

## *Changes of PEPCK Gene Expression in Liver Tissue and HOMA-IR after High-Intensity Interval Training and Royal Jelly Consumption in Rats with Type 2 Diabetes*

Mohammad Reza Yeylaghi Ashrafi<sup>1</sup>,  
Hossein Abednatanzi<sup>2</sup>,  
Farshad Ghazalian<sup>2</sup>

<sup>1</sup> PhD Student in Sports Physiology, Faculty of Literature, Humanity and Social Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Physical Education, Faculty of Literature, Humanity and Social Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received November 24, 2020 ; Accepted January 19, 2021)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Type 2 diabetes is the most common endocrine disease due to glucose intolerance and imbalance between reserves and insulin demand. The aim of this study was to investigate the interactive effect of intensity interval training and n-chromosomal royal jelly on PEPCK gene expression of hepatocytes and glucose levels and insulin resistance in type 2 diabetic rats.

**Materials and methods:** This experimental study was done in 36 Wistar rats (4-6 weeks, 100±20 g). After 20 weeks of high-fat diet, diabetes was induced by intraperitoneal injection of 25 mg STZ per kg body weight. The rats were treated in four groups: control (n=8), training (n=10), royal jelly (n=8), and training-Royal Jelly (n=10). Training protocol continued for eight weeks, including High-intensity interval training (HIIT) for five sessions per week with 2-minute alternation of 2 and 8 interval at 80 to 90% vo<sub>2</sub>max and a one-minute rest cycle at 50 to 56% vo<sub>2</sub>max.

**Results:** Compared to the control group, aerobic exercise led to significant reductions in glucose level and insulin resistance (both P<0.001). Exercise and royal jelly also resulted in increased PEPCK expression in hepatocytes compared to the controls.

**Conclusion:** Improvement of glycemc profile in response to HIIT and royal jelly in diabetic rats can be attributed to changes in glucose and insulin levels and as well as changes in the expression of PEPCK hepatic gluconeogenic gene.

**Keywords:** High-intensity interval training, type 2 diabetes, insulin, royal jelly, PEPCK gene

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (196): 111-124 (Persian).

\* Corresponding Author: Hossein Abednatanzi - Faculty of Literature, Humanity and Social Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (E-mail: abednazar@gmail.com)

## تغییرات بیان ژن PEPCK بافت کبد و HOMA-IR پس از تمرین تناوبی و مصرف ژل رویال در رت های دیابتی نوع دو

محمد رضا بیلاقی اشرفی<sup>1</sup>

حسین عابد نطنزی<sup>2</sup>

فرشاد غزالیان<sup>2</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** دیابت نوع دو شایع ترین بیماری درون ریز است که به دلیل عدم تحمل گلوکز در اثر برهم خوردن تعادل بین ذخایر و تقاضای انسولین رخ می دهد. هدف پژوهش حاضر، مطالعه تغییرات بیان ژن PEPCK بافت کبد و شاخص مقاومت به انسولین پس از انجام تمرین تناوبی و مصرف ژل رویال در رت های دیابتی نوع دو بود.

**مواد و روش ها:** جامعه آماری پژوهش تجربی حاضر را 36 موش صحرایی نر ویستار 4 تا 6 هفته ای با وزن  $100 \pm 20$  گرم تشکیل می داد که پس از 20 هفته تغذیه با رژیم پرچرب و با تزریق درون صفاقی 25 میلی گرم STZ به ازای کیلوگرم وزن رت ها دیابتی شدند. رت های دیابتی در 4 گروه کنترل (8 سر)، تمرین تناوبی (10 سر)، ژل رویال (8 سر)، تمرین تناوبی-ژل رویال (10 سر) گروه بندی و پروتکل تمرینی و گاوژ ژل رویال روی آن ها اجرا شد. هشت هفته تمرین هوازی، 5 جلسه در هفته با تناوب شدید 2 دقیقه ای با 2 تا 8 تناوب با 80 تا 90 درصد  $vo_2$  max و تناوب استراحت یک دقیقه ای با 50 تا 56 درصد  $vo_2$  max اجرا شد.

**یافته ها:** در مقایسه با گروه کنترل، تمرین تناوبی شدید به کاهش معنی دار گلوکز و شاخص مقاومت به انسولین منجر شد ( $P < 0/001$ ). تمرین تناوبی و ژل رویال همچنین به افزایش بیان PEPCK در سلول های کبدی در مقایسه با گروه کنترل منجر شد. **استنتاج:** تمرینات تناوبی و ژل رویال در رت های دیابتی منجر به بهبود نیمرخ گلیسیمیک و تغییرات سطوح گلوکز و انسولین و نیز تغییر در بیان ژن PEPCK کبدی نسبت شد.

**واژه های کلیدی:** تمرین تناوبی، دیابت نوع دو، انسولین، ژل رویال، ژن PEPCK

### مقدمه

می شود و با افزایش گلوکز خون، اختلال در متابولیسم کربوهیدرات و لیپید همراه می باشد (1). کاهش تولید انسولین مهم ترین مشخصه بیماری دیابت می باشد. انسولین با اثر تحریکی بر آنزیم کلیدی مسیر گلیکولیز، یعنی گلوکو کیناز و مکانیسم کنترل منفی بر مسیر

دیابت نوع دو شایع ترین بیماری درون ریز است که به دلیل عدم تحمل گلوکز در اثر برهم خوردن تعادل بین ذخایر و تقاضای انسولین رخ می دهد. این بیماری متابولیکی با هیپر گلیسمی ناشی از نقصان ترشح انسولین، مقاومت به انسولین و یا ترکیبی از هر دو مشخص

**مؤلف مسئول:** حسن عابد نطنزی - تهران: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده ادبیات، علوم انسانی و اجتماعی E-mail: abednazari@gmail.com

1. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات، علوم انسانی و اجتماعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

2. استادیار، گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات، علوم انسانی و اجتماعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1399/9/4 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/9/11 تاریخ تصویب: 1399/10/30

کم و مدت زمان تمرینی کمتر از 20 دقیقه انجام می‌گیرد، با به کارگیری و درگیر کردن بهتر و بیش تر تارهای عضلانی و فراخوانی قوی تر ارگان‌های سوخت‌وسازی و متابولیسمی می‌تواند از طریق سازوکار سلولی مولکولی، متابولیسم کل بدن را در جهت مثبت تحت تأثیر قرار دهد (11) که با فعال کردن متابولیسم عضلانی بسیاری از مسیرهای مربوط به متابولیسم چربی و جذب گلوکز خون را افزایش و باعث بالا رفتن هرچه بهتر متابولیسم می‌شود (12). لذا در این مطالعه در نظر است یک پروتکل تمرینی تناوبی هوازی شدید بر درمان دیابت نوع دو گزارش گردد. از طرفی در طب سنتی برای پیشگیری و درمان بیماری‌های متابولیک از جمله دیابت و کبد چرب از داروهای گیاهی و سنتی استفاده می‌شود (13). در این مورد مطالعات نشان داده، عسل آویشن با توجه به خواصی که دارد، در تنظیم قند خون به‌عنوان یک گیاه ضد دیابت نقش مهمی ایفا می‌کند. پژوهش‌ها درباره عسل حاکی از این است که عسل اثرات ضد دیابتی را در مدل‌های حیوانی گرفته تا آزمایش‌ها بالینی نشان داده است و محققان از آن به‌عنوان یک عامل ضد دیابتی بالقوه استفاده کرده‌اند (14، 15).

