

**Original Article****Anti-inflammatory effect of swimming exercise and genistein in combination in the pancreas of ovariectomized diabetic rats**Balal Khalilzadeh<sup>1</sup>, Mohammad Zayer<sup>2</sup>, Hadi Yousefi<sup>2,3\*</sup><sup>1</sup>Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran<sup>2</sup>Student Research Committee, Khoy University of Medical Sciences, Khoy, Iran<sup>3</sup>Department of Basic Medical Sciences, Khoy University of Medical Sciences, Khoy, Iran**ARTICLE INFO****Article History:**

Received: 7 Nov 2023

Accepted: 30 Dec 2023

ePublished: 04 Feb 2024

**Keywords:**

- Inflammation
- Ovariectomy
- Genistein
- Diabetes
- Swimming Exercise

**Abstract**

**Background.** Menopause is associated with an increase in blood sugar and an increase in inflammatory cytokines. Exercise and genistein have biological activities, including anti-inflammatory and antidiabetic activity. This study examined the combined effects of regular swimming exercise and genistein as a preventive strategy against inflammation and pancreatic cell damage in ovariectomized diabetic rats.

**Methods.** A total of 42 female Wistar rats were divided into six groups: Sham, ovariectomy (OVX), diabetic ovariectomy (OVX.D), diabetic ovariectomy + exercise (OVX.D.E), diabetic ovariectomy + genistein (OVX.D.G), and diabetic ovariectomy + exercise + genistein (OVX.D.E.G). Animals underwent swimming training or received genistein or a combination of both for eight weeks. At the end of this period, the levels of TNF- $\alpha$ , Nf- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , and SIRT1 proteins were evaluated using western blot in pancreatic tissue.

**Results.** Ovariectomy increased the expression of TNF- $\alpha$ , Nf- $\kappa$ B, and IL-1 $\beta$  and decreased the expression of SIRT1, and these effects were more significant in ovariectomized diabetic rats. Treatment with genistein and swimming exercise individually reversed these changes in the level of proteins and improved the inflammation, but the combined effect of these two interventions exhibited more effect.

**Conclusion.** The combination of genistein and regular swimming exercise provides enhanced protection for pancreatic tissue and effectively prevents damage to it. Therefore, performing appropriate physical activities and consuming compounds containing phytoestrogens can prevent the occurrence of disorders such as diabetes during menopause.

**Practical Implications.** The results of this study can guide health policymakers to prevent disorders and complications caused by menopause.

**How to cite this article:** Khalilzadeh B, Zayer M, Yousefi H. Anti-inflammatory effect of swimming exercise and genistein in combination in the pancreas of ovariectomized diabetic rats. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2024;46(1):38-47. doi: 10.34172/mj.2024.012. Persian.

**Extended Abstract****Background**

Menopause is associated with an increase in blood sugar and inflammatory cytokines. Menopause has been identified as one of the risk factors for metabolic illnesses, including diabetes, due to the role that estrogen plays in the pancreas and the

body's metabolism. Metabolic changes that occur in women after menopause are usually associated with weight gain, obesity, and increased inflammation, which may cause diabetes. Nevertheless, estrogen therapy can reduce the risk of diabetes in postmenopausal women, indicating the important

\*Corresponding author; Email: [yousefi\\_h@khoyums.ac.ir](mailto:yousefi_h@khoyums.ac.ir)

© 2024 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

role of estrogen in regulating glucose homeostasis. Exercise and genistein have biological effects that include anti-inflammatory and antidiabetic properties. This study investigated the combined effects of regular swimming exercise and genistein as a preventive strategy against inflammation and pancreatic cell damage in ovariectomized diabetic rats.

## Methods

A total of 42 female Wistar rats were divided into 6 groups: Sham, ovariectomy (OVX), diabetic ovariectomy (OVX.D), diabetic ovariectomy + exercise (OVX.D.E), diabetic ovariectomy + genistein (OVX.D.G), and diabetic ovariectomy + exercise + genistein (OVX.D.E.G). The surgical procedure involved the administration of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) via intraperitoneal injection to induce anesthesia, followed by a small incision and bilateral removal of the ovaries. A high-fat diet was used with an intraperitoneal injection of a low single dose of streptozotocin (35 mg/kg) to induce type 2 diabetes. A glucometer was used to diagnose diabetes, and rats with blood sugar levels greater than 250 mg/dl were classified as diabetic. Animals received swimming training (1 hour/day) and administration of genistein (35 mg/kg/day) individually or in combination for eight weeks. At the end of this period, after anesthetizing the animals with an intraperitoneal injection of ketamine and xylazine, pancreatic tissue was removed from the body to examine the protein levels of TNF- $\alpha$ , Nf- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , and SIRT1 using western blot in pancreatic tissue. In this method, after homogenizing pancreatic tissue, proteins were first separated by electrophoresis in an acrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS). Then, the protein bands were transferred to the membrane and appeared by the chemiluminescence method and radiographic film. The density of the bands was analyzed using Image J software and then normalized against the beta-actin band. All the data obtained in this study, including the expression of inflammatory and anti-inflammatory proteins, are expressed as mean  $\pm$  standard error. The SPSS software (version 21) was used for statistical analysis. The

Kolmogorov-Smirnov test was used to evaluate the normality distribution. Since the data distribution was normal; a two-way analysis of variance and Tukey's test (post hoc) were used to compare the data between groups. The difference between the groups was significant at  $P < 0.05$ .

