt1 and AMPK-related pathways, while reducing oxidative stress.

**Keywords:** ellagic acid, ageing, heart, oxidative stress, Sirt1, AMPK

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 36 (259): 30-40 (Persian).

**Corresponding Author:** Mahdieh Nazari-Robati - School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran (E-mail: mnazari@kmu.ac.ir)

# اثر الازیک اسید بر بیان ژن های *SIRT1* و *AMPK* و استرس اکسیداتیو در قلب موش های پیر

مهدیه نظری رباطی<sup>۲،۱</sup>

نیلوفر نقیبی<sup>۳</sup>

آسیه صادقی<sup>۴</sup>

هانیه قادری پور<sup>۵</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** اختلال در متابولیسم انرژی و استرس اکسیداتیو باعث ایجاد تغییرات ساختاری و عملکردی در بافت های پیر مثل قلب می شود. سیرتوئین ۱ (*SIRT1*) و پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین مونوفسفات (*AMPK*) در تنظیم مسیرهای متابولیکی و پاسخ های آن تی اکسیدانی نقش دارند. الازیک اسید یک ترکیب پلی فنولی طبیعی است که خاصیت آن تی اکسیدانی دارد. این مطالعه با هدف بررسی، اثر الازیک اسید بر بیان ژن های *SIRT1* و *AMPK* و استرس اکسیداتیو در قلب موش های پیر، انجام پذیرفت.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، ۱۴ سر موش صحرایی نر ۲۵ ماهه به طور تصادفی به ۲ گروه کنترل و تیمار با الازیک اسید تقسیم شدند. الازیک اسید در نرمال سالین که دارای DMSO ۰/۱ درصد بود حل شد. گروه اول، حلال الازیک اسید و گروه دوم، الازیک اسید (30 mg/kg) به مدت یک ماه به صورت گاواژ دریافت کردند. بعد از یک ماه، قلب حیوانات تحت بیهوشی عمیق جدا شد. سپس بیان ژن های *SIRT1* و *AMPK* به روش Real-Time PCR (Real-time polymerase chain reaction) بررسی شد. علاوه بر این، شاخص های استرس اکسیداتیو شامل مالون دی آلدئید (MDA)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و ظرفیت آن تی اکسیدانی کل (TAC) در بافت قلب اندازه گیری شد.

**یافته ها:** تیمار با الازیک اسید باعث افزایش معنی دار بیان ژن های *SIRT1* و *AMPK* در بافت قلب موش های پیر شد ( $P < 0/05$ ). هم چنین، مقادیر SOD، CAT و TAC افزایش معنی داری نشان دادند ( $P < 0/05$ ) و مقدار MDA کاهش معنی داری ( $P < 0/01$ ) در مقایسه با گروه کنترل نشان داد.

**استنتاج:** الازیک اسید با افزایش بیان ژن های *SIRT1* و *AMPK* و کاهش استرس اکسیداتیو می تواند اثرات محافظتی برای قلب پیر داشته باشد.

**واژه های کلیدی:** پیری، قلب، الازیک اسید، *SIRT1*، *AMPK*، استرس اکسیداتیو

**مؤلف مسئول: مهدیه نظری رباطی** - کرمان، انتهای بلوار ۲۲ بهمن، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده پزشکی افضل پور، گروه بیوشیمی بالینی E-mail:mnazari@kmu.ac.ir

۱. دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
  ۲. دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی افضل پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
  ۳. کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی افضل پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
  ۴. دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی افضل پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
  ۵. دانشجوی کارشناسی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۱۲/۶ تاریخ تصویب: ۱۴۰۵/۴/۲۸

## مقدمه

پیری یک فرایند زیستی طبیعی است که با کاهش تدریجی عملکرد اندام‌های مختلف بدن مثل قلب مشخص می‌شود. تغییرات وابسته به سنی که در ساختار قلب و مسیرهای انتقال پیام مولکولی آن ایجاد می‌گردد، باعث اختلال در عملکرد قلب و افزایش حساسیت این عضو به بیماری می‌شود (۱، ۲). کاهش عملکرد میتوکنندری، عدم تعادل در متابولیسم سلولی، التهاب مزمن و استرس اکسیداتیو از جمله تغییراتی است که در قلب پیر ایجاد می‌شود. این تغییرات می‌توانند در بروز بیماری‌های قلبی عروقی نقش داشته باشند (۳، ۴).

استرس اکسیداتیو در اثر عدم تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) و حذف این ترکیبات توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌شود. این فرایند، نقش مهمی در پیری قلب ایفا می‌کند. افزایش سطح ROS باعث اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها و آسیب به DNA می‌شود که در نهایت منجر به ایجاد تغییرات ساختاری و اختلال در عملکرد میوکارڈ می‌گردد (۵). سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی که شامل عوامل مختلفی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase, SOD) و کاتالاز (Catalase, CAT) است نقش مهمی در حفظ تعادل ردوکس ایفا می‌کند.

