Journal of Sport and Exercise Physiology
Autumn 2022/Vol.15/No.3/91-101

Protective Effect of Aerobic Training and Royal Jelly on Cellular senescence Markers of Cardiomyocytes in Obese Rats

Iraj Hoseinzade, Ahmad Abdi*, Asieh Abbassi Daloii

Department of Physical Education and Sport Science, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

Original Article

Abstract

Background and Purpose: Fat tissue, frequently the largest organ in humans, is at the nexus of mechanisms involved in longevity and age-related metabolic dysfunction. Fat distribution and function change dramatically throughout life. Obesity is a major risk factor for development of comorbidities such as type-2 diabetes, neurological disorders, osteoarthritis, cancer, cardiovascular and renal diseases, which is associated with increased senescent cell and heart disorders. Exercise training and natural supplements constitute an indispensable, tool in the management of obesity and obesity-related disorders and can have a positive effect on longevity. However, interactive effects of aerobic training (AT) and royal jelly (RJ) is still not well understood in cellular senescence markers of cardiomyocytes in high fat diet (HFD) rats. Therefore, this study aimed to investigate the protective effect of AT and RJ on p16 and p21of cardiomyocytes in obese rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 45 male Wistar rats were randomly divided into five groups (n=9): Normal Diet (ND), High Fat Diet (HFD), High Fat Diet-Training (HFDT), High Fat Diet-Royal Jelly (HFDRJ) and High Fat Diet-Training-Royal Jelly (HFDTRJ). HFD induction was performed using a high-fat diet containing 17% protein, 43% carbohydrate and 40% fat. The supplement groups received 100 mg of royal jelly (per kg of body weight) diluted in distilled water orally during the intervention period. Aerobic exercise program including running on the treadmill with an intensity of 50-60% maximal oxygen consumption (VO2max), was performed five days a week for eight weeks. 48 hours after the last training session, rats were anesthetized with a combination ketamine and xylazine, and after extraction, the heart tissue was placed in a nitrogen tank and sent to the laboratory to measure p16 and p21 gene expression levels. p16 and p21 gene expression levels were measured by real-time PCR. Data were analyzed by two-way analysis of variance and Tukey post hoc test at the $P \leq 0.05$.

Results: HFD significantly increased the expression of p16 (P = 0.000) and p21 (P = 0.000). Data analysis using two-way analysis of variance showed that AT and RJ significantly reduced the expression of p16 (P = 0.000 and P = 0.000, respectively) and p21 (P = 0.000 and P = 0.000, respectively) cardiomyocytes in HFD rats. However, the interaction of AT with RJ had no significant effect on the expression of p16 (P = 0.989) and p21 (P = 0.870) cardiomyocytes in HFD rats.

Conclusion: HFD in rats increased p16 and p21and AT and RJ improved the expression of aging-related genes in cardiomyocytes of HFD rats; however, the interaction of AT and RJ had no effect on cellular aging markers. These data indicate that obesity is associated with increased of cellular senescence markers, and AT and RJ as an appropriate therapeutic intervention in HFD animals, it can delay cellular aging. Further investigation is needed for the interactive effect of the AT and RJ.

Keywords: Exercise, Royal Jelly, p16 and p21.

How to cite this article: Hoseinzade I, Abdi A, Abbassi Daloii A. Protective Effect of Aerobic Training and Royal Jelly on Cellular senescence Markers of Cardiomyocytes in Obese Rats. Journal of Sport and Exercise Physiology. 2022;15(3):91-101.

*Corresponding Author; E-mail: a.abdi58@gmail.com
DOI: 10.52547/joeppa.15.3.91

Received: 25/10/2021 Revised:10/12/2021 Accepted: 25/12/2021

نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی
پاییز ۱۴۰۱/ دوره ۱۵/ شماره ۳/ صفحه‌های ۹۱-۱۰۱

اثر محافظتی تمرین هوازی و ژل رویال بر نشانگرهای پیری سلول‌های قلبی موش‌های چاق

ایرج حسین‌زاده، احمد عبدی *، آسیه عباسی دلویی

گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

مقاله پژوهشی

چکیده

زمینه و هدف: بافت چربی به‌عنوان بزرگ‌ترین بافت بدن، با سازوکارهایی که بر طول عمر و اختلالات متابولیکی ناشی از افزایش سن تأثیر دارد، مرتبط است. توزیع و عملکرد بافت چربی به‌طور چشمگیری در طول زندگی تغییر می‌کند. چاقی، عامل خطر مهم برای ایجاد بیماری‌های مانند دیابت نوع ۲، اختلالات عصبی، آرتروز، سرطان، بیماری‌های قلبی- عروقی و کلیوی است که با افزایش سلول‌های پیر و اختلال‌های قلبی همراه است. تمرینات ورزشی و مکمل‌های طبیعی ابزار ضروری در مدیریت چاقی و اختلال‌های همراه با آن است و می‌تواند بر طول عمر تأثیر مثبتی داشته باشد. با وجود این، اثر متقابل تمرین هوازی (AT) و ژل رویال (RJ) بر نشانگرهای پیری سلول‌های قلبی در موش‌های تغذیه‌شده با رژیم غذایی (HFD) پرچرب به‌خوبی شناخته نشده است. بنابراین، این تحقیق با هدف اثر محافظتی AT و RJ بر p16 و p21 سلول‌های قلبی موش‌های چاق انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی، ۴۵ موش صحرایی نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به پنج گروه (n=۹): رژیم غذایی عادی (ND)، رژیم غذایی پرچرب (HFD)، رژیم غذایی پرچرب-تمرین (HFDT)، رژیم غذایی پرچرب-ژل رویال (HFDRJ) و رژیم غذایی پرچرب-تمرین-ژل رویال (HFDTRJ) تقسیم شدند. القای HFD با استفاده از غذای پرچرب شامل ۱۷ درصد پروتئین، ۴۳ درصد کربوهیدرات و ۴۰ درصد چربی انجام گرفت. گروه‌های مکمل، طی دورهٔ مداخلهٔ روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم RJ (به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) رقیق‌شده در آب مقطر را به‌صورت خوراکی دریافت کردند. برنامهٔ تمرین هوازی شامل دویدن روی نوار گردان با شدت ۵۰-۶۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (VO_2max)، پنج روز هفته به مدت هشت هفته بود. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرینی، موش‌های صحرایی با ترکیب کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند و بافت قلب پس از استخراج در تانک نیتروژن قرار داده شد و به‌منظور اندازه‌گیری سطوح بیان ژنی p16 و p21 به آزمایشگاه انتقال داده شد. سطوح بیان ژنی p16 و p21 به روش real-time PCR اندازه‌گیری شد. داده‌ها به روش تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری P≤۰/۰۵ تجزیه‌وتحلیل شد.

