Journal of Sport and Exercise Physiology
Autumn 2022/Vol.15/No.3/25-34

The effect of six weeks High Intensity Interval Swimming Training and Resveratrol supplementation on the level of SIRT3 in left ventricular heart of aged rats

Ali Reza Rezaei[1], Abbas Ali Gaeini[*2], Sirous Choobineh[2], Reza Nuri[1]

1 Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran Kish International Campus, Kish, Iran.
2 Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.

Original Article

Abstract

Background and Purpose: Identification and analysis of compounds that playing a role in delay aging and increase longevity is essential. Sirtuins are one of the main regulators of cell survival and longevity. The goal of this research was to investigate the effect of six weeks HIIT swimming exercise and Resveratrol supplementation on the level of SIRT3 in left ventricular heart of aged rats.

Materials and Methods: In this research, 30 wistar rats were randomly divided into five groups (control (C), solvent (M), supplement (R), HIIT exercise (EX), HIIT exercise and supplement (EXR)). The EX group performed HIIT swimming for six weeks. C group did not practice. R group received only resveratrol supplementation. EXR group performed HIIT swimming exercises with resveratrol and M group received only solvent. The SIRT3 protein was obtained by Western blotting. Data were analyzed using One-way ANOVA analysis of variance and Tukey's post hoc test.

Results: After six weeks, there was a significant difference between the mean SIRT3 protein levels in the five groups. Therefore, Tukey post hoc test showed that SIRT3 levels were significantly increased in EX and EXR groups compared to C, R and M groups (P = 0/001). However, this difference between EX and EXR groups was not significant (P > 0.05). Moreover, the amount of SIRT3 in group R was significantly higher compared to groups C and M.

Conclusion: Increasing the amount of SIRT3 indicates the involvement of this protein in metabolic pathways, antioxidant defense and improves cell condition. High intensity interval training with resveratrol supplement consumption can also be used to moderate oxidative stress and delay the aging process.

Keywords: Life span, Exercise Training, Antioxidant Supplements.

How to cite this article: Rezaei A, Gaeini A, Choobineh S, Nuri R. The effect of six weeks High Intensity Interval Swimming Training and Resveratrol supplementation on the level of SIRT3 in left ventricular heart of aged rats. Journal of Sport and Exercise Physiology. 2022;15(3):25-34.

*Corresponding Author; E-mail: aagaeini@yahoo.com
DOI: 10.52547/joeppa.15.3.25

Received: 15/11/2021 Revised:29/12/2021 Accepted: 01/01/2022

نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی
پاییز ۱۴۰۱/ دوره ۱۵/ شماره ۳/ صفحه‌های ۲۵-۳۴

تأثیر شش هفته تمرین تناوبی شدید شنا و مکمل رزوراترول بر میزان SIRT3 در بافت بطن چپ قلب موش‌های صحرایی پیر

علیرضا رضائی[۱]، عباسعلی گائینی[۳*]، سیروس چوبینه[۲]، رضا نوری[۱]

۱ دانشکدهٔ تربیت بدنی و علوم ورزشی، پردیس دانشگاه تهران، کیش، ایران.
۲ دانشکدهٔ تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

مقاله پژوهشی

چکیده

زمینه و هدف: شناسایی و تجزیه‌وتحلیل اجزایی که در به تأخیر انداختن پیری و افزایش طول عمر نقش دارند، بسیار ضروری است. سیرتوئین‌ها از تنظیم‌کننده‌های اصلی بقای سلولی و طول عمر هستند. هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر شش هفته فعالیت ورزشی HIIT شنا و مکمل رزوراترول بر مقدار SIRT3 در بافت بطن چپ قلب موش‌های صحرایی پیر بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، ۳۰ سر موش صحرایی ۲۰ ماهه (پیر) نر نژاد ویستار تصادفی به پنج گروه (کنترل (C)، گروه تمرین (EX)، گروه تمرین+مکمل (EXR)، گروه مکمل (R) و گروه حلال (M)) تقسیم شدند. گروه EX، تمرین HIIT شنا را به مدت شش هفته انجام دادند. گروه C، تمرین نمی‌کردند. گروه R، فقط مکمل رزوراترول دریافت کردند. گروه EXR، تمرین HIIT شنا را همراه با دریافت رزوراترول انجام دادند. گروه M فقط حلال دریافت کردند. SIRT3 با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن بلات سنجیده شد. داده‌های حاصله توسط آزمون آماری تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه‌وتحلیل شدند.

نتایج: پس از شش هفته، تفاوت معناداری بین میانگین میزان پروتئین SIRT3 در پنج گروه مشاهده شد. بنابراین، آزمون تعقیبی توکی نشان داد که مقدار SIRT3 در گروه EX و EXR در مقایسه با گروه C، R و M، به‌طور معناداری بیشتر بود (P=۰/۰۰۱)، اما این تفاوت بین دو گروه EX و EXR معنادار نبود (P>۰/۰۵). همچنین، مقدار SIRT3 در گروه R به‌طور معناداری در مقایسه با گروه C و M بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: افزایش SIRT3، نشان‌دهندهٔ دخیل بودن این پروتئین در مسیرهای سوخت‌وسازی، دفاع ضداکسایشی و بهبود وضعیت سلول است. همچنین می‌توان از تمرین تناوبی شدید همراه با مصرف مکمل رزوراترول برای تعدیل فشار اکسایشی و تأخیر روند پیری و سالمندی بهره برد.

واژه‌های کلیدی: تمرین ورزشی، طول عمر، مکمل‌های ضداکسایشی.