## Results

The expression levels of IL-1 $\beta$ , Nf- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , and SIRT1 proteins were studied in the pancreas of ovariectomized and diabetic rats. The analysis of the data obtained from this study showed that the expression levels of IL-1 $\beta$ , Nf- $\kappa$ B, and TNF- $\alpha$  proteins in the ovariectomized group, especially in diabetic ovariectomized rats, increased significantly compared to the Sham group ( $P < 0.05$ ). Swimming exercise and administration of genistein alone caused a significant decrease in IL-1 $\beta$ , Nf- $\kappa$ B, and TNF- $\alpha$  proteins ( $P < 0.05$ ) compared to the diabetic ovariectomized rats. Administration of genistein and swimming exercise together caused a significant decrease in protein levels of IL-1 $\beta$ , Nf- $\kappa$ B, and TNF- $\alpha$  compared to the diabetic ovariectomized group. In addition, the expression levels of the SIRT1 protein were studied in the pancreas of ovariectomized and diabetic rats. The analysis of the data obtained from this study showed that the expression levels of SIRT1 protein in the ovariectomized group, especially in diabetic ovariectomized rats, decreased significantly compared to the Sham group ( $P < 0.05$ ). Swimming exercise and administration of genistein alone caused a significant increase in SIRT1 proteins ( $P < 0.05$ ) compared to the diabetic ovariectomized rats. The administration of genistein and swimming exercise together significantly increased protein levels of SIRT1 compared to the diabetic ovariectomized group.

## Conclusion

The findings of this study showed that ovariectomy, especially with diabetes, was able to increase the inflammatory protein levels of IL-1 $\beta$ , Nf- $\kappa$ B, and TNF- $\alpha$  and decrease the anti-inflammatory protein levels of SIRT1 in the pancreas, which was associated with pancreatic destruction. Regular swimming exercise and

genistein individually decreased inflammatory protein levels of IL-1 $\beta$ , Nf- $\kappa$ B, and TNF- $\alpha$  and increased anti-inflammatory SIRT1 protein levels, and this effect was stronger in the combination of genistein and exercise than individually. Therefore, according to these findings, it can be concluded that

improving the lifestyle, such as performing appropriate physical activities and consuming foods containing phytoestrogens (genistein), can prevent the occurrence of many possible disorders during menopause.

## اثر ضد التهابی تمرین شنا و جنیستئین به صورت توأم در پانکراس موش‌های صحرایی دیابتیک اواریکتومی شده

بلال خلیل‌زاده<sup>۱</sup>، محمد زایر<sup>۲</sup>، هادی یوسفی<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup>مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

<sup>۲</sup>کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده علوم پزشکی خوی، خوی، ایران

<sup>۳</sup>گروه علوم پایه پزشکی، دانشکده علوم پزشکی خوی، خوی، ایران

### چکیده

**زمینه.** دوران یائسگی گاهی با افزایش قندخون و افزایش سیتوکین‌های التهابی همراه است. ورزش و جنیستئین دارای فعالیت‌های بیولوژیکی شامل اثر ضدالتهابی و نیز فعالیت ضددیابتی می‌باشند. بنابراین در این مطالعه اثرات ترکیبی تمرین منظم شنا و جنیستئین به عنوان یک راهکار پیشگیری در برابر التهاب و آسیب سلولی پانکراس در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده دیابتیک مورد مطالعه قرار گرفت.

**روش کار.** تعداد چهل و دو سر موش ماده نژاد ویستار در ۶ گروه Sham، اواریکتومی (OVX)، اواریکتومی دیابتیک (OVX.D)، اواریکتومی دیابتیک+ورزش (OVX.D.E)، اواریکتومی دیابتیک+جنیستئین (OVX.D.G) و اواریکتومی دیابتیک+ورزش+جنیستئین (OVX.D.E.G) تقسیم شدند. حیوانات تمرین شنا و تجویز جنیستئین را به تنهایی و یا به صورت توأم به مدت هشت هفته دریافت کردند. در انتهای این دوره، میزان پروتئین‌های  $TNF-\alpha$ ،  $Nf-\kappa B$ ،  $IL-1\beta$  و  $SIRT1$  با استفاده از وسترن بلات در بافت پانکراس مورد مطالعه قرار گرفت.

**یافته‌ها.** اواریکتومی باعث افزایش بیان  $TNF-\alpha$ ،  $Nf-\kappa B$  و  $IL-1\beta$  و کاهش بیان  $SIRT1$  گردید که این اثرات در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده دیابتیک چشمگیر بود. تیمار با جنیستئین و تمرین ورزشی به تنهایی سبب معکوس شدن این تغییرات در میزان پروتئین‌ها و بهبود فرآیند التهابی گردید ولی اثر ترکیبی این دو مداخله قوی‌تر بود.

**نتیجه‌گیری.** ترکیب جنیستئین و ورزش منظم شنا قدرت محافظت بیشتری در بافت پانکراس و پیشگیری از آسیب آن دارد. بنابراین احتمالاً انجام فعالیت‌های فیزیکی مناسب و گنجاندن مواد غذایی مناسب مانند فیتواستروژن‌ها می‌تواند از بروز اختلالات احتمالی همچون دیابت در دوران یائسگی جلوگیری نماید.

**پیامدهای عملی.** نتایج این مطالعه می‌تواند سیاست‌گذاران سلامت را جهت پیشگیری از اختلالات و عوارض ناشی از یائسگی راهنمایی کند.