ژل رویال (Royal Jelly) ماده سفید مایل به زرد است که توسط غدد تحت‌فکی زنبورهای کارگر ترشح و توسط زنبور ملکه در تمام عمر و لاروها در طول دوره رشد مصرف می‌شود. ژل رویال حاوی آب 50 تا 60 درصد، پروتئین 18 درصد، کربوهیدرات‌ها 15 درصد، لیپیدها 3 تا 6 درصد، نمک‌های معدنی 1/5 درصد و ویتامین‌ها شامل ویتامین A، D، E، C، ویتامین‌های گروه B و نیاسین همراه با ترکیبات زیستی نادر نظیر 10 هیدروکسیل 2 دکانوئیک اسید (نوعی آنتی‌بیوتیک) و ترکیبات فنلی فراوان از گروه فلاونوئیدها است (19-16). ژل رویال حاوی ترکیبات فعال مختلفی (مانند 10HDA، AMP N1-oxide و RJP) است که نشان داده شده دارای خواص درمانی قابل توجهی برای بیماری‌های مختلف است. همچنین نقش مهمی در محافظت از کبد و کلیه،

گلوکونوژنز و آنزیم کلیدی آن فسفوانول پیروات کربوکی کیناز، باعث افزایش گلیکولیز و مهار گلوکونوژنز در بافت‌ها و کاهش قندخون می‌شود (2، 3).

تاکنون بیش از 1200 گونه گیاهی در 725 جنس و 183 خانواده شناخته شده‌اند که دارای فعالیت ضد دیابتی هستند که بیش از نیمی از آن‌ها به‌طور مرسوم به‌عنوان ضد دیابت مصرف شده‌اند و در حدود 50 درصد نیز از طریق آزمایشگاهی مطالعه شده‌اند (2، 3).

در مسیر گلیکولیز آنزیم گلوکوکیناز و در مسیر گلوکونوژنز، آنزیم فسفوانول پیروات کربوکی کیناز نقش کلیدی دارند و کاهش یا افزایش فعالیت آن‌ها تأثیر چشمگیری بر تنظیم گلوکز خون دارد (4، 5). همچنین کدگذاری ژنتیکی این پروتئین‌ها به شدت توسط رونویسی برخی هورمون‌های کلیدی به ویژه انسولین، گلوکاکاگون، آدرنالین (اپی‌نفرین) و گلوکوکورتیکوئیدها کنترل می‌شود (6).

آنزیم فسفوانول پیروات کربوکی کیناز (PEPCK) آنزیم محدودکننده فرآیند تولید گلوکز کبدی یا به عبارتی گلوکونوژنز کبدی است که بیان آن توسط انسولین مهار می‌شود. از طرفی بیان این آنزیم در بیماران دیابتی نوع 2 افزایش می‌یابد که به‌نوعی ریشه در مقاومت انسولین کبدی دارد (7). علاوه بر این، PEPCK توانایی تولید گلوکز اندوژن را در بافت کبد فراهم می‌کند (8). با این وجود، تعیین ارتباط بین بیان این آنزیم با دیابت و نیمرخ قندی در انسان همواره بحث‌برانگیز بوده است. نقش فعالیت ورزشی منظم در بهبود حساسیت به انسولین و دیابت نوع 2 به خوبی مشخص شده است (9). ورزش یکی از عوامل مهم اصلی کنترل قند خون است و همچنین از ابزارهای درمانی کارآمد در افراد مبتلابه دیابت به‌شمار می‌آید (10). با توجه به نقش انجام تمرینات و فعالیت‌های ورزشی در پیشگیری و کنترل چاقی و دیابت، اتخاذ شیوه‌های مختلف تمرینی در جامعه ضرورت پیدا می‌کند. تمرینات تناوبی شدید که معمولاً با شدت‌های بالاتر از 90 درصد حداکثر ضربان قلب و دوره استراحت‌های

محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن میانگین  $170 \pm 30$  گرم تحت رژیم پرچرب قرار گرفتند.

پس از 20 هفته (5 ماه) تغذیه با رژیم پرچرب و دسترسی آزاد به مواد غذایی و آب، به 4 گروه کنترل دیابتی (8 سر)، تمرین تناوبی (10 سر)، ژل رویال (8 سر) و تمرین تناوبی و ژل رویال (10 سر) تقسیم شدند که در پایان پروتکل 29 سر در 4 گروه کنترل دیابتی (6 سر)، تمرین تناوبی (8 سر)، ژل رویال (7 سر)، تمرین تناوبی و ژل رویال (8 سر) باقی ماندند.

برای نگهداری رت‌های صحرایی از قفس‌های جنس پلی‌کربنات شفاف با قابلیت اتوکلاو استفاده شد. دمای مطلوب محل نگهداری حیوانات 20 تا 24 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود 55 تا 65 درصد بود. چرخه روشنایی نیز هر 12 ساعت یکبار به طور دقیق توسط تنظیم‌کننده الکترونیکی نور سالن نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. جهت تغذیه رت‌های صحرایی از رژیم پرچرب استاندارد استفاده شد. دسترسی رت‌های صحرایی به غذا به صورت نامحدود بود و آب در بطری‌های 500 میلی‌لیتری در تمامی قفس‌ها وجود داشت.

پس از آشنا سازی و سازگاری با محیط جدید، تمامی رت‌ها به مدت 20 هفته (5 ماه) تحت رژیم غذایی پرچرب تهیه شده توسط پژوهشکده زیست‌فناوری رویان قرار گرفتند که شامل 45 درصد انرژی کل از چربی مشتق شده از روغن حیوانی حاوی 24 گرم چربی، 24 گرم پروتئین و 41 گرم کربوهیدرات در هر 100 گرم می‌باشد. رژیم پرچرب 45 درصد به مدت 3 ماه و رژیم پرچرب 60 درصد به مدت 2 ماه داده شد (24، 25).

