

## تنظیم بیان ژن‌های *Pgc1a/mt-Nd1/ mt-Nd5/Atp5a1* و غلظت ATP در عضله اسکلتی در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲: نقش عصاره‌ی سنجد وحشی و متفورمین به عنوان طب مکمل

کامران صفوی<sup>۱</sup>، فاطمه حاجی بابایی<sup>۲،۳</sup>، نوید عابدپور<sup>۴،۵</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** میتوکندری نقش کلیدی در حفظ هموستاز متابولیسم سلولی دارد. اختلال عملکرد میتوکندری و اختلال در فسفوریلاسیون اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز عضله اسکلتی دیابتی دارد. در این راستا، هدف این مطالعه، بررسی اثر دیابت نوع ۲ بر نشانگرهای میتوکندریایی عضله اسکلتی و مصرف عصاره سنجد وحشی همراه با متفورمین به عنوان طب مکمل می‌باشد.

**روش‌ها:** ۳۰ سر موش C57BL/6 ۶-۷ هفته‌ای به پنج گروه تقسیم شدند: گروه شاهد، گروه مبتلا به دیابت نوع ۲، گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ تحت تیمار با متفورمین، گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ تحت تیمار با عصاره سنجد وحشی، و گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ تحت تیمار با متفورمین و عصاره سنجد وحشی. ژن‌های بدست آمده از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی بدست آمد. برای بررسی بیان ژنها تکنیک Real-Time PCR استفاده شد و بررسی میزان غلظت ATP عضله با استفاده از روش الیزا انجام شد.

**یافته‌ها:** در گروه دیابت نسبت به گروه کنترل بیان ژن‌های *mt-Nd5/Pgc1a/Atp5a1/mt-Nd1* و غلظت ATP کاهش یافت ( $P < 0.001$ ). مصرف عصاره سنجد وحشی و متفورمین بطور جداگانه سطح بیان ژن‌های *Atp5/mt-Nd1/Pgc1a/mt-Nd5* و غلظت ATP را افزایش داد ( $P < 0.001$ ). مصرف همزمان عصاره سنجد وحشی و متفورمین بطور قابل توجهی بیان ژن‌های *Atp5a1/mt-Nd1/Pgc1a/mt-Nd5* و غلظت ATP را افزایش داد ( $P < 0.001$ ).

**نتیجه‌گیری:** عصاره سنجد وحشی و متفورمین می‌تواند شبکه *mt-Nd5/Pgc1a/Atp5a1/mt-Nd1* و میزان غلظت ATP را در بافت عضله تنظیم کند.

**واژگان کلیدی:** سنجد وحشی؛ *Pgc1a*؛ طب مکمل؛ متفورمین؛ بیوانفورماتیک

**ارجاع:** صفوی کامران، حاجی بابایی فاطمه، عابدپور نوید. تنظیم بیان ژن‌های *Pgc1a/mt-Nd1/ mt-Nd5/Atp5a1* و غلظت ATP در عضله اسکلتی در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲: نقش عصاره‌ی سنجد وحشی و متفورمین به عنوان طب مکمل. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۴؛ ۴۳ (۸۴۷): ۱۹۶۶-۱۹۷۷.

که هزینه جهانی دیابت تا سال ۲۰۳۰ تقریباً دو برابر شود و به ۲/۵ تریلیون دلار برسد (۵، ۶). فرض بر این است که چاقی و سبک زندگی بی تحرک از عوامل خطر مهم برای دیابت نوع دوم و مقاومت به انسولین هستند. جهانی شدن و صنعتی شدن روش‌های فرآوری مواد غذایی، میزان ترکیبات پیشرفته گلیکاسیون نهایی (Advanced AGEs (Glycation End-Products) در رژیم غذایی غربی را افزایش داده است (۷). AGEs ها ترکیبات ناهمگنی هستند که عمدتاً از طریق واکنش مایلارد Maillard بین قند و پروتئین یا لیپید در واکنش‌های غیر

### مقدمه

تعداد افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ (T2DM) در سال ۲۰۲۰ حدود ۴۴۵ میلیون نفر گزارش شده است و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۵۰ به ۷۳۰ میلیون افزایش یابد (۱، ۲). افزایش خطر ابتلا به T2DM در جمعیت‌های مسن و چاق، همراه با داده‌های اپیدمیولوژیک که افزایش جمعیت‌شناسی سالخورده و چاق را نشان می‌دهد، نیاز به درک عمیق تغییرات مولکولی زیربنایی در این جمعیت دارد (۳). دیابت نوع ۲ نود درصد از تمام موارد دیابت را تشکیل می‌دهد (۴). تخمین زده می‌شود

۱- گروه بیوتکنولوژی گیاهی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.

۲- گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

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

نویسنده‌ی مسؤؤل: نوید عابدپور؛ گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

Email: abedpoor.navid@yahoo.com

نیاز به استفاده از ترکیبات زیست فعال گیاهان دارویی به عنوان طب مکمل و جایگزین در بیماران دیابتی برجسته می گردد. اکثر افراد مبتلا به دیابت از داروهای ژنریک استفاده می کنند و خطرات تداخلات و عوارض جانبی و همچنین مزایای ناشناخته مرتبط با استفاده همزمان CAM وجود دارد (۱۴). نشان داده شده است که افزودن سایر عوامل ضد دیابت به متفورمین اثرات کاهش گلوکز آن را از طریق اقدامات مکمل در مسیرهای متابولیک مختلف افزایش می دهد (۱۵). ترکیب متفورمین با ترکیبات زیست فعال طبیعی به دلیل اثرات بالقوه سودمند بر روی کنترل متابولیک و مشخصات ایمنی از طریق مکانیسم‌های اثر مکمل بالقوه آنها، توجه قابل توجهی را به خود جلب کرده است (۱۶). بهینه سازی خواص فیزیوشیمیایی داروها، بهبود فراهمی زیستی آنها و افزایش اثر بخشی از موضوعات مهم برای محققان داروسازی است. سنجد وحشی حاوی نزدیک به ۲۰۰ ماده مغذی و جزء فعال زیستی است (۱۷). سنجد وحشی یک گیاه دارویی است که حاوی انواع مختلفی از مواد فعال زیستی است. سنجد وحشی حاوی پروتئین ها، فلاونوئیدها، تریپنوئیدها، ویتامین ها و سایر مواد مغذی و مواد فعال زیستی است، و فعالیت ضد سرطانی، تقویت کننده سیستم ایمنی، تنظیم کننده چربی خون، و اثرات ضد التهابی را نشان می دهد. (۱۸). کاروتنوئیدها و ترکیبات پلی فنلی، به ویژه اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها، اجزای اصلی فعال زیستی و آنتی اکسیدانی سنجد وحشی هستند (۱۹، ۲۰).

بر این اساس، با توجه به ارتباط بین اختلالات میتوکندری و ایجاد عوارض دیابت، نقش عصاره سنجد وحشی بر روی نشانگرهای میتوکندری و تولید ATP در موش های مبتلا به دیابت نوع ۲ مورد بررسی قرار گرفت.

## روش‌ها

### طرح مطالعه

این مطالعه بر اساس اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی توسط کمیته اخلاق 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.