### اطلاعات مقاله

#### سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۶

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۹

انتشار برخط: ۱۴۰۲/۱۱/۱۵

#### کلید واژه‌ها:

- التهاب
- اواریکتومی
- جنیستئین
- دیابت
- شنا

### مقدمه

پس از یائسگی ایجاد می‌شود معمولاً با افزایش وزن، چاقی و افزایش التهاب همراه است که این عوامل زمینه‌ساز دیابت هستند. این در حالی است که درمان با استروژن می‌تواند سبب کاهش ریسک ابتلا به دیابت در زن‌ها پس از منوپوز شده و همین نشان‌دهنده نقش مهم استروژن در تنظیم هومئوستازی گلوکز می‌باشد.<sup>۱</sup> برخی مطالعات گزارش نموده‌اند که کاهش استروژن می‌تواند موجب پرخوری و کاهش تمایل افراد به فعالیت بدنی و ورزش شده و احتمالاً از این طریق امکان وقوع بیماری دیابت در

سالیان تعداد زیادی از زنان قبل از اینکه به یائسگی طبیعی برسند، به دلایل مختلف تخمدان آنها برداشته شده و دچار یائسگی زودرس و حاد می‌شوند. بنابراین آنها در معرض خطرات بیماری‌هایی همچون قلب و عروق، اختلال شناختی، پارکینسون، یوکی استخوان و بیماری‌های متابولیک از جمله دیابت قرار می‌گیرند.<sup>۱</sup> یائسگی با توجه به نقش استروژن در متابولیسم بدن و پانکراس به عنوان یکی از عوامل خطر ایجاد بیماری‌های متابولیک از جمله دیابت عنوان شده است.<sup>۲</sup> تغییرات متابولیک که در زن‌ها

\*نویسنده مسئول؛ ایمیل: yousefi\_h@khoyums.ac.ir

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

پس از القاء بیهوشی، برش کوچکی از ناحیه پشت موش‌ها در دو طرف ایجاد شده و با استفاده از نخ بخیه پلی‌گلیکولات عروق تخمدان همراه با بافت ناحیه، لیگاتور گشته و سپس تخمدان بصورت کامل از بدن حیوان برداشته شد. جهت القای دیابت نوع دو از رژیم غذایی پرچرب به همراه تزریق داخل صفاقی دوز پایین داروی استرپتوزوتوسین (Streptozotocin) به مقدار ۳۵ mg/kg به صورت تک دوز استفاده شد. جهت تشخیص و تأیید دیابت، از دستگاه گلوکومتر (Boehringer Mannheim Indianapolis, IN) استفاده شد و قندخون بالای ۲۵۰ mg/dl، به عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته شد.<sup>۱۱</sup> دو هفته پس از اواریکتومی و بعد از بهبود کامل ناحیه جراحی، داروی جنیستین (Sigma St. Louis, MO) پس از حل شدن در حلال DMSO+PEG (با نسبت ۱ mg/kg/day)، به میزان ۱ mg/kg/day به حیوانات گروه‌های اواریکتومی به صورت زیر جلدی به مدت هشت هفته تزریق گردید.<sup>۱۲</sup> دو هفته بعد از اواریکتومی، در گروه‌های ورزش، روزانه یک ساعت و به مدت هشت هفته (شش روز در هر هفته) ورزش شنا ارائه شد. برای انجام ورزش منظم شنا از یک مخزن چهار گوش به ابعاد ۱۰۰×۶۰×۸۰ سانتی‌متر، با درجه حرارت آب ۲۴-۲۶ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.<sup>۱۳</sup> در پایان هفته هشتم، پس از بیهوش کردن حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین، بافت پانکراس برای بررسی پروتئین‌های مربوطه از بدن آنها جدا شد.

#### ارزیابی میزان پروتئین‌ها با استفاده از وسترن بلات

در این روش پس از هموژنیزاسیون بافت پانکراس ابتدا پروتئین‌ها با الکتروفورز در ژل آکرلامید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS) تفکیک شدند. سپس، باندهای پروتئینی بر روی غشا ترانسفر شده و با روش کمی لومینسانس و استفاده از فیلم رادیوگرافی به ظهور رسیدند. دانسیته باندها توسط نرم‌افزار Image J آنالیز و سپس در مقابل باند بتا اکتین نرمالیزه شدند. حساسیت این روش در حد پیکوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.<sup>۱۴</sup> تمامی داده‌های بدست آمده از این مطالعه شامل بیان پروتئین‌های التهابی و ضدالتهابی بافت پانکراس به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد گزارش شده‌اند. برای محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده گردید و با توجه به اینکه توزیع داده‌ها نرمال بود، از آزمون آماری واریانس دوطرفه و آزمون توکی (post hoc) جهت مقایسه داده‌ها بین گروه‌ها استفاده شد.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یائسگی زودرس را افزایش دهد.<sup>۴-۶</sup> یکی از راهکارهای جلوگیری و کاهش عوارض دوران یائسگی، هورمون درمانی با استروژن است. با این حال، مطالعات بالینی در مورد هورمون درمانی در زن‌ها پس از منوپوز نشانگر افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان و پیامدهای اجتناب ناپذیر دیگر می‌باشد.<sup>۷</sup> بنابراین تلاش برای یافتن جایگزین‌های استروژن یکی از مهمترین زمینه‌های تحقیقاتی در زنان پس از یائسگی می‌باشد.<sup>۸</sup> بنابراین با تأکید بر این مسئله که جنیستین دارای میل ترکیبی زیاد با گیرنده‌های بتا استروئید می‌باشد و ورزش می‌تواند تعداد این گیرنده‌ها را زیاد نماید، در این طرح اثرات ترکیب درمانی جنیستین و ورزش بر حفظ پانکراس در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده دیابتیک مورد مطالعه قرار گرفت.