اما توانایی این سیستم با افزایش سن کاهش می‌یابد. در نتیجه، ترکیبات حاصل از آسیب اکسیداتیو مثل مالون‌دی‌آلدهید (Malondialdehyde, MDA) در بافت‌های پیر تجمع پیدا می‌کند (۶). علاوه بر افزایش استرس اکسیداتیو، پیری با اختلال در متابولیسم انرژی و مسیرهای پاسخ به استرس سلولی همراه است. سیرتوئین ۱ (Sirtuin 1, SIRT1) یک نوع آنزیم داستیلاز وابسته به نیکوتین آمید آدنسین دی‌نوکلئوتید (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>) است که در تنظیم عملکرد میتوکنندری، ترمیم آسیب‌های DNA، تغییر بیان ژن‌ها، کاهش استرس اکسیداتیو و در نتیجه بقاء سلول نقش دارد.

به طور مشابه، پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین مونوفسفات (Adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) که یک حسگر مرکزی انرژی سلولی است می‌تواند مسیرهای متابولیکی، بیوزنر میتوکنندری و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی را تنظیم کند (۷). مطالعات نشان داده‌اند که AMPK با SIRT1 تعامل دارد و محور پیام رسان AMPK/SIRT1 نقش مهمی در تنظیم استرس اکسیداتیو و حفظ تعادل انرژی سلولی ایفا می‌کند (۸). در حالی که، کاهش عملکرد این محور باعث نارسایی قلبی عروقی وابسته به سن می‌شود (۷، ۹).

امروزه ترکیبات پلی فنولی طبیعی به علت داشتن اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظت قلبی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. الازیک اسید یک ترکیب پلی فنول است که به‌طور طبیعی در میوه‌هایی مانند انار، توت فرنگی، تمشک و مغزهایی مثل گردو و بادام وجود دارد (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند که این ترکیب دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی قوی‌ای است و می‌تواند اثرات محافظتی در برابر بیماری‌های متابولیکی و اختلالات مرتبط با استرس اکسیداتیو داشته باشد (۱۱). در مطالعه انجام گرفته قبلی مشخص شد که الازیک اسید باعث کاهش استرس اکسیداتیو در بافت کلیه پیر می‌شود. همچنین، این ترکیب با تنظیم محور AMPK/SIRT1 باعث کاهش تجمع چربی در کبد پیر می‌گردد (۱۲، ۱۳).

با توجه به نقش محوری استرس اکسیداتیو در پیری قلب و بیماری‌های آن، بررسی اثرات بالقوه الازیک اسید بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و مسیر پیام رسان مرتبط با طول عمر از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. نتایج این بررسی می‌تواند دیدگاه ارزشمندی درباره مکانیسم محافظتی الازیک اسید در پیری قلب ارائه دهد. با وجود مطالعات انجام گرفته درباره اثرات آنتی‌اکسیدانی الازیک اسید، تاکنون اثر این ترکیب بر بیان ژن‌های SIRT1 و AMPK و استرس اکسیداتیو در قلب موش‌های پیر صورت نگرفته است. لذا، در این مطالعه به بررسی اثرات الازیک اسید بر بیان ژن‌های SIRT1 و AMPK و همچنین، تاثیر آن

بر وضعیت استرس اکسیداتیو در بافت قلب موش‌های پیر، پرداخته شد.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از ۱۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار که سن آن‌ها ۲۵ ماه بود استفاده شد. موش‌ها از مرکز نگهداری حیوانات دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران خریداری و در شرایط مناسب دمایی،  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، و چرخه‌های تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. همه حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمام دستورالعمل‌های آزمایش بر روی حیوانات توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان (کد اخلاق: IR.KMU.AH.REC.۱۴۰۰، ۰۴۱) تایید شد.

### گروه‌های مورد مطالعه و روش تیمار حیوانات

در این تحقیق، حیوانات ابتدا شماره گذاری شدند و سپس با استفاده از جدول اعداد تصادفی به صورت تصادفی به دو گروه شامل گروه کنترل و گروه الاژیک اسید تقسیم شدند ( $n=7$  در هر گروه). الاژیک اسید (Sigma, USA) در نرمال سالین که دارای DMSO ۰/۱ درصد بود حل شد. گروه کنترل، حلال الاژیک اسید (نرمال سالین حاوی DMSO ۰/۱ درصد) را به صورت گاوژ دریافت کرد. گروه دیگر با الاژیک اسید (30 mg/kg) به صورت گاوژ تیمار گردید. تیمار هر دو گروه، یک بار در روز و به مدت یک ماه صورت گرفت. دوز الاژیک اسید مورد استفاده و مدت تیمار براساس مطالعات قبلی بود (۱۲، ۱۳). بعد از یک ماه، حیوانات تحت بیهوشی با کتامین (50 mg/kg) و زایلازین (5 mg/kg) قرار گرفتند. سپس قلب حیوانات جدا شد و برای انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