۳۰ سر موش نر C57bl/6 (۶ تا ۷ هفته) از موسسه رویان، اصفهان، ایران تهیه گردید. موش‌ها در لانه حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) قرار گرفتند. موش‌ها در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت چرخه نور تا تاریکی، دمای  $24 \pm 3$  درجه سانتی گراد و رطوبت  $70 \pm 5$ ٪) نگهداری شدند. علاوه بر این، موش‌ها به طور آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. پس از یک هفته سازگاری،

آنزیمی تشکیل می شوند. تعامل بین AGEsها و گیرنده آنها (RAGE) باعث التهاب و افزایش اکسیداتیو استرس می شود که منجر به اختلال عملکرد میتوکندری می شود. میتوکندری، به عنوان یک اندامک حیاتی برای تأمین سطوح کافی ATP جهت رفع نیاز بالای اکسیداتیو عضله اسکلتی، یکی از مکان‌های اصلی تحت تاثیر در شرایط T2DM، است (۸). در دو دهه گذشته، این فرضیه مطرح شده است که دیابت نوع ۲ با کاهش عملکرد میتوکندری در عضله اسکلتی ایجاد می شود (۹). هیپرگلیسمی و دیابت نوع ۲ ارتباط مستقیمی با استرس اکسیداتیو دارند. در واقع، تولید بالای گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و تغییر متعاقب آن در حالت ردوکس و هموستاز سلولی در دیابت نوع ۲ توصیف شده است. میتوکندری ها یکی از منابع اصلی ROS و محل اصلی تولید ATP هستند. هنگامی که سطح گلوکز بالا باشد، میتوکندری تولید ROS را افزایش می دهد و در نتیجه باعث ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب بافت می شود. این اندامک ها انعطاف پذیری بالایی دارد و تحت تاثیر فرآیندهای دینامیکی مانند همجوشی و شکافت میتوکندری، میتوفاژی و بیوژنز میتوکندری قرار می گیرند. بنابراین، دیابت نوع ۲ با اختلال عملکرد میتوکندری، تولید بالای گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و سطوح پایین ATP مشخص می شود. بیوژنز میتوکندری به تعدیل تعادل انرژی کمک می کند و تصور می شود افزایش تولید ROS توسط زنجیره انتقال الکترون در شرایط هیپرگلیسمی باعث تشدید مسیرهای پاتولوژیک می شود. بنابراین کیفیت میتوکندری نیازمند کنترل ویژه است. مکانیسم های مختلفی توسط میتوکندری ها برای کنترل هموستاز آنها استفاده شده است. به عنوان مثال، همجوشی و شکافت میتوکندری، کلیدی برای ترمیم اجزای آسیب دیده میتوکندری است، که امکان تبادل مواد بین میتوکندری آسیب دیده و غیر آسیب دیده از طریق فرآیند همجوشی، یا جداسازی اجزای آسیب دیده از طریق فرآیند شکافت را فراهم می کند (۱۰، ۱۱).

متفورمین که با نام تجاری گلوکوفاز فروخته می شود، از جمله داروهای خط اول اصلی برای درمان دیابت نوع ۲، به ویژه در افرادی است که اضافه وزن دارند (۱۲). با این حال، شواهد نشان داده است که درمان با متفورمین با عوارض جانبی دستگاه گوارش همراه است. از سوی دیگر، درمان طولانی مدت متفورمین ممکن است منجر به شیوع بیماری های دیگر مانند نوروپاتی محیطی می شود. مطالعات حاکی از کاهش برون ده گلوکز کبدی در اثر مصرف متفورمین است و ممکن است با اختلال عملکردی و آنزیمی در کبد همراه باشد (۱۳). بر این اساس، طب مکمل و جایگزین (Complementary and alternative medicine) به عنوان گروهی از شیوه‌های پزشکی و بهداشتی متنوع تعریف می شود. درمان های مختلف موجود برای دیابت نوع ۲ شامل اصلاح سبک زندگی در رژیم غذایی، ورزش و گیاهان دارویی است. در نتیجه،

مطالعات دیابت بر روی عضله اسکلتی در پایگاه داده جنو GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) مرور گردید تا لیستی از ژن‌های مهم با بیان متفاوت در وضعیت دیابت نوع ۲ و اثر آن بر روی متابولیسم عضله اسکلتی مشخص گردد. در این بررسی، GSE179718 برای تجزیه و تحلیل تفاوت قابل توجه بیان ژن‌ها در متابولیسم عضله اسکلتی، با در نظر گرفتن نمونه‌های عضله اسکلتی-دیابت نوع ۲ نسبت به نمونه‌های عضله اسکلتی-کنترل انتخاب گردید. از این رو، تجزیه و تحلیل مجموعه داده ریزآرایه در نرم‌افزار زبان برنامه‌نویسی آماری R انجام و خروجی‌ها به صورت نمودار نقشه حرارتی با امتیاز بیان معنی‌دار  $P < 0.001$  مشخص گردید.

در ادامه، شبکه برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین Protein-protein Interaction (PPI) از پروتئین‌های بدست آمده با تفاوت قابل توجه در بیان ژن‌ها با در نظر گرفتن  $p < 0.05$  و حد آستانه تغییرات بیان ژن در پایگاه داده استرینگ STRING و نرم‌افزار سایتو اسکپ CytoScape طراحی گردید (۲۱، ۲۲). با استفاده از نرم افزار سایتو اسکپ در قسمت پارامترهای شبکه میزان درجه=۵، مرکزیت Betweenness = ۰/۰۰۵ و مرکزیت نزدیکی Closness = ۰/۲، تنظیم گردید. در این مطالعه یک شبکه تعاملات پروتئین-پروتئین از ژن‌های هاب در ارتباط با اختلال متابولیسم عضله اسکلتی ناشی از دیابت نوع ۲ ایجاد گردید تا ژن‌های حیاتی و پروتئین نقطه برش را در مرحله بعدی مشخص گردد. بر اساس داده کاوی و بررسی مطالعات، ژن‌هایی با بالاترین مرکزیت بین و بیشترین درجه در این شبکه را به عنوان پروتئین هدف برای رویکردهای درمانی مشخص شد.

موش‌ها به پنج گروه (در هر گروه ۶ سر) تقسیم شدند:

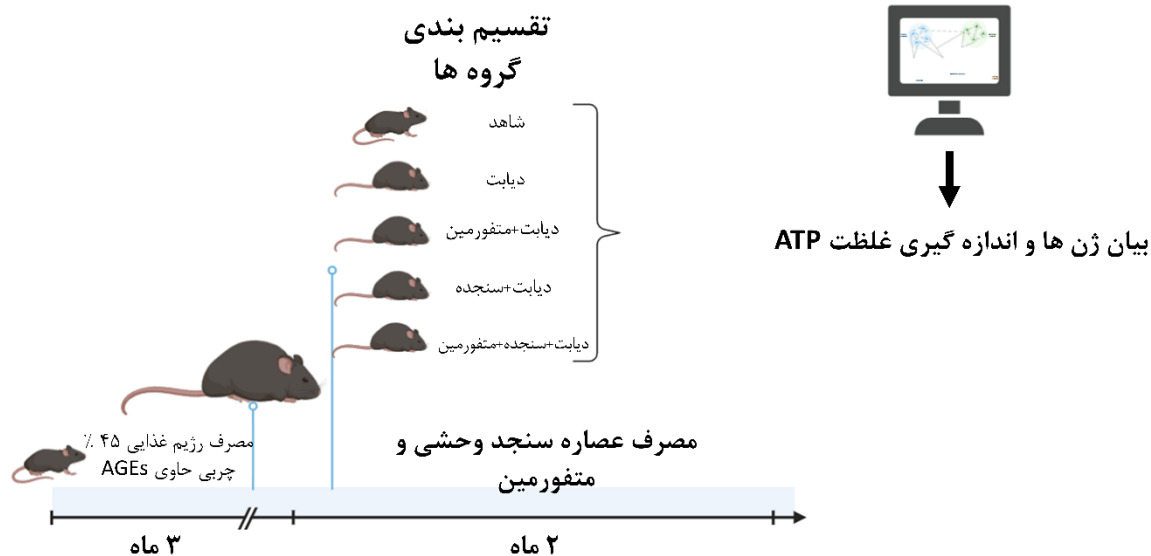
۱. گروه شاهد، ۲. گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ القا شده توسط مصرف رژیم غذایی ۴۵ درصد چربی و فراوری شده به مدت ۳ ماه، (مبتلا به دیابت)، ۳. گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ تحت تیمار با متفورمین با دوز مصرفی بهینه ۳۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت هشت هفته (دیابت+متفورمین)، ۴. گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ تحت تیمار با عصاره سنجد و حشی با دوز مصرفی بهینه ۳۰۰ میلی‌گرم/میلی لیتر به مدت هشت هفته (دیابت+سنجد و حشی)، ۵. گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ تحت تیمار با متفورمین و عصاره سنجد و حشی به مدت هشت هفته (دیابت+متفورمین+سنجد و حشی). در شکل شماره یک طراحی مطالعه و گروه بندی نشان داده شده است. در شکل شماره یک طراحی مطالعه و گروه بندی نشان داده شده است.