* نویسنده مسئول: رایانامه: aagaeini@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۴ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۱

مقدمه

فرایند پیری، با کاهش تدریجی عملکردهای فیزیولوژیایی، افزایش تدریجی آسیب‌های مختلف، کاهش کارایی عملکردی و هومئوستاز سلول‌ها و بافت‌ها همراه است (۱). نظریهٔ بیوشیمیایی، به تغییرات در سوخت‌وساز انرژی، تولید بنیان‌های آزاد، میزان زندگی و سلامت میتوکندری طی افزایش سن اشاره دارد (۲). طی سال‌های اخیر، مطالعات گسترده‌ای برای یافتن روش‌ها، مسیرهای پیام‌رسانی و مولکول‌های هدف تأثیرگذار بر سلامت انجام گرفته است. از جمله عواملی که اخیراً به آن‌ها پرداخته شده است، خانوادهٔ پروتئینی سیرتوئین‌ها هستند که در بخش‌های مختلف سلول قرار دارند و از پروتئین‌های دی‌استیلاز وابسته به NAD^+ هستند که چندین فعالیت سلولی و واکنش‌های مهم سلولی را تنظیم می‌کنند. در واقع فعالیت آنزیمی سیرتوئین‌ها نیازمند NAD^+ است، بنابراین در شرایط استرس انرژیتیکی مانند محدودیت کالریک، گرسنگی و فعالیت ورزشی میزان سیرتوئین‌ها به‌طور معناداری افزایش می‌یابد (۳). نشان داده شده است سیرتوئین‌ها از تنظیم‌کننده‌های اصلی و مهم بقای سلولی و طول عمر موجود زنده‌اند (۴) و احیای سلولی را از طریق سازوکارهای متعددی افزایش می‌دهند (۵). سیرتوئین‌ها، پروتئین‌های کلاس III یک خانواده از آنزیم‌های هیستون داستیلاز هستند. در پستانداران هفت سیرتوئین شناسایی شده است. SIRT1 و SIRT2 در هسته و سیتوپلاسم، SIRT3,4,5 در میتوکندری و البته SIRT3 همچنین در هسته و سیتوپلاسم و SIRT6 و SIRT7 در هسته قرار دارند (۶) SIRT3 میتوکندریایی پروتئینی است که از طریق استیل‌زدایی در بسیاری از جنبه‌های زیستی میتوکندری مانند اکسایش مواد غذایی، تولید ATP، غیرفعال کردن و مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن مؤثر است. همچنین SIRT3 در حفظ سطوح پایهٔ ATP نقش ایفا می‌کند و تنظیم‌کنندهٔ انتقال الکترون میتوکندریایی است. افزون بر این دیده شده است فقدان و کمبود SIRT3 احتمالاً با افزایش ابتلا به بیماری‌های مرتبط با افزایش سن در ارتباط است (۷). به‌طور کلی، گفته شده است کاهش SIRT3، از لحاظ مکانیکی با کاهش عملکرد قلبی ارتباط دارد (۸). SIRT3 در تنظیم محتوا و زیررده‌های میتوکندریایی از طریق PGC-1α شرکت دارد (۹) و بیوژنز میتوکندریایی را تحریک می‌کند (۱۰). همچنین شواهدی مبنی بر ارتباط نزدیک بین SIRT3، PGC-1α و SOD2 وجود دارد که افزایش SIRT3 و PGC-1α با افزایش پاسخ‌های ضداکسایشی و بیان پروتئین SOD2 همراه است (۱۱). مهار SIRT3 در موش‌ها به افزایش استیله شدن پروتئین‌های میتوکندریایی، کاهش محتوای میتوکندری، افزایش تولید ROS و نیز کاهش آنزیم SOD2 در میتوکندری منجر می‌شود (۱۲). با توجه به عملکرد مفید سیرتوئین‌ها در افزایش طول عمر، تلاش‌ها به استفاده از فعال‌کننده‌های آن مانند رزوراترول به‌عنوان دارو معطوف شده است (۱۳). رزوراترول، یک مادهٔ پلی‌فنولیک طبیعی و فیتوآلکسین است که در طبیعت از گیاهان در مقابل قارچ‌ها محافظت می‌کند. این ماده در پوست انگور، توت‌ها، بادام‌زمینی و سایر گیاهان یافت می‌شود. با پیشرفت کارهای پژوهشی حیوانی دیده شد رزوراترول از سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، آسیب ایسکمیک و آلزایمر جلوگیری می‌کند و حتی می‌تواند مانع آسیب ناشی از برقراری مجدد جریان خون در قلب و بهبود عملکرد قلب شود. شواهد نشان می‌دهد رزوراترول دارای خاصیت مهارکنندگی بنیان‌های آزاد، ضداکسایشی و افزایش تعدادی از آنزیم‌های ضداکسایشی است که توانایی ضداکسایشی آن به خواص گروه‌های هیدروکسیل پلی‌فنولی آن وابسته است (۱۴). در مطالعات انسانی رزوراترول موجب مهار پراکسیداسیون لیپوپروتئین با چگالی پایین، افزایش سطح HDL، گشاد شدن عروق (شاید از طریق القای سنتز نیتریک اکساید)، مهار اندوتلین، تغییرات آنژیوژنیک و کاهش آریتمی بطنی و فعالیت آنتی‌ترومبین، جلوگیری از تجمع پلاکت و مهار یا کاهش ROS و کاهش فشار خون می‌شود (۱۵). رزوراترول به‌عنوان ترکیب فعال‌کنندهٔ سیرتوئین (STACs) مطرح است و می‌تواند در مسیری وابسته به سیرتوئین‌ها طول عمر را افزایش دهد (۱۳). برخی پژوهش‌ها گزارش کرده‌اند فعال شدن SIRT3 به‌وسیلهٔ رزوراترول به افزایش کلاژن و عملکرد قلب در موش‌ها منجر شده است (۱۶). همچنین رزوراترول با افزایش فعالیت آنزیم‌هایی همچون SOD، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون-S-ترانسفراز، میزان آسیب‌های اکسایشی را کاهش می‌دهد. مطالعات دیگر نشان می‌دهد آنزیم‌های ضداکسایشی مانند کاتالاز و سوپراکسیددیس موتاز، می‌تواند موجب افزایش طول عمر شود (۱۷).

