



## تأثیر تمرین تناوبی شدید و ژل رویال بر بیان ژن RBP4 و AMPK بافت عضله نعلی و مقاومت به انسولین موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو

فاطمه صائبی: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران  
**حسین عابد نطنزی:** گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران (\* نویسنده مسئول) abednazari@gmail.com  
**محمدعلی آذری یاجانی:** استاد، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران  
**ماندانا غلامی:** گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

تمرین تناوبی شدید،  
ژل رویال،  
ژن RBP4،  
عضله نعلی،  
موش دیابتی

**زمینه و هدف:** دیابت نوع دو شایع‌ترین بیماری درون‌ریز است که به دلیل عدم تحمل گلوکز در اثر برهم‌خوردن تعادل بین ذخایر و تقاضای انسولین رخ می‌دهد. RBP4 یکی از این آدیپوکاین‌ها می‌باشد که غلظت سرمی آن در مدل‌های گوناگون موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ و افرادی که دچار مقاومت انسولین و یا دیابت نوع دو هستند افزایش می‌یابد. هدف پژوهش حاضر مطالعه تغییرات بیان ژن RBP4 بافت عضله نعلی و شاخص مقاومت به انسولین پس از انجام تمرین تناوبی شدید و ژل رویال در موش‌های صحرایی چاق دیابتی نوع ۲ بود.

**روش کار:** این پژوهش از نوع بنیادی بود که به روش تجربی انجام شد. نمونه آماری پژوهش حاضر ۳۶ سر موش‌های صحرایی نر دیابتی چاق بودند. پس از ۲۰ هفته تغذیه با رژیم پرچرب با تزریق درون صفاقی ۲۵ میلی گرم STZ به ازای کیلوگرم وزن موش‌ها دیابتی شدند. موش‌هایی که گلوکز ناشتای آن‌ها بین ۱۵۰ تا ۴۰۰ میلی گرم در دسی لیتر بود، دیابتی نوع دوم در نظر گرفته شدند. موش‌های دیابتی در ۴ گروه کنترل (۶ سر)، تمرین تناوبی (۸ سر)، ژل رویال (۷ سر)، تمرین تناوبی شدید-ژل رویال (۸ سر) گروه بندی و پروتکل تمرینی و گاواژ ژل رویال روی آن‌ها اجرا شد. هشت هفته تمرین تناوبی شدید، پنج جلسه در هفته با تناوب شدید ۲ دقیقه‌ای ۸۰ تا ۹۰ درصد  $VO_2max$  و تناوب استراحت یک دقیقه‌ای با ۵۰ تا ۵۶ درصد  $VO_2max$  اجرا شد. ژل رویال بصورت گاواژ به میزان ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، ۵ روز در هفته داده شد.

**یافته‌ها:** تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و دوعاملی و آزمون تعقیبی نشان داد در مقایسه با گروه کنترل، تمرین تناوبی شدید به کاهش معنی‌دار گلوکز و شاخص مقاومت به انسولین منجر شد. تمرین تناوبی شدید و ژل رویال به کاهش غیر معنی‌دار بیان ژن RBP4 عضله نعلی در مقایسه با گروه کنترل منجر شد. تمرین تناوبی شدید و ژل رویال به افزایش بیان ژن AMPK عضله نعلی در مقایسه با گروه کنترل منجر شد که در گروه تمرین تناوبی معنی‌دار بود ( $P=0/008$ ).  
**نتیجه‌گیری:** تمرین تناوبی و ژل رویال در کاهش شاخص مقاومت به انسولین و بیان ژن‌های موثر در مصرف گلوکز در عضله نعلی موثر بود. همچنین تمرین تناوبی و ژل رویال منجر به کاهش بیان ژن RBP4 و افزایش بیان ژن AMPK در عضله نعلی در مقایسه با گروه کنترل شد که در مصرف گلوکز در افراد دیابتی اهمیت دارد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Saebi F, Abednatanzi H, Azarbayejani MA, Gholami M. The Effect of High Intensity Interval Training and Royal Jelly on RBP4 and AMPK Gene Expression in Soleus Muscle and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Rats. Razi J Med Sci. 2023;30(6): 13-28.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.

## The Effect of High Intensity Interval Training and Royal Jelly on RBP4 and AMPK Gene Expression in Soleus Muscle and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Rats

**Fateme Saebi:** Ph.D. Student of Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Hossein Abednatanzi:** Department of Physical Education and Sport Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (\* Corresponding author) [abednazari@gmail.com](mailto:abednazari@gmail.com)

**Mohammad Ali Azarbajejani:** Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran

**Mandana Gholami:** Department of Physical Education and Sport Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** Type 2 diabetes is the most common endocrine disease that occurs due to glucose intolerance due to imbalance between reserves and insulin demand. RBP4 is one of these adipocytes whose serum concentrations increase in different models of rats with type 2 diabetes and people with insulin resistance or type 2 diabetes. The aim of this study was the interactive effect of High Intensity Exercise Training (HIIT) and n-chromosomal royal jelly on RBP4 and AMPK gene expression in liver hepatocytes and glucose levels and insulin resistance in type 2 diabetic rats. Intense interval training is usually performed with intensities above 90% of the maximum heart rate and short rest periods and a training duration of less than 20 minutes. Royal Jelly is a yellowish white substance secreted by the submandibular glands of worker bees and by the queen bee is consumed throughout its life and the larvae during the growing period. Due to their anti-oxidant and anti-diabetic, anti-cancer, anti-inflammatory effects, various drugs are obtained from Royal Jelly. Evidence from studies shows that the possibility of RBP4 and AMPK gene expression in soleus muscle plays an important role in increasing consumption glucose. Therefore, this article intends to report the interactive effect of HIIT and consumption of n-chromosomal royal jelly on glucose regulatory factors.

**Methods:** The statistical population of the present study consisted of rats. After 20 weeks of high-fat diet, rats became diabetic by intraperitoneal injection of 25 mg STZ per kg body weight. Mice with fasting glucose between 150 and 400 mg / dL were considered to have type 2 diabetes. Mice were treated in 4 groups: 6-head diabetic control, 8-period periodic training, 7-head Royal Jelly, 8-head Periodic Exercise, and 8-head Royal Jelly training group and training protocol and gel-royal gavage.

The HIIT protocol consisted of eight weeks of aerobic exercise, five sessions per week with a gradual increase in extreme frequency from 22 to 38 meters per minute and a rest period of 16 to 22 meters per minute for 15 to 34 minutes by running on a treadmill. Running time increased from 16 minutes in the first week to 34 minutes in the eighth week. At the end of the training period and 48 hours after the last training session, the experimental training groups and after 12 hours of fasting, the rats were anesthetized and sacrificed by ether anesthetic. Blood samples were collected from the heart. Glucose was measured using an auto-analyzer. Insulin measured by a special kit of Pars Azmoun Company. The insulin resistance index was calculated using the formula and gene expression was also determined by RT-PCR. To describe the data, descriptive statistics and inferential statistics of one-way analysis of variance and Bonferroni post hoc test were used to compare the differences between groups and two-factor analysis of variance and effect size index were used to compare the effect of each of the independent variables. Significance level it was considered  $p \leq 0.05$ .

### Keywords

High intensity interval training,  
Royal Jelly,  
RBP4 gene,  
Soleus muscle,  
Diabetic rat

Received: 08/07/2023

Published: 09/09/2023

**Results:** Mean glucose concentration (mg / dL) in the exercise group compared to the control was significantly reduced ( $P = 0.005$ ) and in the exercise-royal gel group compared to the royal gel group had no significant difference and had a significant decrease compared to the control in the gel exercise group ( $P = 0.001$ ). Mean insulin concentration (IUI / ml) in the exercise group was significantly increased compared to the control ( $P = 0.005$ ) but the royal jelly group had a significant increase compared to the control. In the exercise group, Royal Jelly had a non-significant increase compared to control. The mean insulin resistance index in the exercise group was significantly lower than the control group and Royal jelly ( $P = 0.044$ ). Data analysis using one-way and two-factor analysis of variance and post hoc test showed that, HIIT and royal jelly resulted in a non-significant decrease in soleus muscle RBP4 gene expression compared to the control group. HIIT and royal jelly increased the expression of AMPK gene in soleus muscle compared to the control group, which was significant in the HIIT group ( $P = 0.008$ ). Since increasing in glucose consumption muscle tissues, especially in diabetic patients is importance. The findings of the present study revealed that the expression of genes involved in glucose consumption in soleus muscle is affected by HIIT and combined with royal jelly. Eight weeks of HIIT alone, in interaction with n-chromosomal royal jelly. The findings of the present study showed that HIIT and royal jelly reduced a non-significant decrease in soleus muscle RBP4 gene expression compared to the control group of type 2 diabetic rats, so decrease in glucose concentration and increased insulin and significantly reduced the insulin resistance of type 2 diabetic rats fed a high-fat diet and decrease RBP4 gene expression in soleus muscle in the HIIT groups. Various mechanisms have been suggested for the effects of RBP4 on the induction of insulin resistance and type 2 diabetes. Serum RBP4 has been shown to be involved in inducing insulin resistance by stimulating the expression of gluconeogenic enzymes in the liver and impaired insulin signaling in muscle. In muscle tissue, there is a negative correlation between RBP4 and access to glucose and GLUT4 levels in diabetes people. In other words, increasing the concentration of RBP4 reduces the activity of phosphoinositide 3 kinase (PI3-kinase) and subsequently phosphorylates the insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and affects the transfer of GLUT4, which in turn It affects the insulin signaling pathway and reduces insulin-dependent glucose uptake into muscle tissue. Researchers have suggested that reducing and inhibiting RBP4 may be effective in reducing the damage caused by diabetes. For example, a recent study confirmed the beneficial effects of fentertinide (an RBP4 inhibitor) in the treatment of mice with a high-fat diet, so that the results of the above study showed that fentertinide inhibits glucose intolerance and insulin resistance in Prevents liver and muscle and improves glucose production in the liver and glucose metabolism in muscle.