#### روش کار

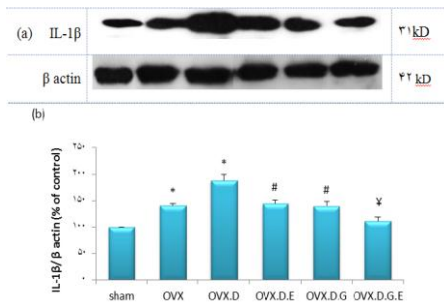
کلیه مراحل آزمایشی با استفاده از موش‌های صحرایی توسط راهنماهای استفاده از حیوانات مصوب کمیته اخلاق نهادی در دانشگاه علوم پزشکی تبریز برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. این مطالعه در کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده علوم پزشکی خوی (کد اخلاق: IR.KHOY.REC.1402.026) تصویب و اجرا گردید. در این مطالعه تعداد ۴۲ سر موش صحرایی ماده بالغ دو ماهه نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۸۰-۲۲۰ گرم استفاده شد که از محل پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه خریداری شدند. در تمام روند کار با حیوانات، اصول اخلاقی کار با حیوانات مطابق معاهده کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی خوی رعایت گردید. حیوانات در شرایط محیطی یکسان اعم از دسترسی آزاد به آب و غذا، در محیطی با دمای  $22 \pm 2$  و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی نگهداری شدند و سپس به ۶ گروه ۷ تایی به شرح ذیل تقسیم شدند:<sup>۹</sup>

۱- گروه Sham: در این گروه، حیوانات تحت عمل جراحی بدون ایجاد اواریکتومی قرار گرفته و حلال داروی جنیستین (PEG & DMSO) را نیز دریافت نمودند، ۲- گروه اواریکتومی (OVX)، ۳- گروه اواریکتومی شده دیابتیک (OVX.D)، ۴- گروه اواریکتومی شده و دیابتیک و جنیستین (OVX.D.G)، ۵- گروه اواریکتومی شده و دیابتیک و ورزش (OVX.D.E)، ۶- گروه اواریکتومی شده دیابتیک و ورزش و جنیستین (OVX.D.E.G). جهت انجام عمل جراحی و برداشتن دوطرفه تخمدان‌ها از تزریق داخل صفاقی داروهای بیهوشی کتامین به میزان ۱۰۰ mg/kg و زایلازین ۱۰ mg/kg استفاده شد.<sup>۱۰</sup> در حیوانات گروه اواریکتومی،

## یافته‌ها

میزان بیان پروتئین التهابی *Nf-κB* در پانکراس موش‌های صحرایی اوریکتومی شده دیابتیک

شکل ۱ نتایج حاصل از میزان بیان پروتئین *Nf-κB* در موش‌های صحرایی اوریکتومی شده و دیابتیک را نشان می‌دهد. آنالیز داده‌های بدست آمده از این مطالعه نشان داد که میزان بیان پروتئین‌های *Nf-κB* در گروه اوریکتومی و مخصوصاً در اوریکتومی شده دیابتیک نسبت به گروه Sham به صورت معنی‌دار افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). ورزش شنا و تجویز جنیستئین هر یک به تنهایی باعث کاهش معنی‌دار پروتئین *Nf-κB* نسبت به گروه اوریکتومی شده دیابتیک گردید ( $P < 0.01$ ).

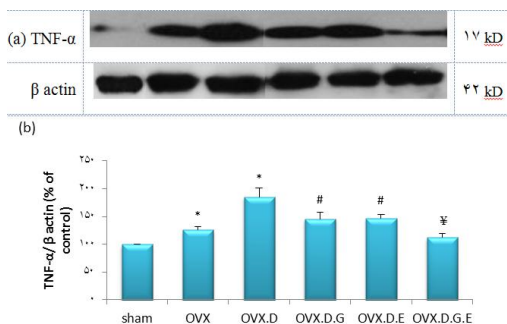


شکل ۲. مقایسه میزان بیان *IL-1β* در گروه‌های مورد مطالعه. (a) ایمونوبلات *IL-1β* و  $\beta$  actin. (b) شکل مقایسه کمی بیان *IL-1β* در مقابل  $\beta$  actin به صورت درصد نسبت به گروه Sham. OVX: اوریکتومی، D: دیابت، G: جنیستئین، E: ورزش. \* ( $P < 0.05$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه Sham. # ( $P < 0.05$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه OVX.D. % ( $P < 0.01$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه Sham.

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (Mean  $\pm$  SEM) در چهار تا شش بلات نشان داده شده‌اند.

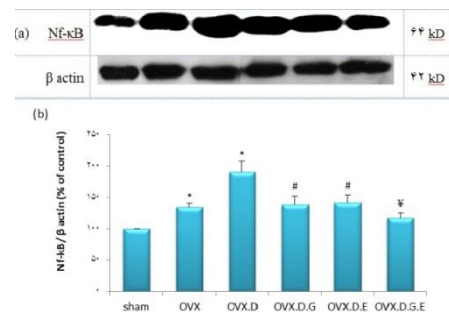
میزان بیان پروتئین التهابی *TNF-α* در پانکراس موش‌های صحرایی اوریکتومی شده دیابتیک

سطح پروتئین *TNF-α* در موش‌های صحرایی اوریکتومی شده و دیابتیک در شکل ۳ نشان داده شده است. میزان بیان پروتئین *TNF-α* در گروه اوریکتومی و اوریکتومی شده دیابتیک نسبت به گروه Sham به صورت معنی‌دار افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). با این وجود، ورزش شنا و تجویز جنیستئین به تنهایی منجر به کاهش قابل توجه این پروتئین نسبت به گروه اوریکتومی شده دیابتیک گردید ( $P < 0.05$ ). البته کاهش این پروتئین در تجویز همزمان جنیستئین و ورزش شنا کاهش قابل توجهی نسبت به گروه اوریکتومی شده دیابتیک از خود نشان داد ( $P < 0.01$ ).



