



Research Article

The Effect of Eight Weeks of Moderate-Intensity Continuous Training and High Intensity Interval Training along with *Citrus aurantium* L on some Cardiac Mitochondrial Biogenesis Markers in the Heart Tissue of Elderly Rats

Khadije Hasanpour¹ , Bahram Abedi^{2,*} , Lida Moradi³

¹ PhD Student in Sports Physiology, Department of Physical Education, Islamic Azad University, Mahallat, Iran

² Professor, Department of Physical Education, Mahallat Branch, Islamic Azad University, Mahallat, Iran

³ Assistant Professor of Exercise Physiology, Islamic Of Azad University, North Tehran, Tehran, Iran

* **Corresponding author:** Bahram Abedi. Professor, Department of Physical Education, Mahallat Branch, Islamic Azad University, Mahallat, Iran. E-mail: abedi@iaumahallat.ac.ir

DOI: [10.52547/nkums.14.2.11](https://doi.org/10.52547/nkums.14.2.11)

How to Cite this Article:

Hasanpour KH, Abedi B, Moradi L. The Effect of Eight Weeks of Moderate-Intensity Continuous Training and High Intensity Interval Training along with *Citrus aurantium* L on some Cardiac Mitochondrial Biogenesis Markers in the Heart Tissue of Elderly Rats. *J North Khorasan Univ Med Sci.* 2022;**14**(2):11-20. DOI: [10.52547/nkums.14.2.11](https://doi.org/10.52547/nkums.14.2.11)

Received: 01 Jan 2022

Accepted: 12 Jul 2022

Keywords:

Exercise Training
Citrus aurantium
Mitochondrial Biogenesis,
Heart
Aging

Abstract

Introduction: Death from cardiovascular diseases is one of the leading causes of death in the elderly; Although the role of exercise and herbs in heart health has been reported, their cellular-molecular mechanisms are not yet well understood. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of eight weeks of continuous exercise with moderate intensity and intense periodicity along with spring orange (Ca) consumption on some markers of mitochondrial biogenesis in the heart tissue of elderly rats.

Method: In this experimental study, 49 elderly female rats (18-16 months old, weighing 280-320 g) were randomly assigned to (1) control, (2) sham (orange spring solvent), (3) Orange Spring, (4) Continuous Exercise, (5) Periodic Exercise, (6) Continuous Exercise + Orange Spring and (7) Periodic Exercise + Orange Spring were divided. Periodic exercises were performed with an intensity of 85-110% VO_{2max} and a speed of 31-45 m / min and moderate-intensity continuous training (MICT) exercises with an intensity of 65% VO_{2max} at a speed of 25-25 m / min; Orange spring consumption was 300 mg / kg / day peritoneally. Expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator (PGC-1 α), sirtoin 1 (SIRT1) and sirtoin 3 (SIRT3) were measured in cardiac tissue. One-way analysis of variance with Tukey post hoc test was used to analyze the results ($P < 0.05$).

Results: There was a significant difference in the values of PGC-1 α , SIRT1 and SIRT3 in the study groups ($P < 0.05$). The expression levels of cardiac PGC-1 α and SIRT1 in the continuous, intermittent and orange spring exercise groups were not significantly different from the control group. But in the periodic training group, SIRT3 levels were significantly higher than the sham group ($P < 0.05$). Also, the levels of PGC-1 α , SIRT1 and SIRT3 in the groups of continuous training + spring orange and periodic training + spring orange were significantly higher than the control group ($P < 0.05$). Increased expression of PGC-1 α in the combined group of continuous exercise + spring orange was more favorable than the other groups. However, the increase in SIRT3 in exercise groups, especially periodic exercise, was more than other groups ($P < 0.05$).

Conclusion: Periodic and continuous exercise with orange spring extract seems to improve mitochondrial biogenesis in the heart tissue of elderly rats.