پس از هشت هفته از القای دیابت نوع ۲ و تیمار گروه‌ها با متفورمین و عصاره سنجد و حشی، هر گروه بوسیله تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، وزن بدن هر موش) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، وزن بدن هر موش) بیهوش شدند. خونگیری مسقیم از بافت قلب برای بدست آوردن سرم و جداسازی بافت عضله با رعایت پروتکل‌های بهداشتی انجام گرفت. لازم به ذکر است که بافت عضله و سرم جمع‌آوری با رعایت زنجیره دمایی سرد و ایمنی زیستی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پزشکی منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد برای سنجش تجربی بیشتر نگهداری شدند.

### پیش بینی ژنتیکی بر اساس تجزیه و تحلیل ژنتیکی

نزدیک‌ترین مجموعه داده ترانسکریپتوم Transcriptome به

### آنالیز بیوانفورماتیک و طراحی دارو



شکل ۱. طراحی مطالعه و گروه بندی

## الفای دیابت نوع ۲

به غیر از گروه شاهد که رژیم غذایی نرمال مصرف کرده است، گروه های دیگر به مدت سه ماه از رژیم غذایی ۴۵ درصد چربی فرآوری شده مصرف کردند. رژیم غذایی فرآوری شده بر اساس دستورالعمل استفاده از رژیم غذایی ۴۵ درصد چربی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و رطوبت ۳۰ درصد آماده گردید (۹، ۲۳).

## مصرف متفورمین

متفورمین به میزان ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش، بصورت روزانه (پنج روز در هفته) و بمدت هشت هفته بوسیله گاوآژ به حیوانات مدل تجویز شد (۹).

## آماده سازی سنجد وحشی

استخراج عصاره سنجد وحشی مطابق با روش های توصیف شده قبلی انجام شد (۲۴). به طور خلاصه، ابتدا سنجد وحشی سه بار (هر کدام ۶ ساعت) در اتر، دمای ۷۰ درجه سانتیگراد جوشانده شد. سپس در یک کابینت تهویه در هوای اتاق خشک شد و با ۷۰۰ میلی لیتر لتانول در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد چهاربار (هر بار ۲ ساعت) آنکوبه شده تا کل فلاون های خام استخراج شود. سپس کل فلاونوئیدهای خام به یک ستون رزین ماکرو متخلخل D101 منتقل و با اتانول از ۳۰۰ میلی لیتر در لیتر تا ۵۰۰ میلی لیتر در لیتر با سرعت ۲ میلی لیتر در دقیقه شسته شد (۲۴، ۲۵).

## مصرف سنجد وحشی

عصاره سنجد وحشی به میزان ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش بصورت روزانه (پنج روز در هفته) و بمدت هشت هفته بوسیله گاوآژ به حیوانات مدل تجویز شد (۲۴).

## اندازه گیری میزان غلظت گلوکز و انسولین

به منظور اندازه گیری سطح گلوکز، موش ها به مدت ۶ ساعت در حالت ناشتا نگهداری شدند و سطح گلوکز توسط گلوکومتر (Alpha TRAK2 USA)، از خون گرفته شده از ورید دم اندازه گیری شد (۹، ۲۳، ۲۶). سطح انسولین سرم توسط کیت انسولین فوق حساس الایزا موش (90080 crystal-chem، USA) طبق دستورالعمل سازنده اندازه گیری شد.

## استخراج RNA و سنجش تغییرات بیان ژن

استخراج RNA تام از بافت عضله اسکلتی با استفاده از محلول استخراج ترایزول (TRIZol، Thermo Scientific)، ایالات متحده آمریکا) و بر اساس دستورالعمل سازنده انجام شد. سنتز cDNA توسط کیت (TaKaRa، Kusatsu، Shiga Prefecture، Japan) بر اساس دستورالعمل سازنده آماده شد. بیان ژن های مورد نظر با استفاده از دستگاه Rotor-Gene 6000 (شرکت Corbett Life Science، Mortlake، استرالیا) و با بهره گیری از ترکیب آماده و بهینه شده SYBR Green (ساخت شرکت TaKaRa، ژاپن) انجام شد. ارزیابی بیان ژن ها با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  انجام گرفت. *18s rRNA* به عنوان ژن مرجع (کنترل داخلی) به منظور تعیین کمیت نسبی، استفاده شد. توالی پرایمرهای طراحی شده در نرم افزارهای oligo 7 و Beacon Designer 7 در جدول ۱ گزارش شده است. همچنین برنامه دمایی و زمانی اجرا شده جهت بررسی بیان ژن ها بر اساس شکل ۲ بوده است.

## اندازه گیری غلظت ATP از بافت عضله

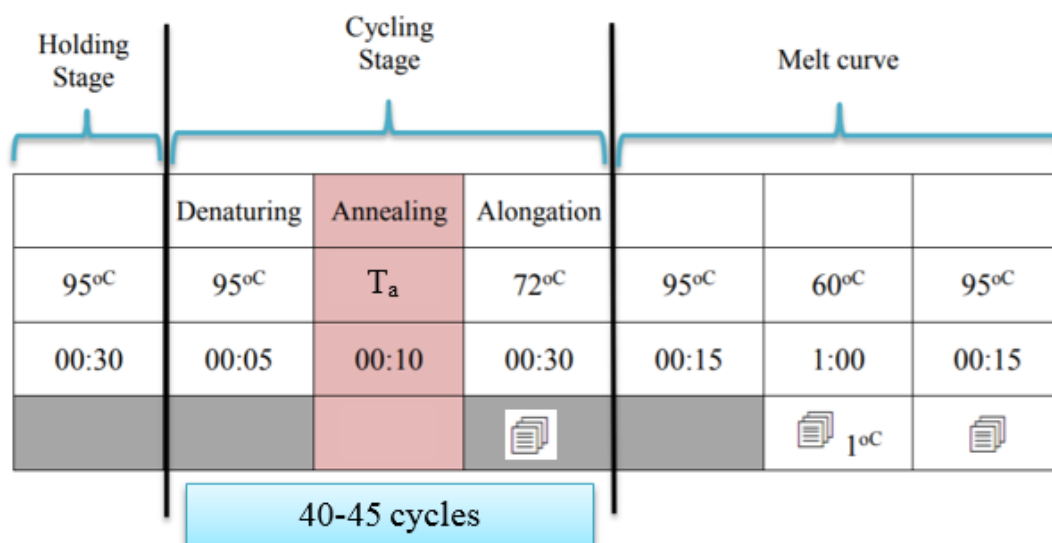
اندازه گیری غلظت ATP توسط کیت رنگ سنجی/فلورومتريک سنجش ATP (Abcam، ab83355، ایالات متحده آمریکا) طبق پروتکل سازنده انجام شد. به طور خلاصه، نزدیک به ۱۰ میلی گرم از عضله اسکلتی در PBS سرد شسته شد و در ۱۰۰ میکرولیتر اسید پرکلریک به منظور پروتئین زدایی بافت همگن شد. اسید پرکلریک با مقدار مناسب KOH خنثی شد. pH در طول فرآیند خنثی سازی برای رسیدن به محدوده pH برابر ۷/۵-۸ کنترل شد. نمونه های آزمایش و کنترل پس زمینه در پلیت ۹۶ چاهی طبق پروتکل سازنده برای سنجش رنگ سنجی تهیه شد. در نهایت، صفحه توسط صفحه خوان در OD 570 نانومتر خوانده شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

داده های ارائه شده در این مطالعه با میانگین و انحراف معیار نشان داده شد. تجزیه و تحلیل واریانس توسط نرم افزار GraphPad Prism (نسخه ۹، Graph Pad Software Inc.، La Jolla، CA) انجام شد. نرمال سازی توزیع متغیرها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk انجام شد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای (پرایمرهای) ژن های منتخب به همراه ژن ژن مرجع (کنترل داخلی)

GENE	FORWARD PRIMER (5'-3')	REVERSE PRIMER (5'-3')	ANNEALING TEMPRETURE (°C)
<i>Pgc1<math>\alpha</math></i>	GAATCAAGCCACTACAGACACCG	CATCCCTCTTGAGCCTTTCGTG	۶۰
<i>mt-Nd1</i>	GACAGAAGGAGAATCAGAATTAG	ATAGTTGTTAGGGCGTTTATTAG	۵۸
<i>mt-Nd5</i>	ATTGCCTTCTCTACATCAAGC	GATGCTTGTTCGTCTGCC	۵۸
<i>Atp5a1</i>	TCCGCTTACATTCCAACA	ACACAGACAAACCCACAT	۵۴
18S rRNA	CGGACACGGACAGGATTG	TCGCTCCACCAACTAAGAAC	۶۰



شکل ۱. برنامه دمایی و زمانی روش Real Time PCR

مرور مسیرهای پیام‌رسانی مولکولی دریافتیم که *Atp5a1* با بیشترین مرکزیت در شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین، یکی از نقاط برش بالقوه است و ممکن است پروتئین هدف به عنوان رویکرد درمانی جدید در دیابت نوع ۲ و بیماری‌های متابولیسم عضله اسکلتی باشد. در این مطالعه ژن‌های با بالاترین درجه و مرکزیت بینایی در شبکه ژنی حاصل از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی شامل *Atp5a1*، *mt*، *Nd5*، *mt-Nd1*، *Pgc1a*، به عنوان ژن‌های کلیدی در ارتباط متقابل دیابت و متابولیسم عضله اسکلتی مورد ارزیابی با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی Real Time PCR قرار داده شدند.