روش دیابتی کردن رت‌ها از طریق تزریق استرپتوزتوسین (STZ):

برای القای دیابت از رژیم غذایی پرچرب به مدت 20 هفته و سپس تزریق محلول تازه تهیه شده از STZ در سرم فیزیولوژیکی قابل تزریق و به صورت داخل صفاقی

بهبود زخم و سیستم تناسلی دارد و در بیماران دیابتی، اثرات کاهش روی قندخون و کاهش سطح پراکسیداسیون لیپید و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند CAT، GSH-PX و SOD را نشان داد (16). ژل رویال به طور عمده از ترکیبات مهم با فعالیت‌های بیولوژیکی و تقویت‌کننده سلامتی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، قندها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و اسیدهای آمینه آزاد تشکیل شده است (19) و حاوی ویتامین‌هایی مانند ریوفلاوین، تیامین، نیاسین، اسید فولیک، بیوتین و پیریدوکسین و مقادیر کم‌تری از ویتامین‌های A، D، C و E (20) و علاوه بر این، کلسیم، سدیم، پتاسیم، مس، آهن، روی و منگنز مواد معدنی اصلی RJ هستند (21). در یک مطالعه روی رت‌ها، مکمل‌یاری دوزهای مختلف ژل رویال (10، 30 و 300 میلی‌گرم بر کیلوگرم) به کاهش فشارخون سیستولیک و سطح انسولین سرم و شاخص مقاومت به انسولین منجر شد. اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریایی، ضدالتهابی و محافظت‌کننده عصبی ژل رویال نیز به اثبات رسیده است (22، 23). لذا این مقاله در نظر دارد اثر تعاملی تمرین هوازی تناوبی و مصرف ژل رویال n کروموزومی را بر عوامل تنظیمی گلوکز و بیان ژن گلوکوکورتونیک PEPCK بافت کبد با هم گزارش کند تا شاید بتوان از اثربخشی ژل رویال در کنار طراحی برنامه ورزشی تناوبی متناسب با رژیم غذایی برای دیابتی‌ها استفاده کرد. امید است نتایج حاصل از این پژوهش در علوم پزشکی و ورزشی پس از مطالعات انسانی مشابه به‌عنوان راهی نجات‌بخش در بهبود عوارض ناشی از دیابت مانند قلب دیابتی و آسیب‌های کبدی مورد استفاده قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

جامعه آماری: پژوهش حاضر را رت‌های صحرایی نر تشکیل می‌دهند و نمونه‌های پژوهش 36 سر رت نر نژاد ویستار جوان با دامنه سنی 35 تا 45 روز و میانگینی وزنی  $110 \pm 10$  گرم بودند. پس از دو هفته آشنایی با

سرد نگهداری شده و هنگام گاوآژ طبق دوز لازم با توجه به پروتکل رفرنس ها در آب مقطر حل و گاوآژ شد.

روش انجام تمرین ورزشی تناوبی شدیدی:

برنامه هشت هفته تمرین هوازی، پنج جلسه در هفته با افزایش تدریجی تناوب شدید از سرعت 22 الی 38 متر بر دقیقه (80 تا 90 درصد  $Vo_{2max}$ ) و تناوب استراحت با سرعت 16 تا 22 متر در دقیقه (50 تا 56 درصد  $vo_{2max}$ ) زمان 15 الی 34 دقیقه به صورت دویدن روی تردمیل انجام شد، گروه کنترل نیز در طول اجرای پروتکل به همین ترتیب روی تردمیل راه رفتند. برای تعیین سرعت حداکثر از پروتکل رودریگرز و همکاران (2007) استفاده شد. به این ترتیب که هر دو هفته یکبار رت ها در یک وهله تمرینی پس از 5 دقیقه گرم کردن با سرعت 10 متر در دقیقه سپس با سرعت 15 متر در دقیقه به مدت 2 دقیقه شروع به دویدن کردند و هر 3 دقیقه، 3 متر در دقیقه به سرعت افزوده شد تا اینکه هر کدام از رت ها که به واماندگی رسیدند، آن سرعت به عنوان سرعت حداکثر آنان در نظر گرفته می شد و سرعت حداکثر برای شدت تمرین بین 80 تا 95 درصد MERT در نظر گرفته شد (33-31) (جدول شماره 1).

نمونه گیری:

با خاتمه دوره تمرینی و 48 ساعت پس از آخرین جلسه تمرین گروه های تجربی تمرینی و پس از 12 ساعت ناشتایی رت ها توسط ماده بی هوشی اتر بی هوش و قربانی شدند. نمونه های خون از طریق خون گیری از قلب جمع آوری شد و در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری شد. گلوکز با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر و

(25 میلی گرم/کیلوگرم) استفاده شد. در این مطالعه سعی شد با رژیم پرچرب و حداقل دوز STZ استفاده شود تا سلول های پانکراس کم تر تخریب شوند و دیابت نوع 2 ایجاد شود. یک هفته پس از تزریق، گلوکز خون ناشتایی با ایجاد جراحت کوچک در دم رت ها یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتر قرار گرفته و توسط دستگاه گلوکومتر نوار خوانده شد و اندازه گیری گردید و قند خون بین 150 تا 400 میلی گرم/دسی لیتر به عنوان معیاری برای اطمینان از ابتلای رت ها به دیابت در نظر گرفته شد. برای اطمینان بیش تر از دیابتی شدن رت ها و دقت کار از 10 سر رت به طور تصادفی خون گیری از دم به عمل آمد و گلوکز و انسولین و شاخص مقاومت به انسولین آن ها اندازه گیری شد که اطلاعات آن در جداول یافته ها آمده است (28-26).

روش تهیه و مصرف ژل رویال n کروموزومی:

ژل رویال (Royal Jelly) ماده سفید مایل به زرد است که توسط غدد تحت فکی زنبورهای کارگر ترشح و توسط زنبور ملکه در تمام عمر و لاروها در طول دوره رشد مصرف می شود. ژل رویال n کروموزومی از کندوی زنبور عسل در طالقان و با روش خاص تهیه شد. در طی دوره آزمایش به رت های گروه ژل رویال و گروه ژل رویال و تمرین تناوبی، ژل رویال با دوز 100 میلی گرم بر کیلوگرم (100mg/kg) رقیق شده در آب مقطر و به روش گاوآژ خورانده شد (29,30). ژل رویال نیز حاوی مقادیر فراوانی ترکیبات فنلی از خانواده فلاونوئیدها است که از مهم ترین آن ها می توان کوئرستین، کامفرول، آپیزین و لوتئولین را نام برد. ژل رویال آنالیز شده و در دمای منفی 20 درجه سانتی گراد و به صورت

