

تعدیل مسیر Nrf1/Sod1/Hmox1 توسط مصرف سینئول و تمرین ورزشی در محیط غنی شده جهت حفاظت کبد در برابر سمیت آکريل آميد

مسعود اردشیری لردجانی^۱، فرزانه تقیان^۱، خسرو جلالی دهکردی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: استرس اکسیداتیو، ناشی از چاقی و مواجهه با آکريل آميد، توانایی دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد. این پژوهش، اثرات مداخله‌ی ترکیبی فعالیت بدنی در محیط غنی شده و مکمل سینئول بر تعدیل بیان ژن‌های مؤثر بر مسیر Nrf2/SOD1/HMOX1 در موش‌های القاء شده‌ی چاق را مورد ارزیابی قرار داد.

روش‌ها: پژوهش حاضر از نوع تجربی و بنیادی می‌باشد. ۵۴ سر موش ماده C57BL/6 ۷-۶ هفته‌ای به‌صورت تصادفی در ۹ گروه تقسیم شدند: کنترل، چاق با رژیم پرچرب حاوی آکريل آميد، چاق با رژیم پرچرب بدون آکريل آميد، چاق با رژیم آکريل آميد و تمرین در محیط غنی شده (۸ هفته، ۵ روز/هفته، ۶۰-۹۰ دقیقه روزانه، شدت کم-متوسط)، چاق با رژیم آکريل آميد و تیمار سینئول (غلظت ۱۰ میکرومولار به صورت گاواژ)، چاق با محیط غنی شده، چاق با سینئول، چاق با رژیم آکريل آميد، محیط غنی شده و سینئول، چاق با محیط غنی شده و سینئول. بیان ژن‌ها Nrf2/SOD1/HMOX1 در بافت کبد با روش Real-Time-qPCR بررسی شد. داده‌ها با آزمون‌های آنالیز واریانس یک و سه راهه، در سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) انجام شد.

یافته‌ها: فعالیت در محیط غنی شده و مصرف سینئول به‌طور مستقل و تعاملی باعث افزایش بیان این ژن‌ها گردید ($P < 0.001$). مسیر Nrf2/SOD1/HMOX1 در گروه چاق با رژیم پرچرب حاوی آکريل آميد بطور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافت ($P = 0.001$). مصرف سینئول و فعالیت در محیط غنی شده سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های گردید ($P = 0.001$).

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها بیانگر نقش محافظتی سینئول و فعالیت در تعدیل استرس اکسیداتیو و ارتقای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است. این دو مداخله می‌تواند به‌عنوان رویکردی مؤثر در پیشگیری از اختلالات متابولیکی مرتبط با چاقی مطرح شود.

واژگان کلیدی: چاقی؛ فعالیت بدنی؛ استرس اکسیداتیو؛ فاکتور رونویسی Nrf2؛ سوپراکسید دیسموتاز ۱ و ۲؛ سینئول

ارجاع: اردشیری لردجانی مسعود، تقیان فرزانه، جلالی دهکردی خسرو. **تعدیل مسیر Nrf1/Sod1/Hmox1 توسط مصرف سینئول و تمرین ورزشی در محیط غنی شده جهت حفاظت کبد در برابر سمیت آکريل آميد.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۴؛ ۴۳ (۸۳۳): ۱۲۲۸-۱۲۴۰.

مقدمه

چاقی، یک بیماری مزمن و چندعاملی است که فرایندهای متابولیک، التهابی و اکسیداتیو را مختل کرده و فرد را مستعد مقاومت به انسولین، دیابت، استئاتوز کبدی و اختلال عملکرد پانکراس می‌سازد (۱-۳). استرس اکسیداتیو مزمن به‌عنوان یک ویژگی پاتولوژیک کلیدی در چاقی شناخته می‌شود که از عدم تعادل بین تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) ROS و ظرفیت ناکافی سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی ناشی شده و در نهایت به آسیب سلولی و

اختلال عملکردهای فیزیولوژیک منجر می‌شود (۴). در این میان، محور Nrf2/SOD1/HMOX1 به‌عنوان یک مسیر تنظیمی مرکزی در دفاع سلولی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از چاقی، رژیم‌های پرچرب و مواجهه با ترکیبات سمی‌ای همچون آکريل آميد مطرح شده است (۵-۷). NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) یک فاکتور رونویسی حساس به وضعیت رداکس است که در شرایط پایه توسط پروتئین KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) در سیتوپلاسم مهار می‌شود؛ اما در مواجهه با تنش اکسیداتیو یا التهاب از

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲- استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۳- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

نویسنده‌ی مسؤول: فرزانه تقیان؛ استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

Email: f.taghian@iau.ac.ir

Keap1 آزاد شده، به هسته انتقال می‌یابد و با اتصال به نواحی پاسخ‌دهنده آنتی‌اکسیدانی (Antioxidant Response Element) ARE در DNA، بیان مجموعه‌ای از ژن‌های سایتوپروتکتیو از جمله (Superoxide SOD1 (dismutase 1 و HMOX1 (Heme oxygenase 1 gene) را القا می‌کند (۸، ۹).

SOD1 با کاتالیز تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید به پراکسید هیدروژن، نخستین سد آنتی‌اکسیدانی در برابر ROS محسوب می‌شود، در حالی که HMOX1 با تجزیه مولکول هم به بیلی‌وردین، منوکسیدکربن و یون آهن، واسطه‌هایی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی تولید می‌نماید (۱۰، ۱۱). افزایش بیان HMOX1 و فعال‌سازی هماهنگ محور NRF2/SOD1/HMOX1 به‌طور گسترده به‌عنوان شاخص درگیر شدن پاسخ آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد در اختلالات مرتبط با چاقی تلقی می‌شود (۶، ۱۲). تعامل بین NRF2 و دو ژن اثرگذار آن یعنی SOD1 و HMOX1، یک شبکه‌ی محافظتی مؤثر در برابر استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کند که در بسیاری از بیماری‌های مزمن از جمله اختلالات ناشی از چاقی، مورد توجه قرار گرفته است (۱۳).

فعالیت بدنی نیز به‌عنوان یکی دیگر از راهبردهای غیردارویی محوری در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از چاقی شناخته می‌شود. شواهد نشان می‌دهند که تمرین ورزشی، به‌ویژه زمانی که در قالب یک محیط غنی‌شده اجرا شود، می‌تواند متابولیسم سیستمیک را بهبود بخشد، عملکرد قلبی-عروقی را ارتقاء دهد و نوروژن را افزایش دهد و هم‌زمان از طریق افزایش ترشح میوکین‌ها به تنظیم التهاب و بهبود عملکرد سیستم ایمنی کمک کند (۱۴، ۱۵). محیط‌های غنی‌شده با فراهم‌سازی تحریکات پیچیده‌ی حسی، حرکتی، اجتماعی و شناختی از طریق تجهیزاتی نظیر چرخ دوار، تونل‌ها، نردبان‌ها و اشیای تعاملی، بستر مناسبی برای این نوع تمرین فراهم می‌آورند (۱۶).

فعالیت بدنی در محیط غنی، به‌عنوان یک راهکار غیردارویی اشاره به محیطی دارد که به‌طور معمول به صورت یک قفس بزرگ با وسایل تودرتو، اسباب‌بازی‌های مختلف، تونل و نردبان برای اکتشاف و چرخ گردان برای ورزش می‌باشد (۱۷).

Marcon و همکاران نشان داده‌اند که فعالیت در چنین محیط‌هایی می‌تواند هموستاز رداکس را بهبود داده، سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش و شاخص‌های التهابی را کاهش دهد (۱۴).

Su و Meng در سال (۲۰۲۴) نشان دادند که تمرین ورزشی با شدت متوسط، دفاع آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد، در حالی که تمرین ورزشی با شدت بالا ممکن است استرس اکسیداتیو را تشدید کند (۱۸). تمرین در محیط غنی‌شده، به‌ویژه در ترکیب با رژیم‌های پرچرب حاوی آکریلامید، با کاهش تجمع ماکروفاژها در بافت چربی و بهبود کنترل گلوکز، پتانسیل محافظتی کبدی را افزایش می‌دهند. شواهد نشان می‌دهند که چنین

محیط‌هایی می‌توانند بر سطوح مختلف فیزیولوژیکی و رفتاری اثرگذار باشند، به‌گونه‌ای که باعث بهبود عصب‌زایی، افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، بهبود ظرفیت متابولیکی و کاهش سطح سایتوکاین‌های التهابی در مدل‌های حیوانی گردند (۱۹-۲۲). با این وجود، شواهدی نیز حاکی از آن است که تمرین در محیط غنی‌شده به تنهایی برای نرمال‌سازی کامل مسیرهای اکسیداتیو در مدل‌های چاقی کفایت ندارد و ترکیب آن با مداخلات مکملی همچون فیتوکمیکال‌ها می‌تواند اثربخشی بیشتری ایجاد کند (۱۹، ۲۰، ۲۲).