نتایج: HFD سبب افزایش معناداری در بیان p16 (P≤۰/۰۰۱) و p21 (P≤۰/۰۰۱) شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس دوراهه نشان داد که AT و RJ موجب کاهش معناداری در بیان p16 (به‌ترتیب P≤۰/۰۰۱ و P≤۰/۰۰۱) و p21 (به‌ترتیب P≤۰/۰۰۱ و P≤۰/۰۰۱) سلول‌های قلبی موش‌های صحرایی HFD شد. با وجود این، تعامل AT با RJ تأثیر معناداری بر بیان p16 (P=۰/۹۸۹) و p21 (P=۰/۸۷۰) سلول قلبی موش‌های صحرایی HFD نداشت.

نتیجه‌گیری: HFD در موش‌های صحرایی به افزایش p16 و p21 و AT و RJ به بهبود بیان ژن‌های مربوط به پیری در سلول‌های قلبی موش‌های صحرایی HFD منجر شد، با وجود این، تعامل AT و RJ بر نشانگرهای پیری سلولی تأثیر نداشت. این داده‌ها نشان می‌دهد که چاقی با افزایش نشانگرهای پیری سلولی همراه است و AT و RJ، به‌منزلهٔ مداخلهٔ درمانی مناسب در حیوانات HFD، سبب به تأخیر انداختن فرایند پیری سلولی می‌شود. اثر تعاملی AT و RJ به بررسی‌های بیشتری نیاز دارد.

واژه‌های کلیدی: ژل رویال، فعالیت ورزشی، p16 و p21.

* نویسنده مسئول: رایانامه: a.abdi58@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۳ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۴

مقدمه

بافت چربی به‌منزلهٔ یکی از بزرگ‌ترین اندام‌های بدن، با سازوکارهای مؤثر بر طول عمر و اختلال‌های متابولیکی ارتباط دارد. چاقی با شروع بسیاری از بیماری‌ها همراه است و بر طول عمر تأثیر دارد (۱). همچنین چاقی عامل خطرزای قلبی- عروقی است. چاقی و افزایش کلسترول ناشی از آن با تأثیر بر چرخهٔ سلولی موجب پیری سلولی می‌شوند (۱). تحقیقات نشان می‌دهند که افزایش میزان چربی بدن و چاقی با افزایش خطر تخریب DNA به‌واسطهٔ فشار اکسایشی ارتباط دارد، به‌طوری‌که عدم تعادل بین عوامل اکسایندهٔ بافتی و ضداکسایندهها ممکن است سازوکاری در پیشرفت عوارض مرتبط با چاقی همانند دیابت، بیماری‌های قلبی- عروقی و سرطان به‌شمار آید (۲). به‌نظر می‌رسد افزایش تخریب ژنوم در چاقی به‌دلیل سرعت زیاد فرایندهای متابولیک به‌منظور حفظ اعمال زیستی در افراد چاق باشد، که می‌تواند به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و تخریب ژنوم منجر شود (۳). افزایش قند خون، افزایش سطوح چربی‌های سرم، عدم کفایت دفاع ضداکسایشی و التهاب مزمن از جمله مهم‌ترین عوامل القاکنندهٔ تخریب ژنوم در افراد چاق به‌شمار می‌آیند. اخیراً تحقیقات نشان داده‌اند که افزایش میزان دریافت کالری و افزایش بافت چربی می‌تواند موجب افزایش پاسخ‌های استرسی شود، ازاین‌رو قادر به تحریک مسیر سرکوب‌کنندهٔ تومور p53 می‌شود که القاکنندهٔ فنوتیپ شبه‌پیری نیز به‌شمار می‌رود (۱)؛ به‌طوری‌که می‌تواند به القا پیری زودرس و کاهش طول عمر منجر شود. بنابراین چاقی را می‌توان تسریع‌کنندهٔ پیری سلول و اختلالات مرتبط با آن دانست. فشار اکسایشی به تجمع محصولات پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب DNA منجر شده و موجب اختلال در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مربوط به پیری مانند p16، p21 و p53 می‌شود (۴). فعالیت‌های ورزشی با تقویت دفاع ضداکسایشی در بدن، التهاب سیستمیک را در موش‌های چاق کاهش می‌دهد. در پژوهشی نشان داده شد که فعالیت ورزشی با شدت متوسط قادر به ترمیم بافت کبد آسیب‌دیده به وضعیت قبل از القای پیری می‌شود (۵). اکبری و همکاران (۱۳۹۶) بیان کردند که فعالیت ورزشی با شدت متوسط به فعال‌سازی آنزیم تلومراز و تثبیت طول تلومراز منجر می‌شود و فعالیت بدنی از طریق افزایش فعالیت تلومراز در بافت‌های مختلف بدن می‌تواند قابلیت زیست سلول و ثبات ژنتیکی را بالا ببرد و تأثیرات ضدپیری خود را به جای بگذارد (۶). محمدنژاد پناه‌کندی و همکاران (۱۳۹۵) بیان کردند که یک دوره تمرین ترکیبی با تأثیر بر تلومراز می‌تواند روند پیری را کنترل کند و به کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های مرتبط با افزایش سن منجر شود (۷). انجمن قلب ایالات متحده در تحقیقی بیان کرد که فعالیت بدنی طولانی‌مدت از طریق تأثیر بر کروموزوم‌ها در نبرد با فرایند پیری برمی‌آید (۸). ورنر و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند که تمرینات ورزشی از طریق کاهش سطوح p53، Chk2 و p16 آئورت موش‌ها، فرایند پیری را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۹). افزون بر فعالیت ورزشی، به موازات افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی کشورها به‌ویژه در حوزهٔ گروه‌های خاص، کاربرد درمان‌های غیردارویی روزبه‌روز اهمیت بیشتری یافته است، که از مهم‌ترین این روش‌ها می‌توان به اصلاح رژیم غذایی، استفاده از غذاهای طبیعی و اصلاح سبک زندگی اشاره کرد. ژل رویال (RJ) توسط غدد زیر حلق و فک پایین زنبورها تولید می‌شود. RJ تغییرات اپی‌ژنتیکی را تعیین می‌کند که به سرنوشت متفاوت زنبورهای کارگر و زنبورهای ملکه با ژنوتیپ‌های یکسان منجر می‌شود. تغذیهٔ RJ سبب می‌شود که ملکهٔ زنبور عسل بدن بزرگ‌تر و طول عمر بیشتری نسبت به کارگران داشته باشد (۱۰). همچنین گزارش شده است که RJ طول عمر موش‌های C3H /HeJ را افزایش می‌دهد (۱۱). انتظار می‌رود RJ بتواند طول عمر سالم را در انسان نیز تعدیل کند، زیرا نشان داده شده است که RJ دارای مزایای مختلفی مانند افزایش طول عمر، ضدافسردگی، ضدخشکی چشم، ضدچاقی و ضدسارکوپنی در مدل‌های حیوانی و همچنین انسان است (۱۲). بنابراین، RJ مادهٔ غذایی برای افزایش امید به زندگی سالم است. تحقیقات نشان می‌دهد چاقی و بی‌نظمی در سوخت‌وساز چربی در بسیاری از سلول‌ها مانند بافت چربی، آئورت، پانکراس و کبد و همچنین سلول‌های اندوتلیال سبب افزایش بیان ژن نشانگرهای پیری از جمله p16، p19، p21 و p53 می‌شود (۱، ۱۳). با وجود این، اینکه چاقی ناشی از HFD سبب افزایش نشانگرهای پیری در بافت قلب می‌شود، به‌خوبی شناخته نشده است. با توجه به کاهش فرایندهای فیزیولوژیکی در اثر پیری سلولی و تأثیر پیری بر عملکرد