کمبود انرژی ناشی از فعالیت ورزشی سبب افزایش نسبت ATP/AMP سلولی می‌شود. افزایش مقدار AMP سبب فعال شدن AMPK می‌شود و شروع آبشار پیام‌رسانی، بیان SIRT3 را افزایش می‌دهد. فعالیت ورزشی احتمالاً می‌تواند به‌عنوان یک فشارآفرین تأثیر بسزایی بر فعالیت سیرتوئین‌ها داشته باشد و موجب افزایش عملکرد مثبت آن‌ها شود. این موضوع در پژوهش‌های صورت‌گرفته تقریباً معلوم شده است. در پژوهش پلاسیوس و همکاران (۲۰۰۹) که در شش سر موش نر و ماده انجام گرفت، معلوم شد هفت هفته فعالیت ورزشی داوطلبانه روی چرخ دوار ویژهٔ جوندگان، SIRT3 را در عضلهٔ اسکلتی تنظیم می‌کند (۹). در تحقیق گارد همکاران (۲۰۱۰) تمرین تناوبی شدید موجب افزایش سطوح ژن گیرندهٔ فعال PGC-1α و SIRT1 در عضلات اسکلتی انسان شد (۱۸). همچنین نتایج تحقیقی نشان داد دویدن روی نوار گردان سبب افزایش SIRT3 در عضلهٔ نعلی و دوقلو شد. این نتایج نشان داد بیان پروتئین SIRT3 به‌وسیلهٔ فعالیت ورزشی در عضلهٔ اسکلتی افزایش می‌یابد که در نتیجه سبب بهبود سلول می‌شود (۱۹). همچنین افزایش پروتئین SIRT3 و SOD2 پس از تمرین دویدن در سلول‌های عصبی دیده شد (۲۰).

از آنجاکه فعالیت ورزشی تناوبی این ویژگی را دارد که افراد بتوانند وهله‌های تمرینی را با زمان کمتر و شدت بیشتر و نیز امکان استراحت و بازیافت مطلوب بین وهله‌های تمرین داشته باشند و افراد مسن و پیر بیشتر از این ویژگی می‌توانند بهره ببرند، به‌نظر می‌رسد این نوع فعالیت ورزشی اهمیت ویژه‌ای پیدا می‌کند. همچنین با توجه به اینکه اثر رزوراترول شبیه به تمرین است و سازگاری‌های مشابهی در عضلهٔ اسکلتی و قلب دارد، درمان با آن نیز می‌تواند به اندازهٔ تمرین ورزشی در بافت قلبی مفید باشد. بنابراین از این حیث به‌نظر می‌رسد بررسی اثر فعالیت ورزشی و موادی مانند رزوراترول که آثار شبه‌فعالیت ورزشی دارند، توأم با یکدیگر بر مقدار پروتئین SIRT3 ضروری باشد. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف تعیین اثر فعالیت ورزشی HIIT شنا و مکمل رزوراترول بر مقدار SIRT3 در بطن چپ قلب موش‌های صحرایی پیر انجام گرفت.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش: پژوهش حاضر، از نوع توسعه‌ای و از نظر روش کار از نوع پژوهش‌های تجربی است. ۶۰ سر موش صحرایی نر ۲۰ ماههٔ پیر نژاد ویستار با وزن ۳۵۰-۴۵۰ گرم از مرکز پژوهش‌های علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان خریداری شد. از آنجا که معلوم شده است کاهش شناختی، شاخص برجستهٔ شروع فرایند پیری به‌شمار می‌رود (۲۱)، بنابراین، برای ارزیابی شناختی موش‌های صحرایی (به‌عنوان شاخص پیری) و عدم تداخل آن با قرارداد ورزشی، آزمودنی‌ها یک ماه پیش از شروع پژوهش، مورد آزمون ناول۶ قرار گرفتند. این آزمون شامل سه مرحله است؛ در ابتدا هر آزمودنی به مدت ۱۰ دقیقه با محیط آزمایش (جعبه) آزمون ناول آشنا شد. پس از مرحلهٔ آشناسازی و تمیز کردن جعبه و قرار دادن دو شیء مشابه (شیء استوانه‌ای با رنگ سبز) در جعبه، هر آزمودنی به‌آرامی در جعبه برای آشنایی با اشیای مشابه (مرحلهٔ آشنایی با اشیا مشابه) گذاشته شد و به مدت ۵ دقیقه اشیای مشابه را شناسایی کرد (به‌وسیلهٔ اعمال غریزی از جمله بو کشیدن، لمس و توجه به اشیا). برای شروع مرحلهٔ ناول (شناسایی شیء جدید) باید هر موش صحرایی به مدت ۴۵ دقیقه پس از مرحلهٔ آشنایی با اشیای مشابه در قفس قرار داده شود، سپس هر آزمودنی مرحلهٔ ناول را بعد از تمیزی جعبه و جایگزین کردن یکی از اشیای مشابه با شیء کاملاً گوناگون از شیء مرحلهٔ قبل (شیء مکعبی و دارای زوایای گوناگون با رنگ سفید و مشکی) در جعبه، به مدت سه دقیقه انجام داد. مراحل دوم و سوم برای ارزیابی حافظهٔ بازشناختی هر موش صحرایی به‌وسیلهٔ دوربین ضبط و سپس داده‌های مربوطه با مشاهدهٔ فیلم‌های ضبط شده جمع‌آوری شد. همچنین برای بررسی عدم اختلال حرکتی و تعیین سلامت جسمی آزمودنی‌ها برای انجام قرارداد تمرینی، آزمودنی‌ها مورد آزمون میدان باز (۲۲) نیز قرار گرفتند. این آزمون شامل دو مرحله است؛ در ابتدا هر آزمودنی به مدت ۱۰ دقیقه با محیط آزمایش (جعبه) آزمون میدان باز آشنا شد. پس از مرحلهٔ آشناسازی و تمیز کردن جعبه، هر آزمودنی به‌آرامی مجدد در جعبه گذاشته شد و زمان و مسافت طی‌شدهٔ هر موش صحرایی در مناطق گوناگون (مربع میانی و مربع محیطی) جعبه توسط دستگاه ردیابی ویدئویی هوشمند Ethovision, NoldusTechnology, version7 که به رایانه متصل بود، ضبط شد. داده‌های مربوطه جمع‌آوری و بررسی شد. سپس ۳۰ سر موش صحرایی که