بررسی بیان ژن‌های *SIRT1* و *AMPK* در بافت قلب

برای اندازه گیری بیان ژن‌های *SIRT1* و *AMPK* از روش Real-Time PCR استفاده شد. ابتدا، ۵۰ میلی گرم

از بافت قلب در محلول تریزول (GeneAll، کره جنوبی) هموژن شد. سپس استخراج RNA صورت گرفت (۱۲). در مرحله بعد، غلظت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ ND-1000 (Thermo Scientific، آمریکا) تعیین شد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت (پارس طوس، ایران) و براساس دستورالعمل کیت صورت گرفت. در مرحله بعد، با استفاده از دستگاه mic PCR (BMS، استرالیا)، مستر میکس سایبر گرین (Ampliqon، دانمارک)، cDNA سنتز شده و پرایمرها، تکثیر ژن‌ها انجام شد. توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ آورده شده است. مراحل PCR شامل دناتوراسیون اولیه،  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۴۰ سیکل از دناتوراسیون  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر  $62^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۵ ثانیه و طویل سازی  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۵ ثانیه بود. برای بررسی عدم وجود آلودگی و اختصاصی بودن تکثیر ژن‌ها از کنترل منفی (No-template control, NTC) در هر واکنش استفاده شد. پس از انجام Real-Time PCR، تحلیل منحنی ذوب جهت بررسی اختصاصی بودن تکثیر و اطمینان از عدم وجود محصولات غیر اختصاصی انجام گرفت. از ژن *GAPDH* هم به عنوان کنترل داخلی برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد و بیان نسبی ژن‌ها به روش  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  محاسبه گردید. بررسی هر نمونه به صورت سه بار تکرار انجام گرفت.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

| Gene name    | Sequence 5'→3'                  | Product size (bp) |
|--------------|---------------------------------|-------------------|
| <i>SIRT1</i> | Forward: GGTAGTTCCTCGGTGTCCT    | 152               |
|              | Reverse: ACCCAATAACAATGAGGAGGTC |                   |
| <i>AMPK</i>  | Forward: CTCAGTTCCTGGAGAAAGATGG | 174               |
|              | Reverse: CTGCCGGTTGAGTATCTTCAC  |                   |
| <i>GAPDH</i> | Forward: AGGTGTGCTCTGTGACTTC    | 130               |
|              | Reverse: CTGTTGCTGTAGCCATATTC   |                   |

### اندازه گیری سطح استرس اکسیداتیو در قلب

برای ارزیابی سطح استرس اکسیداتیو، فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (Total antioxidant capacity, TAC) و MDA در بافت قلب موش‌های پیر و با کیت (کیازیست، ایران)

اندازه گیری شد. بدین منظور، ابتدا بافت قلب در بافر موجود در کیت هموژن شد و پس از سانتریفیوژ در °C ۴، محلول رویی جدا و براساس دستورالعمل کیت‌ها اندازه گیری صورت گرفت. جذب نوری در طول موج مشخص شده توسط کیت با دستگاه الیزا ریدر (BioTek Epoch، آمریکا) اندازه گرفته شد.

#### اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (TAC) به روش رنگ سنجی در طول موج ۴۵۰ نانومتر و براساس توانایی آنتی اکسیدان‌ها در احیا کردن یون  $\text{Cu}^{+2}$  به یون  $\text{Cu}^{+1}$  اندازه گرفته شد. از Trolox به عنوان استاندارد استفاده شد و نمودار استاندارد براساس رقت‌های مختلف Trolox به دست آمد. سپس مقدار TAC بافت‌ها براساس نمودار استاندارد محاسبه شد.

#### اندازه گیری مالون‌دی‌آلدهید

سنجش مقدار مالون‌دی‌آلدهید براساس واکنش آن با تیوباریتوریک اسید در دمای جوش صورت گرفت. مقدار محصول تولید شده به روش رنگ‌سنجی در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه گیری شد. از تترا اتوکسی پروپان برای رسم نمودار استاندارد استفاده گردید و سپس غلظت MDA براساس نمودار استاندارد محاسبه شد.

#### اندازه گیری فعالیت کاتالاز

اساس این روش، تبدیل متانول به فرمالدهید توسط کاتالاز در حضور پراکسید هیدروژن بود. فرمالدهید تولید شده با ترکیب کروموژن Purpald و واکنش داد و کمپلکس بنفش رنگی ایجاد کرد که در طول موج ۵۴۰ نانومتر جذب داشت. از فرمالدهید برای رسم نمودار استاندارد استفاده شد. سپس فعالیت آنزیم براساس نمودار استاندارد به دست آمد.