جدول شماره 1: پروتکل تمرین تناوبی

هفته	شدت گرم کردن 5 دقیقه	تعداد تناوب شدید	زمان تناوب شدید	سرعت تناوب شدید	زمان تناوب استراحت	شدت تناوب استراحت	شدت سرد کردن 5 دقیقه	زمان کل (دقیقه)
اول و دوم	10 متر در دقیقه	2 تناوب	2 دقیقه	80% سرعت پیشینه (30 متر در دقیقه)	1 دقیقه	50% (16 متر در دقیقه)	10 متر در دقیقه	16
سوم و چهارم	10	4 تناوب	2 دقیقه	85% (32 متر در دقیقه)	1 دقیقه	52% (18 متر در دقیقه)	10	22
پنجم و ششم	10	6 تناوب	2 دقیقه	90% (34 متر در دقیقه)	1 دقیقه	54% (20 متر در دقیقه)	10	28
هفتم و هشتم	10	8 تناوب	2 دقیقه	95% (36 متر در دقیقه)	1 دقیقه	56% (22 متر در دقیقه)	10	34

آزمون لوین برای تجانس واریانس‌ها و از آمار استنباطی تحلیل واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی بن فرونی جهت مقایسه تفاوت بین گروه‌ها و از آزمون تحلیل واریانس دو عاملی و شاخص تعیین اندازه اثر جهت مقایسه میزان تاثیر هر یک از متغیرهای مستقل استفاده گردید. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS22 انجام شد. سطح معنی داری  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

میانگین وزن رت‌های مورد مطالعه در جدول شماره 3 ارائه شده است.

در جدول شماره 3 نیز میانگین وزن رت‌ها (گرم) قبل و پس از رژیم پرچرب را نشان می‌دهد. جدول شماره 4 نشان می‌دهد وزن بعد از اعمال رژیم پرچرب افزایش قابل مشاهده داشته است. اطلاعات توصیفی گلوکز و انسولین و شاخص مقاومت انسولین رت‌ها که پس از خون‌گیری از دم اندازه‌گیری شده نیز در جدول شماره 3 مشاهده می‌شود که حاکی از دیابتی شدن رت‌ها هست. جدول شماره 4 هم اطلاعات توصیفی متغیرها را نشان می‌دهد.

### تحلیل استنباطی یافته‌ها:

جدول شماره 5 نتایج تحلیل واریانس دو عاملی و تعقیبی بنفرونی و نیز اندازه اثر گروه‌ها را نشان می‌دهد.

### یافته‌های بیان ژن:

نمودار شماره 1، منحنی تکثیر PEPCK در نمونه‌های دیابتی کنترل و تجربی (ژل رویال و تمرین تناوبی) را نشان می‌دهد.

انسولین توسط کیت مخصوص شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شدند. شاخص مقاومت به انسولین (HOMA-IR) با استفاده از فرمول محاسبه شد (22).

405 / (گلوکز (mg/dl) × انسولین (μU/ml) = مقاومت به انسولین (HOMA-IR)

### روش بیان ژن PEPCK بافت کبد:

بافت کبد نیز به منظور اندازه‌گیری بیان ژن جدا و بلافاصله توسط ازت مایع به فریزر منفی 80 درجه سانتی‌گراد منتقل شد. مقداری از بافت کبد برای انجام مراحل ریل تایم درون RNA later قرار داده شد و سپس در فریزر منفی 20 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد RNA با استفاده از کیت RiboEx Total RNA isolation solution (GeneAII) استخراج شد و در نهایت بررسی کمی و کیفی آن با استفاده از دستگاه نانودارپ و ژل آگارز یک درصد انجام شد. پس از اطمینان از خلوص و کیفیت RNA استخراج شده، با cDNA با استفاده از کیت FIRE Script RT cDNA Synthesis (Solis BioDyne) ساخته شد و به فریزر منفی 20 درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. سپس برای بررسی ژن PEPCK، پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش توسط نرم‌افزار Primer3 طراحی شد و توسط شرکت بیوتکنولوژی پیشگام سنتر گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره 2 آورده شده است.

### روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS22 تجزیه و تحلیل شدند. برای توصیف داده‌ها از آمار توصیفی (میانگین و انحراف استاندارد) استفاده شد. آزمون شاپیرو ویلک جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها و

جدول شماره 2: پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

Gene Bank	T m	Product size	Primer sequence	ژن
NM_001191052.1	60	159 bp	For: TGCCCCAGGAAGTGAGGAAG Rev: CAGTGAGAGCCAGCCAACAG	PEPCK
XM_008759265.1	60	164 bp	For: ACTTTGATGACGTGGAGGAGGAC Rev: GTTGGCCTGCGGTCGTTTC	RNA PolymeraseII

جدول شماره 3: اطلاعات توصیفی اولیه وزن و گلوکز و مقاومت به انسولین رت‌های صحرائی پس از رژیم پرچرب HFD و القای دیابت با STZ برای تشخیص دیابت نوع دوم

وزن شروع پروتکل (گرم)	وزن پس از جانی	گلوکز (mg/dl)	انسولین ( $\mu$ UI/ml)	HOMA-IR
193/34 $\pm$ 19/46	409/03 $\pm$ 51/69	363 $\pm$ 124/5	3/92 $\pm$ 0/49	3/56 $\pm$ 1/43

جدول شماره 4: توصیف وزن و گلوکز، انسولین و شاخص مقاومت به انسولین و بیان ژن PEPCK کبدی رت‌های صحرائی در گروه‌های مختلف

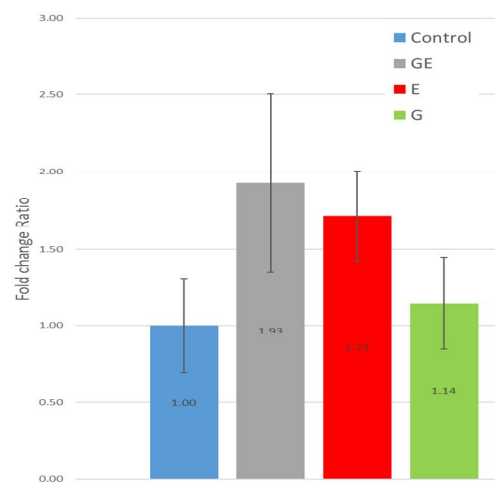
متغیر / گروه	کنترل (6 سر)	تمرین تناوبی (8 سر)	ژل رویال (7 سر)	تمرین ژل رویال (8 سر)
وزن پس از رژیم پرچرب	386/66 $\pm$ 48/42	407/37 $\pm$ 64/64	417/42 $\pm$ 33/69	420/12 $\pm$ 56/05
وزن پس از هشت هفته	317 $\pm$ 71/3	373/12 $\pm$ 54/28	344/57 $\pm$ 35/17	334/25 $\pm$ 32/27
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	333/83 $\pm$ 39/39	40/04 $\pm$ 138/25	131/57 $\pm$ 15/74	134/00 $\pm$ 14/87
انسولین ( $\mu$ UI/ml)	3/89 $\pm$ 0/53	6/22 $\pm$ 1/35	7/36 $\pm$ 2/87	5/12 $\pm$ 0/89
HOMA-IR	3/18 $\pm$ 0/33	2/04 $\pm$ 0/35	2/31 $\pm$ 0/68	1/69 $\pm$ 0/36
PEPCK.gen.Fold.cheng	1/13 $\pm$ 0/55	1/93 $\pm$ 1/08	1/29 $\pm$ 0/81	2/17 $\pm$ 1/64