کاهش شناختی داشتند و اختلال حرکتی نیز نداشتند، وارد پژوهش شدند. همهٔ آزمودنی‌ها یک هفته پیش از شروع تمرین اصلی مرحلهٔ آشنایی با استخر حیوانات (قطر ۱۸۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۸۰ سانتی‌متر) (۵ جلسه در یک هفته) را گذراندند. در جلسهٔ اول این مرحله، آزمودنی‌ها با نهایت دقت و آرامش در استخر حیوانات با عمق آب ۵۰ سانتی‌متر و میانگین دمای ۰/۵±۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند و با سرعت دلخواه به مدت پنج دقیقه شنا کردند. در جلسه‌های بعدی برای آشنایی با تمرین تناوبی چند نوبت پس از یک دقیقه شنا از طریق صفحهٔ استراحت از آب بیرون آورده شده و دوباره در آب قرار داده می‌شدند.

روش اجرای پژوهش: پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان آخرین جلسهٔ آشناسازی، آزمودنی‌ها تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند (هر گروه شش سر)؛ گروه C (وزن ۳۴±۴۱۵ گرم)، گروه EX (وزن ۳۰±۴۰۴)، گروه R (وزن ۳۰±۴۰۰ گرم) و گروه EXR (وزن ۳۱±۴۰۱ گرم) و گروه M (وزن ۳۱±۴۰۰ گرم). گروه EX، ۱۴ نوبت۲۰ ثانیه‌ای شنا با ۱۰ ثانیه استراحت بین هر نوبت را انجام دادند. این برنامهٔ ورزشی به مدت شش هفته (سه روز در هفته یک روز در میان) انجام گرفت. در تمرین HIIT شنا میزان بار اعمال‌شدهٔ اولیه (در هفتهٔ اول) ۹ درصد وزن بدن هر موش صحرایی بود که هر هفته یک درصد به آن اضافه می‌شد و در هفتهٔ آخر آزمودنی‌ها با ۱۴درصد وزن بدن خود تمرین کردند (۲۳). گروه C، تمرین نمی‌کردند. گروه R، فقط از مکمل رزوراترول (Usa-10700-serva) محلول در کربوکسی متیل سلولز (CMC) یک درصد از راه گاواژ (روزانه۱۰میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن هر موش صحرایی) دریافت کردند. آزمودنی‌های گروه EXR، تمرین HIIT شنا را همراه با دریافت رزوراترول انجام دادند. گروه حلال (M) محلول CMC (China-13-G201505) یک درصد را از طریق گاواژ دریافت کردند. گاواژ سه گروه (R، EXR و M) صبح‌هنگام انجام گرفت. بنابراین، گروه EXR، هشت ساعت پس از گاواژ تمرین خود را شروع می‌کردند (برای از بین رفتن فشار ناشی از گاواژ). تمرین HIIT شنا (مشابه گروه EX) عصرهنگام (که بهترین زمان تمرین در چرخهٔ فعالیتی طبیعی است) در زیر نور قرمز (با هدف کمترین استرس‌زایی) انجام می‌گرفت (۲۴). برای ارزیابی شدت تمرین، در جلسه‌های اول و سوم هر هفته لاکتات خون موش‌های صحرایی هر دو گروه تمرینی بلافاصله در پایان نوبت آخر از رگ انتهای دم (Lactate Scout-EKF-German) سنجیده می‌شد.

روش‌های آزمایشگاهی: آزمودنی‌های هر پنج گروه، در قفس مخصوص جوندگان (هر قفس سه سر) و دمای ۴±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و چرخهٔ روشنایی/تاریکی ۱۲ساعته و دسترسی آزادانه به آب و غذای استاندارد نگهداری شدند. برای از بین بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای کنترل‌نشدنی و استرس موش‌های صحرایی در زمان اجرای برنامهٔ ورزشی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین موش‌های صحرایی پیر با رعایت اصول اخلاقی، کمیتهٔ اخلاق مرکز پژوهش‌های علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان (کا/۱۶-۹۸) در دسی‌کاتور متصل به کپسول دی‌اکسید کربن تحت بی‌هوشی سبک قرار گرفتند و کشته شدند. پس از جدا کردن قلب، بطن چپ روی یخ جدا شده و در تانک ازت مایع ثابت شد و برای آزمایش وسترن بلات جمع‌آوری و سپس تا زمان سنجش در دمای۸۰- نگهداری شدند. برای تعیین مقدار پروتئین، ابتدا بافت‌ها روی یخ هموژن شدند. سپس به روش برادفورد و استفاده از منحنی استاندارد غلظت مناسب پروتئین نمونه‌ها محاسبه شد. روش وسترن بلات برای تعیین مقدار SIRT3 با استفاده از آنتی‌بادی اولیه (Anti-SIRT3antibody sc-365175) و ثانویه (Rabbit anti-mouse IgG-HRP:sc-358914) و GAPDH (6c5) : (sc-32233) ساخت شرکت سانتاکروز آمریکا انجام گرفت و نور متسع از واکنش لومینسانس روی فیلم ثبت شد. آنگاه تصاویر ظاهر شدند. چگالی فیلم‌ها با استفاده از نرم‌افزار ImagJ بررسی شد.