اثر هشت هفته تمرین تداومی با شدت متوسط و تناوبی شدید همراه با مصرف بهارنارنج بر برخی نشانگرهای بیوژنز میتوکندریایی در بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند

خدیجه حسن پور^۱، بهرام عابدی^{۲*}، لیدا مرادی^۳

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، محلات، ایران

^۲ استاد، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد محلات، دانشگاه آزاد اسلامی، محلات، ایران

^۳ استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: بهرام عابدی، استاد، گروه تربیت بدنی، واحد محلات، دانشگاه آزاد اسلامی، محلات، ایران. ایمیل:

abedi@iaumahallat.ac.ir

DOI: 10.52547/nkums.14.2.11

چکیده مقدمه: مرگ بر اثر بیماری‌های قلبی-عروقی یکی از عمده‌ترین دلایل مرگ سالمندان به شمار می‌رود؛ اگرچه نقش تمرینات ورزشی و گیاهان دارویی در سلامت قلب گزارش شده است، ولی مکانیسم سلولی-مولکولی آن‌ها هنوز به خوبی شناخته نشده است. لذا هدف مطالعه حاضر بررسی اثر هشت هفته تمرین تداومی با شدت متوسط و تناوبی شدید همراه با مصرف بهارنارنج (Ca) بر برخی نشانگرهای بیوژنز میتوکندریایی در بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند بود.	تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۲۱
روش کار: در این مطالعه تجربی تعداد ۴۹ سر موش صحرایی ماده سالمند (سن ۱۶-۱۸ ماهه، و وزن ۲۸۰-۳۲۰ گرم) به طور تصادفی به گروه‌های (۱) کنترل، (۲) شم (حلال بهارنارنج)، (۳) بهارنارنج، (۴) تمرین تداومی، (۵) تمرین تناوبی، (۶) تمرین تداومی+بهارنارنج و (۷) تمرین تناوبی+بهارنارنج تقسیم شدند. تمرینات تناوبی با شدت ۸۵-۱۱۰ درصد VO_{2max} و سرعت ۳۱-۴۵ متر بر دقیقه و تمرینات تداومی با شدت ۶۵ درصد VO_{2max} با سرعت ۲۰-۲۵ متر بر دقیقه انجام شد؛ مصرف بهارنارنج به میزان ۳۰۰ mg/kg/day به صورت صفاقی بود. مقادیر بیان‌زنی گیرنده پروکسی زوم گاما فعال شده با کوآکتیویتور آلفا (PGC-1α)، سیرتوئین ۱ (SIRT1) و سیرتوئین ۳ (SIRT3) در بافت قلب اندازه‌گیری شد. جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون واریانس یک‌راهه به همراه آزمون تعقیبی توکی استفاده شد ($P < 0.05$).	واژگان کلیدی: تمرین بهارنارنج بیوژنز میتوکندریایی قلب سالمندی
یافته‌ها: تفاوت معنی داری در مقادیر PGC-1α، SIRT1 و SIRT3 در گروه‌های تحقیق وجود داشت ($P < 0.05$). مقادیر بیان PGC-1α و SIRT1 قلبی در گروه‌های تمرین تداومی، تناوبی و بهارنارنج تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. ولی در گروه تمرین تناوبی سطوح SIRT3 نسبت به گروه‌های تمرین تداومی و بهارنارنج به طور معنی داری بالاتر بود ($P < 0.05$). همچنین مقادیر PGC-1α، SIRT1 و SIRT3 در گروه‌های تمرین تداومی+بهارنارنج و تمرین تناوبی+بهارنارنج به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$). افزایش بیان PGC-1α در گروه ترکیبی تمرین تداومی+بهارنارنج معنادارتر از سایر گروه‌ها بود. ولی افزایش SIRT3 در گروه‌های تمرین به ویژه تمرین تناوبی بیشتر از سایر گروه‌ها بود ($P < 0.05$). نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرین تناوبی و تداومی همزمان با مصرف عصاره بهارنارنج موجب بهبود بیوژنز میتوکندریایی در بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند می‌گردند.	