The results also showed that AMPK gene expression increased in the experimental groups compared to the control, which was significantly increased in the intense periodic training group compared to the control ( $P = 0.008$ ). AMPK has been shown to improve insulin sensitivity after exercise. In their study, Rimko et al. showed that 8 weeks of aerobic exercise increased the AMPK signaling pathway in the muscle tissue of diabetic rats, which was also effective in improving insulin sensitivity. Increased blood glucose intake, which is affected by exercise, especially HIIT, can counteract the negative effects of RBP4. In the study of Aghaei and et al, Induction of diabetes caused a significant increase in RBP4 expression and after 8 weeks of HIIT exercise, its expression decreased significantly compared to control and AMPK gene expression was significantly increased in HIIT exercise group.

**Conclusion:** HIIT and royal jelly resulted in a non-significant decrease in soleus muscle RBP4 gene expression compared to the control group. HIIT and royal jelly increased the expression of soleus muscle AMPK gene compared to the control group, which was significant in the HIIT group ( $P = 0.008$ ).

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Saebi F, Abednatanzi H, Azarbayejani MA, Gholami M. The Effect of High Intensity Interval Training and Royal Jelly on RBP4 and AMPK Gene Expression in Soleus Muscle and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Rats. Razi J Med Sci. 2023;30(6): 13-28.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

## مقدمه

بیماری دیابت نوعی اختلال در سوخت و ساز بدن است، به طوری که بدن در این اختلال قادر به برداشت مناسب و کامل قند نمی‌باشد (۱). یکی از دلایل اصلی بروز دیابت نوع دوم، بافت‌های اصلی مصرف کننده گلوکز می‌باشد. اختلال در عمل انسولین در بافت‌های چربی، عضلات و همچنین، برخی عوامل بیوشیمیایی از جمله شاخص‌های التهابی و برخی آدیپوکاین‌ها که غالباً از بافت چربی حجیم و کبد تولید می‌شوند، مانند رتینول متصل به پروتئین ۴ (RBP4) (Retinol binding protein 4)، در بروز اختلالات متابولیک موثرند و در کارکرد های ایمنی، تنظیم هزینه انرژی و عمل انسولین نقش دارند (۲). افزایش قند خون از طریق افزایش تولید محصولات نهایی گلیکوزیله پیشرفته باعث تسهیل در تولید رادیکال‌های آزاد، از طریق اختلال در تولید رادیکال‌های درون زاد آزاد مثل سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌گردد که به آسیب سلول منجر می‌شود (۳). اما در مقابل RBP4، AMPK قرار دارد که مسیرهای اصلی و بالادست مرتبط با متابولیسم گلوکز را تحت تاثیر قرار می‌دهد و بر فاکتورهای PI3K و GLUT4 موثر می‌باشد. به بیان دیگر AMPK آنزیمی است که به عنوان یک سوخت سنج عمل می‌کند. تحریک فسفوریلاسیون پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) منجر به افزایش جابه‌جایی انتقال دهنده گلوکز ۴ (GLUT4) در غشای پلاسمایی می‌شود که منجر به بهبود مصرف گلوکز در عضله اسکلتی می‌گردد (۴). یافته‌ها نشان داده که در عضله اسکلتی نمونه‌های دیابتی، مسیر سیگنالینگ AMPK که در عملکرد متابولیکی و مصرف گلوکز درگیر است، بطور کاهشی تنظیم می‌شود. همچنین فعال سازی AMPK، حساسیت انسولینی و هموستاز گلوکز را در بافت عضلانی بهبود می‌بخشد و افزایش آن برای مقابله با تخریب‌های ناشی از بیماری دیابت نوع دوم موثر می‌باشد. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی قادر به بهبود مسیرهای پیام‌رسانی درگیر در متابولیسم گلوکز در شرایط دیابت می‌باشد (۵ و ۶). فعال سازی AMPK اثرات متفاوتی در بافت‌های مختلف دارد به طوری که در عضلات اسکلتی باعث تحریک برداشت گلوکز، اکسیداسیون FFA، جابه‌جایی و فعال سازی

انتقال دهنده گلوکز نوع ۴ (GLUT4) و بیویژن میتوکندریایی می‌شود و مهار سنتز پروتئین و گلیکوزن را در پی دارد. تنظیم AMPK یکی از بزرگ‌ترین هدف‌ها در مطالعات دیابت نوع دوم و سندروم متابولیک می‌باشد، زیرا شواهد روز افزونی پیشنهاد می‌دهند که اختلال در تنظیم AMPK نقش مهمی در توسعه مقاومت به انسولین و دیابت نوع دوم ایفا می‌کند و فعال سازی AMPK چه از طریق دارویی و چه فیزیولوژیکی می‌تواند از مقاومت به انسولین و دیابت نوع دوم جلوگیری کند. کاهش فعالیت AMPK در عضلات اسکلتی در چند مدل حیوانی دچار اختلالات متابولیک، نشان داده شده است. از طرفی شواهدی وجود دارد که فعالیت AMPK در عضلات اسکلتی و بافت چربی نمونه‌های انسانی چاق و دیابتی کاهش می‌یابد (۷) یکی از راه‌های درمانی و پیشگیری از دیابت، فعالیت بدنی به شکل منظم برای بیماران می‌باشد. اما اینکه چه ورزشی و با چه نوع پروتکلی، سوالی است که محققین همیشه در پی کشف آن هستند. با توجه به نقش انجام تمرینات و فعالیت‌های ورزشی در پیشگیری و کنترل چاقی و دیابت، اتخاذ شیوه‌های مختلف تمرینی برای پیشگیری و کاهش شیوع چاقی و نیز کمک به کاهش روند چاقی و عوارض ناشی از آن مانند بیماری‌های کاردیومتابولیک مانند کبد چرب و دیابت و... در جامعه ضرورت پیدا می‌کند. تمرین استقامتی با حجم بالا کنترل قند خون را در دیابت نوع دو بهبود می‌بخشد، اما بسیاری از افراد "کمبود وقت" را به عنوان مانعی برای مشارکت منظم ذکر می‌کنند. تمرین تناوبی با شدت بالا (high intensity interval training-HIIT) در نهایت یک روش با زمان کارآمد برای ایجاد سازگاری‌های فیزیولوژیکی می‌باشد، اما در مورد تاثیر تمرین تناوبی با شدت بالا در دیابت نوع دو کمتر شناخته شده است. تمرینات تناوبی شدید که معمولاً با شدت‌های بالاتر از ۹۰ درصد حداکثر ضربان قلب و دوره استراحت‌های کم و مدت زمان تمرینی کمتر از ۲۰ دقیقه انجام می‌گیرد، با به کارگیری و درگیر کردن بهتر و بیشتر تارهای عضلانی و فراخوانی قوی‌تر ارگان‌های سوخت و سازی و متابولیکی می‌تواند از طریق سازوکار سلولی مولکولی، متابولیسم کل بدن را در جهت مثبت تحت تاثیر قرار

آزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند GSH-PX, CAT و SOD را نشان داد (۱۴ و ۱۵). ژل رویال به‌طور عمده از ترکیبات مهم با فعالیت‌های بیولوژیکی و تقویت‌کننده سلامتی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، قندها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و اسیدهای آمینه آزاد تشکیل شده است و حاوی ویتامین‌هایی مانند ریوفلاوین، تیامین، نیاسین، اسید فولیک، بیوتین و پیریدوکسین و مقادیر کمتری از ویتامین‌های C، D، A و E است. علاوه بر این، کلسیم، سدیم، پتاسیم، مس، آهن، روی و منگنز مواد معدنی اصلی ژل رویال (Royal Jelly - RJ) هستند (۱۶ و ۱۷). علاوه بر این، ژل رویال (RJ) فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی از قبیل اثر فشار خون، عملکرد شبیه انسولین دارد. بنابراین، ممکن است که رویال ژل تاثیراتی در مقاومت به انسولین داشته باشد که به‌عنوان علت اصلی دیابت در نظر گرفته می‌شود (۱۸). به‌طور مثال، در یک مطالعه روی موش‌ها، مکمل یاری دوزهای مختلف ژل رویال (۱۰، ۳۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به کاهش فشار خون سیستولیک و سطح انسولین سرم و شاخص مقاومت به انسولین منجر شد. اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریایی، ضدالتهابی و محافظت‌کننده عصبی ژل رویال نیز به اثبات رسیده است (۱۹ و ۲۰).

رتینول متصل به پروتئین ۴ (RBP4) یکی از این آدیپوکاین‌ها می‌باشد که غلظت سرمی آن در مدل‌های گوناگون موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ و افرادی که دچار مقاومت انسولین و یا دیابت نوع ۲ هستند، افزایش می‌یابد. این آدیپوکاین از بافت‌های چربی احشایی و زیرپوستی به درون جریان خون ترشح می‌شود و متابولیسم گلوکز خون سیستمیک را از طریق گلوکونئوز کبد تنظیم می‌کند. نقش RBP4 در توسعه مقاومت انسولین در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است. در واقع RBP4 گلوکونئوز کبدی را افزایش و سیگنالینگ انسولین در عضله‌های اسکلتی را تضعیف می‌کند.