تحلیل آماری: داده‌ها، به‌وسیلهٔ نرم‌افزار آماری SPSS26 تجزیه‌وتحلیل شد. پس از اینکه طبیعی بودن داده‌ها با آزمون شاپیرویلک تأیید شد، به‌منظور تعیین معنادار بودن تفاوت متغیرها، از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معناداری برای تمامی آزمون‌های $P\leq ۰/۰۵$ آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

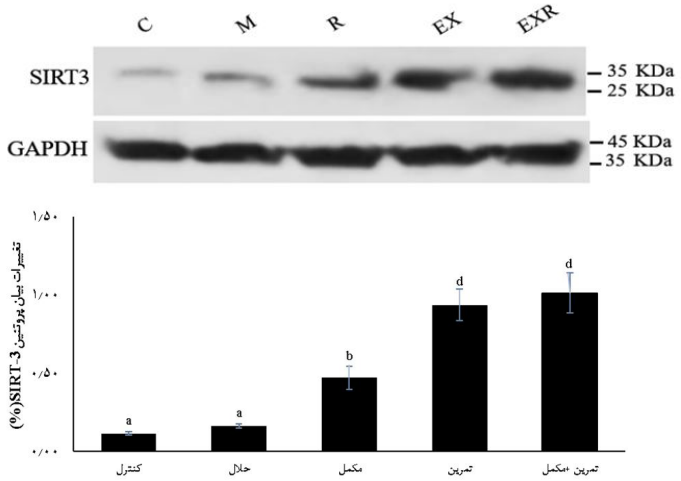
نتایج آزمون تحلیل واریانس اندازه‌گیری مکرر نشان داد وزن آزمودنی‌ها در هر پنج گروه پس از شش هفته تغییر معناداری نداشت (جدول ۱). آزمون تحلیل واریانس یکطرفه ($P<۰/۰۵$) نشان داد تفاوت معناداری بین

میانگین میزان پروتئین SIRT3 در پنج گروه وجود دارد (جدول ۲). بنابراین، آزمون تعقیبی توکی نشان داد که مقدار SIRT3 در گروه EX و EXR در مقایسه با گروه C، R و M، به‌طور معناداری بیشتر بود (P=۰/۰۰۱) (شکل ۱). اما این تفاوت بین دو گروه EX و EXR معنادار نبود (P>۰/۰۵). افزون بر این گروه حلال در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری نداشت، بدین‌معنا متیل سلولز استفاده‌شده به‌عنوان حلال در گروه EXR و R تأثیری در نتایج این دو گروه نداشته است. همچنین مقدار SIRT3 در گروه R به‌طور معناداری در مقایسه با گروه C و M بیشتر بود.

جدول ۱. میانگین وزن (گرم) موش‌های صحرایی در هفته‌های اول، سوم و ششم

	گروه	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد
هفتهٔ اول	کنترل	۶	۴۱۵/۶۷	۳۴/۸۹
	حلال	۶	۴۰۰/۲۲	۳۱/۹۵
	مکمل	۶	۴۰۰/۲۲	۳۰/۱۹
	تمرین و مکمل	۶	۴۰۱/۴۴	۳۱/۵۹
	تمرین	۶	۴۰۴/۴۴	۳۰/۶۸
هفتهٔ دوم	کنترل	۶	۴۱۹/۲۲	۳۱/۰۴
	حلال	۶	۴۱۱/۰۰	۲۶/۶۹
	مکمل	۶	۳۹۲/۴۴	۳۳/۸۲
	تمرین و مکمل	۶	۳۹۴/۲۲	۲۵/۲۰
	تمرین	۶	۴۰۶/۲۲	۲۸/۴۲
هفتهٔ سوم	کنترل	۶	۴۲۵/۵۶	۳۵/۲۱
	حلال	۶	۴۲۷/۸۹	۲۲/۳۳
	مکمل	۶	۳۹۰/۶۷	۳۴/۶۷
	تمرین و مکمل	۶	۳۸۰/۳۳	۱۷/۰۳
	تمرین	۶	۴۰۵/۲۲	۲۹/۹۵

بین وزن موش‌های صحرایی در هفته‌های اول، سوم و ششم در گروه‌های کنترل، حلال، مکمل، تمرین و مکمل و تمرین تفاوت معناداری وجود نداشت.



شکل ۱. مقایسه مقدار پروتئین SIRT3/ GAPDH بین گروه‌ها. a: بیانگر تفاوت معنادار با گروه‌های رزوراترول، تمرین و تمرین+مکمل/ b: بیانگر تفاوت معنادار با گروه‌های کنترل، حلال، تمرین، تمرین+مکمل / d : بیانگر تفاوت معنادار با گروه‌های کنترل، حلال، مکمل