قلب، به‌نظر می‌رسد فعالیت‌های بدنی و RJ تأثیر مفیدی بر بهبود عملکرد قلب در نمونه‌های چاق دارد. با وجود این، سازوکارهای سلولی فعالیت ورزشی و RJ به‌خوبی شناسایی نشده است. همچنین براساس شواهد به‌نظر می‌رسد به‌منظور کاهش چربی بدنی و بهبود عملکرد قلبی- عروقی انواع ورزش‌های هوازی انتخاب مناسبی است، هرچند تمرینات مقاومتی و تمرینات هوازی شدت بالا نیز توصیه می‌شود، اما به‌نظر می‌رسد در افراد کم‌تحرک، تحمل این نوع تمرینات راحت‌تر باشد (۱۴). ازاین‌رو در این پژوهش سعی شده است همزمان اثر محافظتی تمرین هوازی و ژل رویال بر نشانگرهای پیری سلولی سلول‌های قلبی موش‌های چاق بررسی شود.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش: این پژوهش از نوع تجربی است و همهٔ آزمایش‌های مربوط به حیوانات با توجه به سیاست‌های مربوط به حمایت از حیوانات (براساس خط‌مشی‌های قرارداد هلسینگی) انجام گرفت و قوانین راهنمای مؤسسهٔ ملی سلامت در نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. همچنین این پژوهش با تأیید کمیتهٔ اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت با کد IR.IAU.M.REC.1400.020 به تصویب رسیده است. ۴۵ سر موش صحرایی نر هشت‌هفته‌ای با نژاد ویستار و میانگین وزن ۹/۳۷ ± ۱۸۷/۵۱ گرم از مؤسسهٔ پاستور تهیه و به آزمایشگاه حیوانی منتقل شدند. حجم نمونهٔ تحقیق حاضر براساس نتایج تحقیقات پیشین، در سطح معناداری ۵ درصد (خطای نوع اول) و توان آماری ۹۵ درصد (خطای نوع دوم) و با استفاده از نرم‌افزار Medcalc 18.2.1 (۸ سر در هر گروه) تعیین شد. حیوانات مورد آزمایش به‌صورت جداگانه در قفس‌های پلی‌کربنات نگهداری شدند. دمای محیط ۱/۴±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و چرخهٔ روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت ۴±۵۵/۶ درصد بود. تمامی حیوانات به آب و غذای ویژهٔ موش دسترسی آزاد داشتند. پس از سازگاری با شرایط محیطی جدید (پس از یک هفته)، موش‌ها به دو گروه رژیم غذایی عادی (n=۸، ND) و رژیم غذایی پرچرب (n=۳۶، HFD) تقسیم شدند. موش‌های گروه ND به مدت هشت هفته با غذایی استاندارد (۲۳ درصد پروتئین، ۶۵ درصد کربوهیدرات و ۱۲ درصد چربی) تغذیه شدند. در همین مدت موش‌های گروه HFD از رژیم غذایی پرچرب استفاده کردند. غذای پرچرب شامل ۱۷ درصد پروتئین، ۴۳ درصد کربوهیدرات و ۴۰ درصد چربی بود. غذای استاندارد و غذای پرچرب با هماهنگی مؤسسهٔ پاستور تهیه شد (۱۵). پس از هشت هفته همهٔ موش‌ها به پنج گروه رژیم غذایی عادی (ND)، پرچرب (HFD)، پرچرب- تمرین (HFDT)، پرچرب-ژل رویال (HFDRJ) و پرچرب- تمرین- ژل رویال (HFDTRJ) تقسیم شدند. پس از دورهٔ القای چاقی و در شروع دورهٔ تمرینی و خوراندن مکمل، رژیم غذایی پرچرب به رژیم غذایی عادی تغییر یافت.