از جمله راه‌های پیشگیری و درمان دیابت، افزایش تحرک و انجام فعالیت ورزشی می‌باشد. در مطالعاتی که از خاموش کردن ژن GLUT4 در بافت‌های چربی

دهد (۸). از این رو با انجام تمرینات تناوبی شدید، همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، عضلات بیشتری درگیر خواهد شد. لذا در پاسخ به درگیری بیشتر عضلات اسکلتی، میزان مایوکین‌های ترشح‌یافته از عضلات اسکلتی افزایش می‌یابد و با فعال کردن متابولیسم عضلانی بسیاری از مسیرهای مربوط به متابولیسم چربی و جذب گلوکز خون را افزایش و باعث بالا رفتن هرچه بهتر متابولیسم می‌شود (۹). با توجه به تولید رادیکال‌های آزاد توسط دیابت و فعالیت ورزشی و نهایتاً ایجاد آپوپتوز یکی از مواردی که توجه محققین را به خود جلب کرده است، یافتن راهکارهایی برای کاهش عواقب منفی ناشی از دیابت و تولید رادیکال‌های آزاد است. در همین زمینه، مصرف عوامل آنتی‌اکسیدانی می‌تواند موثر باشد. محققان زیادی در سراسر دنیا در تلاش هستند تا با استفاده از روش‌های گوناگون از بیماری دیابت پیشگیری و یا آن را درمان کنند و یا عوارض بیماری را کاهش دهند. امروزه استفاده از گیاهان دارویی و عصاره‌ها برای درمان بیماری‌ها افزایش یافته است. گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها اگرچه از دیرباز در درمان دیابت قندی و عوارض ناشی از آن مطرح بوده‌اند، ولی در مورد اثربخشی قطعی بسیاری از آن‌ها تاکنون شواهد معتبری یافت نشده است (۱۰).

در طب سنتی برای پیشگیری و درمان بیماری‌های متابولیک از جمله دیابت و کبد چرب از داروهای گیاهی و سنتی استفاده می‌شود (۱۱). ژل رویال (Royal Jelly) ماده سفید مایل به زرد است که توسط غدد تحت فکی زنبورهای کارگر ترشح و توسط زنبور ملکه در تمام عمر و لاروها در طول دوره رشد مصرف می‌شود. ژل رویال و ترکیبات فعال زیستی آن به‌دلیل داشتن اثرات آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضدباکتریایی، ضد دیابتی، ضد سرطان، ضد التهابی، ضد فشار خون، و داروهای سیستم ایمنی بدن، داروهای گسترده‌ای را به نمایش می‌گذارند (۱۲ و ۱۳). همچنین نقش مهمی در محافظت از کبد و کلیه، بهبود زخم و سیستم تناسلی دارد و در بیماران دیابتی، اثرات کاهش‌دهنده روی قند خون و کاهش سطح پراکسیداسیون لیپید و افزایش فعالیت

تمرین‌های ورزشی با شدت بالاتر، تاثیرات مثبت و زیادتری بر سطوح RBP4 پلاسمایی دارد. بیان شده که ۱۲ هفته تمرین هوازی و مقاومتی در افراد با دیابت نوع ۲، سبب تغییرات معنی داری در غلظت سرمی RBP4 می‌شود (۲۱)، اما تاکنون پژوهشی در زمینه اثرات تعاملی تمرین تناوبی شدید و ژل رویال بر شاخص مقاومت به انسولین و بیان ژن‌های موثر در مصرف گلوکز مانند RBP4 و AMPK عضله نعلی موش‌های مدل چاق شده با رژیم پر چرب و دیابتی شده نوع دو با دوز پایین استرپتوزوتوسین (STZ) انجام و گزارش نشده است. لذا، در این مطالعه در نظر است تاثیرات تمرین تناوبی شدید به همراه ژل رویال بر بیان ژن RBP4 و AMPK عضله نعلی موش‌های دیابتی نوع دو گزارش گردد تا شاید بتوان از اثر بخشی و نقش آنتی اکسیدانی و ضد التهابی و دیابتی ژل رویال در کنار طراحی برنامه ورزشی تناوبی متناسب با رژیم غذایی برای دیابتی‌ها استفاده کرد. امید است نتایج حاصل از این پژوهش در علوم پزشکی و ورزشی پس از مطالعات انسانی مشابه به عنوان راهی نجات بخش در بهبود عوارض ناشی از دیابت از قبیل بیماری‌های کاردیومتابولیک مورد استفاده قرار گیرد.

### روش کار

این پژوهش از نوع بنیادی بود که به روش تجربی انجام شد. جامعه آماری پژوهش حاضر را موش‌های صحرایی نر تشکیل می‌دهند و نمونه‌های پژوهش ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار جوان با دامنه سنی ۳۵ تا ۴۵ روز و میانگینی وزنی  $110 \pm 10$  گرم بودند. پس از دو هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن میانگین  $170 \pm 30$  تحت رژیم پر چرب قرار گرفتند. پس از ۲۰ هفته (۵ ماه) تغذیه با رژیم پر چرب و دسترسی آزاد به مواد غذایی و آب، به ۴ گروه کنترل دیابتی (۸ سر)، تمرین تناوبی شدید (۱۰ سر)، ژل رویال (۸ سر)، تمرین تناوبی شدید و ژل رویال (۱۰ سر) تقسیم شدند که در پایان پروتکل ۲۹ سر در ۴ گروه کنترل دیابتی (۶ سر)، تمرین تناوبی شدید (۸ سر)، ژل رویال (۷ سر)، تمرین تناوبی شدید و ژل رویال (۸ سر)

موش صحرایی استفاده کرده اند، افزایش سطوح mRNA RBP4 در بافت چربی گزارش شده است. از طرف دیگر، درمان همین موش‌های صحرایی با rosiglitazone- داروی افزایش دهنده حساسیت انسولین- بیان RBP4 mRNA را در بافت چربی و غلظت سرمی آن را کاهش می‌دهد. از آنجایی که بافت چربی احشایی و زیرپوستی تفاوت‌های متابولیکی قابل توجهی با هم دارند، بافت چربی احشایی نسبت به چربی کل بدن ارتباط نزدیک تری با مقاومت انسولین را از خود نشان می‌دهد. دلیل این مسئله ممکن است تولید بیشتر RBP4 در چربی احشایی نسبت به چربی زیرپوستی باشد. با اینکه نقش سلول‌های چربی در ترشح RBP4 به خوبی ثابت شده است، ارتباط ضعیفی بین بیان RBP4 بافت چربی و سطح‌های RBP4 سرم در انسان گزارش شده است که نشان دهنده این است که بافت چربی ممکن است نقش کم اهمیت تری در تعیین سطوح RBP4 سرم در انسان نسبت به حیوانات داشته باشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که احتمالاً بافت‌های دیگر نیز می‌توانند عامل افزایش غلظت RBP4 سرم در دیابت نوع ۲ باشند. اخیراً عضله اسکلتی به عنوان محل اصلی مصرف گلوکز در نظر گرفته شده و می‌تواند متابولیسم گلوکز خون را تحت موقعیت کاهش قند خون (هایپوگلیسمیا) با ترشح مایوکاین‌ها از جمله اینترلوکین ۶ (IL6) و RBP4 تنظیم کند. افزایش در mRNA RBP4 عضله اسکلتی موش صحرایی بعد از یک لسه تمرین استقامتی شدید گزارش شده است که این بافت را به عنوان یک منبع ترشح کننده RBP4 معرفی کرده است. در واقع عضله اسکلتی در پاسخ به افزایش فعالیت انقباضی، مایوکاین‌هایی را تولید و رهاسازی می‌کند که می‌تواند بر متابولیسم دیگر بافت‌ها تاثیرگذار باشد (۲۱). در مورد تاثیر تمرینات مختلف ورزشی از جمله هوازی، مقاومتی و ترکیبی بر روی نمونه‌های انسانی در سطح سرم و نمونه‌های حیوانی دیابتی مطالعاتی انجام شده است.

مطالعات زیادی نشان داده اند که سطوح RBP4 با تمرین ورزشی افت می‌کند. نشان داده شده که

باقی ماندند.

### شیوه نگهداری و تغذیه موش‌های صحرایی:

برای نگهداری موش‌های صحرایی از قفس‌های جنس پلی کربنات شفاف با قابلیت اتو کلاو استفاده شد. دمای مطلوب محل نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ۶۵ درصد بود چرخه روشنایی نیز هر ۱۲ ساعت یکبار به طور دقیق توسط تنظیم کننده الکترونیکی نور سالن نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. جهت تغذیه موش‌های صحرایی از رژیم پر چرب استاندارد استفاده شد. دسترسی موش‌های صحرایی به غذا به صورت نامحدود بود و آب در بطری‌های ۵۰۰ میلی لیتری در تمامی قفس‌ها وجود داشت.

### روش چاق کردن موش‌های صحرایی با رژیم پر

**چرب:** برای این منظور، پس از آشناسازی و سازگاری با محیط جدید، تمامی موش‌ها به مدت ۲۰ هفته (۵ ماه) تحت رژیم غذایی پرچرب تهیه شده توسط پژوهشکده زیست فناوری رویان قرار گرفتند که شامل ۴۵ درصد انرژی کل از چربی مشتق شده از روغن حیوانی (حاوی ۲۴ گرم چربی، ۲۴ گرم پروتئین و ۴۱ گرم کربوهیدرات در هر ۱۰۰ گرم می باشد رژیم پر چرب ۴۵ درصد به مدت ۳ ماه و رژیم پر چرب ۶۰ درصد به مدت ۲ ماه داده شد (جدول ۱) (۲۲ و ۲۳).