#### اندازه گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز

در این روش از سیستم زانتین/زانتین اکسیداز که تولید کننده رادیکال سوپراکسید است استفاده شد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز رادیکال‌های سوپراکسید را به آب اکسیژنه و اکسیژن تبدیل می کند. کاهش رادیکال‌های سوپراکسید تولید شده توسط SOD مانع از تبدیل شدن ترکیب resazurin به resorufin و کاهش جذب آن می گردد. در این روش، میزان جذب در ۵۸۰ نانومتر اندازه گرفته شد.

#### اندازه گیری غلظت پروتئین

سنجش مقدار پروتئین به روش بردفورد و با استفاده از رنگ کوماسی آبی G-250 صورت گرفت. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گرفته شد و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

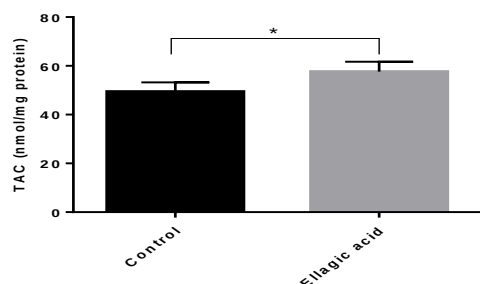
از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲٫۰ (IBM، آمریکا) برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk و برای بررسی همگن بودن واریانس‌ها از آزمون Levene استفاده شد. برای مقایسه میانگین دو گروه از آزمون t مستقل استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شدند. همچنین، مقادیر کم‌تر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

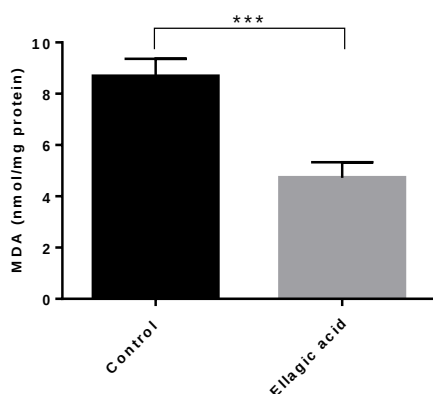
### اثر الازیک اسید بر بیان ژن های SIRT1 و AMPK در بافت قلب

بررسی بیان نسبی ژن SIRT1 در بافت قلب موش‌های پیر نشان داد که بیان این ژن در موش‌هایی که با الازیک اسید تیمار شدند افزایش یافته و ۲/۴ برابر بیان این ژن در گروه کنترل است ( $P < 0/05$ ) (نمودار شماره ۱). به طور مشابه، میزان بیان نسبی ژن AMPK در موش‌های تیمار شده با الازیک اسید نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد و ۲/۵ برابر بیان نسبی ژن AMPK در گروه کنترل بود ( $P < 0/05$ ) (نمودار شماره ۲).

میلی گرم پروتئین) که اختلاف آن بین دو گروه از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.001$ ).



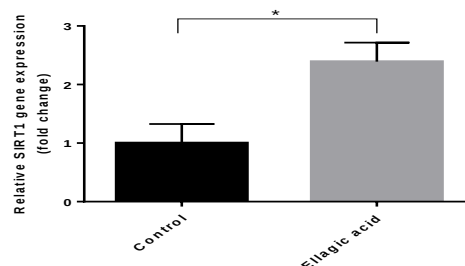
نمودار شماره ۳: میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (TAC) در گروه های کنترل و تحت تیمار با الازیک اسید (30 mg/kg)،\*:  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل (n=7)



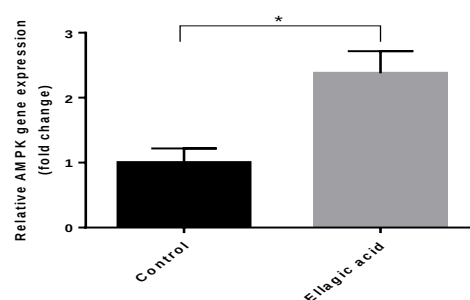
نمودار شماره ۴: میزان مالون دی آلدیید (MDA) در گروه های کنترل و تحت تیمار با الازیک اسید (30 mg/kg)،\*\*\*:  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل (n=7)

اثر الازیک اسید بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بافت قلب

فعالیت آنزیم SOD که یکی از اجزاء سیستم آنتی اکسیدانی است در بافت قلب موش های پیر اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که الازیک اسید می تواند فعالیت این آنزیم را در بافت قلب پیر به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل افزایش دهد (به ترتیب،  $101.1 \pm 13.0$  و  $62.4 \pm 7.8$  میلی یونیت بر میلی گرم پروتئین) ( $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۱: میزان بیان نسبی ژن SIRT1 در گروه های کنترل و تحت تیمار با الازیک اسید (30 mg/kg)،\*:  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل (n=7)



نمودار شماره ۲: میزان بیان نسبی ژن AMPK در گروه های کنترل و تحت تیمار با الازیک اسید (30 mg/kg)،\*:  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل (n=7)

اثر الازیک اسید بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در بافت قلب نمودار شماره ۳، نتایج مربوط به میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل را در بافت قلب موش های پیر نشان می دهد. مقدار این شاخص در موش های تیمار شده با الازیک اسید نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته است (به ترتیب،  $57.6 \pm 4.0$  و  $49.4 \pm 3.8$  نانومول بر میلی گرم پروتئین) ( $P < 0.05$ ).