روش اجرای پژوهش: پیش از شروع تمرین اصلی و به‌منظور آشنایی با چگونگی فعالیت به‌وسیلهٔ نوار گردان، موش‌ها در یک هفته طی پنج جلسه، به مدت پنج دقیقه با سرعت ۸-۱۰ متر بر دقیقه با شیب صفر فعالیت داشتند. برنامهٔ فعالیت ورزشی هوازی شامل دویدن روی نوار گردان (شرکت تجهیز گستر امید ایرانیان، ساخت ایران، ۱۰ لاین) با شیب صفر درصد به مدت هشت هفته و پنج روز در هفته بود. در هفتهٔ اول موش‌ها برنامهٔ تمرینی هوازی فزاینده را روی نوار گردان با شدت ۱۵ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه انجام دادند. پس از آن شدت فعالیت از ۱۵ متر در دقیقه به ۲۵ متر در دقیقه در هفتهٔ هفتم رسید و زمان فعالیت نیز به ۶۰ دقیقه افزایش یافت (جدول ۱) (۱۶). به‌منظور تحریک موش‌ها برای دویدن، از محرک صوتی (ضربه به دیوارهٔ نوار گردان استفاده شد؛ بدین‌صورت که در جلسات اول، از محرک الکتریکی با ولتاژ کم، همراه با محرک صوتی استفاده شد و پس از شرطی کردن موش‌ها به‌همراه بودن دو محرک، در سایر جلسات به‌منظور رعایت نکات اخلاقی کار با حیوان آزمایشگاهی، فقط از محرک صوتی استفاده شد.

جدول ۱. قرارداد تمرین

	هفتهٔ اول	هفتهٔ دوم	هفتهٔ سوم	هفتهٔ چهارم	هفتهٔ پنجم	هفتهٔ ششم	هفتهٔ هفتم	هفتهٔ هشتم
شدت (متر)	۱۵	۱۶	۱۸	۲۰	۲۱	۲۳	۲۵	۲۵
مدت (دقیقه)	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۵۵	۶۰	۶۰

روش‌های آزمایشگاهی: مصرف ژل رویال: پودر ژل رویال از شرکت Bulk Supplements Co, Ltd (Henderson, USA) خریداری شد. گروه مکمل، روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم ژل رویال (به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) رقیق‌شده در آب مقطر را به‌صورت خوراکی دریافت کردند (۱۷).

روش نمونه‌گیری از بافت قلب: پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی) با تزریق داخل‌صفاقی ترکیبی از کتامین (۶۰ kg/mg) و زایلازین (۵ kg/mg) بی‌هوش شدند. بافت موردنظر بلافاصله پس از جداسازی و شست‌وشو با سالین در تیوب‌های حاوی RNA later به‌منظور جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شده و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد. برای جلوگیری از تأثیر آهنگ شبانه‌روزی، نمونه‌گیری از ساعت ۸ آغاز شد و ۱۱:۳۰ به اتمام رسید.

روش اندازه‌گیری بیان ژن‌ها: طراحی و آماده‌سازی آغازگرها (پرایمر): جدول ۲ الگوی آغازگر را نمایش می‌دهد. ابتدا طراحی پرایمر انجام گرفت و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج و به cDNA تبدیل شد. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکرشده بررسی شد.

جدول ۲. توالی آغازگرهای (پرایمرهای) p16 و p21 به‌همراه ژن کنترل

Genes	Primer Sequences
β-Actin	Forward: 5'-AGGAGTACGATGAGTCCGGC -3'
	Reverse: 5'-CGCAGCTCAGTAACAGTCCG -3'
P۱۶	Forward: 5'-CGTACCCCGATACAGGTGATG -3'
	Reverse: 5'-ATACCGCAAATACCGCACGA -3'
P۲۱	Forward: 5'-GTCTTGCACTCTGGTGTCTC -3'
	Reverse: 5'-ATAGAAATCTGTTAGGCTGGTCTG -3'

انجام Real time-PCR: ۲۰ میلی‌گرم از بافت با استفاده از اسکالپر خرد و وارد میکروتیوب شده، سپس با استفاده از محلول تیازول، RNA کل سلول‌ها استخراج و با استفاده از کیت RNeasy (کیاژن، آلمان) خالص‌سازی شد. به‌منظور اطمینان از غلظت مناسب RNA استخراج‌شده، جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ (ND-1000 NANODROP 385 spec-trophotometer) خوانده شد. cDNA طبق شیوه‌نامهٔ شرکت سازنده (Thermo Scientific, USA) سنتز شده و به‌منظور انجام واکنش رونویسی معکوس استفاده شد. cDNA سنتزشده با استفاده از SYBR Green master mix (Thermo Scientific, USA) و آغازگرهای ذکرشده در جدول ۲ تکثیر شد. Real-time PCR با استفاده از دستگاه Roche LightCycler 480 Real Time PCR Detection System انجام گرفت. برای اندازه‌گیری mRNA، ۱میکروگرم از کل RNA بافتی با آنزیم RQ1 RNAse-free DNAse-I (Promega) و retro-transcribed (RT) تیمار شد. واکنش Real-time PCR با استفاده از دستگاه SYBR Green qPCR Master Mix انجام گرفت. قرارداد چرخه‌های حرارتی مورد استفاده Real time-PCR شامل ۹۵° به مدت ۱۰ دقیقه و در پی آن ۳۵ دور ۳۰° ثانیه‌ای در حرارت ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در۶۰° و ۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد بود. سپس در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخهٔ آستانه (Thereshold Cycle: CT) ارزیابی شدند. برای طبیعی‌سازی بیان ژن از فرمول $\Delta ct = ct$ (هدف) - ct (کنترل) استفاده شد. پس از محاسبهٔ تغییرات بیان ژن‌ها با Δct، برای کمی کردن نتیجهٔ حاصل از تغییرات ct نمونه‌ها، این عدد در فرمول $2^{-\Delta ct}$ وارد و نتایج حاصل بین گروه‌ها مقایسه شد.

تحلیل آماری: پس از تأیید توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون لون، برای تجزیه‌وتحلیل آماری از آزمون t، تحلیل واریانس دوراهه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخهٔ

۲۶ انجام گرفت و سطح معناداری آزمون‌ها ۰/۰۵=α در نظر گرفته شد.

نتایج

میانگین وزن گروه‌ها پیش و در دورهٔ القای چاقی و همچنین پس از القای چاقی در جدول‌های ۳ و ۴ ارائه شده است.