مقدمه

است [۱، ۳]. عوامل زیادی در پاتولوژی بیماری‌های قلبی در سالمندان دخیل است، اما مطالعات نشان می‌دهند کاهش کارایی سیستم آنتی اکسیدانی و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن (RONS) منجر به کاهش توان میتوکندری در تولید انرژی می‌شود و این امر به مرور با آپوپتوز، التهاب و افزایش استرس اکسیداتیو همراه است و در نهایت به اختلال عملکرد ماهیچه قلب منجر می‌شود [۴]. افزایش استرس اکسیداتیو می‌تواند از مسیرهای گوناگونی مانند کاهش نسبت ATP به ADP، کاهش نیکوتین آمید دی‌نوکلوئید (NAD) موجب کاهش پروتئین‌های استیل زدای وابسته به NAD⁺ مانند سیرتوئین ۱

جمعیت سالمندی جهان به سرعت رو به افزایش است، به گونه‌ای که آمار و ارقام نشان می‌دهند جمعیت سالمندان بالای ۶۵ سال از ۹/۰۹ درصد در سال ۲۰۱۹ به ۱۶/۶۷ درصد در سال ۲۰۵۰ برسد [۱]. سالمندی با ابتلا به بیماری‌های جسمی و روحی منجر به افزایش هزینه‌های درمانی می‌گردد و به عنوان یک مشکل اصلی برای سازمان‌های بهداشتی-درمانی در جهان شناخته شده است [۲]. همچنین مرگ و میر بر اثر بیماری‌های قلبی - عروقی یکی از عمده‌ترین دلایل مرگ در سالمندان به شمار می‌رود بطوری که حدود ۲۰ درصد از مرگ سالمندان به خاطر بیماری‌های قلبی گزارش شده

همچنین ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بهار نارنج به صورت صفاقی با هدف اثرات محافظت قلبی موجب کاهش MDA و پروتئین کربونیل در بافت قلب موش‌های صحرایی در معرض K2Cr2O7 گردید [۱۳]؛ همچنین محققین اشاره نمودند که عصاره بهار نارنج می‌تواند موجب مهار استرس اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین شود [۱۵]. علی‌رغم اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره بهار نارنج، مطالعات محدودی در ارتباط با اثرات بیوژنز میتوکندریایی این گیاه دارویی در بافت قلب مشاهده نشد؛ از سویی با توجه به روند رو به رشد جمعیت سالمندی و اهمیت یافتن بهترین نوع تمرین ورزشی که هنوز نتایج متناقضی در ارتباط با آن گزارش می‌شود؛ به نظر می‌رسد انجام مطالعات بنیادی که بتواند در شرایط سالمندی با بهره‌گیری از آنتی‌اکسیدان طبیعی، از تمرینات با شدت بالا بهره‌گیرد و یا اثر تعاملی MICT و HIIT همراه با بهار نارنج را بر بیوژنز میتوکندریایی در بافت قلب مورد بررسی قرار دهد ضروری به نظر می‌رسد. از این رو مطالعه حاضر با هدف اثر هشت هفته تمرین تناوبی کم‌شدت و تناوبی شدید همراه با مصرف بهار نارنج بر برخی نشانگرهای بیوژنز میتوکندریایی در بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند انجام شد.

روش کار

در این مطالعه تجربی در ابتدای سال ۱۴۰۰ تعداد ۵۶ سر موش صحرایی ماده سالمند با میانگین سنی ۱۶-۱۸ ماه و محدوده وزنی ۲۸۰-۳۲۰ گرم از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تهیه و به آزمایشگاه تخصصی فیزیولوژی ورزشی این واحد دانشگاهی منتقل شدند. این نکته قابل ذکر است که موش‌های صحرایی در این سن بر اساس منابع انتخاب شدند و به عنوان موش صحرایی سالمند در نظر گرفته شدند [۱۶]. این حیوانات به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط در آزمایشگاه نگهداری شدند. شرایط استاندارد نگهداری شامل دمای استاندارد ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ تا ۶۰ درصد، چرخه روشنایی-تاریکی (۱۲/۱۲) و دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش‌های صحرایی رعایت گردید. در ادامه موش‌های صحرایی ماده جهت همگن سازی دوره عادت ماهانه بر اساس تحقیق صدوقی و همکاران در سال ۱۳۹۵ انجام شد. در این روش جهت هم‌سایکل سازی موش‌های صحرایی ماده مقدار ۵۵۰ میکرو گرم استرادیول والرات و ۳ میلی گرم پروژسترون به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن موش‌های صحرایی در روغن کنجد حل شد و به صورت عضلانی به موش‌های صحرایی تزریق گردید؛ پس از گذشت ۳۶ ساعت مقدار ۰/۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی توسط سمپلر به آرامی به واژن حیوانات تزریق گردید و سپس دو قطره از مایع فوق برداشته و اسمیر واژینال تهیه شد. سپس نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۵۰ برابر بررسی گردید؛ با توجه به تغییر سولول جنسی در دوره‌های مختلف سیکل ماهانه، موش‌های صحرایی با دوره یکسان استروس که سولول‌ها شاخی شکل و فاقد لوکوسیت هستند به عنوان نمونه آماری انتخاب شدند [۱۶]. این نکته قابل ذکر است که به دلیل هم‌سایکل نشدن تعداد ۷ سر موش صحرایی از دوره تحقیق حذف شدند و در ادامه ۴۹ سر از ۵۶ سر موش صحرایی به عنوان نمونه هم‌سایکل انتخاب شدند. در ادامه موش‌های صحرایی سالمند به طور تصادفی به ۷ گروه ۷ سری شامل (۱) کنترل (Co)، (۲) شم (حلال بهار نارنج/Sh)، (۳) بهار نارنج