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد شش هفته تمرین تناوبی شدید شنا موجب افزایش معنادار SIRT3 در بطن چپ قلب موش‌های صحرایی پیر شد. در پژوهش پالاسیوس و همکاران (۲۰۰۹) معلوم شد، شش هفته دویدن داوطلبانه روی چرخ دوار بر موش‌های هفت‌هفته‌ای، SIRT3 در عضلهٔ سه‌سر افزایش یافت (۹). همسو با این نتایج فتحی و همکاران (۲۰۱۶) افزایش معنادار مقدار SIRT3 عضلهٔ نعلی موش صحرایی چاق را پس از هشت هفته تمرین HIIT دویدن روی نوار گردان در مقایسه با گروه کنترل چاق و غیرچاق مشاهده کردند (۲۵). همسو با نتایج پژوهش حاضر، مهرابی و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند فعالیت ورزشی HIIT شنا سبب افزایش SIRT3 در لوب پیشانی مغز موش‌های صحرایی پیر می‌شود (۲۶). همچنین لانزا و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند تمرین ورزشی می‌تواند سطح SIRT3 را در عضلهٔ اسکلتی در هر دو گروه جوان و سالمند افزایش دهد (۲۷). چیا و همکاران (۲۰۲۱) افزایش SIRT3 عضلهٔ دوقلو را پس از هشت هفته فعالیت ورزشی تناوبی شدید (دویدن روی نوار گردان) گزارش کردند. همچنین چیا و همکاران بیان کردند میزان تأثیر فعالیت ورزشی بر بیان پروتئین SIRT3 عضلهٔ اسکلتی با توجه به نوع تمرین و نوع عضلهٔ اسکلتی متفاوت است (۲۸). بیشتر پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تمرین ورزشی منظم (۲۷) و نه ورزش کوتاه‌مدت کمتر از یک هفته (۹)، سطوح SIRT3 عضله را افزایش می‌دهد. بنابراین با توجه به نتایج مشابه پژوهش‌ها، می‌توان گفت فعالیت ورزشی HIIT چه از نوع دویدن روی نوار گردان یا چرخ دوار، چه شنا و دویدن داوطلبانه تأثیر مشابهی در SIRT3 داشته است و احتمالاً SIRT3 به شدت‌های کم فعالیت ورزشی نیز پاسخ می‌دهد. همچنین پروتئین SIRT3 چه در بافت عضلانی (۲۵) و چه در بافت عصبی (۲۶) در پاسخ به شدت‌های مختلف ورزشی افزایش خواهد یافت. این نتایج نشان داد که بیان پروتئین SIRT3 سبب بهبود وضعیت سلول می‌شود. در مطالعات دیده شده در موش‌های با ژن SIRT3 سرکوب‌شده، فعالیت AMPK در عضلهٔ اسکلتی و عضلهٔ قلبی کاهش یافته است، اما تنظیم افزایشی SIRT3 عضلهٔ اسکلتی موجب بیوژنز اسکلتی و بهبود استقامت هوازی می‌شود (۲۸). HIIT می‌تواند مسیرهای پیام‌رسان سلولی وابسته به Ca^{2+} از جمله کالمودولین و AMPK را با افزایش Ca^{2+} و هیدرولیز ATP راه‌اندازی کند. فعال شدن این دو مسیر پیام‌رسان سلولی به نوبهٔ خود سبب افزایش SIRT3 می‌شود. بنابراین، فعالیت ورزشی شدید شنا احتمالاً با فعال کردن مسیرهای کالمودولین و AMPK توانسته SIRT3 را افزایش دهد (۲۶). همچنین در پژوهش‌ها مشاهده شده است افزایش NAD^+ به‌طور بالقوه سبب افزایش فعالیت سیرتوئین‌ها می‌شود (۲۹). افزایش معنادار SIRT3 پژوهش حاضر می‌تواند تا حدودی ناشی از فشار انرژیتیکی و سازگاری‌های ناشی از افزایش چگالی میتوکندریایی و در نتیجه افزایش محتوای $NAD^+/NADH$ باشد. در شرایط استرس انرژیتیکی مانند فعالیت ورزشی، به‌منظور حفظ شارژ انرژی سلول و نسبت ATP مصرفی با ATP تولیدی، مقدار خیلی بیشتری NADH اکسیده می‌شود و در نتیجه محتوای NAD^+ افزایش می‌یابد، بنابراین فعالیت SIRT3 که وابسته به NAD^+ است افزایش می‌یابد (۲۵،۲۹). از آنجا که میتوکندری اندام اصلی تولید انرژی است، اختلال در عملکرد میتوکندری احتمالاً در توسعه و ایجاد سارکوپنی از طریق کاهش ذخایر انرژی و آپوپتوز با واسطهٔ میتوکندری نقش دارد. بنابراین، اختلال میتوکندری با مرگ سلولی و در نتیجه کاهش طول عمر ارتباط نزدیکی دارد. همچنین تمرینات ورزشی از طریق اثرگذاری بر PGC-1α و SIRT3 سبب افزایش فرایندهای مرتبط با بایوژنز میتوکندریایی و کاهش تولید ROS، افزایش اکسیژن مصرفی بیشینه، بهبود اکسایش in لیپید و فسفوریلاسیون اکسایشی می‌شود. با توجه به اینکه فعالیت ورزشی تناوبی شدید تقاضای انرژی را افزایش می‌دهد (۳۰)، این روند تغییرات احتمالاً به ماهیت متفاوت تمرین تناوبی و اثرگذاری بیشتر این‌گونه تمرینات بر محتوای $NAD^+/NADH$ و جلوگیری از کاهش ظرفیت اکسایشی میتوکندریایی در بافت قلب متعاقب افزایش سن مربوط می‌شود (۲۸). با وجود مشابهت و همسویی نتایج اشاره‌شده (۹،۲۵،۲۶،۲۷)، نتایج ناهمسویی نیز وجود دارد. هاج و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی اثر دو هفته تمرین هوازی (دویدن روی نوار گردان با سرعت ۳۰ متر در دقیقه، به مدت ۶۰ دقیقه، پنج روز در هفته) بر مقدار SIRT3 عضلهٔ دوقلوی موش صحرایی پرداختند. نتایج نشان داد تفاوتی در مقدار SIRT3 گروه تمرین و کنترل وجود ندارد (۳۲). احتمالاً دورهٔ کوتاه‌مدت دو هفته دلیل این نتایج

بوده است و به‌نظر می‌رسد برای افزایش مقدار SIRT3 به دورهٔ طولانی‌تر تمرین نیاز باشد.

همچنین، نتایج نشان داد مقدار پروتئین SIRT3 در دو گروه EX و EXR در مقایسه با گروه R افزایش معناداری داشته است که با نتایج مهرابی و همکاران (۲۰۲۱) همسوست (۲۶). در تحقیق افضل‌پور و همکاران (۲۰۲۰) مقدار SIRT3 کبدی گروه‌های رزوراترول، تمرین تناوبی، تمرین تناوبی و رزوراترول، تمرین تداومی و ترکیب تمرین تداومی و رزوراترول نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش یافت که این مقدار افزایش در گروه تمرین تداومی و تمرین تناوبی بیشتر بود. این روند تغییرات به ماهیت متفاوت تمرین تداومی و تناوبی و اثرگذاری بیشتر این‌گونه تمرینات بر محتوای $NAD^+/NADH$ و جلوگیری از کاهش ظرفیت اکسایشی میتوکندریایی در عضلهٔ اسکلتی انسان متعاقب افزایش سن نسبت داده شد (۳۳). چن و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند رزوراترول به‌نوعی از فعال‌کننده‌های سیرتوئین‌هاست (۲۹) که آثار شبه‌ورزشی دارد و بر مقدار این پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارد و تعدیل‌کنندهٔ SIRT3 است (۱۷). سازوکار اثر رزوراترول بر SIRT3 هنوز مشخص نیست، اما یافته‌های تحقیقی نشان داد رزوراترول در تنظیم سوخت‌وساز انرژی درگیر است و سبب تنظیم سوخت‌وساز انرژی از طریق تحریک NADH دهیدروژناز و افزایش نسبت $NAD^+/NADH$ می‌شود. اعتقاد بر این است که این سطح بالاتر NAD^+، موجب افزایش مسیرهای وابسته به SIRT3 می‌شود (۳۴). رزوراترول با القای ژن‌های مختلفی از جمله SIRT1,2,4 مانع کاهش عملکرد قلبی عروقی در اثر افزایش سن می‌شود و از قلب در برابر آسیب ناشی از برقراری مجدد جریان خون محافظت می‌کند و باعث تحریک مقاوم‌سازی قلب می‌شود (۳۵). به‌طور کلی، در خصوص سازوکار احتمالی تأثیر همزمان تمرین ورزشی و مکمل رزوراترول می‌توان گفت پلی‌فنول موجود در رزوراترول با افزایش ظرفیت آنزیم‌های ضداکسایشی درون‌سلولی مانند گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز، مهار مسیر پیام‌رسانی mTOR، افزایش فعالیت SOD2، ممانعت از کوتاه شدن تلومرها و در نهایت فعالیت سیرتوئین‌هایی مانند SIRT1,3، موجب افزایش ظرفیت ضداکسایشی بدن و تأخیر در فرایند پیری و افزایش طول عمر می‌شود (۳۶).