### روش دیابتی کردن موش‌ها از طریق تزریق

**استرپتوزتوسین (STZ):** برای القای دیابت از رژیم غذایی پر چرب به مدت ۲۰ هفته و سپس تزریق محلول تازه تهیه شده از STZ در سرم فیزیولوژیکی قابل تزریق و به صورت داخل صفاقی (۲۵ میلی گرم/کیلوگرم) استفاده شد. یک هفته پس از تزریق، گلوکز خون ناشتایی با ایجاد جراحت کوچک در دم موش‌ها یک

قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار گرفته و توسط دستگاه گلوکومتر نوار خوانده شد و اندازه گیری گردید و قند خون بین ۱۵۰ تا ۴۰۰ میلی گرم/دسی لیتر به عنوان معیاری برای اطمینان از ابتلای موش‌ها به دیابت در نظر گرفته شد. برای اطمینان بیشتر از دیابتی شدن موش‌ها و دقت کار از ۱۰ سر موش به طور تصادفی خون‌گیری از دم به عمل آمد و گلوکز و انسولین و شاخص مقاومت به انسولین آن‌ها اندازه گیری شد که اطلاعات آن در جداول یافته‌ها آمده است (۲۴ و ۲۵).

### پروتکل مصرف ژل رویال «کروموزومی» در طی

دوره آزمایش به موش‌های گروه ژل رویال، و گروه ژل رویال و تمرین تناوبی شدید، ژل رویال با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم رقیق شده در آب مقطر و به روش گاوژ ۵ روز در هفته به گروه ژل و ژل - تمرین قبل شروع تمرین خورنده شد. ژل رویال نیز حاوی مقادیر فراوانی ترکیبات فنلی از خانواده فلاونوئیدها است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان کوئرستین، کامفرول، آپیزنین و لوتئولین را نام برد. ژل رویال آنالیز شده و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد و به صورت سرد نگهداری شده و هنگام گاوژ طبق دوز لازم با توجه به پروتکل رفرنس‌ها در آب مقطر حل و گاوژ شد (۲۶ و ۲۷).

### آزمون تمرین دویدن با سرعت حداکثر برای

#### تعیین شدت تمرین (Maximal Exercise Test (MERT

**Running Test):** برای تعیین سرعت حداکثر از پروتکل رودریگز و همکاران استفاده شد. برای اندازه‌گیری حداکثر اکسیژن مصرفی (VO2max) به دلیل عدم دسترسی به ابزار مستقیم (مانند دستگاه آنالیز گازهای تنفسی) و با توجه به پژوهش‌های انجام شده، پروتکل غیرمستقیم با دقت زیاد مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب که هر دو هفته یکبار موش‌ها در یک وهله

جدول ۱- ترکیب امولسیون پر چرب جهت گاوژ به موش‌های صحرایی

ماده	غذای رایج	غذای پرچرب ۴۵٪	غذای پرچرب ۶۰٪
کربوهیدرات (%)	۵۰/۰۳	۴۱	۲۶
پروتئین (%)	۲۳	۲۴	۲۴
چربی (%)	۵/۱	۲۴	۳۵
چربی (Kcal%)	-	۴۵	۶۰
کالری (Kcal/g)	۳/۱	۴/۸	۵/۲

نمونه‌گیری: با خاتمه دوره تمرینی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین گروه‌های تجربی تمرینی و پس از ۱۲ ساعت ناشتایی موش‌ها توسط ماده بی‌هوشی اتر بی‌هوش و قربانی شدند. نمونه‌های خون از طریق خون‌گیری از قلب جمع‌آوری شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. گلوکز با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر و انسولین توسط کیت مخصوص شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شدند. شاخص مقاومت به انسولین (HOMA-IR) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۲).

$\text{HOMA-IR} = \frac{4.05 \times (\text{گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر)}) \times (\text{انسولین (میکرو واحد بر میلی لیتر)})}{\text{مقاومت به انسولین (HOMA-IR)}}$

### روش بیان ژن *RBP4* و *AMPK* بافت عضله نعلی:

بافت عضله نعلی به منظور اندازه‌گیری بیان ژن جدا و بلافاصله توسط ازت مایع به فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. مقداری از بافت عضله نعلی برای انجام مراحل ریل تایم درون RNA later قرار داده شد و سپس در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد RNA با استفاده از کیت GeneAll (RiboEx Total RNA isolation solution) استخراج شد و در نهایت بررسی کمی و کیفی آن با استفاده از دستگاه نانودارپ و ژل آگارز یک درصد انجام شد. پس از اطمینان از خلوص و کیفیت RNA استخراج شده، cDNA با استفاده از کیت FIRE Solis BioDyne (Script RT cDNA Synthesis) استخراج شد.

تمرینی پس از ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۰ متر در دقیقه سپس با سرعت ۱۵ متر در دقیقه به مدت ۲ دقیقه شروع به دویدن کردند و هر ۳ دقیقه ۳ متر در دقیقه به سرعت افزوده شد تا این که هر کدام از موش‌ها که نتوانستند ادامه دهند و روی شوکر باقی ماندند و به واماندگی رسیدند، آن سرعت به عنوان سرعت حداکثر آنان در نظر گرفته می‌شد و سرعت حداکثر برای شدت تمرین بین ۸۰ تا ۹۵ درصد MERT در نظر گرفته شد که خلاصه پروتکل در جدول ۲ آمده است. با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته، ارتباط بالایی بین سرعت نوارگردان و  $\text{VO}_2\text{max}$  موش‌ها وجود دارد ( $r=0.94$ ،  $p<0.05$  0.98). از این رو می‌توان با توجه به سرعت دویدن، میزان  $\text{VO}_2\text{max}$  موش‌ها را برآورد کرد (۲۸).

**پروتکل تمرین تناوبی شدید:** برنامه هشت هفته تمرین هوازی، پنج جلسه در هفته با افزایش تدریجی تناوب شدید از سرعت ۲۲ الی ۳۸ متر بر دقیقه (۸۰ تا ۹۰ درصد  $\text{VO}_2\text{max}$ ) و تناوب استراحت با سرعت ۱۶ تا ۲۲ متر در دقیقه (۵۰ تا ۵۶ درصد  $\text{VO}_2\text{max}$ ) زمان ۱۵ الی ۳۴ دقیقه به صورت دویدن روی تردمیل انجام شد، به طوری که زمان دویدن از ۱۶ دقیقه در هفته اول، به ۳۴ دقیقه در هفته هشتم افزایش یافت. موش‌ها یک هفته قبل از شروع پروتکل به منظور آشنایی با تردمیل سه روز در هفته با سرعت ۵ متر در دقیقه با شیب صفر درصد با زمان ۱۰ و ۱۲ و ۱۵ دقیقه روی تردمیل راه رفتند. گروه کنترل نیز در طول اجرای پروتکل به همین ترتیب روی تردمیل راه رفتند (۲۹ و ۳۰) (جدول ۲).

جدول ۲- پروتکل تمرین تناوبی شدید

هفته	شدت گرم کردن ۵ دقیقه	تعداد تناوب شدید	زمان تناوب شدید	سرعت تناوب شدید	زمان - تناوب استراحت	شدت تناوب استراحت	شدت سرد کردن ۵ دقیقه (زمان کل)
اول و دوم	۱۰ متر در دقیقه	۲ تناوب	۲ دقیقه	۸۰٪ سرعت پیشینه (۳۰ متر در دقیقه)	۱ دقیقه	۵۰٪ (۱۶ متر در دقیقه)	۱۰ متر در دقیقه
سوم و چهارم	۱۰	۴ تناوب	۲ دقیقه	۸۵٪ (۳۲ متر در دقیقه)	۱ دقیقه	۵۲٪ (۱۸ متر در دقیقه)	۱۰
پنجم و ششم	۱۰	۶ تناوب	۲ دقیقه	۹۰٪ (۳۴ متر در دقیقه)	۱ دقیقه	۵۴٪ (۲۰ متر در دقیقه)	۱۰
هفتم و هشتم	۱۰	۸ تناوب	۲ دقیقه	۹۵٪ (۳۶ متر در دقیقه)	۱ دقیقه	۵۶٪ (۲۲ متر در دقیقه)	۱۰



جدول ۳- پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

Oligo Name Genes	Primer Sequence (5' → 3')	Product size
RBP4	For: CTAGAGAGGCAGTACAGATGGAT Rev: AGATGAAGACTGGATGAGAGCTAA	132 bp
AMPK	For: CCAGAGCAAACCATACGACA Rev: TTCACGTAATTGCCAGTCACT	132 bp
GapDh	For: GCCTGGAGAAACCTGCCA Rev: GGAAGAATGGGAGTTGCTGT	bp 137

آورده شد سطح معنی داری  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

میانگین وزن موش‌های مورد مطالعه در جدول ۴ ارائه شده است.

در جدول ۴ نیز میانگین وزن موش‌ها (گرم) قبل و پس از رژیم پر چرب را نشان می‌دهد. این جدول نشان می‌دهد وزن بعد از اعمال رژیم پرچرب افزایش قابل مشاهده داشته است. اطلاعات توصیفی گلوکز و انسولین و شاخص مقاومت انسولین موش‌ها که پس از خون‌گیری از دم اندازه‌گیری شده نیز در جدول ۴ مشاهده می‌شود که حاکی از دیابتی شدن موش‌ها می‌باشد.