جدول ۳. میانگین وزن گروه‌ها پیش و در دورهٔ القای چاقی

دوره	پیش از القای چاقی			القای چاقی				
	موش هشت هفته‌ای	پس از سازگاری	گروه‌بندی	هفتهٔ اول	هفتهٔ دوم	هفتهٔ چهارم	هفتهٔ ششم	هفتهٔ هشتم
سن (هفته)	هشت	نه		ده	یازده	دوازده	سیزده	چهارده
گروه‌ها	۹/۳۷ ± ۱۸۷/۵۱	۱۶/۲۶ ± ۲۰۰/۵۱	ND (n=۹)	۱۹/۳۴ ± ۲۱۱/۳۳	۱۷/۶۶ ± ۲۱۶/۳۳	۱۶/۵۱ ± ۲۴۵/۲۲	۲۲/۸۱ ± ۲۵۷/۲۲	۲۷/۵۵ ± ۲۷۰/۱۱
			HFD (n=۹)	۲۲/۷۴ ± ۲۰۹/۶۱	۱۳/۹۰ ± ۲۳۳/۵۶	۲۱/۲۰ ± ۲۷۱/۸۹	۲۱/۶۸ ± ۳۱۰/۵۸	۴۱/۰۱ ± ۳۵۰/۸۳

جدول ۴. میانگین وزن گروه‌ها بعد از القای چاقی

		اعمال متغیر مستقل				
		شروع هفتهٔ اول	هفتهٔ دوم	هفتهٔ چهارم	هفتهٔ ششم	هفتهٔ هشتم
	سن (هفته)	هفده	هجده	بیست	بیست‌ودو	بیست‌وچهار
گروه‌ها	ND (n=۹)	۲۷/۵۵ ± ۲۷۰/۱۱	۲۴/۱۳ ± ۲۸۱/۷۸	۳۲/۹۴ ± ۲۹۱/۵۵	۳۶/۰۶ ± ۲۹۷/۸۸	۳۸/۹۵ ± ۳۱۰/۸۸
	HFD (n=۹)	۵۰/۹۰ ± ۳۴۳/۶۶	۲۳/۵۴ ± ۳۸۴/۳۳	۴۷/۶۵ ± ۴۱۰/۴۴	۸۱/۸۶ ± ۴۳۵/۱۱	۳۷/۹۴ ± ۴۶۱/۱۱
	HFDT (n=۹)	۴۲/۷۲ ± ۳۵۲/۸۸	۲۳/۳۸ ± ۳۷۴/۲۲	۴۳/۳۳ ± ۳۸۹/۷۷	۳۷/۵۶ ± ۴۱۱/۵۵	۴۹/۰۵ ± ۴۱۴/۰۰
	HFDRJ (n=۹)	۳۷/۹۸ ± ۳۴۸/۴۴	۲۳/۱۲ ± ۳۷۷/۱۱	۵۱/۶۸ ± ۳۹۸/۸۸	۵۱/۶۸ ± ۴۱۵/۸۸	۴۹/۱۱ ± ۴۲۳/۷۷
	HFDTRJ (n=۹)	۳۶/۹۷ ± ۳۵۸/۳۳	۲۱/۴۸ ± ۳۶۸/۴۴	۴۵/۴۳ ± ۳۷۸/۶۶	۵۰/۳۱ ± ۳۸۷/۲۲	۴۰/۱۲ ± ۳۹۰/۵۵

نتایج نشان داد که میزان بیان p16 (P≤ ۰/۰۰۱) و p21 (P≤ ۰/۰۰۱) در گروه HFD به‌طور معناداری بیشتر از گروه ND بود (جدول ۵).

جدول ۵. نتایج آزمون t مستقل در دو گروه ND و HFD

متغیر	p-value	t
P16	۰/۰۰۰۱	-۶/۸۷۲
P21	۰/۰۰۰۱	-۶/۲۱۲

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس دوراهه نشان داد که میزان بیان p16 سلول‌های قلبی موش‌های گروه HFD تمرین‌کرده (AT) (P≤ ۰/۰۰۱) و تیمار با ژل رویال (RJ) (P≤ ۰/۰۰۱) نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معناداری کمتر بود.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس دوراهه نشان داد که AT (P≤ ۰/۰۰۱) و RJ (P≤ ۰/۰۰۱) سبب کاهش معناداری در بیان p21 سلول‌های قلبی موش‌های صحرایی HFD شد. با وجود این، مداخلهٔ ترکیبی AT با RJ تأثیر معناداری بر بیان p21 سلول قلبی موش‌های HFD نداشت (P=۰/۷۸۰) (جدول‌های ۹، ۱۰ و ۱۱).

جدول ۶. نتایج تجزیه‌وتحلیل واریانس دوراهه برای اثرات یک دوره تمرین و ژل رویال بر بیان ژن p16 بافت قلب

منبع	مجموع مجذورات	درجهٔ آزادی	میانگین مجذورات	F	p-value	مجذور اتا (اندازهٔ اثر)	توان
AT	۰/۹۴۱	۱	۰/۹۴۱	۱۵/۱۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۳۲۱	۰/۹۶۵
RJ	۰/۹۴۷	۱	۰/۹۴۷	۱۵/۲۰۷	۰/۰۰۰۱	۰/۳۲۲	۰/۹۶۶
AT×RJ	۱/۱۱۱	۱	۱/۱۱۱	۰/۰۰۰	۰/۹۸۹	۰/۰۰۰	۰/۰۵۰
خطا	۱/۹۹۴	۳۲	۰/۰۶۲				

جدول ۷. نتایج آزمون بنفرونی برای مقایسات دوگانهٔ بیان ژن p16 بافت قلب موش‌ها برای عامل AT

گروه‌های ۱	گروه‌های ۲	تفاوت میانگین	خطای استاندارد	p-value
با AT	بدون AT	-۰/۳۲۳	۰/۰۸۳	۰/۰۰۰۱

جدول ۸. نتایج آزمون بنفرونی برای مقایسات دوگانه بیان ژن p16 بافت قلب موش‌ها برای عامل RJ

گروه‌های ۱	گروه‌های ۲	تفاوت میانگین	خطای استاندارد	p-value
با RJ	بدون RJ	-۰/۳۲۴	۰/۰۸۳	۰/۰۰۰۱

جدول ۹. نتایج تجزیه‌وتحلیل واریانس دوراهه برای اثرات یک دوره تمرین و ژل رویال بر بیان ژن p21 بافت قلب