براساس نتایج پژوهش حاضر، تمرین تناوبی شدید شنا سبب افزایش سطح SIRT3 بافت قلب شد. در واقع تعامل تمرین تناوبی شدید شنا و رزوراترول و تمرین تناوبی شدید شنا به‌تنهایی نسبت به مکمل رزوراترول افزایش سطح SIRT3 به‌طور معناداری بیشتر بود. به‌نظر می‌رسد تمرین تناوبی در بالا بردن سطح SIRT3 تأثیر بسزایی داشته است. همچنین بر این اساس که افزایش SIRT3 به کاهش آسیب mtDNA با واسطهٔ ROS می‌شود، این موضوع این احتمال را افزایش می‌دهد که افزایش ناشی از فعالیت ورزشی در پروتئین‌های مرتبط با افزایش طول عمر سلولی به‌ویژه SIRT3 و آثار آن بر عملکرد میتوکندریایی را می‌توان تا حدودی از آثار درمانی فعالیت ورزشی دانست. دیده شده مداخلهٔ توأم و مجزای رزوراترول و تمرین منظم هوازی مانع از آریتمی قلبی، توسعهٔ انفارکتوس و استرس اکسایشی ناشی از انفارکتوس میوکارد می‌شود. در مجموع نتایج پژوهش حاضر دال بر آن است که اجرای تمرین تناوبی شدت بالا و با حجم کم (HIIT) به‌همراه و بدون دریافت مکمل رزوراترول سبب بهبود SIRT3 در بافت قلب موش‌های صحرایی پیر می‌شود و می‌توان از این نوع تمرین و مکمل برای تعدیل فشار اکسایشی و تأخیر روند پیری و سالمندی بهره برد. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که برنامه‌های تمرینی با شدت زیاد نیز توسط موش‌های صحرایی پیر و مسن نیز قابل اجرا هستند. البته باید همهٔ ملاحظات را هنگام طراحی برنامهٔ تمرینی جامعهٔ مسن رعایت کرد. افزون بر این در مورد رزوراترول باید گفت اینکه میزان مصرفی رزوراترول چقدر باشد و اینکه آیا برای همهٔ افراد در سنین مختلف مناسب است، هنوز باید بررسی شود. البته پیشنهاد ما برای بررسی دقیق‌تر سیرتوئین‌ها و عملکرد آن‌ها این است که این پروتئین‌ها همراه با عوامل بالادستی و پایین‌دستی خود در مسیرها و آبشارهای پروتئینی که در پاسخ به فعالیت ورزشی و رزوراترول راه‌اندازی می‌شوند، بررسی شود.

حامی/ حامیان مالی

این مقاله برگرفته از رسالهٔ توسعه‌ای دکتری علیرضا رضائی در رشتهٔ فیزیولوژی ورزشی گرایش قلب، عروق و تنفس پردیس کیش دانشگاه تهران است. منابع مالی انجام این پژوهش تجربی به‌صورت شخصی تأمین شده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت یکسان داشته‌اند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی در مقالهٔ حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کرمان که شرایط تسهیل انجام این پژوهش را فراهم کردند، بسیار سپاسگزاریم.