جدول ۵ وزن پس از رژیم پرچرب، وزن پس از هشت هفته، گلوکز، انسولین، HOMA.IR و RBP4 و AMPK را در گروه کنترل، تمرین تناوبی شدید، ژل رویال و گروه ترکیبی تمرین و ژل رویال نشان می‌دهد.

شکل ۱ بیان ژن RBP4 و شکل ۲ بیان ژن AMPK را در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

میانگین وزن (گرم) در گروه‌های تجربی تمرین (۳۷۳/۱۲)، ژل رویال (۳۴۴/۵۷) و تمرین - ژل رویال (۳۳۴/۲۵) نسبت به کنترل (۳۱۷) افزایش غیر معنی‌داری داشت. میانگین غلظت گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر) در گروه تمرین (۱۳۸/۲۵) نسبت به کنترل

ساخته شد و به فریزر منفی ۲۰ انتقال داده شد. سپس برای بررسی بیان ژن RBP4 و AMPK بافت عضله نعلی، پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش توسط نرم افزار Primer3 طراحی شد و توسط شرکت بیوتکنولوژی پیشگام سنتز گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۳ آورده شده است.

در این مطالعه ابتدا مطابق برنامه دمایی ذکر شده، واکنش PCR Housekeeping جهت تایید کیفیت ساخت cDNA انجام شد (جدول ۳) پس از تعیین کیفیت cDNA سنتز شده، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن آنتی بادی واکنش PCR انجام شد.

**روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:** داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS22 تجزیه و تحلیل شدند. برای توصیف داده‌ها از آمار توصیفی (میانگین و انحراف استاندارد) استفاده شد. از آزمون شاپیرو ویلک جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها و آزمون لوین برای تجانس واریانس‌ها و از آمار استنباطی تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی بنفرونی و LSD جهت مقایسه تفاوت بین گروه‌ها و از آزمون تحلیل واریانس دو عاملی و شاخص تعیین اندازه اثر جهت مقایسه میزان تاثیر هر یک از متغیرهای مستقل استفاده گردید. آنالیز آماری بیان ژن RBP4 و AMPK بافت عضله نعلی با استفاده از نرم افزار SPSS22 انجام شد. در اینجا گروه شاهد به عنوان رفرنس سایر گروه‌ها می‌باشد و برحسب این گروه P-Value سایر گروه‌ها به دست

جدول ۴- اطلاعات توصیفی اولیه وزن و گلوکز و مقاومت به انسولین موش‌های صحرایی پس از رژیم پر چرب HFD و القای دیابت با STZ برای تشخیص دیابت نوع دوم

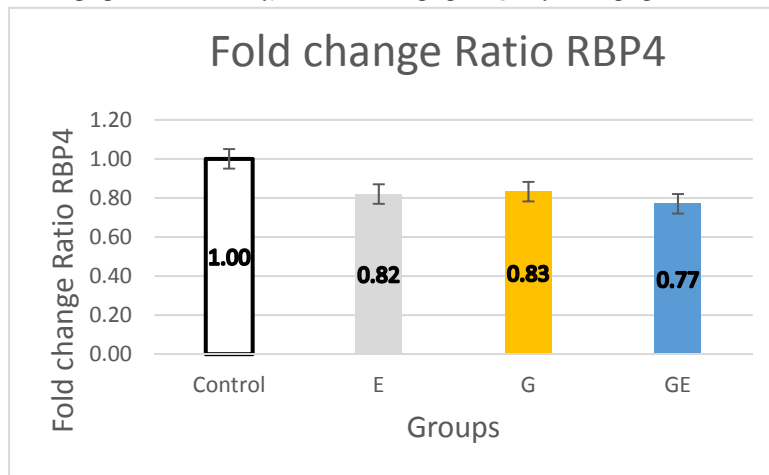
HOMA.IR	انسولین (میکرو واحد بر میلی لیتر)	گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر)	وزن پس از چاقی (گرم)	وزن شروع پروتکل (گرم)
۳/۵۶ ± ۱/۴۳	۳/۹۲ ± ۰/۴۹	۳۶۳ ± ۱۲۴/۵	۴۰۹/۰۳ ± ۵۱/۶۹	۱۹۳/۳۴ ± ۱۹/۴۶

(۳۳۳/۸۳) کاهش معنی دار داشت (C&E. P=۰/۰۰۵) و در گروه تمرین- ژل رویال (۱۳۴) نسبت به گروه ژل رویال (۱۳۱/۵۷) تفاوت معنی داری ندا شت (P=۰/۹۹۲) و در گروه تمرین ژل نسبت به کنترل کاهش معنی داری (C&EG. P=۰/۰۰۱) داشت. میانگین غلظت انسولین (میکرو یکای بین‌المللی/ میلی لیتر) در گروه تمرین (۶/۲۲) نسبت به کنترل (۳/۸۹) افزایش معنی دار داشت (C&E. P=۰/۰۰۵) و در گروه تمرین-

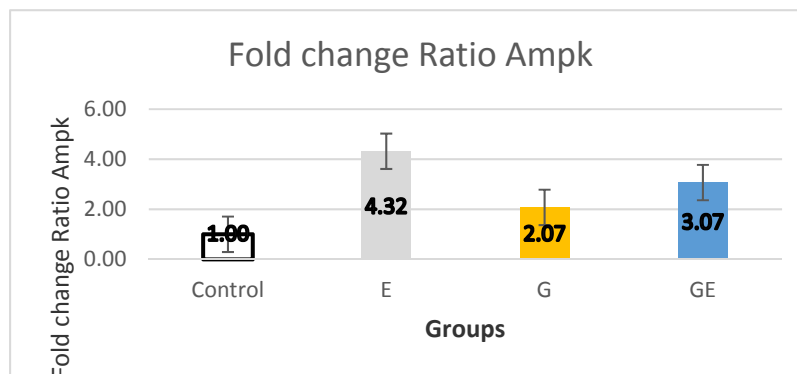
**جدول ۵-** تو صیف وزن و گلوکز، از سولین و شاخص مقاومت به از سولین و بیان ژن‌های RBP4 و AMPK بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف

متغیر / گروه	کنترل (۶ سر)	تمرین تناوبی (۸ سر)	ژل رویال (۷ سر)	تمرین و ژل رویال (۸ سر)
وزن پس از رژیم پر چرب (گرم)	۳۸۶/۶۶ ± ۴۸/۴۲	۴۰۷/۳۷ ± ۶۴/۶۴	۴۱۷/۴۲ ± ۳۳/۶۹	۴۲۰/۴۲۰ ± ۵۶/۰۵
وزن پس از هشت هفته (گرم)	۳۱۷ ± ۷۱/۳	۳۷۳/۱۲ ± ۵۴/۲۸	۳۴۴/۵۷ ± ۳۵/۱۷	۳۳۴/۲۵ ± ۳۲/۲۷
گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر)	۳۳۳/۸۳ ± ۳۹/۳۹	۱۳۸/۲۵ ± ۴۰/۰۴	۱۳۱/۵۷ ± ۱۵/۷۴	۱۳۴/۰۰ ± ۱۴/۸۷
انسولین (میکرو واحد بر میلی لیتر)	۰/۵۳ ± ۳/۸۹	۱/۳۵ ± ۶/۲۲	۲/۸۷ ± ۷/۳۶	۰/۸۹ ± ۵/۱۲
HOMA.IR	۰/۳۳ ± ۳/۱۸	۰/۳۵ ± ۲/۰۴	۰/۶۸ ± ۲/۳۱	۰/۳۶ ± ۱/۶۹
RBP4.gen.Fold.cheng	۱	۰/۸۲ ± ۰/۳۷	۰/۸۳ ± ۰/۶۴	۰/۷۷ ± ۰/۵۰
AMPK.gen.Fold.cheng	۱	۴/۳۲ ± ۳/۰۶	۲/۰۷ ± ۱/۷۰	۳/۰۷ ± ۱/۵۸