#### کاهش غلظت گلوکز و انسولین در اثر مصرف متفورمین و

##### عصاره سنجد وحشی:

میزان غلظت گلوکز و انسولین در گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است. در این مطالعه مشخص گردید، میزان غلظت گلوکز و انسولین همانطور که مورد انتظار بود در گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ تحت تیمار با متفورمین (دیابت+متفورمین) بطور معناداری نسبت به گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ کاهش یافته است. از سویی، مصرف ۳۰۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر عصاره سنجد وحشی به مدت هشت هفته (گروه دیابت+سنجد وحشی) سبب کاهش معنی‌داری نسبت به گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ شده است. اگر چه تفاوت معناداری بین گروه‌های دیابت+متفورمین و دیابت+سنجد وحشی مشاهده نشده است. از سویی، در این مطالعه تأثیر مصرف همزمان متفورمین و عصاره سنجد وحشی (دیابت+متفورمین+سنجد وحشی) مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها نشان داد که میزان غلظت گلوکز و انسولین بطور معناداری نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافته است (جدول ۲).

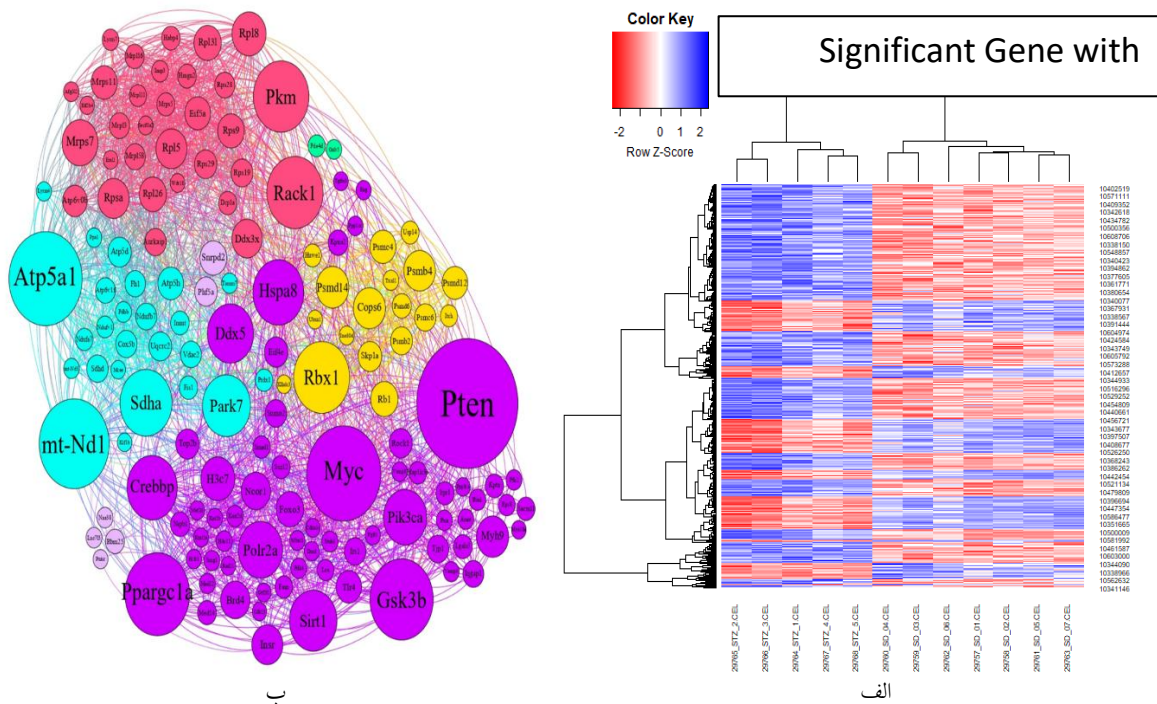
که نشان داد متغیرها توزیع نرمال را نشان می‌دهند. داده‌ها تحت تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) قرار گرفتند و از آزمون تعقیبی Tukey برای محاسبه مقایسه‌های چندگانه استفاده شد. نتایج به عنوان میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد نشان داده شد، و تفاوت در  $P < 0/01$  نشان‌دهنده معنی‌داری در تمام تحلیل‌ها بود.

#### یافته‌ها

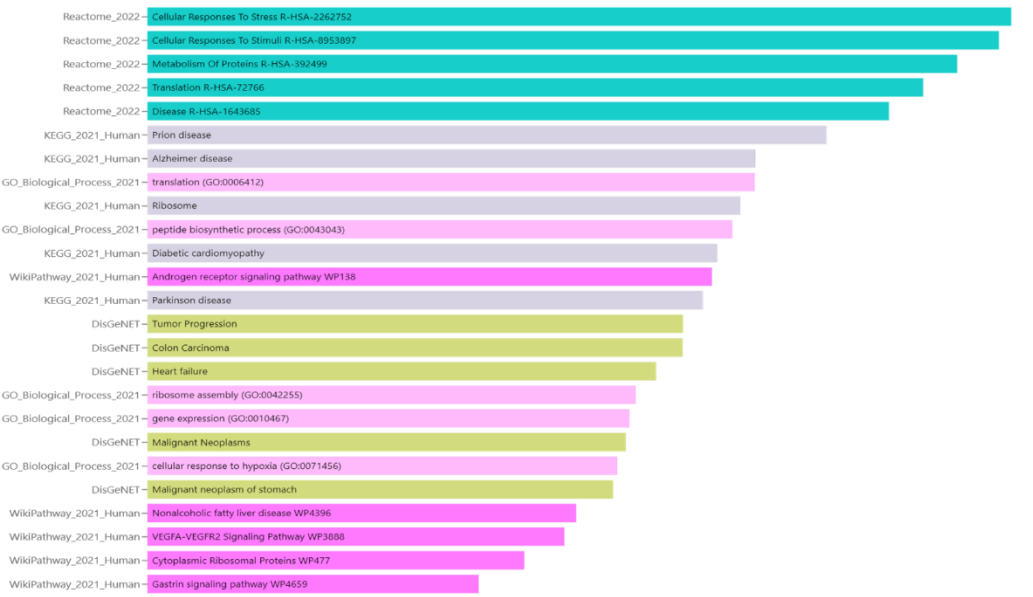
##### نتایج رویکرد زیست‌شناسی سیستمی

بر اساس خروجی نرم‌افزار برنامه‌نویسی آماری R، از تجزیه و تحلیل مجموعه داده ریزآرایه بیماری‌های متابولیسم عضله اسکلتی در وضعیت دیابت نوع ۲، ۱۱۷۰ ژن با بیان تفاوت معنی‌داری با در نظر گرفتن  $P < 0/05$  در متابولیسم عضله اسکلتی ناشی از دیابت نسبت به وضعیت کنترل پیدا شد. از این رو، ژن‌های با بیان متفاوت قابل توجه، با در نظر گرفتن حد آستانه معنی‌داری  $P < 0/001$  در نمودار نقشه حرارتی نشان داده شده است (شکل ۳. الف).