با توجه به جداول شماره 4 و 5 و نمودار شماره 1 نتایج زیر به دست آمد:

میانگین وزن (گرم) در گروه‌های تجربی تمرین (373/12) ژل رویال (344/5) و تمرین-ژل رویال (334/25) نسبت به کنترل (317) افزایش غیر معنی‌دار داشت. میانگین غلظت گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) در گروه تمرین (138/25) نسبت به کنترل (333/83) کاهش معنی‌دار داشت و در گروه تمرین-ژل رویال (134) نسبت به گروه ژل رویال (131/57) تفاوت معنی‌داری نداشت و در گروه تمرین ژل رویال نسبت به کنترل کاهش معنی‌دار داشت. میانگین غلظت انسولین ( $\mu$ UI/ml) در گروه تمرین (6/22) نسبت به کنترل (3/89) افزایش معنی‌دار داشت و در گروه تمرین-ژل رویال (5/12) نسبت به گروه ژل رویال (7/36) تفاوت معنی‌داری نداشت اما گروه ژل رویال نسبت به کنترل افزایش معنی‌دار داشت. در گروه تمرین ژل رویال نسبت به کنترل افزایش غیر معنی‌دار داشت. میانگین شاخص مقاومت به انسولین (HOMA) در گروه تمرین (2/04) نسبت به گروه کنترل (3/18) و ژل رویال (2/31) کاهش معنی‌دار داشت. میانگین نسبت بیان ژن PEPCK در گروه تمرین تناوبی (1/93) و گروه ژل رویال (1/29) و در گروه تمرین-ژل رویال (2/17) بود که نسبت به کنترل (1/13) افزایش بیان غیر معنی‌دار داشت.

جدول شماره 5: تحلیل واریانس دو عاملی و تعقیبی بنفرونی و نیز اندازه اثر گروه‌ها

متغیر شاخص آماری	گروه	گروه	F	Sig.	اندازه اثر
وزن (گرم)	کنترل	تمرین	0/943	0/341	0/036
	ژل رویال		0/334	0/569	0/013
	تمرین-ژل رویال		4/29	0/049	0/147
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	کنترل	تمرین	75/70	0/0001	0/752
	ژل رویال		86/53	0/0001	0/776
	تمرین-ژل رویال		79/55	0/0001	0/761
انسولین (میکرو واحد بر میلی‌لیتر)	کنترل	تمرین	0/005	0/0946	0/000
	ژل رویال		3/62	0/069	0/127
	تمرین-ژل رویال		13/45	0/001	0/350
شاخص مقاومت به انسولین	کنترل	تمرین	26/23	0/012	0/0001
	ژل رویال		12/78	0/167	0/001
	تمرین-ژل رویال		2/26	0/394	0/145
بیان ژن PEPCK (Fold Cheng)	کنترل	تمرین تناوبی	3/74	0/065	0/140
	ژل رویال		0/21	0/64	0/057
	تمرین-ژل رویال		0/008	0/92	0/000



نمودار شماره 1: منحنی تکثیر PEPCK در نمونه‌های دیابتی کنترل و تجربی

## بحث

در پژوهش حاضر اثر 8 هفته تمرین تناوبی شدید و ژل رویال بر بیان ژن PEPCK کبدی و نیز سطوح گلوکز و مقاومت به انسولین رت‌های دیابتی نوع دو مطالعه شد. فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز (PEPCK) یکی از آنزیم‌های کلیدی در گیر در گلوکونئوزنز هست. بیان ژن PEPCK با انسولین و گلوکاگون کنترل می‌شود.  $PGC-1\alpha$  می‌تواند به سرعت باعث افزایش رونویسی چندین فاکتور رونویسی، از قبیل فاکتور  $4\alpha$  هسته هپاتوسیت (HNF-4 $\alpha$ ) و FOXO شود، به این ترتیب رونویسی آنزیم‌های گلوکونئوزنی نظیر فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز (PEPCK) را کنترل می‌کند. با این حال پس از وعده غذایی، سلول‌های بتای پانکراس، انسولین تولید و ترشح می‌کنند که به گیرنده‌اش متصل می‌شود و باعث فسفریلاسیون AKT می‌شود که به نوبه خود  $PGC-1\alpha$  را فسفریله کرده و فعالیت آن را مهار می‌کند. این کار باعث تحریک سنتز گلیکوژن و مهار گلوکونئوزنز می‌شود (34، 35).

فعال‌سازی کامل رونویسی پروموتور PEPCK نیاز به فعال‌سازی هم‌زمان HNF-4 $\alpha$  توسط  $PGC-1\alpha$  دارد. مطالعات نشان داده است که روش‌های مختلف تمرینی، تأثیر مثبتی بر حساسیت به انسولین، کنترل گلیسمی و سایر عوامل خطر مرتبط با دیابت نوع 2 دارد. در رابطه به مکانیزم‌های سلولی مولکولی برای افزایش برداشت گلوکز توسط انسولین با تمرین ورزشی می‌توان گفت ممکن است این کار تا حدودی به افزایش بیان و فعالیت پروتئین‌های کلیدی شناخته شده برای تنظیم متابولیسم گلوکز در عضلات و کبد مرتبط باشد (34، 36-38). تمرین ورزشی می‌تواند از طریق کاهش  $PGC-1\alpha$  و متعاقباً کاهش گلوکونئوزنز به واسطه کاهش بیان PEPCK باعث بهبود گلیسمی شود. همچنین تحقیقات قبلی نشانگر این مسئله است که در تمرینات هوازی با شدت متوسط، برداشت گلوکز محیطی بیش از گلوکز تولیدی کبد است این مسئله