در همین راستا، ۸-۱-سینئول Cineole، به‌عنوان یک مونوترپن موجود در اسانس گیاهانی مانند اوکالپتوس، به‌سبب ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و سایتوپروتکتیو خود، به‌عنوان یک مداخله‌ی تغذیه‌ای و فیتوتراپیک مورد توجه قرار گرفته است (۲۳-۲۵). داده‌های تجربی نشان می‌دهند که سینئول می‌تواند با مهار تولید ROS، تعدیل سایتوکین‌های التهابی و تقویت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تاحدی از آسیب‌های مرتبط با چاقی پیشگیری نماید و بخشی از این اثرات از طریق فعال‌سازی مسیر PI3K/AKT/NRF2 اعمال می‌شود (۲۳، ۲۶، ۲۷). با این حال، بخش عمده‌ای از مطالعات پیشین بر مکانیسم‌های وابسته به PPAR- γ متمرکز بوده‌اند و نقش اختصاصی محور NRF2/SOD1/HMOX1 در زمینه‌ی چاقی القاشده با رژیم پرچرب همراه با آکرل‌امید به‌طور کامل تبیین نشده است (۲۳). افزون بر این، نتایج مطالعات دوز-پاسخ نشان داده‌اند که با وجود پتانسیل درمانی گسترده، مصرف مقادیر بالای سینئول ممکن است با سمیت بالقوه همراه باشد و این امر ضرورت تعیین پروتکل‌های دوزدهی ایمن و بهینه را در کاربردهای ترجمانی برجسته می‌کند.

در این چارچوب، بررسی مسیر NRF2/SOD1/HMOX1 در یک مدل چاقی القاشده با رژیم پرچرب همراه با آکرل‌امید، فرصت مناسبی برای تحلیل تعامل بین رژیم غذایی، تعدیل محیطی و بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد فراهم می‌آورد. آکرل‌امید، که به‌طور گسترده در بسیاری از مواد غذایی سرخ‌شده و تنوری تشکیل می‌شود، ترکیبی نوروتوکسیک و پرواکسیدان است که با تشدید تولید ROS و القای مرگ سلولی، شدت آسیب‌های اکسیداتیو مرتبط با چاقی را افزایش می‌دهد. سنجنش بیان ژن‌های NRF2، SOD1 و HMOX1 در این شرایط، می‌تواند به‌عنوان شاخصی عملکردی از کفایت دفاع آنتی‌اکسیدانی کبد مورد استفاده قرار گیرد. بر این اساس، پژوهش حاضر با به‌کارگیری سه ابزار غیردارویی شامل محیط غنی‌شده، تمرین داوطلبانه و مکمل سینئول، و تمرکز بر سه ژن کلیدی در آشکار آنتی‌اکسیدانی، در پی ارائه یک رویکرد کم‌خطر، عملی و مبتنی بر شواهد مولکولی برای مقابله با پیامدهای متابولیک و اکسیداتیو نامطلوب ناشی از چاقی و رژیم‌های غنی از آکرل‌امید است.

روش‌ها

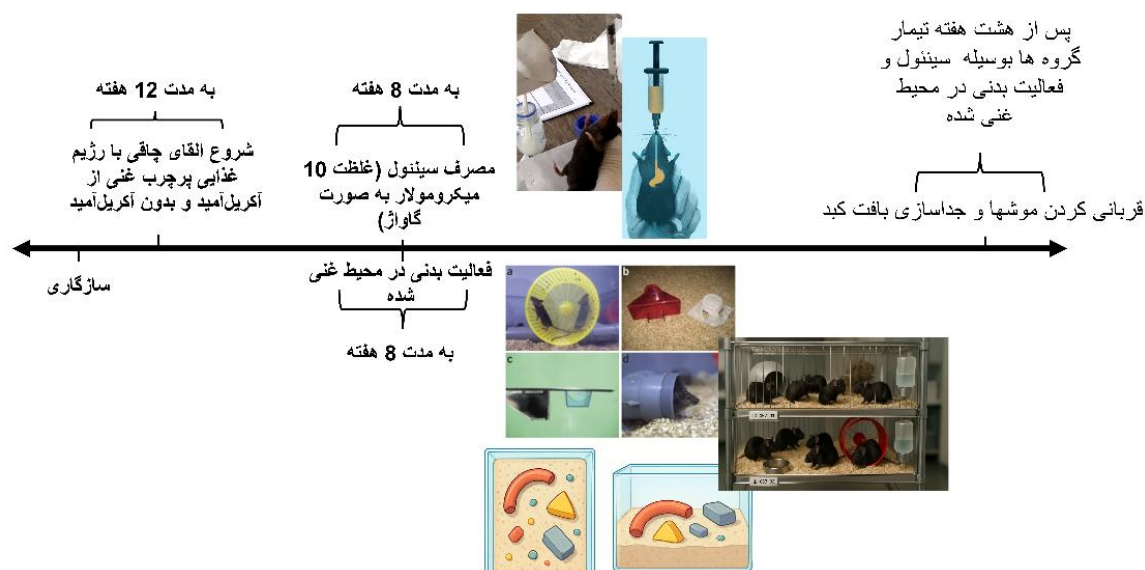
این مطالعه بر اساس اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی توسط کمیته‌ی اخلاق (کد اخلاق: IR.IAU.KHUISF.REC.1403.492) دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) تنظیم و تأیید شد. تمامی آزمایشات بر اساس دستورالعمل‌های تحقیقات حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) با عنوان «راهنمای مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی در تحقیقات علمی» و دستورالعمل‌های ARRIVE 2.0 و توصیه‌ها انجام شد (۲۸).

در تمامی مراحل تحقیق، پروتکل استاندارد کار با حیوانات آزمایشگاهی کوچک انجام شد. ۵۴ سر موش ماده C57BL/6J با میانگین وزنی 24 ± 2 گرم و میانگین سنی ۷ هفته از موسسه رویان، اصفهان تهیه گردید. موش‌ها در لانه‌ی حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) قرار گرفتند. موش‌ها در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت چرخه‌ی نور تا تاریکی، دمای 24 ± 3 درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت 65 ± 5 درصد) نگهداری شدند. علاوه بر این، موش‌ها به طور آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. پس از یک هفته سازگاری، حیوانات به ۹ گروه تقسیم شدند که هرگروه شامل ۶ سر موش بود: (۱) گروه کنترل سالم، (۲) گروه چاق با رژیم پرچرب، (۳) گروه چاق با رژیم حاوی آکريل آمید، (۴) گروه چاق حاوی رژیم آکريل آمید همراه با محیط غنی شده، (۵) گروه چاق حاوی رژیم آکريل آمید همراه با سینتول، (۶) گروه چاق همراه با محیط غنی شده، (۷) گروه چاق همراه با سینتول، (۸) گروه چاق حاوی رژیم آکريل آمید همراه با محیط غنی شده و سینتول و (۹) گروه چاق همراه با محیط غنی شده و سینتول. در شکل شماره یک طراحی مطالعه نشان داده شده است.

پس از هشت هفته تیمار گروه‌ها بوسیله‌ی سینتول و فعالیت بدنی در محیط غنی شده، هر گروه بوسیله‌ی تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، وزن بدن هر موش) و زلیلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، وزن بدن هر موش) بیهوش شدند. جداسازی بافت کبد با رعایت پروتکل‌های بهداشتی انجام گرفت. لازم به ذکر است که بافت کبد جمع‌آوری و با رعایت زنجیره دمایی سرد و ایمنی زیستی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پزشکی منتقل و در دمای -80°C درجه‌ی سانتی‌گراد برای سنجش تجربی بیشتر نگهداری شدند.