یک شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین برای ژن‌های با بیان متفاوت قابل توجه طراحی و پس از اعمال پارامترهای شبکه در سایتواسکیپ، ۱۴۵ ژن به عنوان ژن‌های هاب مشخص شد (شکل ۳. ج). غنی‌سازی و داده‌کاوی ژن‌های هاب نشان می‌دهد که مسیر پیام‌رسانی استرس اکسیداتیو، و پاسخ‌های سلولی به استرس، مسیر پیام‌رسانی متابولیسم پروتئین‌ها و بیوسنتز پپتیدها، مسیر پیام‌رسانی سر هم شدن ریبوزوم‌ها و فرایند ترجمه و کاربومیوپاتی دیابتی و بیماری‌های پیش‌رونده عصبی، مسیرهای پیام‌رسانی مولکولی حیاتی مرتبط با این ژن‌های هستند. بر اساس خروجی‌های غنی‌سازی و



ب

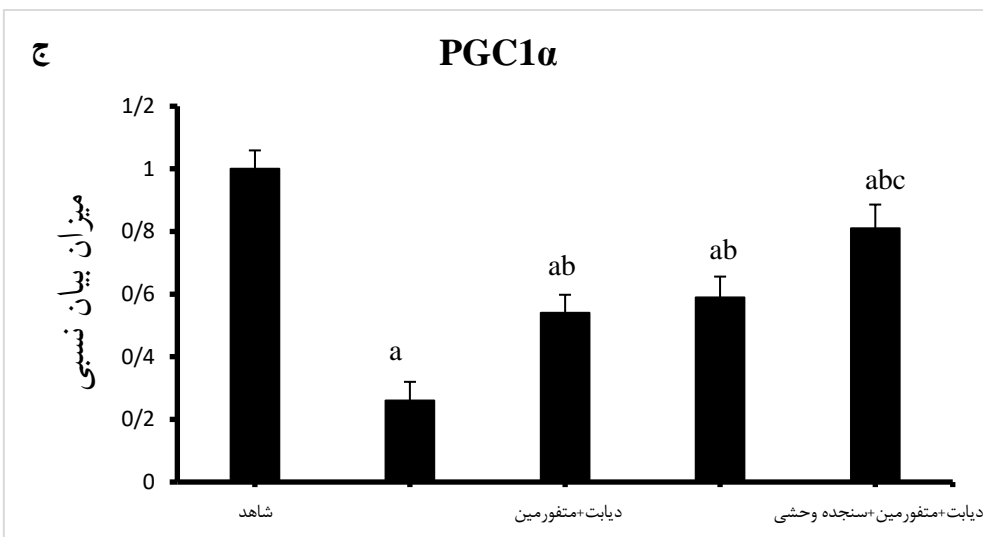
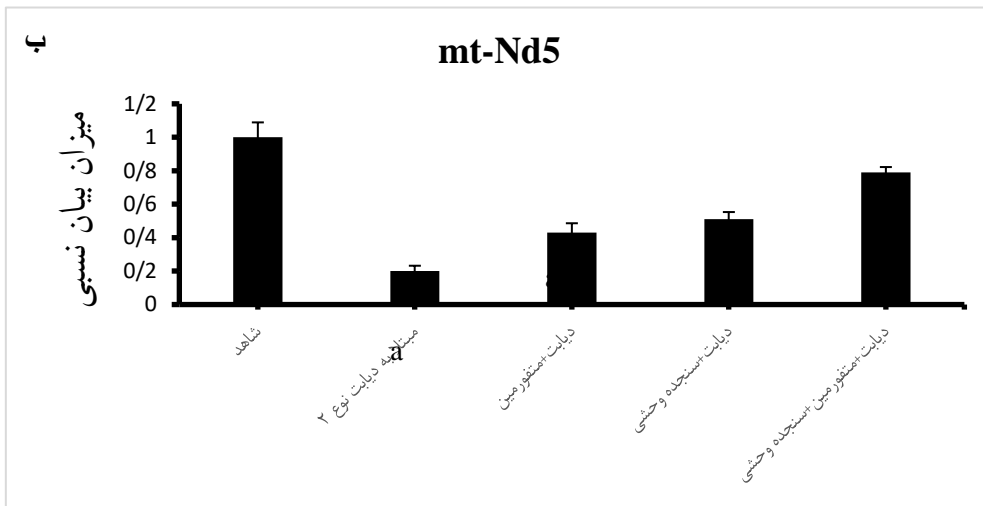
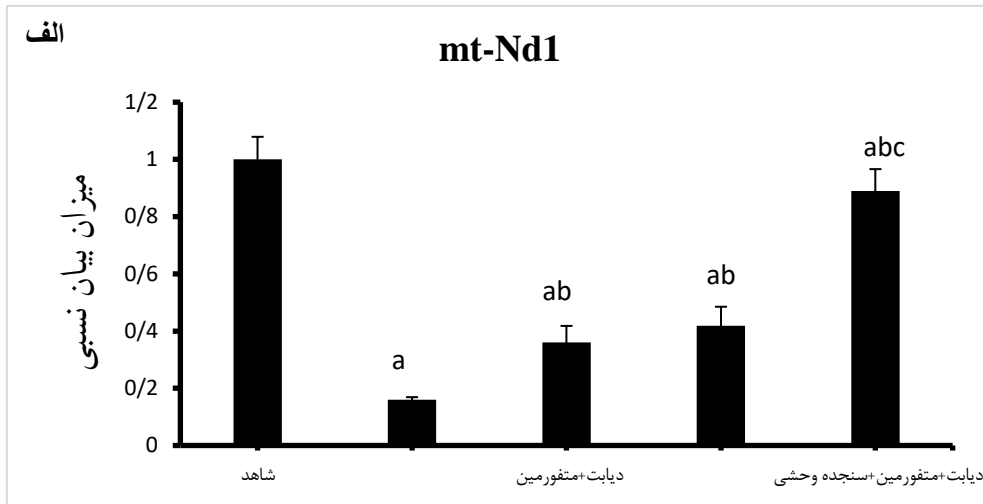


ج

شکل ۳: الف، نقشه حرارتی بیان ژن‌های نمونه‌های مرتبط با دیابت نوع ۲ در مقایسه با نمونه‌های سالم، ب، داده کاوی مسیرهای دخیل در دیابت نوع ۲، ج، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی.

تعدیل میزان بیان ژن‌های *Pgc1α-mt-Nd1-mt-Nd5* از طریق مصرف متفورمین و عصاره سنجد وحشی در بافت عضله اسکلتی موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲: میزان بیان ژن‌های *mt-Nd5/Pgc1α/mt-Nd1* در گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است (شکل ۴، الف و ب،  $P < 0.001$ ). نتایج نشان داده است که میزان بیان ژن‌های *mt-*

در اثر مصرف متفورمین *Nd5/Pgc1α/mt-Nd1/Atp51a* (دیابت+متفورمین،  $P < 0.001$ ) و مصرف عصاره سنجد وحشی (گروه دیابت+سنجد وحشی،  $P < 0.001$ ) بطور معناداری سبب افزایش بیان ژن‌های *Pgc1α-mt-Nd1-mt-Nd5* نسبت به گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ شده است. علاوه بر این، مصرف همزمان متفورمین و عصاره سنجد وحشی (دیابت+متفورمین+سنجد وحشی) بطور