منجر به کاهش گلوکز خون می‌شود (34، 39). بنابراین، برنامه ورزشی مناسب برای حفظ محیط متابولیک برنامه‌ای است که می‌تواند از طریق تمرین منظم حاصل شود (34، 40، 41). اگرچه مطالعات در این زمینه بر روی مسیرهای درگیر در رهایی گلوکز کبدی کم‌تر انجام گرفته است، اما یافته‌های مطالعه حاضر آشکار نمود که بیان ژن‌های درگیر در فرآیند گلوکونئوزنز کبدی از تمرینات ورزشی تأثیر می‌پذیرد. به طوری که 8 هفته تمرین تناوبی به تنهایی و در تعامل با مصرف ژل رویال n کروموزومی به افزایش غیر معنی‌دار بیان PEPCK در سلول‌های کبدی رت‌های دیابتی نوع 2 نسبت به گروه کنترل که در برنامه تمرینی شرکت نداشته‌اند، منجر شد که این تمایل به افزایش بیان را می‌توان به شدت تمرینات و افزایش نیاز به گلوکز نسبت داد ولی تاکنون مطالعات بسیار محدودی در این رابطه انجام شده است و نیاز به مطالعات بیش‌تر در شدت‌های متفاوت تمرین کماکان وجود دارد. در مطالعه Chang و همکاران (2006) و Marinho و همکاران (2012) نیز با استناد به یافته‌های خود نشان دادند که تمرینات ورزشی استقامتی طولانی مدت مستقل از کاهش وزن موجب بهبود مسیرهای سیگنالینگ انسولین در بافت کبد می‌شود. همچنین اثرات سودمند ورزش بر روی عملکرد انسولین به همراه کاهش بیان ژن‌های گلوکونئوزنیک مشخص گردید، به طوری که تمرینات استقامتی طولانی مدت به کاهش بیان ژن‌های گلوکونئوزنیک منجر شد. علاوه بر این تعادل و بهبود در سطوح پروتئین و بیان ژن‌های درگیر در مسیر گلوکونئوزنز کبدی، جدا از مقاومت یا حساسیت انسولین در بافت‌های هدف نظیر عضلات اسکلتی و بافت چربی، به شدت سطوح گلوکز خون را متأثر می‌نماید. تاجایی که می‌توان کاهش سطوح گلوکز خون متعاقب تمرینات ورزشی را به کاهش بیان ژن‌های درگیر در مسیر گلوکونئوزنز کبدی نسبت داد (42، 43). در این زمینه، اگرچه مطالعات روی مسیرهای درگیر در رهایی گلوکز کبدی کم‌تر انجام گرفته است، اما یافته‌های مطالعه حاضر



نتایج مطالعه حاضر نشان داد 8 هفته تمرین تناوبی و ژل رویال در رت‌های صحرایی نر دیابتی باعث کاهش معنی‌دار گلوکز ناشتا و افزایش معنی‌دار میزان انسولین سرم رت‌های صحرایی دیابتی شد اما در مورد تغییرات انسولین در تمرینات تناوبی در این زمینه، ایزدی و همکاران (2017)، افزایش انسولین سرم همراه با کاهش گلوکز خون را در پاسخ به تمرینات HIIT طولانی‌مدت در رت‌های دیابتی نوع 2 گزارش نموده‌اند (47). با این حال، موافق با پژوهش حاضر، رشیدی و همکارانش در سال 2016 در مطالعه‌ای روی رت‌های صحرایی دیابتی که با stz دیابتی شده بودند، تأثیر 12 هفته تمرین هوازی stz نیکوتین آمید و به‌صورت دویدن روی تردمیل را روی رت‌های صحرایی دیابتی بررسی کردند و گزارش کردند برنامه تمرینی به کاهش معنی‌دار گلوکز ناشتا در گروه دیابتی هوازی نسبت به گروه دیابتی کنترل منجر شد و سطوح انسولین سرم در گروه دیابتی هوازی بالاتر از گروه دیابتی کنترل بود اما این تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار نبود (48). از طرفی پژوهش دیگری توسط خواجه لندی و همکاران (2017) روی نمونه‌های حیوانی، تأثیر 6 هفته تمرین شنا همراه با مصرف عصاره آلونه ورا بر نیمرخ چربی رت‌های نر دیابتی مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که تمرین شنا، مصرف عصاره آلونه‌ورا و ترکیب آن‌ها، اثر معنی‌داری بر کاهش گلوکز و بهبود نیمرخ چربی رت‌های دیابتی داشت (49) که نتایج آن‌ها همسو با پژوهش حاضر می‌باشد. از طرفی، به این نکته نیز اشاره می‌شود که مسیرهای سیگنالینگ انسولین نقش مهمی را در کنترل بیان ژن‌های گلوکونوزنیک نظیر G6Pase و PEPCK که سرعت گلوکونوزن کبدی را تنظیم می‌کنند، بازی می‌کند. بر پایه شواهد موجود، افزایش بیان ژن PEPCK در گروه ژل رویال را می‌توان به نوعی به افزایش بیشتر سطوح انسولین در پاسخ به مصرف طولانی‌مدت ژل رویال نسبت داد (50).

آشکار نمود که بیان ژن‌های درگیر در فرآیند گلوکونوزن کبدی در پاسخ به تمرینات ورزشی متأثر می‌شود. با این وجود، مشخص شده است که بیان ژن‌های درگیر در فرایند گلوکونوزن پس از ریکاوری طولانی‌مدت متعاقب ورزش طولانی‌مدت به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. به‌طوری‌که در مطالعه Ropelle و همکاران (2009)، بیان ژن‌های کبدی G6Pase و PEPCK متعاقب 8 ساعت ریکاوری پس از یک جلسه ورزش طولانی‌مدت کاهش یافت و محققان این کاهش را به‌نوعی به تغییر در مسیرهای سیگنالینگ دیگر ژن‌های مرتبط نظیر فرایندهای کبدی نسبت داده‌اند. یافته‌ها نشان داد که مسیرهای سیگنالینگ انسولین پس از 8 ساعت ریکاوری متعاقب یک جلسه ورزش استقامتی طولانی‌مدت بهبود می‌یابد که با کاهش بیان ژن‌های گلوکونوزن کبدی نظیر PEPCK و G6Pase هم‌زمان با افزایش فسفوریلاسیون Akt و Foxo1 وابسته به انسولین همچنین کاهش بیان PGC-1alpha در سلول‌های کبدی همراه است (44). در این زمینه، محققان همواره به این نکته تأکید نموده‌اند که جدا از مقاومت یا حساسیت انسولین در بافت‌های هدف نظیر عضلات اسکلتی و بافت چربی، تعادل و بهبود در سطوح پروتئین و بیان ژن‌های درگیر در مسیر گلوکونوزن کبدی به‌شدت سطوح گلوکز خون را متأثر می‌کند (45). این محققان کاهش سطوح گلوکز متعاقب تمرینات ورزشی را به کاهش بیان ژن‌های درگیر در مسیر گلوکونوزن کبدی نسبت داده‌اند. در مطالعه de Moura و همکاران (2013)، اثر یک جلسه ورزش شنای طولانی‌مدت روی سطوح پروتئین و بین برخی ژن‌های موثر در رهایی گلوکز کبدی در رت‌های چاق سالمند اندازه‌گیری شد. به طوری که رت‌های مورد مطالعه 1/5 ساعت شنا در دو مرحله با فاصله زمانی 45 دقیقه اجرا نمودند. یافته‌ها آشکار نمود که سطوح پروتئین PEPCK و G6Pase در 16 ساعت پس از آزمون ورزشی در بافت کبد گروه سالمند به میزان معنی‌داری کاهش یافت (46).