شکل ۳. مقایسه میزان بیان *TNF-α* در گروه‌های مورد مطالعه. (a) ایمونوبلات *TNF-α* و  $\beta$  actin. (b) شکل مقایسه کمی بیان *TNF-α* در مقابل  $\beta$  actin به صورت درصد نسبت به گروه Sham. OVX: اوریکتومی، D: دیابت، G: جنیستئین، E: ورزش. \* ( $P < 0.05$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه Sham. # ( $P < 0.05$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه OVX.D. % ( $P < 0.01$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه Sham.

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (Mean  $\pm$  SEM) در چهار تا شش بلات نشان داده شده‌اند.



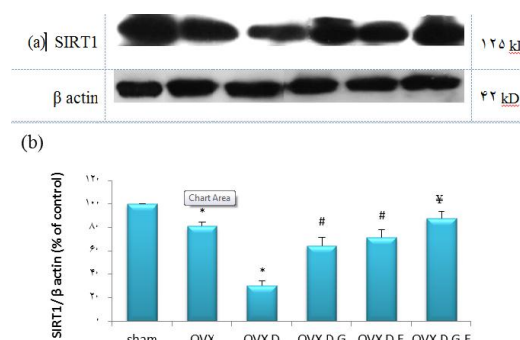
شکل ۱. مقایسه میزان بیان *Nf-κB* در گروه‌های مورد مطالعه. (a) ایمونوبلات *Nf-κB* و  $\beta$  actin. (b) شکل مقایسه کمی بیان *Nf-κB* در مقابل  $\beta$  actin به صورت درصد نسبت به گروه Sham. OVX: اوریکتومی، D: دیابت، G: جنیستئین، E: ورزش. \* ( $P < 0.05$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه Sham. # ( $P < 0.05$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه OVX.D. % ( $P < 0.01$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه Sham.

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (Mean  $\pm$  SEM) در چهار تا شش بلات نشان داده شده‌اند.

میزان بیان پروتئین التهابی *IL-1β* در پانکراس موش‌های صحرایی اوریکتومی شده دیابتیک

با استفاده از روش وسترن بلات میزان بیان پروتئین *IL-1β* در موش‌های اوریکتومی شده و دیابتیک مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۲. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که میزان بیان پروتئین *IL-1β* در گروه اوریکتومی و اوریکتومی شده دیابتیک نسبت به گروه Sham به صورت معنی‌دار افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). ولی ورزش شنا و تجویز جنیستئین به تنهایی باعث کاهش معنی‌دار این پروتئین نسبت به گروه اوریکتومی شده دیابتیک گردید ( $P < 0.05$ ) و این کاهش در تجویز همزمان جنیستئین و ورزش شنا کاهش قابل توجهی نسبت به گروه اوریکتومی شده دیابتیک از خود نشان داد ( $P < 0.05$ ).

در بافت‌های مختلف از جمله پانکراس همراه است.<sup>۱۵</sup> یافته‌های این مطالعه نشان داد که اواریکتومی به‌تنهایی و همراه با دیابت سبب افزایش معنی‌دار در بیان  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ ،  $\text{IL-1}\beta$  و  $\text{TNF-}\alpha$  و کاهش پروتئین ضدالتهابی SIRT1 در پانکراس موش‌های صحرایی گردید. SIRT1 متعلق به کلاس ۳ هیستون/پروتئین داستیلاز می‌باشد که با مسیر سیگنالینگ  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$  مرتبط بوده و اثرات ضدالتهابی دارد.<sup>۱۶، ۱۸</sup>  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$  نیز به‌عنوان یکی از پروتئین‌های التهابی نقش محوری در آسیب سلول‌های بتا به‌واسطه سیتوکین‌ها بر عهده دارد که بیان SIRT1 می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر ضدالتهابی نقش محافظتی برای سلول‌های بتا در برابر سیتوکین‌ها بازی کند.<sup>۱۶</sup> سیتوکین‌های آزاد شده از ماکروفاژهای ارتشاحی در پانکراس سبب مهار تولید و ترشح انسولین در اثر گلوکز و تشدید دیابت می‌شود.<sup>۱۹</sup> مهار تولید  $\text{IL-1}\beta$  یا مهار واکنش آن با گیرنده خود، سبب کاهش آسیب پانکراس در اثر این فاکتور می‌شود.<sup>۲۰</sup> از آنجایی که  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$  یکی از پروتئین‌های هدف اصلی برای عملکرد سیتوکین‌ها می‌باشد و داستیل‌شدن آن توسط SIRT1 سبب مهار این پروتئین می‌شود، در این مطالعه تغییرات  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$  و SIRT1 در گروه‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که اواریکتومی و اواریکتومی دیابتیک منجر به افزایش  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$  و کاهش SIRT1 گردید. در این راستا، مطالعه‌ای نشان داده است که سرکوب SIRT1 در ماکروفاژهای سلول‌های داخل صفاقی موش‌ها منجر به تحریک ترشح و تولید  $\text{TNF-}\alpha$  و در نتیجه ایجاد التهاب می‌گردد.<sup>۲۱</sup> نتایج حاصل از مطالعه دیگری نیز نشان داده‌است که بیان متوسط SIRT1 منجر به سرکوب پاسخ التهابی می‌گردد؛ در حالی که سرکوب SIRT1 منجر به القاء التهاب سیستمیک به دنبال رژیم غذایی پرچرب می‌شود.<sup>۲۲</sup> بنابراین مطابق با این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت SIRT1 مستقیماً در تنظیم فرآیند التهاب دخیل بوده و کاهش آن منجر به افزایش التهاب می‌شود. یکی از یافته‌های اصلی مطالعه حاضر اثرات ضدالتهابی جنیستئین و ورزش و ترکیب این دو در جلوگیری از التهاب پانکراس در موش‌های صحرایی دیابتی بود. در این مطالعه مشاهده شد که جنیستئین و ورزش یا ترکیب آنها سبب کاهش سطح پروتئین‌های  $\text{IL-1}\beta$ ،  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$  و  $\text{TNF-}\alpha$  و افزایش پروتئین ضدالتهابی SIRT1 در پانکراس گروه‌های تیمار با جنیستئین نسبت به موش‌های صحرایی دیابتیک می‌شود. همسو با یافته‌های مطالعه حاضر، مطالعه‌ای نشان است که بیان SIRT1 منجر به مهار مسیر  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$  گردیده و بیان زیاد آن باعث معکوس شدن این اثر و کاهش آسیب سلول‌های بتا می‌گردد.<sup>۱۶</sup> بیان SIRT1 می‌تواند تحت تأثیر عوامل مختلفی قرار گیرد. یکی از