**شکل ۱-** بیان ژن RBP و شکل ۲ بیان ژن AMPK را در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد.



**شکل ۱-** بیان ژن RBP را در گروه‌های مختلف



**شکل ۲-** بیان ژن AMPK را در گروه‌های مختلف

جدول ۶- نتایج تحلیل واریانس دو عاملی و تعقیبی و نیز اندازه اثر گروه‌ها

معنی داری	اندازه اثر	Sig.	F	گروه	گروه	متغییر/شاخص آماری
P= ۰/۶۲۷	۰/۰۳۶	۰/۳۴۱	۰/۹۴۳	تمرین	کنترل	وزن(گرم)
	۰/۰۱۳	۰/۵۶۹	۰/۳۳۴	ژل رویال		
	۰/۱۴۷	۰/۰۴۹	۴/۲۹	تمرین*ژل رویال		
C&E. P= ۰/۰۰۰۱ E &EG. P= ۰/۹۹۲ C&EG. P= ۰/۰۰۰۱	۰/۷۵۲	۰/۰۰۰۱	۷۵/۷۰	تمرین	کنترل	گلوکز(میلی گرم بر دسی لیتر)
	۰/۷۷۶	۰/۰۰۰۱	۸۶/۵۳	ژل رویال		
	۰/۷۶۱	۰/۰۰۰۱	۷۹/۵۵	تمرین*ژل رویال		
C&G. P= ۰/۰۰۱	۰/۰۰	۰/۹۴۶	۰/۰۰۵	تمرین	کنترل	انسولین (میکرو واحد بر میلی لیتر)
	۰/۱۲۷	۰/۰۶۹	۳/۶۲	ژل رویال		
	۰/۳۵۰	۰/۰۰۱	۱۳/۴۵	تمرین*ژل رویال		
C&E. P= ۰/۰۰۱ C&G. P= ۰/۰۰۱ E&EG P= ۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۲	۲۶/۲۳	تمرین	کنترل	شاخص مقاومت به انسولین
	۰/۰۰۱	۰/۱۶۷	۱۲/۷۸	ژل رویال		
	۰/۱۴۵	۰/۳۹۴	۲/۲۶	تمرین*ژل رویال		
C&E. P= ۰/۰۰۱ G&EG. P= ۰/۰۰۱ G&E. P= ۰/۰۰۱	۰/۰۲۱	۰/۵۱۵	۰/۴۳۹	تمرین	کنترل	بیان ژن RBP4 (Fold Cheng)
	۰/۰۱۹	۰/۵۳۶	۰/۳۹۷	ژل رویال		
	۰/۰۰۵	۰/۷۵۷	۰/۰۹۹	تمرین*ژل رویال		
C&E. P= ۰/۰۰۰۸	۰/۰۲۳	۰/۰۰۲	۶/۱۵	تمرین	کنترل	بیان ژن AMPK (Fold Cheng)
	۰/۰۰۱	۰/۰۹۲	۰/۰۰۱	ژل رویال		
	۰/۰۰۸	۰/۰۱۹	۱/۷۹	تمرین*ژل رویال		

تمرین و ژل رویال=EG، ژل رویال=G، تمرین=E، کنترل=C

هم قابل توجه نیست ولی مشاهده نمودار ۱ و جدول ۶ و از مقایسه تفاضل میانگین‌ها نشان می‌دهد، اثر ترکیب تمرین تناوبی-ژل رویال و تمرین و مصرف ژل بر کاهش نسبت بیان ژن RBP4 به ترتیب بیشتر بود. همچنین نتایج نشان داد بیان ژن AMPK در گروه‌های تجربی نسبت به کنترل افزایش داشت که در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به کنترل افزایش معنی دار مشاهده شد (P=۰/۰۰۸).

### بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تمرین تناوبی شدید تناوبی و ژل رویال منجر به کاهش معنی دار گلوکز و افزایش انسولین و کاهش معنی دار مقاومت به انسولین موش‌های دیابتی نوع دوم تغذیه شده با رژیم

ژل رویال (۵/۱۲) نسبت به گروه ژل رویال (۷/۳۶) تفاوت معنی داری نداشت (G&EG. P=۰/۹۹۲) اما گروه ژل رویال نسبت به کنترل افزایش معنی داری داشت. و در گروه تمرین ژل رویال نسبت به کنترل افزایش غیرمعنی دار داشت. میانگین شاخص مقاومت به انسولین (HOMA) در گروه تمرین (۲/۰۴) نسبت به گروه کنترل (۳/۱۸) و ژل رویال (۲/۳۱) کاهش معنی دار داشت (E&G. P=۰/۰۴۴). نتایج نشان داد انجام تمرین تناوبی و مصرف ژل رویال هر کدام به تنهایی و باهم بر نسبت بیان ژن RBP4 گروه‌های مورد مطالعه معنا دار نیست. نتیجه گرفته می‌شود که نسبت بیان ژن RBP4 در گروه‌های تجربی نسبت به کنترل کاهش داشته است. هرچند تحلیل واریانس دو عاملی نشان داده می‌شود که کاهش معنی دار نبوده است و اندازه اثرها

سرمی RBP4 می شود که این تغییرات به طور معنی داری در گروه تمرین مقاومتی بیشتر از گروه تمرین هوازی بود و تغییرات RBP4 در تمرین های HIIT نیز مشابه تمرین های مقاومتی می باشد (۳۳ و ۳۴).

بیان شده که AMPK حساسیت انسولینی بعد از فعالیت ورزشی را بهبود می بخشد. ریم کو و همکاران، در تحقیق خود نشان دادند که ۸ هفته فعالیت ورزشی هوازی سبب افزایش مسیر سیگنالینگ AMPK در بافت عضلانی موش های دیابتی شد که در بهبود حساسیت انسولینی نیز موثر بود بنابراین یکی از راه ها و هدف های درمانی بیماری دیابت افزایش AMPK برای افزایش مصرف گلوکز جریان خون می باشد، که تحت تاثیر تمرین های ورزشی به ویژه HIIT قرار می گیرد و می تواند به مقابله با تاثیرات منفی RBP4 برخیزد. در پژوهش آقای و همکاران نیز القای دیابت سبب افزایش معنی داری در میزان بیان RBP4 شد و پس از ۸ هفته انجام تمرین HIIT میزان بیان آن نسبت به کنترل کاهش معنی داری نشان داد و بیان ژن AMPK در گروه تمرین HIIT افزایش معنی داری داشت (۳۵ و ۳۶).

مطالعات نشان داده است که روش های مختلف تمرینی، تاثیر مثبتی بر حساسیت به انسولین، کنترل گلیسمی و سایر عوامل خطر مرتبط با دیابت نوع ۲ دارد. به خوبی نشان داده شده است که تمرین ورزشی، حتی تمرین حاد، می تواند حساسیت به انسولین در عضله موش های چاق را بهبود بخشد. ورزش هوازی باید یکی از ویژگی های کلیدی برنامه های تمرینی در دیابت نوع ۲ باشد. با اینکه اثربخشی و مقرون به صرفه بودن ورزش برای پیشگیری دیابت نوع ۲ به خوبی شناخته شده است. در رابطه به مکانیزم های سلولی مولکولی برای افزایش برداشت گلوکز توسط انسولین با تمرین ورزشی می توان گفت ممکن است این کار تا حدودی به افزایش بیان و فعالیت پروتئین های کلیدی شناخته شده برای تنظیم متابولیسم گلوکز در عضلات و کبد مرتبط باشد (۳۷-۴۰).

بنابراین نتایج پژوهش حاضر نیز که کاهش غیر معنی دار در بیان ژن RBP4 را در بافت عضله نعلی در گروه

پر چرب گردید و بیان ژن RBP4 بافت عضله نعلی را در گروه تمرین تناوبی نسبت به کنترل در بافت عضله نعلی کاهش اما معنی دار نبود و بیان ژن AMPK در گروه های تجربی افزایش یافت که در گروه تمرین تناوبی افزایش معنی دار مشاهده شد.

مکانیسم های متنوعی در رابطه با تاثیرهای RBP4 در القای مقاومت به انسولین و دیابت نوع دوم ذکر شده است. نشان داده شده که RBP4 سرمی در القای مقاومت به انسولین به وسیله تحریک بیان آنزیم های گلوکونئوزنیک در کبد و اختلال سیگنالینگ انسولین در عضله سهیم می باشد. در بافت عضلانی یک همبستگی منفی بین RBP4 و دسترسی به گلوکز و سطوح GLUT4 در افراد با سابقه دیابت وجود دارد. به بیان دیگر افزایش غلظت RBP4، فعالیت فسفوانوزیتید 3 کیناز (PI3-kinase) را کاهش می دهد و متعاقب آن سوپسترای گیرنده انسولینی ۱ (IRS-1) را فسفوریله و بر روی نقل و انتقال GLUT4 نیز تاثیر میگذارد که از این طریق بر مسیر سیگنالینگ انسولین تاثیر گذاشته و مصرف گلوکز وابسته به انسولین را در بافت عضله کاهش می دهد. محققین پیشنهاد داده اند که کاهش و مهار RBP4 در کاهش آسیب های ناشی از دیابت میتواند تاثیر داشته باشد. به عنوان مثال، اخیرا در پژوهشی تاثیرات مفید فرتینید (یک مهار کننده RBP4) در درمان موش ها، با رژیم غذایی پرچرب مورد تایید قرار گرفته است، به طوری که نتایج تحقیق فوق نشان داده که فرتینید از ایجاد عدم تحمل گلوکز و مقاومت به انسولین در کبد و عضله پیشگیری میکند و تولید گلوکز در کبد و متابولیسم گلوکز در عضله را بهبود می بخشد (۳۱ و ۳۲).