## سپاسگزاری

در کمیته اخلاق پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی وزارت علوم و تحقیقات و فناوری تایید شد.

این مقاله مستخرج از رساله دکتری محمدرضا ییلاقی اشرفی بوده و با کد اخلاق IR.SSRC.REC.1399.034

## References

1. Shokrolahi Ardakani A, Abednatanzi H, Gholami M, Shakeri N. The effect of 12 weeks resistance training on G6Pase and PEPCK genes expression in liver hepatocytes, glucose and insulin levels in type 2 diabetic rats. *RJMS* 2020; 27(4): 88-89.
2. Chahardoli M, Mahmoodi M, Hajizadeh M, Khoramdel Azad H, Khoshdel A, Mirzaei M. Effect of Aloe Vera Hydroalcoholic Extract on Blood Glucose, Serum Insulin and the Key Enzymes in Metabolic Pathways of Glycolysis and Gluconeogenesis in Hepatocytes of Type 1 Diabetic Rats. *JRUMS* 2015; 13(8): 669-682 (Persian).
3. Bazi Shad A, Miri H R, Esmaeilzadeh Bahabadi S, Hajinezhad M R, Dahmardeh Ghale no F, Sabori H et al . The effect of hydro-alcoholic extract of *Prosopis farcta* on weight, blood glucose and gene expression of Pyruvate Kinase in Diabetic Rats (Type1). *Jms* 2017; 4(4): 1-9 (Persian).
4. Zhang X, Yang S, Chen J, Su Z. Unraveling the regulation of hepatic gluconeogenesis. *Front Endocrinol* 2019; 9: 802.
5. Li C, Li X, Mao Q, Guo Y. MicroRNA-223 inhibits hepatic gluconeogenesis by targeting forkhead boxO1. *Int J Clin Exp Pathol* 2016; 9(12): 12502-12510.
6. Kim HJ, Jee HJ, Yun J. DNA damage induces down-regulation of PEPCK and G6P gene expression through degradation of PGC-1 $\alpha$ . *Acta Biochim Biophys Sin* 2011; 43(8): 589-594.
7. Haeusler RA, Camastra S, Astiarraga B, Nannipieri M, Anselmino M, Ferrannini E. Decreased expression of hepatic glucokinase in type 2 diabetes. *Mol Metab* 2015; 4(3): 222-226.
8. Konopelska S, Kienitz T, Quinkler M. Downregulation of hepatic glucose-6-phosphatase-alpha in patients with hepatic steatosis. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19(12): 2322-2326.
9. Samuel VT, Beddow SA, Iwasaki T, Zhang XM, Chu X, Still CD, et al. fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(29): 12121-12126.
10. Research Institute of Endocrinology & Metabolism. *Diabetes and exercise*. Tehran, Vista; 2010. (Persian).
11. Gillen JB, Little JP, Punthakee Z, Tamopolsky MA, Riddell MC, Gibala MJ. Acute high-intensity interval exercise reduces the postprandial glucose response and prevalence of hyperglycaemia in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2012; 14(6): 575-577.
12. Godin G, Desharnais R, Valois P, Lepage L, Jobin J, Bradet, R. Differences in perceived barriers to exercise between high and low intenders: observations among different populations. *Am J Health Promot* 1994; 8(4): 279-285.
13. Khajehlandi Ali, Abed Natanzi H, Nikbakht

- H. The Effect of Swimming Training and Aloe Vera Extract on Lipid Profile of Male Diabetic Rats. *Journal of Isfahan Medical School* 2017; 34(411): 1515-1522 (Persian).
14. Erejuwa OO, Gurtu S, Sulaiman SA, Ab Wahab MS, Sirajudeen KN, Salleh MS. Hypoglycemic and antioxidant effects of honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Vitam Nutr Res* 2010; 80(1): 74-82.
  15. Al-Waili N. Intrapulmonary administration of natural honey solution, hyperosmolar dextrose or hypoosmolar distilled water to normal individuals and to patients with type-2 diabetes mellitus or hypertension: their effects on blood glucose level, plasma insulin and C-peptide, blood pressure and peaked expiratory flow rate. *Eur. J Med Res* 2003; 8(7): 295-303.
  16. Khazaei M, Ansarian A, Ghanbari E. New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review. *J Diet Suppl* 2018; 15(5): 757-775.
  17. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez J. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 2008; 73(9): 117-124.
  18. Izuta H, Chikaraishi Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009; 6(4): 489-494.
  19. Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement Altern Med* 2009; 9: 4.
  20. Nagai T, Inoue R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chem* 2004; 84(2): 181-186.
  21. Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: a review. *J Funct Foods* 2012; 4(1): 39-52.
  22. Shidfar F, Jazayeri Sh, Musavi SN, Malek M, Hosseini AF, Khoshpey B, et al. Does Supplementation with Royal Jelly Improve Oxidative Stress and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients? *Iran J Public Health* 2015; 44(6): 797-803.
  23. Nomura M, Maruo N, Zamami Y, Takatori S, Doi S, Kawasaki H. Effect of long-term treatment with royal jelly on insulin resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Yakugaku Zasshi* 2007; 127(11): 1877-1882.
  24. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, et al. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006; 79(11): 1100-1107.
  25. Zou F, Mao XQ, Wang N, Liu J, Ou-Yang JP. Astragalus polysaccharides alleviates glucose toxicity and restores glucose homeostasis in diabetic states via activation of ampk. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30(12): 1607-1615.
  26. Gheibi S, Bakhtiari Zadeh F, Ghasemi A. A review of high fat diet-Streptozotocin model for Induction of type 2 diabetes in rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2016; 18(2): 135-148 (Persian).
  27. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 2005; 52(4): 313-320.
  28. Moeini Fard M, Hedayati M. Aluxan and Streptozotocin, *Diabetes Research Tool*.