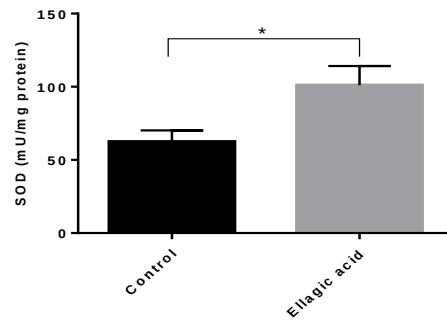
اثر الازیک اسید بر سطح مالون دی آلدیید در بافت قلب مقدار MDA که یک نوع شاخص پراکسیداسیون لیپیدها محسوب می شود در بافت قلب موش های پیر اندازه گیری شد. براساس نمودار شماره ۴، تیمار با الازیک اسید باعث کاهش سطح MDA نسبت به گروه کنترل شد (به ترتیب،  $4.7 \pm 0.6$  و  $8.7 \pm 0.7$  نانومول بر

بین تنظیم مسیرهای مولکولی مرتبط با متابولیسم سلولی و وضعیت آنتی اکسیدانی بافت قلب است.

## بحث

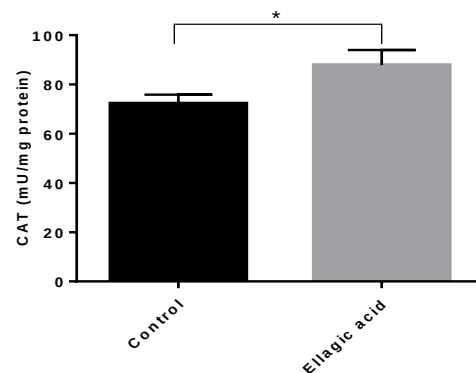
در مطالعه حاضر اثر الازلیک اسید بر بیان ژن های SIRT1 و AMPK و وضعیت آنتی اکسیدانی در قلب موش های پیر بررسی شد. نتایج نشان داد که الازلیک اسید باعث افزایش بیان این ژن ها و بهبود شاخص های آنتی اکسیدانی در بافت قلب می شود. این یافته ها نشان می دهند که اثرات محافظتی این ترکیب احتمالا از طریق تنظیم همزمان مسیرهای مرتبط با هموستاز انرژی و کاهش استرس اکسیداتیو سلولی اعمال می شود.

پیری یک فرایند زیستی پیچیده است که باعث کاهش عملکرد بدن می شود. اختلال در عملکرد اندام های مختلف عامل خطر ساز اصلی در بروز بیماری هایی مثل سرطان، دیابت، بیماری های قلبی عروقی و نورودژنراتیو می باشد. چندین مسیر مولکولی مرتبط با هم در بروز پیری نقش دارند که از جمله آن ها می توان به اختلال در کنترل هموستاز انرژی سلول و کاهش مقاومت در برابر استرس اشاره کرد. SIRT1 و AMPK تنظیم کنندگان اصلی تعادل انرژی سلولی و ردوکس محسوب می شوند که در فرایند پیری کاهش یافته و باعث اختلال در عملکرد میتوکندری و افزایش تولید ROS می شوند (۱۴). کاهش بیان و فعالیت SIRT1 در بافت هایی از جمله قلب و عروق خونی پیر گزارش شده که می تواند در کاهش انتقال پیام AMPK نقش داشته باشد (۷). به طور طبیعی، SIRT1 از طریق داسیتلاسیون و فعال کردن پروتئین کیناز LKB1 باعث فسفریلاسیون و فعال شدن AMPK می شود. در مقابل، فعال شدن AMPK باعث افزایش  $NAD^+$  سیتوزولی و فعال شدن SIRT1 می گردد (۱۵، ۱۶). مطالعات نشان می دهند که افزایش بیان SIRT1 و AMPK می تواند اثرات محافظتی از قلب و عروق داشته باشد. لذا، این پروتئین ها اهداف درمانی بیماری های قلبی عروقی مثل



نمودار شماره ۵: میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در گروه های کنترل و تحت تیمار با الازلیک اسید (30 mg/kg)، \*:  
P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل (n=۷)

اثر الازلیک اسید بر فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت قلب نمودار شماره ۶، فعالیت آنزیم CAT را در بافت قلب موش های پیر نشان می دهد. فعالیت این آنزیم در گروه تیمار شده با الازلیک اسید بیش تر از گروه کنترل بود (به ترتیب،  $87/8 \pm 6/2$  و  $72/2 \pm 3/6$  میلی یونیت بر میلی گرم پروتئین) و اختلاف بین دو گروه از نظر آماری معنی دار بود ( $P<۰/۰۵$ ).