منبع	مجموع مجذورات	درجهٔ آزادی	میانگین مجذورات	F	p-value	مجذور اتا (اندازهٔ اثر)	توان
AT	۰/۹۴۶	۱	۰/۸۴۶	۱۸/۶۲۵	۰/۰۰۰۱	۰/۳۶۸	۰/۹۸۷
RJ	۰/۸۱۰	۱	۰/۸۱۰	۱۷/۸۲۴	۰/۰۰۰۱	۰/۳۵۸	۰/۹۸۴
AT×RJ	۰/۰۰۴	۱	۰/۰۰۴	۰/۰۷۹	۰/۷۸۰	۰/۰۰۲	۰/۰۵۹
خطا	۱/۴۵۴	۳۲	۰/۰۴۵				

جدول ۱۰. نتایج آزمون بنفرونی برای مقایسات دوگانهٔ بیان ژن p21 بافت قلب موش‌ها برای عامل AT

گروه‌های ۱	گروه‌های ۲	تفاوت میانگین	خطای استاندارد	p-value
با AT	بدون AT	-۰/۳۰۷	۰/۰۷۱	۰/۰۰۰۱

جدول ۱۱. نتایج آزمون بنفرونی برای مقایسات دوگانهٔ بیان ژن p21 بافت قلب موش‌ها برای عامل RJ

گروه‌های ۱	گروه‌های ۲	تفاوت میانگین	خطای استاندارد	p-value
با RJ	بدون RJ	-۰/۳۰۰	۰/۰۷۲	۰/۰۰۰۱

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای چاقی سبب افزایش معناداری در بیان p16 و p21 سلول‌های قلبی موش‌های صحرایی HFD شد. در همین زمینه کیم و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که چاقی ناشی از رژیم غذایی پرچرب در موش‌ها سبب پیری سلولی کلیه با افزایش در بیان p16 و p21 می‌شود و عملکرد کلیه و اکسیژن‌رسانی قشر را مختل می‌کند (۱۸). همچنین تحقیقات نشان داده است که HFD و چاقی سبب تجمع سلول‌های پیر در بافت چربی، پانکراس، کبد و کلیه می‌شود (۱، ۱۳). سازوکاری که HFD سبب پیری سلولی در قلب می‌شود، ممکن است چندعاملی باشد و چاقی و بی‌نظمی در سوخت‌وساز چربی به این روند کمک کند. چاقی موجب مقاومت به انسولین و اختلال در سوخت‌وساز گلوکز می‌شود که ممکن است به پیری سلول‌ها در بافت‌های هدف از جمله بافت چربی و کلیه (۱۸) منجر شود. همچنین نشان داده شده که افزایش سطوح کلسترول، پراکسیداسیون چربی، فشار اکسایشی

و اختلال در عملکرد میتوکندری محرک‌های پیری سلولی‌اند که در پی HFD و چاقی به‌وجود می‌آیند (۱۹). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌توانند از طریق القای p21 با واسطهٔ p53 یا فعال کردن p16INK4a از طریق اختلال در عملکرد میتوکندری با واسطهٔ p38-MAPK سبب پیری سلولی شوند (۲۰). افزون‌بر این، آدیپوکاین‌هایی که در پی چاقی افزایش می‌یابند نیز ممکن است به‌طور مستقیم سبب القای پیری سلولی شوند (۲۱). با وجود این، یو و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که HFD در موش‌ها تأثیری بر نشانگرهای پیری سلولی p21 و p53 بافت قلب ندارد (۲۲). تفاوت در نتایج ممکن است ناشی از نوع بافت به‌کاررفته، روش القای HFD یا آزمودنی‌های استفاده‌شده باشد. با وجود این، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین ورزشی هوازی می‌تواند موجب کاهش معناداری در بیان p16 و p21 سلول‌های قلبی موش‌های صحرایی HFD شود. در همین زمینه شفر و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که تمرین ورزشی می‌تواند سبب معکوس شدن افزایش نشانگرهای پیری ناشی از مصرف رژیم غذایی فست‌فود مانند p16، EGFP، β-galactosidase و SASP در بافت چربی شود (۲۳). عسگری و همکاران (۱۳۹۷) نیز نشان دادند که فعالیت ورزشی می‌تواند در موش‌های صحرایی که IGF-1 تزریق کردند، سبب کاهش بیان p53 کولورکتال شود (۲۴). همچنین روسمن و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که فعالیت ورزشی با تأثیر بر p53، p21 و p16 موجب محافظت عروق در افراد پیر می‌شود (۲۵). تأثیرات مفید فعالیت ورزشی بر طول عمر انکارناپذیر است؛ با این حال، سازوکارهای زیستی آن به‌طور کامل درک نشده است. یافته‌های ما تأیید می‌کند که تمرین ورزشی هوازی می‌تواند سبب افزایش سلامت قلب شود و مهم‌تر از این، بر آثار مخرب HFD غلبه کند. افزون‌بر این، با استفاده از نشانگرهای زیستی پیری سلولی، برای اولین بار نشان دادیم که تمرین ورزشی هوازی از پیری سلول ناشی از HFD در بافت قلب جلوگیری می‌کند. سه دلیل برای کاهش بیان نشانگرهای پیری سلولی در پی فعالیت ورزشی محتمل است؛ اول اینکه به‌دنبال افزایش تقاضای انرژی به‌دنبال فعالیت ورزشی، انبارهای چربی کمتر و کوچک‌تر می‌شود و در نتیجه التهاب کاهش پیدا می‌کند. به‌نظر می‌رسد کاهش التهاب با کاهش بیان p53، p21 و p16 همراه باشد؛ دلیل دوم این است که فعالیت ورزشی می‌تواند سبب پاکسازی سلول‌های پیر شود. در برخی بیماری‌ها نشان داده شده که عمر سلول‌های پیر ممکن است چند دهه ادامه پیدا کند (۲۶). با وجود این، نشان داده شده که فعالیت ورزشی سبب کاهش بیان p16 در پی کاهش چاقی می‌شود (۲۳)؛ سومین علت می‌تواند مربوط به پاسخ‌های محافظتی فعالیت ورزشی در برابر عوامل مؤثر بر پیری سلولی باشد. فعالیت ورزشی می‌تواند اثر محافظتی در برابر آسیب DNA، فرسایش تلومراز، فشار اکسایشی و اختلال در عملکرد میتوکندری در انواع سلول‌ها داشته باشد (۲۷). به نظر فعالیت ورزشی از طریق چندین مسیر از پیری سلولی بافت قلب جلوگیری می‌کند.