از جمله راه های پیشگیری و درمان دیابت، افزایش تحرک و انجام فعالیت ورزشی می باشد. مطالعات زیادی نشان داده اند که سطوح RBP4 با تمرین ورزشی افت می کند. فیلیپس و کوبولد در مقاله مروری خود بیان کردند که تمرین های ورزشی با شدت بالاتر، تاثیرات مثبت و زیادتری بر سطوح RBP4 پلاسمایی دارد بیان شده که ۱۲ هفته تمرین هوازی و مقاومتی در افراد با دیابت نوع ۲، سبب تغییرات معنی داری در غلظت

و تکمیلی هورمون ها و نروپیتاید های مرتبط با چاقی و اشتها اندازه گیری و ارتباط سنجی شود و نیز میزان غذای مصرفی هر یک از موش ها به طریقی اندازه گیری شود که جزو محدودیت های این پژوهش بود. آپی ژنین و کوئرسستین استرس اکسیداتیو ناشی از استرپتوزوتوسین را در سلول های بتا، کبد و کلیه مهار می کنند و رادیکال های آزاد را کاهش می دهند (۴۶ و ۴۷). آپیژنین و کامفرول اثر هیپوگلیسمیک در موش های صحرایی دیابتی دارند و می توانند گلوکز ناشتا را کاهش دهند که در این پژوهش هم این نتیجه مشاهده شد (۴۸). ژل رویال با خاصیت قوی آنتی اکسیدانی، در برابر گونه های فعال اکسیژن نظیر رادیکال هیدروکسیل و آنیون سوپراکسید مبارزه می کند (۴۹) و به میزان قابل توجهی موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش آنتی اکسیدان ها در بافت پانکراس بیماران دیابتی تیپ ۲ می شود که با توجه به مطالب ذکر شده، بخشی از این اثرات احتمالا به علت وجود فلاونوئیدها در ژل رویال ایجاد شده است. اثر هیپوگلیسمیک ژل رویال را به ویتامین های موجود در آن نیز می توان نسبت داد (۵۰ و ۵۱). مطالعات نشان داده است که ویتامین های B، C، E، D، بیوتین و نیاسین به فراوانی در ژل رویال یافت می شود. ویتامین C سطح گلوکز سرم را در دیابت نوع دو کاهش می دهد (۵۲) و در بسیاری از واکنش های شیمیایی به صورت رقابتی جاننشین گلوکز می شود و از گلیکوزیلاسیون پروتئین ها به خصوص هموگلوبین و لیپوپروتئین ها ممانعت می کند. ویتامین های B1، B6، B12، D، E، بیوتین و نیاسین نیز عملکرد سلول های بتا را تقویت می کنند و با تحریک تولید گلیکوژن و مهار گلوکونئوژن، سطح گلوکز را در بیماران مبتلا به دیابت کاهش می دهد. (۵۳). بنابراین بخشی از نقش مصرف ژل رویال بر کاهش گلوکز را می توان به ترکیبات ویتامینی موجود در آن نسبت داد.

### نتیجه گیری

به طور کلی با توجه به نتایج تحقیق می توان نتیجه گرفت که تمرینات تناوبی و همینطور در تعامل با ژل

تجربی به ویژه کاهش بیشتر را در گروه تعاملی تمرین تناوبی شدید- ژل رویال نشان می دهد و همچنین کاهش بیان بیشتر این ژن در گروه تعاملی تمرین تناوبی - ژل رویال از این مباحث حمایت می کند و می تواند اثر گذاری انجام تمرین تناوبی و ژل را بر هم در کاهش بیان ژن RBP4 بافت عضله نعلی بر طبق مسیر های تنظیمی اشاره شده نشان دهد ولی در گروه ژل رویال تنها، کاهش معنی داری در بیان این ژن مشاهده نشد که می توان استنباط کرد در هنگام استفاده از ژل رویال جهت استفاده از خواص دارویی و آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آن انجام تمرینات تناوبی می تواند اثر بخشی آن را از طریق کاهش بیشتر بیان ژن RBP4 بهبود بخشد. همچنین در گروه های تجربی بیان ژن AMPK افزایش یافت که اثر تاثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن AMPK معنی دار بود که می تواند از طریق فعال سازی GLUT4 و افزایش مصرف گلوکز به طور موثر دیابت را بهبود بخشد برای درمان آن مورد استفاده قرار گیرد (۴۱ و ۴۲).

ژل رویال نیز حاوی مقادیر فراوانی ترکیبات فنلی از خانواده فلاونوئیدها است که از مهم ترین آن ها می توان کوئرسستین، کامفرول، آپیژنین و لوتئولین را نام برد (۴۳). فلاونوئیدها از چند جهت بر دیابت تاثیر می گذارند، این ترکیبات موجب تنظیم متابولیسم کربوهیدرات و لیپید و کاهش هیپرگلیسمی، دیس لیپیدمی و مقاومت به انسولین می شوند و از استرس اکسیداتیو و پاسخ های التهابی ممانعت می کنند. فلاونوئیدها (به خصوص کوئرسستین) از کاهش وزن در دیابت نیز جلوگیری می کنند (۴۴ و ۴۵). بنابراین ممکن است ژل رویال با محتوای فلاونوئیدی خود از کاهش وزن موش های دیابتی در مطالعه حاضر جلوگیری کرده باشد و حتی افزایش غیر معنی دار وزن هم در گروه تمرین و ژل رویال داشتیم و در گروه تمرین هم احتمالا به دلیل افزایش اشتها در نتیجه افزایش فعالیت هورمون ها و نروپیتاید های اشتها در نتیجه انجام فعالیت های ورزشی میزان و رفتار دریافت غذا توسط موش ها افزایش یافته و احتمالا گروه تمرین ژل رویال نیز بیشتر غذا مصرف می کردند که لازم است در پژوهش های آتی

insulin sensitivity. *Endocr Rev.* 1998 Aug; 19(4):491-503. doi:10.1210/edrv.19.4.0338. PMID: 9715377.

2. Mehrabani j, Damirchi A., Rahmaninia F. Effect of Two Aerobic Exercise Intensities on Lipocalin-2, Interleukin-1 $\beta$  Levels, and Insulin Resistance Index in Sedentary Obese Men, *Sport Physiology*, 2014; 21:p.95-108.

3. jabbari E, gholami M, nikbakht H, shakeri N, ghazaliyan F. Effect of aerobic training and L-carnitine supplementation on some apoptotic factors in diabetic rat liver. *RJMS.* 2019; 26 (7) :131-140 URL: <http://rjms.iuums.ac.ir/article-1-5798-fa.html>.

4. Sun Y, Hong J, Chen M, Ke Y, Zhao S, Liu W, et al. Ablation of Lgr4 enhances energy adaptation in skeletal muscle via activation of Ampk/Sirt1/Pgc1 $\alpha$  pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; 464(2): 396-400.

5. Lin CH, Wu JB, Jian JY, Shih CC. Epicatechin-3-O- $\beta$ -D-allopyranoside from *Davallia formosana* prevents diabetes and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *PloS One* 2017; 12(3):e0173984.

6. Kjøbsted R, Munk-Hansen N, Birk JB, Foretz M, Viollet B, Bjørnholm M, et al. Enhanced muscle insulin sensitivity after contraction/exercise is mediated by AMPK. *Diabetes* 2016: db160530.

7. Hasan ghomi M, Arshadi S, Banaeifar A, Kazemzade Y. The Effect of Eight Weeks Aerobic and Resistance Training on AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Gene Expression in Soleus Muscle and Insulin Resistance of STZ-Induced Diabetic Rat. *Journal of Medical council of iran.* 2019; 37(2):81-87. URL: <http://jmciri.ir/article-1-2905-fa.html>

8. Godin, G., Desharnais, R., Valois, P., Lepage, L., Jobin, J., Bradet, R., (1994). Differences in perceived barriers to exercise between high and low intenders: observations among different populations. *American Journal Health Promotion*, (8)4, 279-285. <https://doi.org/10.4278/0890-1171-8.4.279>

9. Khajehlandi Ali, Abed Natanzi Hossein, Nikbakht Hojatallah. The Effect of Swimming Training and Aloe Vera Extract on Lipid Profile of Male Diabetic Rats. *Journal of Isfahan Medical School.* Vol. 34, No. 411, 3rd Week, February 2017. <http://jims.mui.ac.ir/index.php/jims/article/view/7102> [Persian].

10. Shapiro K, Gong WC. Natural products used for diabetes. *J Am Pharmacol Assoc* 2002; 42: 217-26. <https://doi.org/10.1331/108658002763508515>.

11. Khajehlandi Ali, Abed Natanzi Hossein, Nikbakht Hojatallah. The Effect of Swimming Training and Aloe Vera Extract on Lipid Profile of Male Diabetic Rats. *J Isfahan Med School.* 2017; 34 (411). [Persian].

رویال می تواند باعث کاهش بیان ژن RBP4 و افزایش بیان ژن AMPK گردد و در بهبود سطوح گلوکز به واسطه تاثیر مولفه های ژنتیکی موثر در مصرف گلوکز عضلانی در بیماران دیابتی نوع ۲ موثر می باشد و ژل رویال هم بدلیل ترکیبات متنوع ویتامینی و پروتئینی و ترکیبات فنلی و جایگزین خوب برای نقش گلوکز و نیز نقش های متعدد آنتی اکسیدانی و ضد التهابی و ... موجب تنظیم متابولیسم کربوهیدرات ها به ویژه گلوکز و نیز تنظیم متابولیسم لیپید و کاهش هیپرگلیسمی و دیس لیپیدمی و کاهش مقاومت به انسولین می شوند و از استرس اکسیداتیو و پاسخ های التهابی افراد دیابتی نوع دو که دیابت مرتبط با ورزش و معمولا همراه با اضافه وزن و چاقی نیز می باشد ممانعت می کنند، اما مصرف ژل رویال به تنهایی نمی تواند در این زمینه ها و تغییرات ژن RBP4 موثر باشد و استفاده از برنامه های تمرینی ورزشی هواری از نوع تمرینات تناوبی می تواند اثر بخشی آن را بهبود بخشد. با این وجود انجام مطالعات بیشتر و تکمیلی در این زمینه ضروری می باشد. از طرفی برای مطالعه بیشتر دلایل این تغییرات و بررسی مسیر سیگنالینگ بالادستی این ژن ها پیشنهاد می گردد عواملی مانند PGC1-a و GLUT4 نیز در این مسیر مورد بررسی قرار گیرند و علاوه بر بافت عضله، بافت آدیپوز و کبد نیز که یکی از فعال ترین بافت ها حین فعالیت ورزشی است مورد بررسی قرار گیرد.

### تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از رساله دکتری فاطمه صائبی بود و با کد اخلاق IR.SSRC.REC.1399.128 در کمیته اخلاق پزشکی پژوهشگاه تربیت بدنی وزارت علوم تایید شد. از تمام همکاران پژوهشی و پرسنل آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می شود.

### References

1. Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired

12. Yeylaghi Ashrafi M R, Abednatanzi H, Ghazalian F. The effect of eight weeks of high intensity interval training and n-chromosomal royal jelly on G6Pase gene expression in hepatocytes, glucose levels and insulin resistance in type 2 diabetic rats. *RJMS*. 2020; 27 (8). URL: <http://rjms.iuums.ac.ir/article-1-6387-en.html> [Persian].
13. Khazaei M, Ansarian A, Ghanbari E. New findings on biological actions and clinical applications of royal jelly: a review. *J Diet Suppl*. 2018; 15(5):757-75.
14. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*. 2008; 73(9):117-24.
15. Izuta H, Chikaraishi Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Evid-Based Complement Altern Med*. 2009; 6(4):489-94.
16. Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement Altern Med*. 2009; 26:9(4).
17. Nagai T, Inoue R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chem*. 2004; 84(2):181-6.
18. Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: a review. *J Funct Foods*. 2012; 4:39-52.
19. Shidfar F, Jazayeri Sh, Musavi SN, Malek M, and et.al. Does Supplementation with Royal Jelly Improve Oxidative Stress and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients? *Iran J Public Health*. 2015; 44(6):797-803.
20. Nomura M, Maruo N, Zamami Y, Takatori S, Kawasaki H. Effect of long-term treatment with royal jelly on insulin resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Yakugaku zasshi: J Pharm Soc Jpn*. 2007; 127(11):1877-82.
21. Aveseh M, Nikooie R, Atabi F, Mirzaie zadeh Z, Omidfar K, Larijani B. THE EFFECT OF SEVEN WEEKS ENDURANCE TRAINING ON RBP4 GENE EXPRESSION IN SKELETAL MUSCLE IN TYPE 2 DIABETIC RATS. *ijdd*. 2014; 13 (2) :102-110  
URL: <http://ijdd.tums.ac.ir/article-1-5106-fa.html>
22. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, et al. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci*, 2006 Aug 8; 79(11): 1100-1107. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.03.021
23. Gheibi. Sevda, Bakhtiari Zadeh. F, Ghasemi. A. A review of the high-fat diet model - Streptozotocin for type 2 diabetes in rats. *Journal of Endocrinology and Metabolism of Iran, Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services, Volume 18*. No. 2. Pages 135 to 148. July 2016. [Persian]. URL: <http://ijem.sbm.ac.ir/article-1-2039-en.html>
24. Aghanouri Z, Nouredini M, Salami M. Effect of Citrullus Colocynthis on diabetic rat's plasma glucose. *Feyz*. 2009; 12 (4):1-6. [Persian]. URL: <http://feyz.kaums.ac.ir/article-1-678-fa.html>.
25. Moeini Fard.M, Hedayati.M. Aluxan and Streptozotocin, Diabetes Research Tool. *Journal of Applied Sports Physiology, Tenth Year, Issue 20* (2014). 10(20): 13-22. Doi: 10.22080/jaep.2015.915 [Persian].
26. Asgari M, Asle-Rousta M, Sofiabadi M, Effect of Royal Jelly on Blood Glucose and Lipids in Streptozotocin Induced Type 1 Diabetic Rats. *Arak Med Uni J*. 2017; 20(122): 48-56.
27. Baburao Waykar B. and Alqadhi YA, Administration of Honey and Royal Jelly Ameliorate Cisplatin Induced Changes in Liver and Kidney Function in rats. *Biomed Pharmacol J*. 2018; 11(4):2191-2199.
28. Rodrigues, Bruno, Diego M Figueroa, and ET. All. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in Streptozotocin -diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology* 2007, 6:38 doi: 10.1186/1475-2840-6-38.
29. Akbarzadeh A, Fattahi bafghi A. The effect of high intensity interval training combined with curcumin supplementation on Plasma glucose concentration and insulin resistance in diabetic rats. *JSSU*. 2018; 25 (12):961-969 URL: <http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-4261-en.html>. [Persian].
30. Rezaei. R, Norshahi M, Bigdeli. M R, Khodaghali. F, Haghparast. A, Effect of eight weeks of continuous and interval intense aerobic exercise on VEGFR-2 and VEGF-A values in the brain tissue of wistar rats. *Journal of Exercise Physiology and Physical Activity. Physiology of Exercise and Physical Activity*, 2015; 8(2): 1213-1221. [http://oeppa.sbu.ac.ir/article\\_98757.html?lang=fa](http://oeppa.sbu.ac.ir/article_98757.html?lang=fa) [Persian].
31. Ost A, Danielsson A, Lidén M, Eriksson U, Nystrom FH, Stralfors P. Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes. *The FASEB Journal* 2007; 21(13): 3696-704.
32. Preitner F, Mody N, Graham TE, Peroni OD, Kahn BB. Long-term fenretinide treatment prevents high-fat diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2009; 297(6): E1420-9.
33. Ku Y, Han K, Ahn H, Kwon H, Koo B, Kim H, et al. Resistance exercise did not alter intramuscular adipose tissue but reduced retinol-binding protein-4 concentration in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of International Medical Research* 2010; 38(3): 782-91.

34. Phillips A, Cobbold C. A comparison of the effects of aerobic and intense exercise on the type 2 diabetes mellitus risk marker adipokines, adiponectin and retinol binding protein-4. Review article, International Journal of Chronic Diseases 2014; 5: 358058.
35. Ko JR, Seo DY, Park SH, Kwak HB, Kim M, Ko KS, et al. Aerobic exercise training decreases Cereblon and increases AMPK signaling in the skeletal muscle of STZ-induced diabetic rats. Biochemical and Biophysical Research Communications 2018; 501(2): 448-53.
36. Aghaei F, Mohsenzadeh M, Nameni F, Feizollahi F. The Effect of High Intensity Interval Training on Retinol Binding Protein 4 and AMP-Activated Protein Kinase Gene Expression in Skeletal Muscle of Rats with Type II Diabetes. Armaghane danesh. 2019; 23 (6) :709-721. URL: <http://armaghanej.yums.ac.ir/article-1-2242-fa.html>
37. Wu H, Deng X, Shi Y, Su Y, Wei J, Duan H. PGC-1 $\alpha$ , glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus. J Endocrinol 2016; 229(3):R99-R115. DOI: 10.1530/JOE-16-0021
38. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. Nature 2001; 413(6852):131. DOI: 10.1038/35093050
39. Rui L. Energy metabolism in the liver. Comprehensive Physiology. 2014; 4(1): 177. DOI: 10.1002/cphy.c130024
40. Aoi W, Ichiishi E, Sakamoto N, Tsujimoto A, Tokuda H, Yoshikawa T. Effect of exercise on hepatic gene expression in rats: a microarray analysis. Life Sci 2004; 75(26):3117-28. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.04.053>
41. Sharabi K, Lin H, Tavares CD, Dominy JE, Camporez JP, Perry RJ, et al. Selective chemical inhibition of PGC-1 $\alpha$  gluconeogenic activity ameliorates type 2 diabetes. Cell 2017; 169(1):148-60. e15. DOI: 10.1016/j.cell.2017.03.001
42. Way KL, Hackett DA, Baker MK, Johnson NA. The effect of regular exercise on insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. J Diabetes Metab 2016; 40(4):253-71. DOI: 10.4093/dmj.2016.40.4.253.
43. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. J Food Sci. 2008; 73(9): 117-24.
44. Kocot J, Kiełczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. Oxid Med Cell Longev. 2018; 1-29.
45. Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, De Nigris V, Ceriello A. The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complic. Nutr. 2016; 8(5): 310.
46. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. Pharmacol Res. 2005; 51(2): 117-23 .
47. Rauter AP, Martins A, Borges C, Mota-Filipe H, Pinto R, Sepodes Bet al. Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. Phytother Res. 2010; 24(S2): S133-8.
48. De Sousa E, Zanatta L, Seifriz I, Creczynski-Pasa TB, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, Silva FR. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3, 7-O-( $\alpha$ -dirhamnoside from Bauhinia forficata Leaves. J Nat prod. 2004; 67(5): 829-32.
49. Nagai T, Inoue R, Suzuki N, Nagashima T. Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly. J Med food 2006; 9(3): 363-7.
50. Amirshahi T, Nejati V, Najafi G. Biochemical and Histological Evaluation of Protective Effect of Royal Jelly on Pancreas Induced Oxidative Stress in Male Rat Pancreas. J Mazandaran Uni Med Sci. 2013; 23(107).
51. Afkhami-Ardekani M, Shojaoddiny Ardekani A. Effect of vitamin C on blood glucose, serum lipids & serum insulin in type 2 diabetes patients. Indian J Med Res. 2007; 126(5): 471.
52. Dakhale GN, Chaudhari HV, Shrivastava M. Supplementation of vitamin C reduces blood glucose and improves glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind study. Adv Pharmacol Sci. 2011; 1-5.
53. Xiang X, Liu Y, Zhang X, Zhang W, Wang Z. Effects of biotin on blood glucose regulation in type 2 diabetes rat model. J Hyg Res. 2015; 44(2): 185-9.