رژیم غذایی پرچرب حاوی آکريل آمید

رژیم غذایی استاندارد با میزان کالری $4/2$ به ازای هر گرم وزن پلیت به عنوان خوراک پایه برای موش‌های گروه کنترل سالم استفاده شد. رژیم غذایی حاوی آکريل آمید در دمای 121°C درجه‌ی سانتی‌گراد تحت حرارت قرار گرفتند. زمان قرار گرفتن در معرض 121°C درجه سانتی‌گراد به مقدار ۲۰ دقیقه، زمان خشک شدن ۵ دقیقه و زمان پاکسازی ۱ دقیقه با ۴ پالس برای هر یک از چرخه‌های دما بود. خوراک در کیسه‌های کاغذی سوراخ دار اتوکلاو شد. برای بررسی شاخص‌های بیولوژیک، ۲۵ گرم از خوراک به‌صورت استریل داخل محیط کشت تی‌یوگلایکولات قرار داده شد و در دمای 37°C درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس مقدار ۱۰۰۰ واحد در میلیارد (ppb) آکريل آمید به فرمولاسیون افزوده شد (۲۹). در ابتدا، رژیم غذایی پرچرب حاوی آکريل آمید با ترکیبی از رژیم غذایی استاندارد جهت سازگاری استفاده می‌شد و به تدریج طی ۲ هفته پس از سازگاری، موش‌ها به تنهایی رژیم غذایی پرچرب حاوی آکريل آمید مصرف می‌کردند و پس از آن ۱۲ هفته رژیم غذایی پرچرب حاوی آکريل آمید ادامه یافت.



شکل ۱: الف، طرح شماتیک مطالعه

رژیم غذایی پرچرب فاقد آکريل آميد

در این آزمایش، موش‌های گروه کنترل سالم با یک رژیم غذایی استاندارد تغذیه شدند و موش‌های گروه‌های دارای رژیم پرچرب یک رژیم غذایی پرچرب حاوی ۴۵ درصد کالری از چربی استفاده شد (۳۰، ۳۱). در ابتدا، رژیم غذایی پرچرب حاوی ۴۵ درصد کالری از چربی با ترکیبی از رژیم غذایی استاندارد جهت سازگاری استفاده می‌شد و به تدریج طی ۲ هفته پس از سازگاری به موش‌ها به تنهایی رژیم غذایی پرچرب حاوی ۴۵ درصد کالری مصرف می‌کردند و پس از آن ۱۲ هفته رژیم غذایی پرچرب حاوی ۴۵ درصد کالری ادامه یافت.

تهیه‌ی ترکیب زیست فعال سینتول

ترکیب سینتول از کمپانی Aldrich-Sigma ایالات متحده آمریکا خریداری شد. دوز ایمن مورد استفاده بر اساس مقالات مشخص گردید و با غلظت ۱۰ میکرومولار به صورت گاواژ داده شد (۳۲، ۳۳).

فعالیت بدنی در محیط غنی شده

فعالیت بدنی در محیط غنی‌شده از نوع ارادی-اکتشافی طراحی شد تا حیوان ضمن آزادی حرکت، درگیر محرک‌های حرکتی و شناختی متنوع گردد. برای این منظور از جعبه‌هایی از جنس پلکسی‌گلاس به ابعاد تقریبی ۶۰×۴۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر استفاده شد که مجهز به نردبان، رمپ با زاویه ۲۵-۳۰ درجه، سکوها با ارتفاع متفاوت (۵ تا ۲۰ سانتی‌متر)، تونل‌های پلاستیکی، قوطی‌ها، اسباب‌بازی‌های جویدنی و مواد لانه‌سازی بود. پیش از شروع آزمایش، موش‌ها به مدت ۷ روز در محیط‌های مشابه جهت سازگاری قرار گرفتند.

پروتکل تمرینی به مدت ۸ هفته، ۵ روز در هفته و به‌طور متوسط ۶۰ تا ۹۰ دقیقه در هر جلسه اجرا شد. شدت تمرین بر اساس مشاهده مستقیم رفتار حرکتی (تعداد صعود و نزول از نردبان، جابجایی بین سکوها و تعامل با اشیاء) در محدوده کم تا متوسط تعریف گردید. هر هفته چیدمان و نوع وسایل تغییر داده شد تا از عادت رفتاری حیوان جلوگیری شده و رفتارهای اکتشافی تحریک شود. در طول برنامه، هر

جلسه ثبت و رفتارهای اکتشافی از طریق مشاهده تصویری و بررسی شاخص‌های فعالیت فیزیکی (تعداد حرکت‌ها، زمان درگیری با اشیاء، میزان بالا رفتن از نردبان) پایش شلند (جدول ۱). این پروتکل با هدف شبیه‌سازی فعالیت بدنی با شدت کم تا متوسط طراحی شد و از نوع غیرالزامی بود تا ضمن کاهش استرس ناشی از اجبار، به‌طور طبیعی موجب تحریک سیستم‌های حرکتی و شناختی شود.

موش‌ها در محیط غنی‌شده نگهداری شدند که شامل مجموعه‌ای از وسایل غنی‌سازی فیزیکی و اکتشافی در چند دسته اصلی بود. وسایل لانه‌سازی و سرپناه از مواد کاغذی خردشده، دستمال کاغذی و حداقل یک سرپناه پلاستیکی یا مقوایی تشکیل شده بود تا موقعیت مناسبی برای استراحت و رفتارهای طبیعی جست‌وجو و لانه‌سازی فراهم شود. عناصر حرکتی و ورزشی شامل رمپ‌هایی با شیب‌های ۲۰ تا ۳۰ درجه، سکوهایی با ارتفاع‌های متفاوت بین ۵ تا ۲۰ سانتی‌متر، تونل‌ها و لوله‌های PVC، یک چرخ و فلک و یک سازه بالارونده بود که به منظور تحریک فعالیت‌های فیزیکی و بهبود مهارت‌های حرکتی حیوانات تعبیه گردید. علاوه بر این، مجموعه‌ای از وسایل جویدنی و اکتشافی شامل چوب‌های جویدنی، لوله‌های مقوایی و اسباب‌بازی‌های پلاستیکی غیرسمی با رنگ‌های متفاوت در محیط قرار داده شد تا رفتارهای اکتشافی، کنجکاوی و تحریک حسی حیوانات را افزایش دهد. پروتکل فعالیت بدنی ارادی-اکتشافی به‌مدت هشت هفته، پنج روز در هفته و به‌طور متوسط روزانه ۶۰ تا ۹۰ دقیقه اجرا شد و پس از یک دوره سازگاری اولیه هفت‌روزه آغاز گردید. شدت فعالیت بر اساس مشاهدات رفتاری از جمله تعداد صعود و نزول از سازه‌ها، میزان استفاده از چرخ و فلک، جابجایی بین ناحیه‌های مختلف و تعامل با اشیای محیطی ارزیابی و در محدوده کم تا متوسط طبقه‌بندی شد. برای جلوگیری از عادت رفتاری و حفظ انگیزش اکتشافی، در پایان هر هفته چیدمان قفس و ترکیب وسایل غنی‌سازی تغییر داده می‌شد تا حیوانات با محیطی تازه و محرک‌های جدید مواجه شوند (۳۴-۳۷).