منابع

1. Cui, Hang, Yahui Kong, and Hong Zhang. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. Journal of signal transduction.2012;(2012)1-13.
2. Shin, Jung-Won, et al. Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. International journal of molecular sciences. 2019;20(9).21-26.
3. Fritz KS, Galligan JJ, Hirschey MD, Verdin E, Petersen DR. Mitochondrial acetylome analysis in a mouse model of alcohol-induced liver injury utilizing SIRT3 knockout mice. J Proteome Res. 2012;11(3):1633-1643.
4. Guarente L, Picard F. Calorie restriction the SIR2 connection. Cell. 2005;120(4):473-82.
5. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. Cell. 2001;107(2):149-59.
6. Corbi, G, Conti, V, Scapagnini, G, Filippelli, A, Ferrara N. Role of sirtuins, calorie restriction and physical activity in aging. Front Biosci (Elite Ed).2012;768-778.
7. McDonnell E, Peterson BS, Bomze HM, Hirschey MD. SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging. Trends Endocrinol Metab. 2015;26(9):486-492.
8. Winnik S, Auwerx J, Sinclair DA, Matter CM. Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: from bench to bedside. European heart journal. 2015;36(48):3404-12.
9. Palacios OM, Carmona JJ, Michan S, Chen KY, Manabe Y, Ward III JL, Goodyear LJ, Tong Q. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1α in skeletal muscle. Aging (Albany NY). 2009;1(9):771.
10. Singh SP, Schragenheim J, Cao J, Falck JR, Abraham NG, Bellner L. PGC-1 alpha regulates HO-1 expression, mitochondrial dynamics and biogenesis: Role of epoxyeicosatrienoic acid. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2016;125:8-18
11. Cheng A, Yang Y, Zhou Y, Maharana C, Lu D, Peng W, Liu Y, Wan R, Marosi K, Misiak M, Bohr VA, Mattson MP. Mitochondrial SIRT3 Mediates Adaptive Responses of Neurons to Exercise and Metabolic and Excitatory Challenges. Cell Metab. 2016;23(1):128-42.
12. Green MF, Hirschey MD. SIRT3 weighs heavily in the metabolic balance: a new role for SIRT3 in metabolic syndrome. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2013;68(2):105-7.
13. Knutson MD, Leeuwenburgh C. Resveratrol and novel potent activators of SIRT1: effects on aging and age-related diseases. Nutrition reviews. 2008;66(10):591-6.
14. Li H, Xia N, Forstermann U. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. Nitric Oxide. 2012;26(2):102-10.
15. Li H, Xia N, Hasselwander S, Daiber A. Resveratrol and Vascular Function. Int J Mol Sci. 2019;20(9):2155.
16. Chen T, Li J, Liu J, Li N, Wang S, Liu H, Zeng M, Zhang Y, Bu P. Activation of SIRT3 by resveratrol ameliorates cardiac fibrosis and improves cardiac function via the TGF-β/Smad3 pathway. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2015;308(5):424-34.
17. Tyagi S, Sharma A., Aggarwal G. Clinical and medicinal application of resveraterol: a reviwe. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 2010;3(1): 49-52.
18. Gurd BJ, Perry CG, Heigenhauser GJ, Spriet LL, Bonen A. High-intensity interval training increases SIRT1 activity in human skeletal muscle. Appl Physiol Nutr Metab. 2010;35(3):350-7.
19. Hokari, F., Kawasaki, E., Sakai, A., Koshinaka, K., Sakuma, K. and Kawanaka, K. Muscle contractile activity regulates Sirt3 protein expression in rat skeletal muscles. Journal of applied physiology.2010;109(2):332-340.
20. Huang CC, Wang T, Tung YT, Lin WT. Effect of Exercise Training on Skeletal Muscle SIRT1 and PGC-1α Expression Levels in Rats of Different Age. Int J Med Sci. 2016;13(4):260-70.
21. Dutt Way W, Soga T, Parhar IS. Aging and chronic administration of serotonin-selective reuptake inhibitor citalopram upregulate Sirt4 gene expression in the preoptic area of male mice. Frontiers in genetics. 2015;6:281.
22. Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: a critical review. Psychological bulletin. 1976;83(3):482.
23. Ramos-Filho D, Chicaybam G, de-Souza-Fer-

reira E, Guerra Martinez C, Kurtenbach E, Casimiro-Lopes G, Galina A. High intensity interval training (HIIT) induces specific changes in respiration and electron leakage in the mitochondria of different rat skeletal muscles. PloS one. 2015;29;10(6):e0131766.

24. Shafiee A, Gaeini A, Soleimani M, Nekouei A, Hadidi V. The effect of eight week of high intensity interval training on expression of mir-210 and ephrinA3 mRNA in soleus muscle healthy male rats. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2014;17(3):26-34.)In Persian(.
25. Fathi I, Noorshahi M, Haghparast A, Fallah Hoseini H. Effect of eight-week aerobic continuous and high intensity interval training on levels of SIRT3 in skeletal muscle tissue of Wistar rats. Journal of Sport and Exercise Physiology. 2015;8(2): 1277–1289.(In Persian).
26. Mehrabi A, Gaeini AA, Nuri R, Daryanoosh F. The Effect of Six-Week HIIT Swimming Exercise and Resveratrol Supplementation on the Level of SIRT3 in Frontal Lobe of aged rats.the neuroscience journal of shefaye khatam.2021,9(2).48-59.
27. Lanza IR, Short DK, Short KR, Raghavakaimal S, Basu R, Joyner MJ, McConnell JP, Nair KS. Endurance exercise as a countermeasure for aging. Diabetes. 2008;57(11):2933-42.
28. M Xiao, X Xu, J Lu. Effect of High-intensity Interval Training and Accumulated Exercise on PGC-1α and SIRT3 Levels in the Skeletal Muscle of Rats and Bioinformatics Analysis, International Conference on Information Technology and Contemporary Sports (TCS), 2021.215-220.
29. Chen D, Bruno J, Easlon E, Lin S-J, Cheng H-L, Alt FW, et al. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. Genes & development.2008;22(13): 1753-7.
30. Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng CX, Finkel T. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105(38):14447-52.
31. Little JP, Safdar A, Wilkin GP, Tarnopolsky MA, Gibala MJ. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. The Journal of physiology. 2010;588(6):1011-22.
32. Hodge T, Starnes J, Feger B, Hixson L, Harris MB. Effects of exercise and body temperature on eNOS, SIRT1, SIRT3 and Hsp70 expression in rat plantaris muscles. The FASEB Journal. 2014;28:1164-6.
33. Afzalpour MS, Sarir H, Zanjirian Z, Mohammadnia Ahmadi M, Ghasemi E. The effect of vigorous continuous and interval exercise training along with resveratrol on SIRT3 and OGG1 proteins in the liver tissue of male Wistar rats. Journal of Sport and Exercise Physiology; 2020:13(1):111-127.(In Persian).
34. Desquiret-Dumas V, Gueguen N, Leman G, Baron S, Nivet-Antoine V, Chupin S, Chevrollier A, Vessières E, Ayer A, Ferré M, Bonneau D. Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells. Journal of Biological Chemistry. 2013;288(51):36662-75.
35. Singh B, Shoulson R, Chatterjee A, Ronghe A, Bhat NK, Dim DC, Bhat HK. Resveratrol inhibits estrogen-induced breast carcinogenesis through induction of NRF2-mediated protective pathways. Carcinogenesis. 2014;35(8):1872-80.
36. Gertz M, Nguyen GT, Fischer F, Suenkel B, Schlicker C, Fränzel B, Tomaschewski J, Aladini F, Becker C, Wolters D, Steegborn C. A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. PloS one. 2012;7(11):e49761.