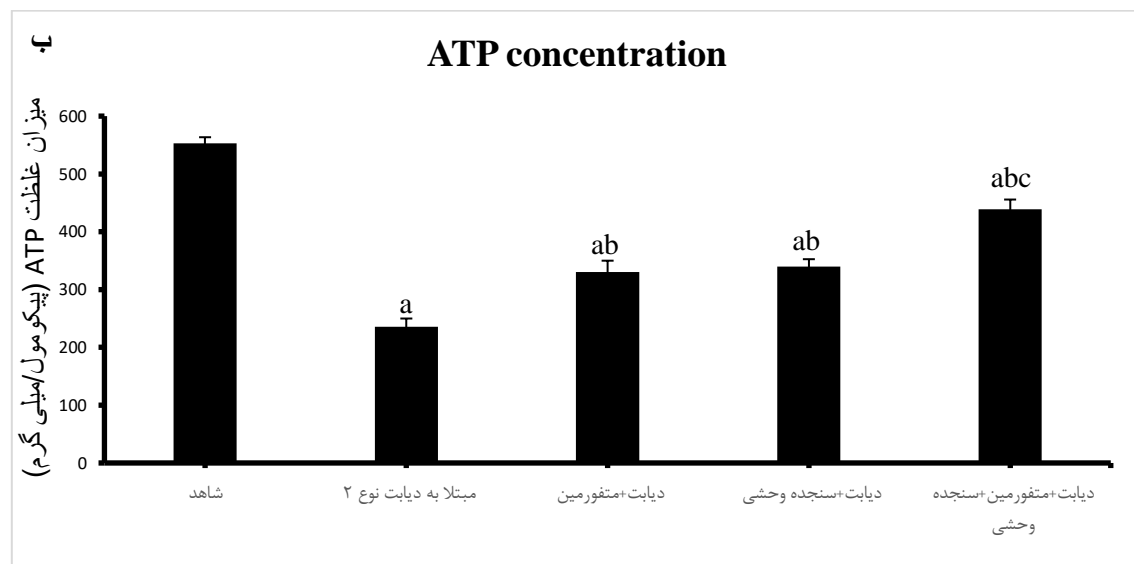
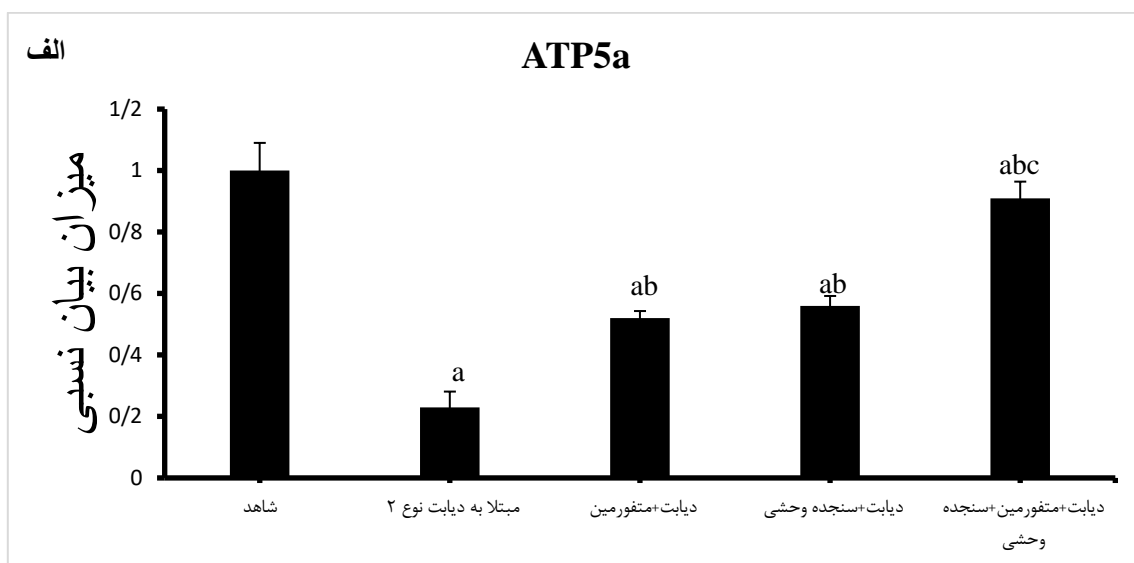
شکل ۴. میزان تغییرات بیان mRNA در بافت عضله اسکلتی. الف، میزان بیان نسبی ژن *mt-Nd1*. ب، میزان بیان نسبی ژن *mt-Nd5*. ج، میزان بیان نسبی ژن *PGC1 $\alpha$* . ا نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه کنترل و سایر گروه‌ها می‌باشد. ب نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ و سایر گروه‌ها می‌باشد. c نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه دیابت+متفورمین+سنجد وحشی با گروه‌های دیابت+متفورمین و دیابت+سنجد وحشی می‌باشد.

*ATP5a* و میزان غلظت ATP در بافت عضله اسکلتی موش های مبتلا به دیابت نوع ۲ که توسط متفورمین (دیابت+متفورمین،  $P < 0/001$ ) و عصاره سنجد وحشی (گروه دیابت+سنجد وحشی،  $P < 0/001$ ) تیمار شده اند بطور معناداری افزایش یافته است. علاوه بر این، مصرف همزمان متفورمین و عصاره سنجد وحشی (دیابت+متفورمین+سنجد وحشی) بطور معناداری سبب افزایش میزان نسبی بیان ژن *ATP5a* و میزان غلظت ATP در بافت عضله اسکلتی در موش های مبتلا به دیابت نوع ۲ شده است.

معناداری سبب افزایش میزان نسبی بیان ژن های *mt-Nd5/Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd1* در موش های مبتلا به دیابت نوع ۲ شده است.

### افزایش میزان بیان ژن *ATP5a* و میزان غلظت ATP از طریق مصرف متفورمین و عصاره سنجد وحشی در بافت عضله اسکلتی موش های مبتلا به دیابت نوع ۲:

میزان بیان ژن *ATP5a* و میزان غلظت ATP در بافت عضله اسکلتی موش های مبتلا به دیابت نوع ۲ نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است (شکل ۵. الف و ب،  $P < 0/001$ ). نتایج نشان داده است که میزان بیان ژن



شکل ۵. میزان تغییرات بیان mRNA در بافت عضله اسکلتی. الف، میزان بیان نسبی ژن *ATP5a*. ب، میزان غلظت ATP.

a نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه کنترل و سایر گروه ها می باشد. b نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ و سایر گروه ها می باشد. c نشانگر تفاوت معنی دار بین گروه دیابت+متفورمین+سنجد وحشی با گروه های دیابت+متفورمین و دیابت+سنجد وحشی می باشد.

جدول ۲. تغییرات میزان وزن، غلظت گلوکز و انسولین غلظت گلوکز و انسولین در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ و گروه‌های تحت تیمار

گروه	میانگین و انحراف معیار وزن	P	میانگین و انحراف معیار انسولین	P	میانگین و انحراف معیار گلوکز	P
شاهد	۲۵.۸۹±۰.۶۵	<۰/۰۵p	۰.۸۹±۰.۰۹	<۰/۰۵p	۹۸.۴±۲.۱	<۰/۰۵p
مبتلا به دیابت	۴۵.۵۱±۱.۴۵	*<۰/۰۵p	۴.۷±۰.۲۹	*<۰/۰۵p	۳۴۲.۲±۸.۵	*<۰/۰۵p
دیابت+متفورمین	۳۶.۷۶±۲.۱۲	@*<۰/۰۵p	۲.۲۹±۰.۱	@*<۰/۰۵p	۲۰۷.۲±۳.۵	@*<۰/۰۵p
دیابت+سنجد و وحشی	۳۷.۲۳±۱.۲۳	@*<۰/۰۵p	۲.۱۸±۰.۱۶	@*<۰/۰۵p	۲۲۱±۴.۴	@*<۰/۰۵p
دیابت+متفورمین+سنجد و وحشی	۲۹.۵۴±۱.۰۶	@#^*<۰/۰۵p	۱.۰۴±۰.۰۵	@#^*<۰/۰۵p	۱۲۱.۵±۲.۷	@#^*<۰/۰۵p

\* نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و سایر گروه‌ها می‌باشد. @ نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه مبتلا به دیابت نوع ۲ و سایر گروه‌ها می‌باشد. # نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه دیابت+متفورمین+سنجد و وحشی با گروه دیابت+متفورمین می‌باشد. ^ نشانگر تفاوت معنی‌دار بین گروه دیابت+متفورمین+سنجد و وحشی با گروه دیابت+سنجد و وحشی می‌باشد.

### بحث

بر اساس نتایج بیوانفورماتیک مشخص گردید که ژن‌های *mt-Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd1/Atp5* دارای نقش مهمی در دیابت نوع ۲ و عوارض عضلانی-اسکلتی ناشی از اختلال در عملکرد میتوکندری هستند. در این مطالعه مشخص گردید که میزان بیان ژنهای *mt-Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd1/Atp5* در بافت عضله در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ کاهش یافته است. همچنین، میزان غلظت ATP در بافت عضله اسکلتی موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است. از سویی، نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژنهای *mt-Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd1/Atp5* و میزان غلظت ATP در بافت عضله اسکلتی موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ که توسط متفورمین (دیابت+متفورمین) و عصاره سنجد و وحشی (گروه دیابت+سنجد و وحشی) تیمار شده‌اند بطور معناداری افزایش یافته است. علاوه بر این، مصرف همزمان متفورمین و عصاره سنجد و وحشی (دیابت+متفورمین+سنجد و وحشی) بطور معناداری سبب افزایش میزان نسبی بیان ژنهای *mt-Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd1/Atp5* و میزان غلظت ATP در بافت عضله اسکلتی در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ شده است.