جدول ۱. جدول ژورنل فعالیت بدنی در محیط غنی شده

هفته	جلسات (روز/هفته)	مدت هر جلسه	شدت (بر اساس مشاهده)	وسایل اصلی استفاده‌شده	تغییرات هفتگی
۱ (سازگاری)	۵	۳۰-۴۰ دقیقه	کم (کاوش اولیه)	نردبان، قوطی، رمپ	شناخت اولیه وسایل
۲	۵	۳۰-۴۵ دقیقه	کم (صعود/ نزول نردبان)	نردبان، قوطی، سکو، مواد لانه‌سازی	تعویض قوطی‌ها
۳	۵	۵۰ دقیقه	کم-متوسط (فعالیت مداوم)	نردبان، رمپ، سکو، اسباب‌بازی جویدنی	افزودن رمپ جدید
۴	۵	۶۰-۷۵ دقیقه	متوسط (ترکیب صعود+کاوش)	همه وسایل + لوله PVC	تغییر مواد لانه‌سازی
۵	۵	۷۵ دقیقه	متوسط (۵۰-۶۰٪ فعالیت اکتشافی)	نردبان، قوطی، رمپ، سکو	تعویض اسباب‌بازی
۶	۵	۷۵-۹۰ دقیقه	متوسط (صعود مکرر نردبان)	همه وسایل	تغییر موقعیت نردبان
۷	۵	۹۰ دقیقه	متوسط (۶۰-۷۰٪ فعالیت)	نردبان، رمپ، سکو، لوله	افزودن سکو جدید
۸	۵	۹۰ دقیقه	متوسط (فعالیت کامل)	همه وسایل کامل	تعویض کامل+ ارزیابی نهایی

قفس‌ها از جنس پلکسی‌گلاس با ابعاد تقریبی ۴۰ در ۶۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر بودند و موش‌ها به‌صورت گروهی (چهار تا پنج حیوان در هر قفس) نگهداری شدند. تمیز کردن محیط و تعویض اجزای کاغذی یا مقوایی به‌صورت هفتگی انجام گرفت و سلامت عمومی، رفتار و وضعیت فیزیولوژیکی حیوانات به طور روزانه بررسی شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و سنجش بیان ژن

استخراج RNA تام از بافت کبد با استفاده از معرف TRIzol مطابق پروتکل استاندارد سازنده انجام شد. خلوص و غلظت RNA دستگاه نانودراپ و بر اساس نسبت جذب نوری ۲۸۰/۲۶۰ ارزیابی گردید و نمونه‌هایی با نسبت بین ۱/۸ تا ۲/۰ برای مراحل بعدی انتخاب شدند. به‌منظور حذف هرگونه آلودگی احتمالی DNA ژنومی، RNA استخراج‌شده با آنزیم DNase تحت تیمار قرار گرفت. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت تجاری سنتز cDNA و با به‌کارگیری ۱ میکروگرم RNA تام در هر واکنش، طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. صحت فرایند سنتز cDNA از طریق انجام واکنش PCR روی ژن مرجع و بررسی الگوی باند حاصل در ژل الکتروفورز آگارز تأیید گردید. سنجش کمی بیان ژن‌های SOD1، NRF2 و HMOX1 به‌وسیله‌ی Real-Time PCR با استفاده از رنگ فلورسنت SYBR Green و پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده توسط نرم‌افزارهای Beacon Designer و Oligo7 بر اساس توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه NCBI انجام شد. واکنش‌های Real-Time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل cDNA رقیق‌شده، مستر میکس حاوی SYBR Green، جفت پرایمرهای اختصاصی و آب بدون نوکلئاز اجرا گردید. شرایط چرخه حرارتی شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه، به‌دنبال آن ۴۰ چرخه دناتوراسیون، اتصال پرایمر و گسترش بود؛ همچنین در پایان هر واکنش، منحنی ذوب (Melt curve) برای اطمینان از اختصاصیت تک‌باندی محصول انجام شد. ژن B2M به‌عنوان ژن مرجع داخلی جهت نرمال‌سازی تغییرات بیان به کار رفت. آنالیز داده‌های بیان ژن با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد و نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار برای هر گروه آزمایشی گزارش گردید (جدول ۲).

برای بررسی توزیع داده‌ها از آزمون نرمالیتی Shapiro-Wilk

استفاده شد. مقایسه بین گروه‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه (One-way ANOVA) به همراه آزمون تعقیبی Tukey صورت گرفت. جهت مشخص شدن تأثیرپذیری متغیرهای مستقل و تعاملات فعالیت ورزشی در محیط غنی شده، مصرف سینئول و رژیم غذایی پر چرب از آزمون تحلیل واریانس سه راهه با سطح معنی‌داری آماری برابر با $P < 0/05$ استفاده گردید. پردازش آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۷ (IBM Corporation, Armonk, NY) انجام گرفت.

یافته‌ها

در جدول ۳، تحلیل واریانس سه راهه بیان ژن *Nrf2* نشان داد که هر سه عامل اصلی رژیم غذایی پر چرب غنی از آکریل آمید با ضریب تأثیر برابر ۰/۹۱۷، فعالیت در محیط غنی شده ضریب تأثیر برابر ۰/۳۳۹ و مصرف سینئول، ضریب تأثیر برابر ۰/۹۴۵ تأثیر معنی‌داری داشته‌اند ($P = 0/001$).

از سویی، تعاملات دو راهه شامل رژیم غذایی پر چرب غنی از آکریل آمید * سینئول، ضریب تأثیر برابر ۰/۸۳۳، آکریل آمید * فعالیت در محیط غنی شده ضریب تأثیر برابر ۰/۹۷۷ و سینئول * فعالیت در محیط غنی شده، ضریب تأثیر برابر ۰/۸۴۴ نیز بر سطح بیان نسبی *Sod1* معنی‌دار بودند ($P = 0/001$). تعامل سه راهه آکریل آمید * سینئول * فعالیت در محیط غنی شده، ضریب تأثیر برابر ۰/۵۰۶ بر سطح بیان نسبی *Sod1* معنی‌دار بود ($P = 0/001$).

تحلیل واریانس سه راهه بیان ژن *Sod1* نشان داد که هر سه عامل اصلی رژیم آکریل آمید با ضریب تأثیر برابر ۰/۹۳۱، فعالیت در محیط غنی شده با ضریب تأثیر برابر ۰/۴۳۹ و مصرف سینئول با ضریب تأثیر برابر ۰/۹۵۸ تأثیر معنی‌داری داشته‌اند ($P = 0/001$). از طرفی، تعاملات دو راهه شامل آکریل آمید * سینئول با ضریب تأثیر برابر ۰/۸۷۰، رژیم غذایی پر چرب غنی از آکریل آمید * فعالیت در محیط غنی شده با ضریب تأثیر برابر ۰/۹۸۶ و سینئول * فعالیت در محیط غنی شده با ضریب تأثیر برابر ۰/۸۹۱ نیز بر سطح بیان نسبی *Nrf1* معنی‌دار بودند ($P = 0/001$). تعامل سه راهه رژیم غذایی پر چرب غنی از آکریل آمید * سینئول * فعالیت در محیط غنی شده ضریب تأثیر برابر ۰/۵۸۸ بر سطح بیان نسبی *Nrf1* معنی‌دار بود ($P = 0/001$).

جدول ۲. توالی پرایمر

Gene	NCBI ID	(5'-3') Forward primer	(5'-3') Reverse primer	temperature (°C)
Hmox1	NM_010233	CCCTATCTCTGATACCGTTGTCC	TGCCGCAACTACTGTGATTCCG	۶۰
Sod1	NM_033217	GGAGAGAACTGCACAGCGACA	CAGGCTACTGTAGAGGTTGCCA	۶۰
Nrf1	NM_007540	GGCTGACACTTTTGAGCACGTC	CTCCAAAGGCACTTGACTGCTG	۶۰
B2m	NM_008084	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAG	۶۰

جدول ۳: تحلیل واریانس سه راهه جهت مشخص شدن تعاملات فعالیت ورزشی در محیط غنی شده، مصرف سینتول و رژیم غذایی پر چرب بر اساس متغیرهای وابسته.