شکل ۴. مقایسه میزان بیان SIRT1 در گروه‌های مورد مطالعه. (a) ایمونوبلات SIRT1 و  $\beta$  actin. (b) شکل مقایسه کمی بیان SIRT1 در مقابل  $\beta$  actin به‌صورت درصد نسبت به گروه Sham. OVX: اواریکتومی، D: دیابت، G: جنیستئین، E: ورزش. \* ( $P < 0.05$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه Sham. # ( $P < 0.05$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه OVX.D. ¥ ( $P < 0.01$ ) اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه OVX.D.

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (Mean  $\pm$  SEM) در چهار تا شش بلات نشان داده شده‌اند.

## بحث

در مطالعه حاضر اثر ترکیبی ورزش منظم شنا و جنیستئین در پیشگیری از التهاب و پروتئین‌های دخیل در مسیر آن در بافت پانکراس موش‌های اواریکتومی شده دیابتیک مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های مهم این مطالعه عبارتند از: الف) میزان پروتئین‌های التهابی  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ ،  $\text{IL-1}\beta$  و  $\text{TNF-}\alpha$  در پانکراس موش‌های صحرایی اواریکتومی افزایش یافتند. به‌علاوه پروتئین ضدالتهابی SIRT1 در پانکراس موش‌های صحرایی اواریکتومی کاهش یافت که این تغییرات در افزایش و کاهش پروتئین‌های مذکور در موش‌های صحرایی دیابتیک بیشتر بود. ب) ورزش و جنیستئین هر کدام سبب کاهش پروتئین‌های التهابی گردیدند و نیز توانستند از کاهش پروتئین ضدالتهابی جلوگیری به عمل بیاورند. ج) اثر ترکیبی جنیستئین و ورزش منظم شنا در افزایش و کاهش پروتئین‌های مربوطه قوی‌تر از اثر جنیستئین یا ورزش به تنهایی بود. این یافته‌ها نشان‌دهنده اثرات مفید جنیستئین و ورزش منظم شنا هرکدام به‌تنهایی و مخصوصاً به‌صورت ترکیبی در مهار التهاب می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که کاهش عملکرد تخمدان‌ها در اثر یائسگی و یا فرآیندهای جراحی سبب افزایش سیتوکین‌های التهابی  $\text{TNF-}\alpha$  و  $\text{IL-1}\beta$  می‌شود. کمبود استروژن نیز مشخص شده‌است که با افزایش پاسخ سلول‌ها به این سیتوکین‌ها به‌واسطه افزایش تعداد گیرنده‌های سیتوکین‌ها و کوفاکتورهای آنها و در نتیجه تقویت اثرات سیتوکین‌های التهابی

می‌توان نتیجه گرفت که بهبود سبک زندگی مثل انجام فعالیت‌های فیزیکی مناسب و مصرف مواد غذایی حاوی فیتواستروژن‌ها (جنیستئین) می‌تواند از بروز بسیاری از اختلالات احتمالی در دوران یائسگی جلوگیری نماید.

### قدردانی

نویسندگان از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده علوم پزشکی خوی برای حمایت در انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تبریز جهت تأمین تجهیزات و امکانات اجرای طرح قدردانی می‌گردد.

### مشارکت پدیدآوران

بلال خلیل‌زاده در طراحی مطالعه، نقد و بررسی پیش‌نویس مقاله، محمد زایر در جمع‌آوری داده و پیش‌نویس مقاله، هادی یوسفی در ایده‌پردازی، طراحی، تحلیل داده‌ها و نگارش مقاله نقش داشتند.

### منابع مالی

این مطالعه با حمایت مالی کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده علوم پزشکی خوی تصویب (شماره طرح: ۴۰۱۰۰۰۰۱۲) و اجرا گردید.

### دسترس‌پذیری داده‌ها

تمامی داده‌های ایجاد شده در مطالعه در این مقاله گنجانده شده‌است.

### ملاحظات اخلاقی

کلیه مراحل آزمایشی با استفاده از موش‌های صحرایی توسط راهنماهای استفاده از حیوانات مصوب کمیته اخلاق نهادی در دانشگاه علوم پزشکی تبریز برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. این مطالعه در کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی خوی کد اخلاق: IR.KHOY.REC.1402.026 تصویب و اجرا گردید.

### تعارض منافع

بدینوسیله پدیدآورندگان اعلام می‌کنند که این اثر حاصل یک پژوهش مستقل بوده و هیچگونه تضاد منافی با سازمان‌ها و اشخاص دیگری ندارد.