بسیاری از مطالعات نشان دادند که تغذیه با رژیم غذایی پرچرب منجر به کاهش فعالیت آنزیم اکسیداسیون  $\beta$ ، کاهش بیان پروتئین *Ppargc1 $\alpha$*  به عنوان تنظیم کننده اصلی بیوژنز میتوکندری و کاهش فعالیت آنزیم متابولیسم اکسیداتیو در بیماران دیابتی می‌شود (۲۷، ۲۸). در مقابل، شواهد اخیر نشان داده است که رژیم غذایی پرچرب نه تنها سطح نشانگرهای میتوکندری را کاهش نمی‌دهد، بلکه در واقع آنها را نیز افزایش می‌دهد (۷، ۲۹). در این مطالعه مشخص گردید که رژیم غذایی پرچرب غنی از AGEs سبب کاهش ظرفیت عملکرد میتوکندری می‌گردد. در این مطالعه مشخص شده که میزان بیان ژنهای *mt-Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd1/Atp5* و میزان غلظت ATP در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ ناشی از مصرف رژیم غذایی غنی از

AGEs بطور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است.

متفورمین به دلیل اثرات آن بر متابولیسم و نقش آن در درمان دیابت نوع ۲ به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۰). یکی از مکانیسم‌های عمل آن تأثیر بر روی عملکرد میتوکندری است که می‌تواند منجر به اختلال عملکرد میتوکندریایی گردد (۳۰، ۳۱). مطالعات نشان داده است که متفورمین کمپلکس زنجیره تنفسی I را در میتوکندری مهار می‌کند (۳۱). این مهار باعث کاهش سرعت فسفوریلاسیون اکسیداتیو و کاهش تولید ATP می‌گردد. در نتیجه سبب افزایش نسبت AMP/ATP می‌شود و پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) را فعال می‌کند (۷، ۳۱). در حالی که فعال‌سازی AMPK مزایای متابولیک را افزایش می‌دهد (مانند افزایش جذب گلوکز)، مهار طولانی مدت کمپلکس I می‌تواند در طول زمان به استرس و اختلال عملکرد میتوکندری کمک کند (۷). در مطالعه‌ی حاضر مشخص گردید که متفورمین سبب افزایش بیان ژن‌های *mt-Nd1/Atp5a1/Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd5* نسبت به گروه دیابت شده است. از سویی، مصرف عصاره سنجد و وحشی همانند مصرف متفورمین سبب افزایش بیان ژنهای *mt-Nd1/Atp5a1/Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd5* نسبت به گروه دیابت شده است. در حالیکه، گروه‌های دیابت+متفورمین و دیابت+سنجد و وحشی تفاوت معناداری در بیان ژنهای *mt-Nd1/Atp5a1/Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd5* نسبت به یکدیگر نشان ندادند. با این وجود نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف همزمان متفورمین و عصاره سنجد و وحشی (دیابت+متفورمین+سنجد و وحشی) بطور معناداری سبب افزایش میزان نسبی بیان ژن‌های *mt-Nd1/Atp5a1/Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd5* و میزان غلظت ATP در بافت عضله اسکلتی در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ نسبت به سایر گروه‌های دیگر شده است.

درمان آنتی‌اکسیدانی به عنوان یکی از رویکردهای نوین در آزمایشات مولکولی، پیش‌بالینی و بالینی، به‌طور امیدوارکننده‌ای برای اهداف دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حال حاضر، ترکیبات

بافت‌های قلب و چربی نیز مورد بررسی قرار گیرد. یکی دیگر از محدودیت‌های این مطالعه، تست‌های مرتبط با عملکرد میتوکندری نظیر سنجش نشانگرهای استرس اکسیداتیو و سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی، گلوکاتایون و سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد. علاوه بر این، پیشنهاد می‌گردد جهت بررسی روی عملکرد میتوکندری عضله‌ی اسکلتی روش *High-resolution respirometry* در گروه‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد.

### نتیجه‌گیری

پیشرفت‌های قابل توجهی در درمان دیابت نوع ۲ صورت گرفته است. با این حال، تمرکز فزاینده‌ای بر درمان‌های جایگزین و استفاده از مکمل‌ها در کنار درمان‌های روتین و استاندارد‌های طلایی درمان دیابت نوع ۲ احساس می‌شود. علاوه بر این، ژن‌های هاب شناسایی شده همراه با شاخص‌های تشخیصی و پیش‌آگهی، این پتانسیل را دارند که به عنوان اهداف درمانی و دارویی به منظور ارائه درمانی نوآورانه برای دیابت نوع ۲ عمل کنند. در نتیجه، مصرف عصاره‌ی سنجد و وحشی همراه با متفورمین، سبب بهبود عملکرد عضله و میتوکندری در تولید انرژی در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی رشته بیوتکنولوژی گیاهی می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (خوراسگان) به تصویب رسیده و با حمایت مالی دانشجو و دانشگاه به انجام رسیده است. بدین وسیله از زحمات تمامی همکاران تقدیر و تشکر می‌شود.

فولی مانند فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌ها که منشأ طبیعی دارند و عوارض جانبی کمتری در مقایسه با داروهای شیمیایی از خود بروز می‌دهند، به‌طور گسترده‌ای برای درمان آسیب‌های ناشی از دیابت پیشنهاد می‌شوند (۹). با توجه به این موضوع، درمان ترکیبی با استفاده از گیاهان آنتی‌اکسیدانی و سایر برنامه‌های ضد دیابت، اثرات ترکیبی بیشتری را به نمایش گذاشته است. بنابراین، در این مطالعه نشان داده شد که مصرف عصاره سنجد وحشی سبب فعال‌سازی محور *mt-Nd1/Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd5* و میزان غلظت ATP می‌گردد. دانه‌های سنجد وحشی حاوی فلاونوئیدهای متنوع، عمدتاً گلیکوزیدهای ایزورامنتین، کامفرول، و کورسستین، و همچنین مقادیر کمتری از پروآنتوسیانیدین‌ها و کاتچین، ساپونین‌های تری‌ترپنوئید و تعدادی ترکیبات قطبی و آبگریز ناشناس هستند. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که سنجد وحشی حاوی ترکیبات فعال زیستی مختلفی هستند که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد پلاکت، ضد انعقاد، ضد تومور یا ضد زخم هستند (۳۲-۳۴). با این حال، تعداد مطالعاتی که فعالیت بیولوژیکی سنجد وحشی را بررسی کرده‌اند، هنوز کافی نیست (۳۵). سنجد وحشی سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع مختلف (۴۰ درصد لینولئیک، ۲۰ درصد لینولنیک و ۱۷ درصد اسید اولئیک) هستند و منبع ترکیبات فنلی هستند. یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر، عدم اندازه‌گیری میزان ترکیبات زیست‌فعال در سنجد وحشی می‌باشد. بر این اساس پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی علاوه بر سنجش میزان ترکیبات زیست‌فعال در سنجد وحشی، میزان بیان ریز مولکول‌هایی مانند *microRNAs* و همچنین RNAهای بلند زنجیر غیر کد شونده نیز مورد ارزیابی و بررسی قرار گیرد و اثر مکمل بر روی