(SIRT1) در هسته سلول، سیرتوئین ۳ در میتوکندری (SIRT3)، گیرنده پروکسی زوم گامای فعال شده با کوآکتیوئور ۱-آلفا (PGC-1α)، پروتئین‌های مسئول تنفس هسته‌ای (NRFs)، کاهش سوپراکسید دیسموتاز ۲ میتوکندریایی (SOD2) و نقص عملکرد میتوکندریایی در بافت قلب گردید [۵، ۶]. با توجه به افزایش جمعیت سالمندی ارائه راهکارهای مؤثر برای پیشگیری از ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی در سالمندان ضروری به نظر می‌رسد؛ از این رو محققین بر این عقیده‌اند که انجام فعالیت‌های منظم و طولانی مدت به عنوان کم‌هزینه‌ترین راه موجب بهبود متابولیسم چربی‌ها، قندها، بهبود توان هوازی، عملکرد جسمی، بهبود کیفیت زندگی در شرایط سالمندی می‌گردد [۲، ۷]. اعتقاد بر این است که فعالیت ورزشی با مکانیسم افزایش کاتکولامین‌ها موجب فسفوریلاسیون AMP حلقوی شده، و در ادامه به فعال شدن پروتئین کیناز فعال شده توسط AMP (AMPK) منجر می‌شود؛ در ادامه PGC-1α فسفریله می‌شود و پس از آن این پروتئین می‌تواند به طور مستقیم در بیوژنز میتوکندری تأثیر گذار باشد، همچنین این پروتئین با تغییر در نسبت NAD⁺ به NADH به فعال سازی SIRT1 و SIRT3 روند بیوژنز میتوکندری را تسریع می‌کند [۸]. با این حال تأثیر تمرینات ورزشی وابسته به نوع، شدت و مدت زمان تمرین بوده و مکانیسم نوع تمرینات ورزشی بر این مکانیسم سولولی مولکولی هنوز به خوبی شناخته نشده است [۷]. در این زمینه محققین نشان دادند شش هفته، تمرین تناوبی شدید (HIIT) موجب افزایش مقادیر عضلانی SIRT1، سیرتات سنتتاز، بتا‌هیدروکسیل کو آنزیم A دهیدروناز، سیتوکروم C اکسیداز و PGC-1α در آزمودنی‌های انسانی گردید [۹]؛ همچنین ۱۲ هفته تمرین شنا موجب افزایش سطوح SIRT1، PGC-1α، AMPK و پروتئین خانواده سرچنگالی FOXO3a A ۳- در عضله دوقلو و نعلی موش‌های صحرایی سه ماهه، ۱۲ ماهه و ۱۸ ماهه گردید [۱۰]؛ همچنین در مطالعه‌ای در مقایسه هشت هفته تمرین HIIT و تمرین تناوبی با شدت متوسط (MICT) محققین نشان دادند که SIRT1 در هر دو نوع تمرین افزایش می‌یابد ولی افزایش SIRT3 و PGC-1α در کبد موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ معنی‌دار نبود [۱۱].