این عوامل جنیستئین می‌باشد. در مطالعه‌ای هیراساکا و همکاران نشان دادند که ایزوفلاون‌های دایدزئین و جنیستئین سبب القاء بیان SIRT1 از طریق فسفوریلاسیون AMP kinase می‌شوند که محرک بیان SIRT1 است.<sup>۲۳</sup> جنیستئین در غلظت‌های فیزیولوژیک سبب کاهش تولید بسیاری از میانجی‌های التهابی مثل TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$ ، iNOS و IL-6 توسط مسیر سیگنالینگ Nf- $\kappa$ B می‌شود.<sup>۲۴</sup> بنابراین به نظر می‌رسد جنیستئین علاوه بر اثر مستقیم ضدالتهابی و سرکوب فاکتورهای التهابی، با بیان SIRT1 نیز می‌تواند التهاب را در پانکراس کاهش دهد.<sup>۲۵</sup> نتایج مطالعه ما نشان داد که ورزش شنا هم به‌تنهایی و هم به همراه جنیستئین به‌صورت معنی‌دار سبب کاهش TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$  و Nf- $\kappa$ B و در نتیجه سبب جلوگیری از آسیب بافتی پانکراس در موش‌های صحرایی اواریکتومی شده دیابتیک گردید. مطالعات نشان داده‌اند که در مدل دیابتی چاقی در موش‌های صحرایی، تمرین ورزشی سبب پیشگیری از تجمع سیتوکین‌های التهابی مثل TNF- $\alpha$  و IL-1 $\beta$  در قسمت درون‌ریز پانکراس می‌شود. کاهش سیتوکین‌های التهابی نشان‌دهنده نقش حفاظتی ورزش در جلوگیری از التهاب می‌باشد.<sup>۲۶</sup> این یافته‌ها همچنین همسو با یافته‌های مارتین و همکاران است که در آن موش‌های صحرایی دیابتی چاق Zucker که مدلی از سندرم متابولیک می‌باشد، سبب افزایش سیتوکین‌های التهابی مثل TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$  و سایر سیتوکین‌ها توسط ماکروفاژها می‌شوند که ورزش و فعالیت فیزیکی آنها را بهبود می‌دهد.<sup>۲۷</sup> ورزش همچنین در بیان SIRT1 نقش دارد؛ طوری که در مطالعه‌ای افزایش بیان پروتئین SIRT1 در عضلات اسکلتی به دنبال ورزش مشاهده شده‌است. بیان SIRT1 و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن در قلب موش‌های صحرایی بعد از ورزش متوسط و طولانی مدت مشاهده شده‌است.<sup>۲۸</sup> ورزش باعث فعال شدن پروتئین کیناز فعال شونده در اثر آدنوزین مونوفسفات (AMPK) می‌شود که این پروتئین نیز منجر به افزایش بیان SIRT1 می‌گردد.<sup>۲۹</sup>

### نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که اواریکتومی و مخصوصاً همراه با دیابت قادر به افزایش میزان پروتئین‌های التهابی IL-1 $\beta$ ، TNF- $\alpha$  و Nf- $\kappa$ B و کاهش پروتئین ضدالتهاب SIRT1 در پانکراس می‌شود که می‌تواند منجر به تخریب پانکراس گردد. ورزش منظم شنا و جنیستئین هر کدام به‌تنهایی سبب کاهش پروتئین‌های التهابی و افزایش پروتئین ضدالتهابی شدند که این اثر در ترکیب جنیستئین و ورزش قوی‌تر از هر یک از آنها به‌تنهایی بود. بنابراین، مطابق با یافته‌های بدست آمده از این مطالعه



## References

- Panahi Y, Rajaei SM, Johnston TP, Sahebkar A. Neuroprotective effects of antioxidants in the management of neurodegenerative disorders: A literature review. *Journal of cellular biochemistry*. 2019;120(3):2742-8. doi: 10.1002/jcb.26536
- Kim C, Edelstein SL, Crandall JP, Dabelea D, Kitabchi AE, Hamman RF, et al. Menopause and risk of diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Menopause*. 2011;18(8):857-68. doi: 10.1097/gme.0b013e31820f62d0
- Fuselier T, de Sa PM, Qadir MF, Xu B, Allard C, Meyers MM, et al. Efficacy of glucagon-like peptide-1 and estrogen dual agonist in pancreatic islets protection and pre-clinical models of insulin-deficient diabetes. *Cell Reports Medicine*. 2022;3(4):1-10. doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100598
- Sowers M, Derby C, Jannausch ML, Torrens JI, Pasternak R. Insulin resistance, hemostatic factors, and hormone interactions in pre-and perimenopausal women: SWAN. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88(10):4904-10. doi: 10.1210/jc.2003-030350
- Kim C, Edelstein SL, Crandall JP, Dabelea D, Kitabchi AE, Hamman RF, et al. Menopause and risk of diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Menopause*. 2011;18(8):857-68. doi: 10.1097/gme.0b013e31820f62d0
- Kow N, Arthur F, Adu-Frimpong M, Osei-Yeboah J, Obu Mensah F, Owusu L. The prevalence of metabolic syndrome and its predominant components among pre-and postmenopausal Ghanaian women. *BMC research notes*. 2013;6:1-2. doi: 10.1186/1756-0500-6-446
- Jiang Y, Xie Q, Chen R. Breast cancer incidence and mortality in relation to hormone replacement therapy use among postmenopausal women: results from a prospective cohort study. *Clinical Breast Cancer*. 2022;22(2):e206-13. doi: 10.1016/j.clbc.2021.06.010
- Prasannarong M, Saengsirisuwan V, Piyachaturawat P, Suksamrarn A. Improvements of insulin resistance in ovariectomized rats by a novel phytoestrogen from *Curcuma comosa* Roxb. *BMC complementary and alternative medicine*. 2012;12:1-1. doi: 10.1186/1472-6882-12-28
- Zhao X, He W, Jakobsen LM, Zachariassen LF, Hansen AK, Rasmussen MK, et al. Inulin Supplementation Modulates the Hepatic Transcriptome, Metabolome, and Ferritin Content in Ovariectomized Rats. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2023;67(23):2300372. doi: 10.1002/mnfr.202300372
- Saha JK, Xia J, Grondin JM, Engle SK, Jakubowski JA. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Experimental Biology and Medicine*. 2005;230(10):777-84. doi: 10.1177/153537020523001012
- Kamli-Salino SE, Brown PA, Haschler TN, Liang L, Feliers D, Wilson HM, et al. Induction of experimental diabetes and diabetic nephropathy using anomer-equilibrated streptozotocin in male C57Bl/6J mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2023;650:109-16. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.01.089
- Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, et al. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporosis International*. 1998;8:274-81. doi: 10.1007/s001980050065
- Habibi P, Ahmadiasl N, Nourazarian A, Yousefi H. Swimming exercise improves SIRT1, NF- $\kappa$ B, and IL-1 $\beta$  protein levels and pancreatic tissue injury in ovariectomized diabetic rats. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2022;43(3):345-52. doi: 10.1515/hmbci-2021-0069
- Rostami S, Esmailyanmaleki M, Kargarfard P, Eayazmilani R. The effects of combined training and activity in an enriched environment on the brain BDNF and VEGF protein levels in the pre-pubertal male rats. *Majallah-i pizishki-i Danishgah-i Ulum-i Pizishki va Khadamat-i Bihdashti-i Darmani-i Tabriz*. 2022;43(6):543-53. doi: 10.34172/mj.2022.007. [Persian]
- Pfeilschifter J, Köditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocrine reviews*. 2002;23(1):90-119. doi: 10.1210/edrv.23.1.0456
- Lee JH, Song MY, Song EK, Kim EK, Moon WS, Han MK, et al. Overexpression of SIRT1 protects pancreatic  $\beta$ -cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway. *Diabetes*. 2009;58(2):344-51. doi: 10.2337/db07-1795
- Lee HJ, Hong YS, Yang SJ. Interaction between NLRP3 inflammasome and Sirt1/6: metabolomics approach. *The FASEB Journal*. 2015;29:913-12. doi: 10.1096/fasebj.29.1\_supplement.913.12
- Afkhami F, Shahbazi S, Farzadi L, Azizi M. Validation of methylation-specific polymerase chain