### References

1. Federation ID. IDF diabetes atlas. 8th ed. International diabetes federation. 2017. p. 905-11.
2. Guzman-Vilca WC, Carrillo-Larco RM. Number of people with type 2 diabetes mellitus in 2035 and 2050: A modelling study in 188 countries. *Curr Diabetes Rev* 2025; 21(1): E120124225603.
3. Pinti MV, Fink GK, Hathaway QA, Durr AJ, Kunovac A, Hollander JM. Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus: an organ-based analysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019; 316(2): E268-E285.
4. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14(2): 88-98.
5. Bommer C, Sagalova V, Heeseemann E, Manne-Goehler J, Atun R, Bärnighausen T, et al. Global economic burden of diabetes in adults: projections from 2015 to 2030. *Diabetes Care* 2018; 41(5): 963-70.
6. Chen Y, Zhou X, Jiang Z, Liu Y. Gegen Qinlian Decoction combined with Metformin for the treatment of patients with Type-2 Diabetes Mellitus: A retrospective observational study. *Pak J Med Sci* 2023; 39(4): 1108-12.
7. Azad MH, Niktab I, Dastjerdi S, Abedpoor N, Rahimi G, Safaeinejad Z, et al. Correction: 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): 44.
8. Wang Y, Wang J, Tao SY, Liang Z, Xie R, Liu Nn, et al. Mitochondrial damage-associated molecular patterns: A new insight into metabolic inflammation in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2024; 40(2): e3733.
9. 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.
10. Ding W, Yang X, Lai K, Jiang Y, Liu Y. The potential of therapeutic strategies targeting mitochondrial biogenesis for the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Arch Pharm Res* 2024; 47(3): 219-48.
  11. Song J, Wang L, Wang L, Guo X, He Q, Cui C, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate mitochondrial dysfunction in  $\alpha$  cells and hyperglucagonemia in type 2 diabetes via SIRT1/FoxO3a signaling. *Stem Cells Transl Med* 2024; 13(8): 776-90.
  12. Carlson TJ, King SR, Reaven G. From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40(5): 614-7.
  13. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017; 60(9): 1577-85.
  14. Manya K, Champion B, Dunning T. The use of complementary and alternative medicine among people living with diabetes in Sydney. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12: 1-5.
  15. Nauck M, Frid A, Hermansen K, Thomsen A, Doring M, Shah N, et al. Long-term efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride and placebo, all in combination with metformin in type 2 diabetes: 2-year results from the LEAD-2 study. *Diabetes Obes Metab* 2013; 15(3): 204-12.
  16. Alnuaimi S, Reljic T, Abdulla FS, Memon H, Al-Ali S, Smith T, et al. PPAR agonists as add-on treatment with metformin in management of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2024; 14(1): 8809.
  17. Wang K, Xu Z, Liao X. Bioactive compounds, health benefits and functional food products of sea buckthorn: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2022; 62(24): 6761-82.
  18. Kuhkheil A, Naghdi Badi H, Mehrafarin A, Abdossi V. Chemical constituents of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) fruit in populations of central Alborz Mountains in Iran. *Research Journal of Pharmacognosy* 2017; 4(3): 1-12.
  19. Ji M, Gong X, Li X, Wang C, Li M. Advanced research on the antioxidant activity and mechanism of polyphenols from *Hippophae* species—A review. *Molecules* 2020; 25(4): 917.
  20. Teleszko M, Wojdyło A, Rudzinska M, Oszmianski J, Golis T. Analysis of lipophilic and hydrophilic bioactive compounds content in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries. *J Agric Food Chem* 2015; 63(16): 4120-9.
  21. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res* 2023; 51(D1): D638-D46.
  22. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; 13(11): 2498-504.
  23. Haghparast 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.
  24. Yang X, Wang Q, Pang Z-r, Pan M-r, Zhang W. Flavonoid-enriched extract from *Hippophae rhamnoides* seed reduces high fat diet induced obesity, hypertriglyceridemia, and hepatic triglyceride accumulation in C57BL/6 mice. *Pharm Biol* 2017; 55(1): 1207-14.
  25. Pang X, Zhao J, Zhang W, Zhuang X, Wang J, Xu R, et al. Antihypertensive effect of total flavones extracted from seed residues of *Hippophae rhamnoides* L. in sucrose-fed rats. *J Ethnopharmacol* 2008; 117(2): 325-31.
  26. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295(6): E1323-E32.
  27. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51(10): 2944-50.
  28. Ritov VB, Menshikova EV, Azuma K, Wood R, Toledo FG, Goodpaster BH, et al. Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298(1): E49-E58.
  29. Hancock CR, Han D-H, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC, et al. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(22): 7815-20.
  30. Hwang SH, Kim MC, Ji S, Yang Y, Jeong Y, Kim Y. Glucose starvation induces resistance to metformin through the elevation of mitochondrial multidrug resistance protein 1. *Cancer Sci* 2019; 110(4): 1256-67.
  31. Seneviratne A, Cave L, Hyde G, Moestrup SK, Carling D, Mason JC, et al. Metformin directly suppresses atherosclerosis in normoglycaemic mice via haematopoietic adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Cardiovasc Res* 2021; 117(5): 1295-308.
  32. Suryakumar G, Gupta A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *J Ethnopharmacol* 2011; 138(2): 268-78.
  33. Olas B, Skalski B, Ulanowska K. The anticancer activity of sea buckthorn [*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson]. *Front Pharmacol* 2018; 9: 232.
  34. Olas B. Sea buckthorn as a source of important bioactive compounds in cardiovascular diseases. *Food Chem Toxicol* 2016; 97: 199-204.
  35. Zhang JiaChan ZJ, Wang ChangTao WC, Wang ChengTao WC, Sun BaoGuo SB, Qi Cai QC. Understanding the role of extracts from sea buckthorn seed residues in anti-melanogenesis properties on B16F10 melanoma cells. *Food Funct* 2018; 9: 5402-16.

## Regulation of Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd1/mt-Nd5/Atp5a1 gene expression and ATP concentration in skeletal muscle in mice with type 2 diabetes: The role Hippophae rhamnoides extract and metformin as complementary medicine

Kamran Safavi<sup>1</sup>, Fatemeh Hajibabaie<sup>2,3</sup>, Navid Abedpoor<sup>1,2,4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Mitochondria play a key role in maintaining the homeostasis of cell metabolism. Mitochondrial dysfunction and oxidative phosphorylation disorders play an important role in the pathogenesis of diabetic skeletal muscle. In this regard, the aim of this study is to investigate the effect of type 2 diabetes on skeletal muscle mitochondrial markers and the use of Hippophae rhamnoides extract with metformin as a complementary medicine.

**Methods:** 30 C57BL/6 mice with 6–7-week-olds were divided into five groups: control group, Type 2 diabetes group, 3. The group with type 2 diabetes was treated with metformin, Type 2 diabetes group treated with Hippophae rhamnoides extract, Type 2 diabetes group treated with metformin and Hippophae rhamnoides extract. The genes obtained from bioinformatics analysis. To investigation gene expression, the Real-Time PCR technique was used, and muscle ATP concentration was assessed using the ELISA method.

**Findings:** In the diabetes group, compared to the control group, the expression of *mt-Nd5/Pgc1 $\alpha$ /Atp5a1/mt-Nd1* genes and ATP concentration decreased ( $p < 0.001$ ). Consumption of Hippophae rhamnoides extract and metformin separately increased the expression level of *mt-Nd5/Pgc1 $\alpha$ /Atp5a1/mt-Nd* genes and ATP concentration ( $p < 0.001$ ). Simultaneous consumption of Hippophae rhamnoides extract and metformin significantly increased the expression of *mt-Nd5/Pgc1 $\alpha$ /Atp5a1/mt-Nd* genes and ATP concentration ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** Hippophae rhamnoides extract and metformin can regulate mt-Nd5/PGC1 $\alpha$ /ATP5/mt-Nd1 network and ATP concentration in muscle tissue.

**Keywords:** Hippophae rhamnoides, *Pgc1 $\alpha$* , Complementary Therapies, metformin, Computational Biology

**Citation:** Safavi K, Hajibabaie F, Abedpoor N. Regulation of Pgc1 $\alpha$ /mt-Nd1/mt-Nd5/Atp5a1 gene expression and ATP concentration in skeletal muscle in mice with type 2 diabetes: The role Hippophae rhamnoides extract and metformin as complementary medicine. J Isfahan Med Sch 2026; 43(847): 1966- 77.

1- Department of Plant Biotechnology, Medicinal Plants Research Centre, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2- Department of Physiology, Medicinal Plants Research Center, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

3- Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

4- Department of Sports Physiology, Faculty of Sports Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Navid Abedpoor, Department of Physiology, Medicinal Plants Research Center, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran; Email: abedpoor.navid@yahoo.com