نمودار شماره ۶: میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در گروه های کنترل و تحت تیمار با الازلیک اسید (30 mg/kg)، \*:  
P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل (n=۷)

در مجموع، تغییرات مشاهده شده در بیان ژن های SIRT1 و AMPK با بهبود شاخص های بیوشیمیایی استرس اکسیداتیو از جمله افزایش TAC، SOD و CAT و کاهش MDA همراه بود که نشان دهنده وجود یک ارتباط همسو

ایسکمی، نارسایی و میوپاتی قلبی محسوب می‌شوند (۷). در تحقیق Tian و همکاران نشان داده شد که فلاوونوئید Tilianin با فعال کردن مسیر AMPK/SIRT1/PGC1- $\alpha$  و بهبود عملکرد میتوکندری‌ها باعث کاهش آسیب بافت قلب پس از ایسکمی می‌شود (۱۷). در مطالعه دیگری، Gu و همکاران به بررسی اثر رزوراترول که فعال کننده مهم SIRT1 است پرداختند و نشان دادند که این ترکیب باعث افزایش فعالیت SIRT1 و AMPK در کاردیومیوسیت‌ها می‌شود. همچنین، بازیابی بیان این دو پروتئین باعث بهبود عملکرد قلب در موش‌های مبتلا به نارسایی قلبی می‌گردد (۱۸). از سوی دیگر، مطالعات نشان داده‌اند که نقص عملکرد میتوکندری و افزایش استرس اکسیداتیو در کاردیومیوسیت‌های پیر می‌تواند باعث کاهش سطح انرژی در این سلول‌ها و در نتیجه، ایجاد فیروز در میوکارد و نارسایی قلبی گردد. لذا، فعال کردن فاکتورهای متابولیکی مانند SIRT1 و AMPK می‌تواند در جلوگیری از نارسایی قلبی به علت پیری مفید باشد (۱۹). در مطالعه حاضر مشخص شد که تیمار با الازیک اسید باعث افزایش بیان SIRT1 و AMPK در بافت قلب موش‌های پیر می‌شود. با توجه به نقش SIRT1 و AMPK در تنظیم عملکرد میتوکندری، هموستاز انرژی و پاسخ‌های سلولی به استرس اکسیداتیو، افزایش بیان این دو ژن در مطالعه حاضر می‌تواند در بهبود وضعیت متابولیکی و کاهش استرس اکسیداتیو کاردیومیوسیت‌ها نقش داشته باشد. با این حال، برای تأیید دقیق این مکانیسم، انجام مطالعات تکمیلی ضروری است.

پیری قلب با تغییرات مولکولی، بیوشیمیایی، ساختاری و عملکردی مشخص می‌شود که در ایجاد آن‌ها، استرس اکسیداتیو نقش مهمی ایفا می‌کند. استرس اکسیداتیو به علت عدم تعادل بین تولید عوامل اکسیدکننده و دفاع آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌شود. قلب جوان دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمدی برای حذف عوامل اکسیدکننده است که در این سیستم، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل SOD، CAT و

گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) اهمیت دارند. با افزایش سن، عملکرد این سیستم ضعیف‌تر می‌شود و باعث تجمع عوامل اکسیدکننده در قلب و بروز آسیب‌های قلبی می‌گردد (۵). امروزه کاربرد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی برای محافظت از قلب در برابر استرس اکسیداتیو رو به افزایش است. این ترکیبات معمولاً دارای ساختارهای شیمیایی غنی از الکترون هستند و می‌توانند بر فعالیت آنزیم‌هایی مثل SOD، CAT و GPX تأثیر بگذارند. میزان سمیت بسیار کم ترکیبات طبیعی در کنار ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی، اهمیت بالینی آن‌ها را دو چندان کرده است (۲۰). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که الازیک اسید یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی طبیعی است و می‌تواند اثرات محافظتی از قلب در بیماری‌های مختلف داشته باشد. اخیراً، Wang و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی موش‌های دیابتی انجام دادند گزارش کردند که الازیک اسید می‌تواند مانع از هیپرتروفی قلب و آسیب‌های میوکارد شود. همچنین، این ترکیب باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و گلوتاتیون ردوکتاز و کاهش MDA در بافت قلب می‌گردد. نتایج این مطالعه نشان داد که تغییرات ایجاد شده با افزایش مقدار SIRT1 و کاهش آپوپتوز ارتباط دارد (۲۱). در مطالعه مشابهی، Altamimi و همکاران گزارش کردند که الازیک اسید با افزایش بیان SIRT1 و مهار استیلاسیون فاکتور Nuclear (Nrf2 factor erythroid 2-related factor) در قلب موش‌های دیابتی باعث افزایش فعالیت SOD و کاهش MDA و ROS می‌شود (۲۲). همچنین، در مطالعه دیگری مشخص شد که الازیک اسید می‌تواند آسیب بافتی ناشی از مسمومیت با آدرنالین را در قلب موش‌ها از طریق کاهش فاکتورهای التهابی و سطح استرس اکسیداتیو و افزایش TAC بهبود بخشد (۲۳). نکته قابل توجه آن است که مطالعات قبلی در مدل‌هایی از بیماری‌های مختلف انجام شده‌اند در حالی که، مطالعه حاضر در مدل پیری طبیعی صورت گرفت. با وجود این تفاوت، بهبود شاخص‌های استرس اکسیداتیو در تمامی این مطالعات