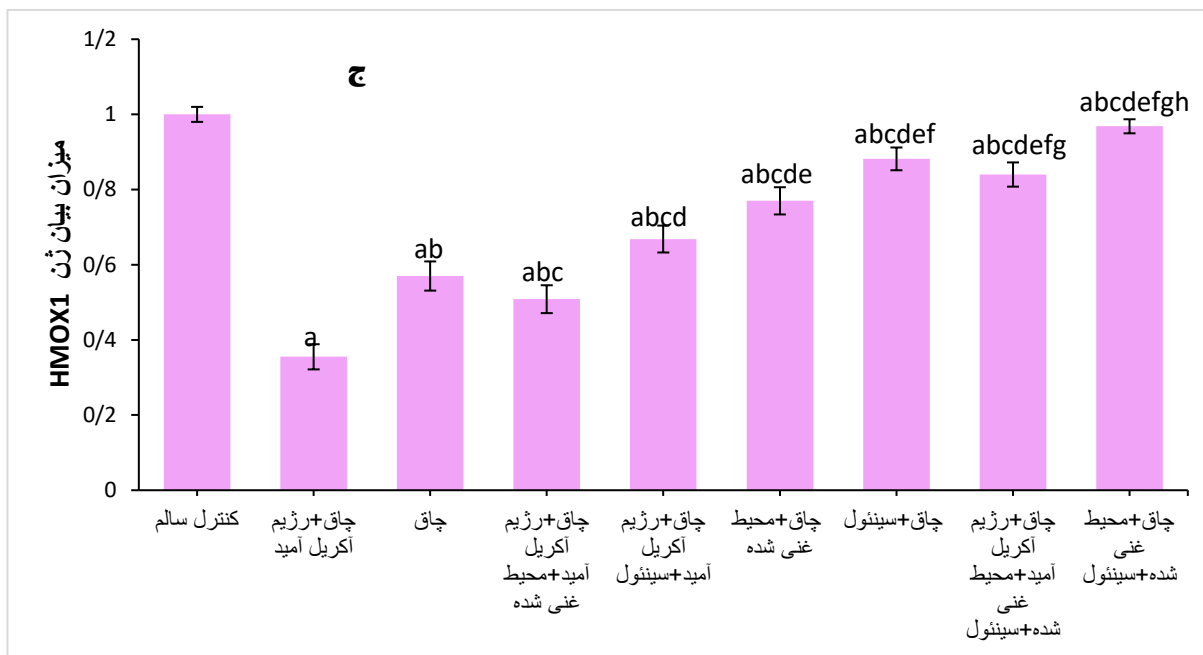
متغیر	مقدار F	معنی‌داری	ضریب تأثیر
Sod1	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد	۰/۰۰۱	۳۸۷/۶۴۰
	سینتول	۰/۰۰۱	۵۹۶/۵۲۲
	فعالیت ورزشی	۰/۰۰۱	۱۷/۹۵۰
	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد* سینتول	۰/۰۰۱	۱۷۴/۶۸۹
	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد* فعالیت ورزشی	۰/۰۰۱	۱۴۸۹/۴۷۲
	سینتول* فعالیت ورزشی	۰/۰۰۱	۱۸۸/۹۴۴
	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد* سینتول* فعالیت ورزشی	۰/۰۰۱	۴۷/۱۱
	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد	۰/۰۰۱	۴۷۰/۱۲۴
	سینتول	۰/۰۰۱	۷۹۳/۱۰۶
	فعالیت ورزشی	۰/۰۰۱	۲۷/۳۹۱
Nrf1	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد* سینتول	۰/۰۰۱	۲۳۵/۰۶۲
	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد* فعالیت ورزشی	۰/۰۰۱	۲۵۲۲/۵۱۶
	سینتول* فعالیت ورزشی	۰/۰۰۱	۲۸۶/۲۱۱
	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد* سینتول* فعالیت ورزشی	۰/۰۰۱	۶۵/۷۲
	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد	۰/۰۰۱	۲۶۰/۲۹۹
	سینتول	۰/۰۰۱	۳۸۰/۹۰۱
	فعالیت ورزشی	۰/۰۰۱	۶۹/۳۴۱
Hmox1	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد* سینتول	۰/۰۰۱	۵۹/۷۲۵
	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد* فعالیت ورزشی	۰/۰۰۱	۷۲۴/۱۸۷
	سینتول* فعالیت ورزشی	۰/۰۰۱	۶۰/۷۹۶
	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد* سینتول* فعالیت ورزشی	۰/۰۰۶	۸/۲
	رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد	۰/۰۰۱	۰/۹۱۷

نسبت به گروه کنترل سالم داشت (شکل ۲ الف-ج)، ($P = ۰/۰۰۱$). این کاهش بیان، نشان‌دهنده اثر منفی رژیم آکريل آميد بر تنظیم پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی سلولی است. در مقابل، گروه‌هایی که سینتول دریافت کرده بودند و یا در محیط غنی‌شده قرار داشتند، افزایش قابل توجهی در بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی نشان دادند (شکل ۲ الف-ج)، ($P = ۰/۰۰۱$). به‌ویژه در گروه چاق همراه با محیط غنی‌شده و سینتول، بیان هر سه ژن به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه چاق و گروه چاق تحت رژیم آکريل آميد افزایش یافت (شکل ۲ الف-ج)، ($P = ۰/۰۰۱$) که حاکی از اثر محافظتی قوی ترکیب این دو عامل است. علاوه بر آن، گروه‌های چاق همراه با سینتول و چاق همراه با محیط غنی‌شده نیز بیان بالاتری نسبت به گروه چاق و گروه چاق تحت رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد نشان دادند (شکل ۲ الف-ج)، ($P = ۰/۰۰۱$)، اما تأثیر آن‌ها به‌اندازه ترکیب هم‌زمان محیط غنی‌شده و سینتول نبود. در نهایت، ترکیب محیط غنی‌شده و سینتول بیشترین تأثیر مثبت را بر افزایش بیان ژن‌های *Nrf2*، *Sod1* و *Hmox1* داشت و این افزایش از نظر آماری نسبت رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد، معنی‌دار بود (شکل ۱ الف-ج)، ($P = ۰/۰۰۱$).

تحلیل واریانس سه راهه بیان ژن *Hmox1* نشان داد که هر سه عامل اصلی رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد با ضریب تأثیر برابر $۰/۸۸۱$ ، فعالیت در محیط غنی‌شده با ضریب تأثیر برابر $۰/۶۶۵$ و مصرف سینتول با ضریب تأثیر برابر $۰/۹۱۶$ تأثیر معنی‌داری داشته‌اند. از سویی، تعاملات دو راهه شامل رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد * سینتول با ضریب تأثیر برابر $۰/۶۳۱$ ، رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد * فعالیت در محیط غنی‌شده با ضریب تأثیر برابر $۰/۹۵۴$ و سینتول * فعالیت در محیط غنی‌شده با ضریب تأثیر برابر $۰/۶۳۵$ نیز بر سطح بیان نسبی *HMOX1* معنی‌دار بودند ($P = ۰/۰۰۱$). تعامل سه راهه رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد * سینتول * فعالیت در محیط غنی‌شده با ضریب تأثیر برابر $۰/۱۵۲$ معنی‌دار بود ($P = ۰/۰۰۶$).

در این مطالعه، بیان ژن‌های *Nrf2* (شکل ۲، الف)، *Sod1* (شکل ۲، ب) و *Hmox1* (شکل ۲، ج)، در گروه‌های مختلف تحت شرایط چاقی، رژیم آکريل آميد، محیط غنی‌شده و ترکیب سینتول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که گروه چاق همراه با رژیم غذایی پر چرب غنی آکريل آميد در هر سه ژن مورد بررسی، کاهش معنی‌داری در بیان





شکل ۲: میزان تغییرات بیان ژنهای *Nrf1/Sod1/Hmox1* در بافت کبد. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. ژن *B2M* به عنوان ژن خانه‌گردان در این پژوهش استفاده شد. آنالیز بیان ژن بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه و ارزیابی گردید ($P < 0.05$). الف، تأثیر مصرف سینئول و تمرین در محیط غنی‌شده بر تغییرات بیان نسبی ژن *Sod1*، ج، تأثیر مصرف سینئول و تمرین در محیط غنی‌شده بر تغییرات بیان نسبی ژن *Nrf1*، ب، تأثیر مصرف سینئول و تمرین در محیط غنی‌شده بر تغییرات بیان نسبی ژن *Hmox1*، ا نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سالم و سایر گروه‌ها می‌باشد. b نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه چاق+رژیم آکريل آميد و سایر گروه‌ها می‌باشد. c نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه چاق با سایر گروه‌ها می‌باشد. d نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه چاق+رژيم آکريل آميد+محيط غني با سایر گروه‌ها می‌باشد. e نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه چاق+رژيم آکريل آميد+سينئول با سایر گروه‌ها می‌باشد. f نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه چاق+محيط غني با سایر گروه‌ها می‌باشد. g نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه چاق+سينئول با سایر گروه‌ها می‌باشد. h نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه چاق+رژيم آکريل آميد+محيط غني+سينئول با سایر گروه‌ها می‌باشد.