- Journal of Applied Sports Physiology 2015; 10(20): 13-22 (Persian).
29. Asgari M, Asle-Rousta M, Sofiabadi M. Effect of Royal Jelly on Blood Glucose and Lipids in Streptozotocin Induced Type 1 Diabetic Rats. J Arak Uni Med Sci 2017; 20(122): 48-56 (Persian).
  30. Baburao Waykar B. and Alqadhi YA, Administration of Honey and Royal Jelly Ameliorate Cisplatin Induced Changes in Liver and Kidney Function in rats. Biochem Pharmacol 2018; 11(4):2191-2199.
  31. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen M, Angelis KD. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in Streptozotocin-diabetic rats. Cardiovasc Diabetol 2007; 6: 38.
  32. Akbarzade.A, Fattahi Bafghi. A, The effect of high intensity interval training combined with curcumin supplementation on Plasma glucose concentration and insulin resistance in diabetic rats. JSSU 2018; 25(12): 961-969.
  33. Rezaei R, Norshahi M, Bigdeli MR, Khodaghohi F, Haghparast A. Effect of eight weeks continuous and HIIT exercises on VEGF A and VEGFR2 levels in stratum hippocampus and cortex of wistar rat brain of continuous and interval intense Journal of Exercise Physiology and Physical Activity 2015; 8(2): 1213-1221 (Persian).
  34. Ghahramani M, Banaei Far, Arshadi, Sohaily sh. Effect of aerobic training on expression of PGC-1 $\alpha$  and PEPCK gens in hepatocyte of streptozotocin-induced diabetic male rats. Stud Med Sci 2019; 30(10): 791-802 (Persian).
  35. Wu H, Deng X, Shi Y, Su Y, Wei J, Duan H. PGC-1 $\alpha$ , glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus. J Endocrinol 2016; 229(3): R99-R115.
  36. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. Nature 2001; 413(6852): 131-138.
  37. Rui L. Energy metabolism in the liver. Compr Physiol 2014; 4(1): 177-197.
  38. Aoi W, Ichiishi E, Sakamoto N, Tsujimoto A, Tokuda H, Yoshikawa T. Effect of exercise on hepatic gene expression in rats: a microarray analysis. Life Sci 2004; 75(26): 3117-3128.
  39. Sharabi K, Lin H, Tavares CD, Dominy JE, Camporez JP, Perry RJ, et al. Selective chemical inhibition of PGC-1 $\alpha$  gluconeogenic activity ameliorates type 2 diabetes. Cell 2017; 169(1): 148-60.e15.
  40. Way KL, Hackett DA, Baker MK, Johnson NA. The effect of regular exercise on insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Diabetes Metab J 2016; 40(4): 253-271.
  41. Kolawole OT, Akanji MA. Effects of extracts of leaves of *Newbouldia laevis* on the activities of some enzymes of hepatic glucose metabolism in diabetic rats. Afr J Biotechnol 2014; 13(22): 2273-2281.
  42. Chang SP, Chen YH, Chang WC, Liu IM, Cheng JT. Merit of physical exercise to reverse the higher gene expression of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase in obese Zucker rats. Life Sci 2006; 79(3): 240-246.
  43. Marinho R, Ropelle ER, Cintra DE, De Souza CT, Da Silva AS, Bertoli FC, et al. Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss. J Cell Physiol 2012; 227(7): 2917-2926.

44. Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, Frederico MJ, de Pinho RA, Velloso LA, De Souza CT. Acute exercise modulates the Foxo1/PGC-1alpha pathway in the liver of diet-induced obesity rats. *J Physiol* 2009; 587(Pt 9): 2069-2076.
45. Boden G, Chen X, Stein TP. Gluconeogenesis in moderately and severely hyperglycemic patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280(1): E23-30.
46. de Moura LP, Souza Pauli LS, Cintra DE, de Souza CT, da Silva ASR, Marinho R, et al. Acute exercise decreases PTP-1B protein level and improves insulin signaling in the liver of old rats. *Immun Ageing* 2013; 10(1): 8.
47. Eizadi M, Soory R, Ravasi A, Baesy K, Choobineh S. Relationship between TCF7L2 Relative Expression in Pancreas Tissue with Changes in Insulin by High Intensity Interval Training (HIIT) in Type 2 Diabetes Rats. *JSSU* 2017; 24(12): 981-993.
48. Rashidi M, Soori R, Choobineh S, Ravasi AA, Baesi K. The Effect of an Aerobic Exercise on MTNR1B Gene Expression, Insulin and Glucose Levels in Pancreas of Induced Diabetic Rat with Streptozotocin-Nicotinamide. *Knowledge & Health* 2016; 11(3): 40-48.
49. Khajehlandi A, Abednatanzi H, Nikbakht H. The Effect of Swimming and Aloe Vera Extract on Serum of Visfatin Levels, and the Ratio of Triglycerides to High-Density Lipoproteins and Glucose in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. *J Arak Uni Med Sci* 2017; 20(120): 39-47 (Persian).
50. Yeylaghi Ashrafi MR, Abednatanzi H, Ghazalian F. The effect of eight weeks of high intensity interval training and n-chromosomal royal jelly on G6Pase gene expression in hepatocytes, glucose levels and insulin resistance in type 2 diabetic rats. *RJMS* 2020; 27(8): 135-150 (Persian).
51. Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 7074209.
52. Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, De Nigris V, Ceriello A. The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complications. *Nutrients* 2016; 8(5): 310.
53. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res* 2005; 51(2): 117-123.
54. Rauter AP, Martins A, Borges C, Mota-Filipe H, Pinto R, Sepodes B, Justino J. Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 2010; 24(S2): S133-138.
55. de Sousa E, Zanatta L, Seifriz I, Creczynski-Pasa TB, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, Silva FR. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3, 7-O-( $\alpha$ -dirhamnoside from *Bauhinia f orficata* Leaves. *J Nat Prod* 2004; 67(5): 829-832.
56. Nagai T, Inoue R, Suzuki N, Nagashima T. Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly. *J Med Food* 2006; 9(3): 363-367.
57. Amirshahi T, Nejati V, Najafi G. Biochemical and Histological Evaluation of Protective Effect of Royal Jelly on Pancreas-Induced Oxidative Stress in Male Rat Pancreas. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 23(107): 107-115 (Persian).
58. Afkhami-Ardekani M, ShojaoddinyArdekani A. Effect of vitamin C on blood glucose,

- serum lipids & serum insulin in type 2 diabetes patients. *Indian J Med Res* 2007; 126(5): 471-474.
59. Dakhale GN, Chaudhari HV, Shrivastava M. Supplementation of vitamin C reduces blood glucose and improves glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind study. *Adv Pharmacol Sci* 2011; 2011: 195271.
60. Xiang X, Liu Y, Zhang X, Zhang W, Wang Z. Effects of biotin on blood glucose regulation in type 2 diabetes rat model. *Journal of Hygiene Research* 2015; 44(2): 185-189.