نشان می‌دهد الازیک اسید می‌تواند هم در شرایط پاتولوژیک و هم در فرایندهای فیزیولوژیک مرتبط با افزایش سن اثرات محافظتی داشته باشد. همچنین، تاکنون گزارشی در مورد بررسی همزمان اثر الازیک اسید بر بیان *SIRT1* و *AMPK* و سیستم آنتی‌اکسیدانی در بافت قلب پیر ارائه نشده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این ترکیب می‌تواند با افزایش فعالیت SOD و CAT و سطح TAC و کاهش MDA اثرات محافظتی از قلب پیر داشته باشد. ایجاد این تغییرات همزمان با افزایش بیان *SIRT1* و *AMPK* در بافت قلب، می‌تواند بیانگر مشارکت این ژن‌ها در تنظیم پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو باشد. در مطالعه قبلی نشان داده شد که الازیک اسید با افزایش سطح *SIRT1* و Nrf2 در بافت کلیه موش‌های پیر باعث کاهش سطح استرس اکسیداتیو و بهبود شاخص‌های عملکردی کلیه می‌شود (۱۲). همچنین، تیمار با الازیک اسید باعث افزایش بیان *SIRT1* و *AMPK* در کبد موش‌های پیر شد که مشابه نتایج اثر الازیک اسید بر بافت قلب پیر بود. این تغییرات در کبد پیر با کاهش تجمع چربی و در نتیجه، کاهش آسیب‌های کبدی ناشی از تجمع چربی ارتباط داشت (۱۳). افزایش همزمان بیان *SIRT1* و *AMPK* و بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت قلب پیر پس از تجویز الازیک اسید از نقش این ترکیب در تنظیم مسیرهای کنترل‌کننده انرژی سلولی وابسته به *SIRT1/AMPK* و حفظ تعادل ردوکس حمایت می‌کند. با این حال، برای تعیین مکانیسم مولکولی دقیق‌تر، انجام مطالعات تکمیلی ضروری است.

این مطالعه دارای محدودیت‌هایی بود که از جمله می‌توان به این موارد اشاره کرد که میزان *SIRT1* و *AMPK* تنها در سطح mRNA بررسی شد و اندازه‌گیری مقدار پروتئین آن‌ها برای دستیابی به نتیجه‌گیری دقیق‌تر انجام نشد. بررسی تغییرات پروتئین‌ها به روش وسترن بلات دارای اهمیت زیادی است زیرا می‌تواند ارتباط بین تغییرات بیان ژن و سطح پروتئین را تایید کند. همچنین، در این مطالعه تغییرات پس از ترجمه مانند فسفریلاسیون *AMPK* و فعالیت *SIRT1* که می‌توانست در مشخص کردن مکانیسم اثر الازیک اسید مفید باشد ارزیابی نشد. علاوه بر این، عملکرد قلب برای بررسی ارتباط بین تغییرات مولکولی و فیزیولوژیکی آن مورد مطالعه قرار نگرفت. بررسی این موارد در مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود.

به طور کلی، تیمار با الازیک اسید باعث افزایش بیان ژن‌های *SIRT1* و *AMPK* و تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو در قلب موش‌های پیر شد. این نتایج نشان می‌دهند که الازیک اسید می‌تواند دارای اثرات محافظتی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و اختلالات متابولیکی مرتبط با پیری در مدل حیوانی باشد. با این حال، برای درک دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی درگیر در این اثرات، انجام مطالعات تکمیلی ضروری است.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از تمام افرادی که در اجرای این مطالعه همکاری داشته‌اند سپاسگزاری می‌کنیم.

## References

- 1- Gude NA, Broughton KM, Firouzi F, Sussman MA. Cardiac ageing: extrinsic and intrinsic factors in cellular renewal and senescence. Nat Rev Cardiol 2018;15(9):523-542 PMID: 30054574.
- 2- Paneni F, Diaz Cañestro C, Libby P, Lüscher TF, Camici GG. The Aging Cardiovascular System: Understanding It at the Cellular and Clinical Levels. J Am Coll Cardiol 2017;69(15):1952-1967 PMID: 28408026.