چاق مقادیر بالایی از ROS را تولید می‌کند؛ این امر از طریق افزایش تنفس میتوکندریایی و فعالیت NADPH اکسیدازهای موجود در سلول‌های کبدی و سلول‌های ایمنی رخ می‌دهد (۳۸). اختلال در مسیر *NRF1/SOD1/HMOX1* چاقی منجر به افزایش اسیدهای چرب آزاد در خون می‌شود، که تولید ROS درون‌سلولی را تشدید کرده و ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی را به‌ویژه از طریق کاهش بیان و فعالیت *SOD1* و سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تضعیف می‌کند (۳۹). اگرچه چاقی در ابتدا، فعال‌سازی جبرانی *Nrf1* را آغاز می‌کند، استرس اکسیداتیو پایدار و التهاب منجر به کاهش تدریجی در بیان ژن *Nrf1* می‌شود (۴۰).

فعالیت بدنی در محیط غنی شده، می‌تواند با تأثیر بر متابولیسم لیپید و گلوکز و افزایش عملکرد میتوکندری، سازگاری‌های زیست‌انرژی را القا کند. عدم تعادل متابولیکی اغلب با استرس اکسیداتیو مرتبط است (۴۱). نشان داده شده است که فعالیت بدنی در محیط غنی شده مسیرهای آنتی‌اکسیدانی را تحریک می‌کند و بیان آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز را افزایش می‌دهد، در حالی که تولید ترکیبات پیش‌اکسیدان را کاهش می‌دهد که آن را به

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیب محیط غنی‌شده و سینئول به‌طور معناداری موجب افزایش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی *Sod1*، *Nrf2* و *Hmox1* در مدل حیوانی چاق شده با رژیم غذایی پرچرب حاوی آکريل آميد شد. یافته‌های این مطالعه که نشان‌دهنده اثرات مثبت محیط غنی‌شده و ترکیب سینئول بر افزایش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی هستند، با مطالعات پیشین کاملاً هم‌راستا و قابل تطبیق‌اند. به‌ویژه، پژوهش Vaquero و همکاران نشان دادند که قرار گرفتن حیوانات در محیط‌های غنی‌شده، موجب فعال‌سازی مسیرهای نوروتروفیک، افزایش انعطاف‌پذیری سیناپسی و کاهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو در مدل‌های بیماری‌های عصبی مانند آلزایمر، پارکینسون و آسیب‌های ایسکمیک مغزی می‌شود (۲۰). این مطالعه تأکید می‌کند که محیط غنی‌شده نه تنها بر رفتار و شناخت، بلکه بر تنظیمات مولکولی و سلولی مرتبط با پاسخ‌های دفاعی نیز اثرگذار است.

چاقی، حالتی پاتوفیزیولوژیکی است که به استرس اکسیداتیو مزمن، ناشی از چندین مکانیسم به‌هم‌پیوسته مشخص می‌شود. بافت کبد در افراد

یک استراتژی امیدوارکننده برای پیشگیری از استرس اکسیداتیو تبدیل می‌کند (۴۲). علاوه بر این، نشان داده شده است که فعالیت بدنی در محیط غنی مسیر سیگنالینگ Nrf1-ARE را فعال می‌کند، به محافظت عصبی و بهبود عملکرد شناختی کمک می‌کند. از سویی، مطالعات متعدد نشان داده‌اند فعالیت بدنی در محیط غنی می‌تواند پاسخ التهابی و عملکرد شناختی را بهبود می‌بخشد (۴۳).

نتایج افزایش بیان NRF1/SOD1/HMOX1 در موش های چاق تحت مداخله سینئول و محیط غنی‌شده، مستقیماً با یافته‌های Marseglia و همکاران همخوانی داشت که استرس اکسیداتیو مزمن را عامل اصلی آسیب‌های کبدی در چاقی معرفی کرده و اختلال در مسیرهای آنتی‌اکسیدانی را گزارش نمودند (۳).

Weisberg و همکاران نیز تجمع ماکروفاژها و التهاب آدیپوزیتی را در مدل‌های رژیم پرچرب تأیید کرده که منجر به افزایش ROS و سرکوب NRF2 می‌گردد (۲). از سویی، در مطالعه‌ی Chartoumpakis و همکاران، موش های Nrf2-KO تحت رژیم غذایی پرچرب طولانی‌مدت از چاقی و مقاومت انسولینی محافظت شدند که با افزایش FGF21 و سرکوب NRF2 در موش های چاق همخوانی داشت (۴۴).

Manzo و همکاران نشان دادند که فعالیت بدنی در محیط غنی‌شده از پیشرفت دیس‌بیوز ناشی از مصرف رژیم غذایی پرچرب در موش های چاق جلوگیری می‌کند و گونه‌های مرتبط با سندرم متابولیک (Acidaminobacteraceae, Tepidimicrobium, Fusibacter) را کاهش می‌دهد و در عین حال گونه‌های مرتبط با فیزیولوژی سالم (Syntrophococcus sucrumutans, Dehalobacterium, Butyricimonas و Prevotella) را تقویت می‌کند (۴۵).

da Silva Fidélis و همکاران نشان دادند که فعالیت بدنی در محیط غنی‌شده، بطور قابل توجهی وزن بدن و سطح مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde) و کربونیل را در کبد کاهش داده است. فعالیت بدنی در محیط غنی‌شده، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی را در تمام بافت کبد، به جز فعالیت کاتالاز که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها نشان نداد، افزایش داد (۴۶).

یکی از علت‌های عدم تغییر کاتالاز در این مطالعه، مدت زمان انجام فعالیت بدنی در محیط غنی‌شده بوده است که در این مطالعه زیر هشت هفته مورد ارزیابی قرار گرفته بود. فعالیت بدنی در محیط غنی‌شده از طریق افزایش BDNF و فاکتورهای میوکاین‌ها را فعال می‌کند. Chartoumpakis و همکاران نشان دادند، فعالیت بدنی محیط غنی‌شده در موش های چاق تعادل اکسیداتیو را از طریق افزایش Nrf2 و کاهش ROS بهبود می‌بخشد (۴۴).

Meng و Su نیز میوکاین‌ها آزادشده در محیط غنی‌شده را با فعال‌سازی ARE/Nrf2 مرتبط دانست (۱۸). Queen و همکاران افزایش انعطاف‌پذیری متابولیک و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کبدی را در مدل‌های چاقی گزارش کرد که افزایش بیان ژن‌های NRF1/SOD1/HMOX1 توسط ترکیب محیط غنی‌شده و مصرف سینئول می‌نماید (۱۵).

از سوی دیگر، نتایج افزایش بیان Nrf2, SOD1 و HMOX1 با یافته‌های مطالعه‌ی Wu و همکاران همسو بود که سینئول از طریق PI3K/Akt/Nrf2 استرس اکسیداتیو را در موش های استرسی کاهش داد. به‌طور خاص اثر سینئول را در کاهش استرس اکسیداتیو در مدل موش های تحت استرس مزمن بررسی کرده و نشان داد که این ترکیب گیاهی از طریق فعال‌سازی مسیر PI3K/Akt/Nrf2 موجب افزایش بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو در هیپوکامپ می‌شود (۳۲). این یافته‌ها با نتایج مطالعه‌ی حاضر که افزایش بیان ژن های Nrf, Sod1 و Hmx1 را در گروه های دریافت‌کننده سینئول و محیط غنی‌شده گزارش کرده، کاملاً هم‌خوانی داشت.

علاوه بر این یافته‌های این پژوهش با مرور سیستماتیک Ramos و همکاران که نشان دادند محیط‌های غنی‌شده موجب بهبود تعادل اکسیداتیو مغز، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش شاخص‌های آسیب سلولی در مدل‌های حیوانی می‌شوند، هم‌راستا هستند (۴۷).

بنابراین، می‌توان گفت که مطالعه حاضر با تلفیق دو مداخله‌ی غیر دارویی مؤثر (محیط غنی‌شده و سینئول) در یک مدل پیچیده از چاقی و مواجهه با آکریل‌آمید، گامی فراتر از مطالعات پیشین برداشته و شواهد تجربی قوی‌تری برای اثربخشی این ترکیب ارائه داده است. این هم‌راستایی با مطالعات گذشته، اعتبار نتایج را تقویت کرده و زمینه‌ساز توسعه‌ی راهکارهای کم‌عارضه برای مقابله با آسیب‌های متابولیکی و اکسیداتیو خواهد بود.