از دیگر نتایج پژوهش حاضر کاهش معناداری بیان p16 و p21 سلول‌های قلبی موش‌های صحرایی HFD در پی مصرف RJ بود. گونوگی و همکاران (۲۰۱۹) در پژوهشی بیان کردند که RJ، پروتئین و ترکیبات چربی آن توان افزایش طول عمر در موجودات مختلف را دارد و همچنین قادر به جلوگیری از پیری بافت‌های انسانی در کشت سلولی است (۲۸). همچنین جیانگ و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیقی روی سلول‌های فیبروبلاست انسانی نشان دادند که پروتئین‌های اصلی ژل رویال (MRJPs) فعالیت ضدپیری دارند. در این پژوهش MRJPs سبب افزایش تلومرها و تنظیم بیان سوپراکسید دیسموتاز-۱ (SOD1) شد و بیان هدف پستانداران راپامایسین (mTOR)، کاتنین شبه بتا-۱ (CTNNB1) و پروتئین P۵۳ را کاهش داد (۲۹). بیان شده است که بیشتر مداخلات غذایی ضدپیری مسیرهای افزایش رشدی مانند IGF-1 و mTOR-S6K را هدف قرار می‌دهند (۳۰). به‌نظر می‌رسد RJ نیز با هدف قرار دادن پیام انسولین طول عمر را افزایش می‌دهد. افزون‌بر این RJ سبب فعال شدن FoxO و انتقال آن به هسته می‌شود و با برخی پروتئین‌های رونویسی مانند SIR-2.1، HCF-1 و FTT-2 ارتباط برقرار می‌کند. این امر به تشکیل بیان پروتئین‌های مؤثر در افزایش طول عمر و همچنین تنظیم پیام‌رسانی دریافت غذا (مصرف غذا را کاهش می‌دهد) و mTOR منجر می‌شود. تداخل چندین مسیر مانند گیرنده‌های انسولینی و mTOR فرایندهای سلولی مرتبط با افزایش طول عمر مانند ترمیم DNA، اتوفاژی، فعالیت ضداکسایشی، فعالیت ضدالتهابی، مقاومت در برابر استرس و تکثیر سلولی را افزایش می‌دهند (۲۸).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تعامل AT به‌همراه RJ، تأثیر معناداری بر نشانگرهای پیری سلولی نداشت. عدم تأثیر همزمان AT و RJ بر نشانگرهای پیری سلول‌های قلبی شاید از مسائل بحث‌انگیز در استفاده از مکمل‌های ضداکسایشی همزمان با فعالیت ورزشی باشد، یعنی مقدار سوپرفیزیولوژیک که با مصرف ضداکسایش اتفاق می‌افتد، ممکن است موجب افزایش وضعیت فشار اکسایشی شود (۳۱) و تأثیر معناداری بر نشانگرهای پیری سلولی نداشته باشد. همان‌طورکه بیان شد، یکی از عوامل مؤثر بر فرایند پیری سلولی تغییر در فعالیت ضداکسایشی سلول‌هاست. تولید ROS در پی فعالیت ورزشی برای برخی پاسخ‌های مولکولی ناشی از فعالیت ورزشی ضروری است. بنابراین ممکن است مصرف مکمل‌های ضداکسایشی، با کاهش غلظت ROSها به پایین‌تر از مقادیر لازم (۳۱)، نتایج معکوسی را به‌وجود آورد. بنابراین توصیه می‌شود در زمان استفادهٔ همزمان از AT و RJ برای نمونه‌های چاق دقت نظر بیشتری اعمال شود. همچنین با توجه به تأثیر دوگانهٔ مصرف مکمل‌های ضداکسایشی همراه با فعالیت ورزشی توصیه می‌شود، مقادیر دیگر RJ نیز برای نشان دادن اثر تعاملی با فعالیت ورزشی بررسی شود. از محدودیت‌های پژوهش حاضر مدت زمان تحقیق (هشت هفته) بود که نمی‌تواند درک دقیقی از تأثیرات تمرین هوازی و RJ را در مدت طولانی نشان دهد. اندازه‌گیری سطوح نشانگر فشار اکسایشی نیز در توجیه اثر تمرین و مکمل بر بیان p16 و p21 می‌توانست مؤثر باشد که به‌دلیل مسائل مالی اندازه‌گیری نشد.

نتایج نشان داد که رژیم غذایی پرچرب در موش‌های صحرایی سبب افزایش نشانگرهای پیری سلولی قلب می‌شود و نقش بالقوه مهمی در پیشرفت آسیب قلبی دارد. درمان با AT و RJ نشانگرهای پیری قلبی را در موش‌های صحرایی HFDکاهش می‌دهد و عملکرد قلبی را بهبود می‌بخشد. بنابراین، از بین بردن یا کاهش نشانگرهای پیری سلولی با استفاده از AT و RJ ممکن است راهبرد مؤثری برای بهبود آسیب قلبی مربوط به رژیم غذایی با چربی بالا باشد. همچنین، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تعامل AT و RJ تأثیری بر نشانگرهای پیری قلبی ندارد. به نظر پژوهش‌های بیشتری در این زمینه نیاز است.

حامی/ حامیان مالی

این پژوهش در قالب رسالهٔ دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی و با هزینهٔ شخصی انجام گرفته است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت یکسان داشته‌اند.

تعارض منافع

بر اساس نظر نویسندگان، هیچ گونه تعارض منافعی در این مقاله وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله، نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحد دانشگاهی اعلام می‌دارند.