- 3- Amorim JA, Coppotelli G, Rolo AP, Palmeira CM, Ross JM, Sinclair DA. Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol* 2022;18(4):243-258 PMID: 35145250.
- 4- Mapuskar KA, London B, Zacharias ZR, Houtman JCD, Allen BG. Immunometabolism in the Aging Heart. *J Am Heart Assoc* 2025;14(1):e039216 PMID: 39719411.
- 5- Pagan LU, Gomes MJ, Gatto M, Mota GAF, Okoshi K, Okoshi MP. The Role of Oxidative Stress in the Aging Heart. *Antioxidants (Basel)* 2022;11(2): PMID: 35204217.
- 6- Santos DF, Simão S, Nóbrega C, Bragança J, Castelo-Branco P, Araújo IM. Oxidative stress and aging: synergies for age related diseases. *FEBS Lett* 2024;598(17):2074-2091 PMID: 39112436.
- 7- Barcena ML, Aslam M, Norman K, Ott C, Ladilov Y. Role of AMPK and Sirtuins in Aging Heart: Basic and Translational Aspects. *Aging Dis* 2024;16(6):3335-3360 PMID: 39656491.
- 8- Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 2008;283(41):27628-27635 PMID: 18687677.
- 9- Chen S, Xu H, Li X, Tang X, Yang L, Lu J, et al. SIRT1-Mediated Mitochondrial Homeostasis in Cardiac Aging: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Aging Dis* 2025 PMID: 41135102.
- 10- Naraki K, Rameshrad M, Hosseinzadeh H. Protective effects and therapeutic applications of ellagic acid against natural and synthetic toxicants: A review article. *Iran J Basic Med Sci* 2022;25(12):1402-1415 PMID: 36544528.
- 11- Naraki K, Ghasemzadeh Rahbardar M, Ajiboye BO, Hosseinzadeh H. The effect of ellagic acid on the metabolic syndrome: A review article. *Heliyon* 2023;9(11):e21844 PMID: 38027887.
- 12- Naghibi N, Sadeghi A, Movahedinia S, Rahimi Naiini M, Rajizadeh MA, Bahri F, et al. Ellagic acid ameliorates aging-induced renal oxidative damage through upregulating SIRT1 and NRF2. *BMC Complement Med Ther* 2023;23(1):77 PMID: 36899375.
- 13- Rahimi Naiini M, Shahouzehi B, Khaksari M, Azizi S, Naghibi N, Nazari-Robati M. Ellagic acid reduces hepatic lipid contents through regulation of SIRT1 and AMPK in old rats. *Arch Physiol Biochem* 2024;130(6):686-693 PMID: 37814948.
- 14- Zhou Q, Yu L, Cook JR, Qiang L, Sun L. Deciphering the decline of metabolic elasticity in aging and obesity. *Cell Metab* 2023;35(9):1661-1671.e6. PMID: 37625407.
- 15- Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, et al. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298(4):E751-E760 PMID: 20103737.
- 16- Chen Q, Lesnefsky EJ. A new strategy to decrease cardiac injury in aged heart following ischaemia-reperfusion: enhancement of the interaction between AMPK and SIRT1. *Cardiovasc Res* 2018;114(6):771-772 PMID: 29596586.
- 17- Tian L, Cao W, Yue R, Yuan Y, Guo X, Qin D, et al. Pretreatment with Tilianin

- improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1  $\alpha$  signaling pathway. *J Pharmacol Sci* 2019;139(4):352-360 PMID: 30910451.
- 18- Gu XS, Wang ZB, Ye Z, Lei JP, Li L, Su DF, et al. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates AMPK and improves cardiac function in heart failure. *Genet Mol Res* 2014;13(1):323-335 PMID: 24535859.
- 19- Gao M, Finkel T. Metabolic Regulation of Cardiovascular Aging. *Curr Cardiol Rep* 2025;27(1):128 PMID: 40815457.
- 20- Rahmani S, Roohbakhsh A, Pourbarkhordar V, Karimi G. The Cardiovascular Protective Function of Natural Compounds Through AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  Signaling Pathway. *Food Sci Nutr* 2024;12(12):9998-10009 PMID: 39723061.
- 21- Wang Q, Zhang X, Xi L. Ellagic Acid Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy by Inhibiting Ferroptosis Through the Modulation of the SIRT1/p53 Pathway in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Iran J Pharm Res* 2025;24(1):e166600 PMID: 41477127.
- 22- Altamimi JZ, Alfari NA, Alshammari GM, Alagal RI, Aljabryn DH, Aldera H, et al. Ellagic acid protects against diabetic cardiomyopathy in rats by stimulating cardiac silent information regulator 1 signaling. *J Physiol Pharmacol* 2020;71(6) PMID: 33901999.
- 23- Aldayel TS, Haleka SAA, Ebaid HM, El-Fadeal NMA, Abdelrazek HM, Gad El-Hak HN, et al. Ellagic acid mediates cardioprotection against adrenaline-induced toxicity via PI3K/AKT and Keap1-NRF2 axes. *Sci Rep* 2025;15(1):36489 PMID: 41115931.