- reaction method and evaluation of FMR1 gene pre-mutations in premature ovarian insufficiency. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences*. 2022;44(4):317-30. doi: 10.34172/mj.2022.032. [Persian].
19. Aharon-Hananel G, Jörns A, Lenzen S, Raz I, Weksler-Zangen S. Antidiabetic effect of interleukin-1 $\beta$  antibody therapy through  $\beta$ -cell protection in the Cohen diabetes-sensitive rat. *Diabetes*. 2015;64(5):1780-5. doi: 10.2337/db14-1018
  20. Pedersen SS, Prause M, Williams K, Barrès R, Billestrup N. Butyrate inhibits IL-1 $\beta$ -induced inflammatory gene expression by suppression of NF- $\kappa$ B activity in pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2022;298(9). doi: 10.1016/j.jbc.2022.102312
  21. Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, Babendure JL, Sonoda N, Bae EJ, et al. SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism*. 2010;298(3):E419-28. doi: 10.1152/ajpendo.00417.2009
  22. Farage AE, Abdo W, Osman A, Abdel-Kareem MA, Hakami ZH, Alsulimani A, et al. Betulin prevents high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease by mitigating oxidative stress and upregulating Nrf2 and SIRT1 in rats. *Life Sciences*. 2023;322:121688. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121688
  23. Hirasaka K, Maeda T, Ikeda C, Haruna M, Kohno S, Abe T, Ochi A, et al. Isoflavones derived from soy beans prevent MuRF1-mediated muscle atrophy in C2C12 myotubes through SIRT1 activation. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2013;59(4):317-24. doi: 10.3177/jnsv.59.317
  24. Siriviriyakul P, Sriko J, Somanawat K, Chayanupatkul M, Klaikeaw N, Werawatganon D. Genistein attenuated oxidative stress, inflammation, and apoptosis in L-arginine induced acute pancreatitis in mice. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2022;22(1):208. doi: 10.1186/s12906-022-03689-9
  25. Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Méneur C, et al. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic  $\beta$  cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell metabolism*. 2005;2(2):105-17. doi: 10.1016/j.cmet.2005.07.001
  26. Teixeira de Lemos E, Oliveira J, Páscoa Pinheiro J, Reis F. Regular physical exercise as a strategy to improve antioxidant and anti-inflammatory status: benefits in type 2 diabetes mellitus. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012;2012. Article ID 741545, 15 pages. doi: 10.1155/2012/741545
  27. Martin-Cordero L, Garcia JJ, Giraldo E, De la Fuente M, Manso R, Ortega E. Influence of exercise on the circulating levels and macrophage production of IL-1 $\beta$  and IFN $\gamma$  affected by metabolic syndrome: an obese Zucker rat experimental animal model. *European journal of applied physiology*. 2009;107:535-43. doi: 10.1007/s00421-009-1140-4
  28. Ferrara N, Rinaldi B, Corbi G, Conti V, Stiuso P, Boccuti S, et al. Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats. *Rejuvenation research*. 2008 Feb 1;11(1):139-50. doi: 10.1089/rej.2007.0576
  29. Ho JH, Baskaran R, Wang MF, Yang HS, Lo YH, Mohammedsalem ZM, et al. Bioactive peptides and exercise modulate the AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$ /FOXO3 pathway as a therapeutic approach for hypertensive rats. *Pharmaceuticals*. 2022;15(7):819. doi: 10.3390/ph15070819