منابع

1. Tchkonia T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. Aging cell. 2010;9(5):667-84.
2. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. Int J Obes (Lond). 2006;30(3):400-18.
3. Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E, Agarwal A. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. Nat Rev Urol. 2010;7(3):153-61.
4. Wang MJ, Chen F, Li JX, Liu CC, Zhang HB, Xia Y, et al. Reversal of hepatocyte senescence after continuous in vivo cell proliferation. Hepatology. 2014;60(1):349-61.
5. Wasityastuti W, Habib NA, Sari DC, Arfian N. Effects of low and moderate treadmill exercise on liver of d-galactose-exposed aging rat model. Physiol Rep. 2019;7(21):e14279.
6. Akbari Boukani H, Ravasi AA, Kordi MR. The effect of a endurance training period with cellular Anti-aging purpose on telomerase enzyme content in cardiac tissue and peripheral blood lymphocytes in rats. Sport Phys & Management Investi. 2017;9(3):127-40. (In Persian).
7. Mohammadnajad y, matinhomaee h, Azarbibijani Ma. The effect 8 weeks concurrent training on telomere length, telomerase activity and TRF2 in sedentary young men. J Sport Exe Physiol. 2019;12(2):93-105. (In Persian).

8. Rae DE, Vignaud A, Butler-Browne GS, Thornell L-E, Sinclair-Smith C, Derman EW, et al. Skeletal muscle telomere length in healthy, experienced, endurance runners. Eur J Appl Physiol. 2010;109(2):323-30.
9. Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, Hanhoun M, et al. Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. Circulation. 2009;120(24):2438-47.
10. Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. Front Pharmacol. 2017;8:412.
11. Inoue S-i, Koya-Miyata S, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage. Exp Gerontol. 2003;38(9):965-9.
12. Yoneshiro T, Kaede R, Nagaya K, Aoyama J, Saito M, Okamatsu-Ogura Y, et al. Royal jelly ameliorates diet-induced obesity and glucose intolerance by promoting brown adipose tissue thermogenesis in mice. Obes Res Clin Pract. 2018;12(1):127-37.
13. Zhang X, Zhou D, Strakovsky R, Zhang Y, Pan Y-X. Hepatic cellular senescence pathway genes are induced through histone modifications in a diet-induced obese rat model. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012;302(5):G558-G64.
14. Alizadeh Z. A review of aerobic, strength and topical exercise programs effective in reducing abdominal distance. J med council iran. 2014;32(4):348-58. (In Persian).
15. Mostafavian M, Abdi A, Mehrabani J, Barari A. Effect of Eight Weeks of Aerobic Progressive Training with Capsaicin on Changes in PGC-1α and UPC-1 Expression in Visceral Adipose Tissue of Obese Rats With Diet. complement Med J. 2020;10(2):106-17. (In Persian).
16. Rocha-Rodrigues S, Rodríguez A, Gouveia AM, Gonçalves IO, Becerril S, Ramírez B, et al. Effects of physical exercise on myokines expression and brown adipose-like phenotype modulation in rats fed a high-fat diet. Life Sci. 2016;165:100-8.
17. Mesri Alamdari N, Irandoost P, Roshanravan N, Vafa M, Asghari Jafarabadi M, Alipour S, et al. Effects of Royal Jelly and Tocotrienol Rich Fraction in obesity treatment of calorie-restricted obese rats: a focus on white fat browning properties and thermogenic capacity. Nutr & Metab. 2020;17:1-13.
18. Kim SR, Jiang K, Ogrodnik M, Chen X, Zhu X-Y, Lohmeier H, et al. Increased renal cellular senescence in murine high-fat diet: effect of the senolytic drug quercetin. Transl Res. 2019;213:112-23.
19. Liao P, Yang D, Liu D, Zheng Y. GLP-1 and ghrelin attenuate high glucose/high lipid-induced apoptosis and senescence of human microvascular endothelial cells. Cell Physiol Biochem. 2017;44(5):1842-55.
20. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. EMBO J. 2011;30(8):1536-48.
21. Zhao X, Dong Y, Zhang J, Li D, Hu G, Yao J, et al. Leptin changes differentiation fate and induces senescence in chondrogenic progenitor cells. Cell death Dis. 2016;7(4):e2188-e.
22. Yu S, Kim SR, Jiang K, Ogrodnik M, Zhu XY, Ferguson CM, et al. Quercetin Reverses Cardiac Systolic Dysfunction in Mice Fed with a High-Fat Diet: Role of Angiogenesis. Oxidative medicine and cellular longevity. Oxid Med Cell Longev. 2021;2021:8875729.
23. Schafer MJ, White TA, Evans G, Tonne JM, Verzosa GC, Stout MB, et al. Exercise prevents diet-induced cellular senescence in adipose tissue. Diabetes. 2016;65(6):1606-15.
24. Askari b, bijeh n, rashidlamir a. The effect of 8 weeks IGF-1 injection and resistance training on Cox-2 and p53 expression in colorectal of male Wistar rats. J Sport Exe Physiol. 2019;12(1):115-27. (In Persian).
25. Rossman MJ, Kaplon RE, Hill SD, McNamara MN, Santos-Parker JR, Pierce GL, et al. Endothelial cell senescence with aging in healthy humans: prevention by habitual exercise and relation to vascular endothelial function. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017;313(5):H890-H5.
26. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, Van Der Horst CM, et al. BRAF E600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature. 2005;436(7051):720-4.
27. Safdar A, Bourgeois JM, Ogborn DI, Little JP, Hettinga BP, Akhtar M, et al. Endurance exercise rescues progeroid aging and induces systemic mitochondrial rejuvenation in mtDNA mutator mice. Proc Natl Acad Sci. 2011;108(10):4135-40.
28. Kunugi H, Mohammed Ali A. Royal jelly and its components promote healthy aging and longevity: from animal models to humans. Int J Mol Sci. 2019;20(19):4662.
29. Jiang C-m, Liu X, Li C-x, Qian H-c, Chen D, Lai C-q, et al. Anti-senescence effect and molecular mechanism of the major royal jelly proteins on human embryonic lung fibroblast (HFL-I) cell line. J Zhejiang Univ Sci B. 2018;19(12):960-72.
30. De Medina P. Deciphering the metabolic secret of longevity through the analysis of metabolic response to stress on long-lived species. Med Hypotheses. 2019;122:62-7.
31. Amirabadi F, Asadi MR, Tabrizi A. The effect of endurance training and use of cinnamon supple-

ment on antioxidant index and lipid peroxidation as additional care in middle-aged female diabetic type II patients. J Diabetes Nurs. 2016;4(3):48-59. (In Persian).