یافته‌های حاضر با مطالعه‌ی Zhang و همکاران هم‌راستا بودند که نشان دادند مواجهه با آکریل‌آمید موجب تحریک مسیر Nrf2 و افزایش بیان آنزیم‌های محافظتی در سلول‌های عصبی می‌شود (۸). در مقایسه با مطالعه‌ی An و همکاران که اثر سینئول را در بهبود علائم شبه آلزایمر ناشی از محصولات گلیکاسیون پیشرفته (Advanced Glycation End products) AGEs در موش های چاق بررسی کرده بود (۳۳). در این مطالعه مشخص گردید که میزان بیان ژن GSK-3 β و BACE-1 که از ژن‌های دخیل در استرس اکسیداتیو می‌باشد افزایش یافته است (۳۳). از سویی، An و همکاران در این مطالعه نشان دادند که مصرف سینئول توانسته است میزان استرس اکسیداتیو و بیان ژن GSK-3 β و BACE-1 بطور معنی‌داری کاهش یابد (۳۳).

کشف تفاوت‌های جنسیتی احتمالی در پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مؤثری ایفا کند. به‌منظور تکمیل داده‌های ژنتیکی، انجام آنالیزهای پروتئینی و سنجش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر SOD, CAT و GPx توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در مجموع، این پژوهش نشان داد که ترکیب فعالیت بدنی در محیط غنی‌شده و سینثول به‌عنوان دو مداخله‌ی غیر دارویی، توانست به‌صورت هم‌افزا پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی سلولی را در برابر آسیب‌های ناشی از چاقی و رژیم‌های غذایی پرخطر تقویت کند. افزایش بیان ژن‌های مرتبط با دفاع اکسیداتیو نشانگر فعال‌سازی مکانیسم‌های حفاظتی بدن در شرایط استرس سلولی بود. این نتایج، چشم‌انداز نوینی برای طراحی مداخلات کم‌عارضه، زیست‌سازگار و کاربردی در پیشگیری و کاهش صدمات متابولیکی ناشی از سبک زندگی ناسالم فراهم می‌سازد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی رشته‌ی علوم ورزشی- فیزیولوژی ورزشی می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) با کد پژوهشیاری ۱۶۲۹۷۶۲۲۶ تصویب و با حمایت مالی دانشجو و دانشگاه به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمات تمامی همکاران تقدیر و تشکر می‌شود.

پژوهش حاضر تأکید بیشتری بر مسیر Nrf2-Sod1-Hmox1 دارد. همچنین با استفاده از مدل ترکیبی رژیم پرچرب و آکرلیل‌آمید، شرایط آسیب‌زاتری برای ارزیابی اثربخشی مداخلات غیر دارویی فراهم شده است. این تفاوت در طراحی مدل، امکان بررسی دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی دفاعی را فراهم کرده و نقش سینثول را در فعال‌سازی مسیرهای آنتی‌اکسیدانی برجسته‌تر می‌سازد.

مزیت این پژوهش، استفاده‌ی همزمان از سه رویکرد مداخله‌ای غیر دارویی (سینثول، محیط غنی‌شده و ورزش) در یک مدل پیچیده از چاقی القاشده، و بررسی دقیق بیان ژن‌های کلیدی دفاع سلولی بوده است. این طراحی چندوجهی نشان‌دهنده‌ی قابلیت تلفیق رویکردهای تغذیه‌ای، زیست‌محیطی و رفتاری برای مقابله با آسیب‌های مزمن متابولیکی است. با این حال، مطالعه‌ی حاضر دارای محدودیت‌هایی نیز بوده است؛ از جمله تمرکز صرف بر موش‌های ماده به‌منظور کنترل رفتارهای پرخاشگرانه، که ممکن است تعمیم‌پذیری یافته‌ها به سایر جنس‌ها را محدود کند. همچنین، بررسی اثرات بلندمدت و دوزهای متفاوت سینثول در کنار تجزیه و تحلیل دقیق‌تر پروتئین‌های مسیر Nrf2 می‌تواند به نتایج جامع‌تری منجر شود.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، انجام مطالعات آینده می‌تواند به روشن‌تر شدن ابعاد مکانیسم‌های مؤثر کمک کند. در این راستا، بررسی دوزهای مختلف و مسیرهای تجویزی جایگزین سینثول با هدف تعیین محدوده بهینه اثرگذاری، بسیار حائز اهمیت است. همچنین، افزودن گروه‌های جنس نر در طراحی آزمایش‌ها می‌تواند در

References

- Ferrante Jr AW. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med* 2007; 262(4): 408-14.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1796-808.
- Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *Int J Mol Sci* 2014; 16(1): 378-400.
- Masschelin PM, Cox AR, Chernis N, Hartig SM. The impact of oxidative stress on adipose tissue energy balance. *Front Physiol* 2020; 10: 1638.
- Vasileva LV, Savova MS, Amirova KM, Dinkova-Kostova AT, Georgiev MI. Obesity and NRF2-mediated cytoprotection: Where is the missing link? *Pharmacol Res* 2020; 156: 104760.
- Ryter SW. Heme oxygenase-1: an anti-inflammatory effector in cardiovascular, lung, and related metabolic disorders. *Antioxidants (Basel)* 2022; 11(3): 555.
- Korac B, Kalezić A, Pekovic-Vaughan V, Korac A, Jankovic A. Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. *Redox Biol* 2021; 42: 101887.
- Zhang L, Gavin T, Barber DS, LoPachin RM. Role of the Nrf2-ARE pathway in acrylamide neurotoxicity. *Toxicol Lett* 2011; 205(1): 1-7.
- Giudice A, Montella M. Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention. *Bioessays* 2006; 28(2): 169-81.
- Liu T, Shang J, Chen Q. Superoxide Dismutases in Immune Regulation and Infectious Diseases. *Antioxidants (Basel)* 2025; 14(7): 809.
- Trist BG, Hilton JB, Hare DJ, Crouch PJ, Double KL. Superoxide dismutase 1 in health and disease: how a frontline antioxidant becomes neurotoxic. *Angew Chem Int Ed Engl* 2021; 60(17): 9215-46.
- Campbell NK, Fitzgerald HK, Dunne A. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1. *Nat Rev Immunol* 2021; 21(7): 411-25.
- Xia Y, Zhai X, Qiu Y, Lu X, Jiao Y. The Nrf2 in obesity: A friend or foe? *Antioxidants (Basel)* 2022; 11(10): 2067.
- Marcon M, Mocelin R, Sachett A, Siebel AM, Herrmann AP, Piatto A. Enriched environment prevents oxidative stress in zebrafish submitted to unpredictable chronic stress. *PeerJ* 2018; 6: e5136.
- Queen NJ, Hassan QN, Cao L. Improvements to healthspan through environmental enrichment and

- lifestyle interventions: where are we now? *Front Neurosci* 2020; 14: 605.
16. Ratuski AS, Weary DM. Environmental enrichment for rats and mice housed in laboratories: a metareview. *Animals (Basel)* 2022; 12(4): 414.
 17. Love CJ, Gubert C, Renoir T, Hannan AJ. Environmental enrichment and exercise housing protocols for mice. *STAR Protoc* 2022; 3(4): 101689.
 18. Meng Q, Su C-H. The impact of physical exercise on oxidative and nitrosative stress: balancing the benefits and risks. *Antioxidants (Basel)* 2024; 13(5): 573.
 19. Kempermann G. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nat Rev Neurosci* 2019; 20(4): 235-45.
 20. Vaquero-Rodríguez A, Ortuzar N, Lafuente JV, Bengoetxea H. Enriched environment as a nonpharmacological neuroprotective strategy. *Exp Biol Med (Maywood)* 2023; 248(7): 553-60.
 21. Marcon M, Mocelin R, Benvenuti R, Costa T, Herrmann AP, de Oliveira DL, et al. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. *J Exp Biol* 2018; 221(4): jeb176735.
 22. Xu Y-q, Chen Y, Xing J-x, Yao J. Relationship between enriched environment and neurodegeneration: a review from mechanism to therapy. *Clin Epigenetics* 2025; 17(1): 13.
 23. de Cássia da Silveira e Sá R, Andrade LN, De Sousa DP. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* 2013; 18(1): 1227-54.
 24. Santos F, Rao V. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res* 2000; 14(4): 240-4.
 25. Juergens UR, Dethlefsen U, Steinkamp G, Gillissen A, Repges R, Vetter H. Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respir Med* 2003; 97(3): 250-6.
 26. Ahmad I, Hasan M, Bhowmik DR, Begum R, Roy S, Islam MM, et al. Modulation of adiposity and adipocyte inflammation by methanol extracts of *Alpinia calcarata* leaf in high-fat-diet induced-obese mice: Involvement of COX-2 and PPAR- γ . *Heliyon* 2025; 11(2): e41949.
 27. Hoch CC, Petry J, Griesbaum L, Weiser T, Werner K, Ploch M, et al. 1, 8-cineole (eucalyptol): A versatile phytochemical with therapeutic applications across multiple diseases. *Biomed Pharmacother* 2023; 167: 115467.
 28. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2020; 40(9): 1769-77.
 29. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123(11): 1939-51.
 30. Wang L, Liu Y, Gao H, Ge S, Yao X, Liu C, et al. Chronotoxicity of acrylamide in mice fed a high-fat diet: the involvement of liver CYP2E1 upregulation and gut leakage. *Molecules* 2023; 28(13): 5132.
 31. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007; 15(4): 798-808.
 32. Wu W, Wang D, Shi Y, Wang Y, Wu Y, Wu X, et al. 1, 8-Cineole Alleviates Hippocampal Oxidative Stress in CUMS Mice via the PI3K/Akt/Nrf2 Pathway. *Nutrients* 2025; 17(6): 1027.
 33. An F, Bai Y, Xuan X, Bian M, Zhang G, Wei C. 1, 8-Cineole ameliorates advanced glycation end products-induced Alzheimer's disease-like pathology in vitro and in vivo. *Molecules* 2022; 27(12): 3913.
 34. Deacon RM. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments. *Nat Protoc* 2006; 1(2): 936-46.
 35. Banjanin S, Mrosovsky N. Preferences of mice, *Mus musculus*, for different types of running wheel. *Lab Anim* 2000; 34(3): 313-8.
 36. Van Loo PL, Blom HJ, Meijer MK, Baumans V. Assessment of the use of two commercially available environmental enrichments by laboratory mice by preference testing. *Lab Anim* 2005; 39(1): 58-67.
 37. Kostomitsopoulos NG, Paronis E, Alexakos P, Balafas E, van Loo P, Baumans V. The influence of the location of a nest box in an individually ventilated cage on the preference of mice to use it. *J Appl Anim Welf Sci* 2007; 10(2): 111-21.
 38. Abedpoor N, Taghian F, Hajibabae F. Physical activity ameliorates the function of organs via adipose tissue in metabolic diseases. *Acta Histochem* 2022; 124(2): 151844.
 39. Haghpour Azad M, Niktab I, Dastjerdi S, Abedpoor N, Rahimi G, Safaeinejad Z, et al. The combination of endurance exercise and SGTC (Salvia-Ginseng-Trigonella-Cinnamon) ameliorate mitochondrial markers' overexpression with sufficient ATP production in the skeletal muscle of mice fed AGEs-rich high-fat diet. *Nutr Metab (Lond)* 2022; 19(1): 17.
 40. Rahimi G, Heydari S, Rahimi B, Abedpoor N, Niktab I, Safaeinejad Z, et al. A combination of herbal compound (SPTC) along with exercise or metformin more efficiently alleviated diabetic complications through down-regulation of stress oxidative pathway upon activating Nrf2-Keap1 axis in AGE rich diet-induced type 2 diabetic mice. *Nutr Metab (Lond)* 2021; 18(1): 14.
 41. Zhang X, Yuan M, Yang S, Chen X, Wu J, Wen M, et al. Enriched environment improves post-stroke cognitive impairment and inhibits neuroinflammation and oxidative stress by activating Nrf2-ARE pathway. *Int J Neurosci* 2021; 131(7): 641-9.
 42. Guo Y-S, Yuan M, Han Y, Shen X-Y, Gao Z-K, Bi X. Effects of enriched environment on microglia and functional white matter recovery in rats with post stroke cognitive impairment. *Neurochem Int* 2022; 154: 105295.
 43. Ray S, Corenblum M, Anandhan A, Reed A, Ortiz F, Zhang D, et al. A role for Nrf2 expression in defining the aging of hippocampal neural stem cells. *Cell Transplant* 2018; 27(4): 589-606.
 44. Chartoumpakis DV, Ziros PG, Psyrogiannis AI, Papavassiliou AG, Kyriazopoulou VE, Sykiotis GP, et al. Nrf2 represses FGF21 during long-term high-fat

- diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 2011; 60(10): 2465-73.
45. Manzo R, Gallardo-Becerra L, Diaz de Leon-Guerrero S, Villaseñor T, Cornejo-Granados F, Salazar-León J, et al. Environmental enrichment prevents gut dysbiosis progression and enhances glucose metabolism in high-fat diet-induced obese mice. *Int J Mol Sci* 2024; 25(13): 6904.
46. da Silva Fidélis DE, De Sousa Fernandes MS, Ramos TL, Gonçalves Silva CB, Perreira AR, de Olivera Nóbrega CG, et al. Three weeks of environmental enrichment enhance hepatic-muscular oxidative balance and decrease interleukin-6 levels in juvenile female C57BL/6 mice. *Front Physiol* 2025; 16: 1626477.
47. Ramos TL, de Sousa Fernandes MS, da Silva Fidélis DE, Jurema Santos GC, Albuquerque RB, Ferreira DJS, et al. The impact of enriched environments on cerebral oxidative balance in rodents: a systematic review of environmental variability effects. *Front Neurosci* 2024; 18: 1366747.

Modulation of the Nrf1/Sod1/Hmox1 Pathway by Cineole Consumption and Exercise in an Enriched Environment Protects the Liver Against Acrylamide Toxicity

Masoud Ardeshirilordejani¹, Farzaneh Taghian², Khosro Jalali Dehkordi³

Original Article

Abstract

Background: Oxidative stress caused by obesity and exposure to acrylamide reduces the ability of antioxidant defenses. This study evaluated the effects of a combined intervention of exercise in an enriched environment and a cineole supplement on the modulation of gene expression in the Nrf2/SOD1/HMOX1 pathway in obese mice induced by a high-fat diet.

Methods: The present study is an experimental, basic study. Fifty-four 6–7-week-old female C57BL/6 mice were randomly divided into 9 groups: control, obese with a high-fat diet containing acrylamide, obese with a high-fat diet without acrylamide, obese with an acrylamide diet and exercise in an enriched environment (8 weeks, 5 days/week, 60–90 min daily, low-moderate intensity), obese with an acrylamide diet and cineole (10 µM administered by oral gavage), obese with an enriched environment, obese with cineole, obese with an acrylamide diet combined with an enriched environment and cineole, and obese with an enriched environment and cineole. The expression of Nrf2/SOD1/HMOX1 genes in the liver was examined by Real-Time qPCR. Data were analyzed via one-way and three-way ANOVA at a significance level of $P < 0.05$.

Findings: Both enriched environment exercise and cineole administration, individually and in combination, significantly increased the expression of these genes ($P < 0.001$). The Nrf2/SOD1/HMOX1 pathway was markedly downregulated in obese mice receiving a high-fat diet containing acrylamide compared to the other groups ($P = 0.001$). In contrast, cineole treatment and enriched environment exercise induced a significant upregulation of these antioxidant genes ($P = 0.001$).

Conclusion: These findings indicate the protective role of cineole and physical activity in modulating oxidative stress and enhancing antioxidant capacity. These two interventions can be proposed as an effective approach in preventing metabolic disorders associated with obesity.

Keywords: Obesity; Physical activity; Oxidative stress; Nrf2; Superoxide dismutase 1; 1,8-Cineole

Citation: Ardeshirilordejani M, Taghian F, Jalali Dehkordi Kh. **Modulation of the Nrf1/Sod1/Hmox1 Pathway by Cineole Consumption and Exercise in an Enriched Environment Protects the Liver Against Acrylamide Toxicity.** J Isfahan Med Sch 2025; 43(833): 1228-40.

1- Department of Sports Physiology, Isf.C., Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2- Professor, Department of Sports Physiology, Isf.C., Islamic Azad University, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Sports Physiology, Isf.C., Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Farzaneh Taghian, Professor, Department of Sports Physiology, Isf.C., Islamic Azad University, Isfahan, Iran; Email: f.taghian@iau.ac.ir