علیرغم نقش مطلوب فعالیت بدنی ناشی از سازگاری طولانی مدت با تمرینات ورزشی در سالمندان، مطالعاتی نیز عنوان کردند که تمرینات ورزشی کوتاه مدت و شدید می‌تواند باعث افزایش نشانگرهای استرس اکسیداتیو شوند که این عامل می‌تواند آسیبی برای فرد سالمند باشد [۱۲]؛ از این رو اخیراً توجه محققین به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و گیاهان دارویی در کنار فعالیت‌های بدنی جلب شده است [۲]. از میان گیاهان دارویی بهار نارنج (Ca) با نام علمی *Citrus aurantium L.* درختی با ارتفاع ۴-۵ متر، با برگ‌هایی براق و معطر، حاوی هیدروکربن‌ها، الکل‌ها، انواع استات، اسیدها و فنول‌ها و فلاونوئیدها است که در طب سنتی برای درمان برخی از بیماری‌ها مانند سردرد، درد سینه، رفع تپش قلب و اضطراب مورد استفاده قرار می‌گرفته است [۱۳]. در این زمینه محققین جهت بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی بهار نارنج، نتیجه گرفتند که ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره اتانولی بهار نارنج به صورت صفاقی موجب افزایش سطوح سرمی ویتامین E، C، SOD، ATPase، کاتالاز، کاهش مالون دی‌آلدئید (MDA) در موش‌های صحرایی بالغ در معرض K2Cr2O7 گردید [۱۴]؛

(Ca)، (۴) تمرین تداومی کم شدت (MICT)، (۵) تمرین تناوبی شدید (HIIT)، (۶) MICT+Ca و (۷) HIIT+Ca تقسیم شدند.

ملاحظات اخلاقی

براساس بیانیه هلسینکی در مطالعه بر روی حیوانات با توجه به حفظ زیست و آسایش حیوانات آزمایشگاهی، در این مطالعه حداقل نمونه که جهت اجرا و نتیجه گیری صحیح مطالعه لازم بود، گزینش شد. همچنین در طی مدت مطالعه شرایط مناسب تغذیه و زندگی نمونه‌ها ایجاد شد. علاوه بر رعایت شرایط حمل و نقل، نگهداری و تغذیه مناسب که ملزومات تحقیق است، برای رعایت اصول اخلاقی و به حداقل رساندن در حیوان ضمن رعایت دوز مناسب محلول کتامین و زایلازین، تزریق و جراحی توسط فرد متخصص صورت گرفت. همچنین پژوهش حاضر با کد اخلاق (IR.IAU.M.REC.1400.023) توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تأیید و انجام شد.

تمرینات تداومی کم شدت و تناوبی شدید

ابتدا برای آشنا سازی با نوارگردان موش‌های صحرایی به مدت یک هفته، ۵ دقیقه در روز با سرعت ۸ متر بر دقیقه، برای سه روز بر روی نوارگردان راه رفتند. در ادامه برای بدست آوردن سرعت بیشینه موش‌های صحرایی ابتدا برای مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه گرم کردند، سپس به ازای هر ۳ دقیقه دو متر به سرعت نوار گردان

جدول ۱. پروتکل تمرین تداومی کم شدت و تناوبی شدید در موش‌های صحرایی

تمرین هفته	تمرین تناوبی شدید			تمرین تداومی کم شدت		
	شدت اینتروال شدید	تعداد اینتروال شدید	سرعت در شدت بالا	شدت اینتروال کم شدت	سرعت در شدت پایین	سرعت زمان
اول	۸۵	۷	۳۱	۶۰	۱۵	۲۰
دوم	۸۵	۷	۳۳	۶۰	۱۶	۲۰
سوم	۹۰	۸	۳۵	۶۰	۱۷	۲۲
چهارم	۹۵	۸	۳۷	۶۰	۱۸	۲۲
پنجم	۱۰۰	۹	۳۹	۶۵	۱۹	۲۴
ششم	۱۰۰	۹	۴۱	۶۵	۲۱	۲۴
هفتم	۱۱۰	۱۰	۴۳	۶۵	۲۲	۲۵
هشتم	۱۱۰	۱۰	۴۵	۶۵	۲۳	۲۵

نکته. در تمام طول دوره تمرین شدت بر اساس حداکثر سرعت دوییدن، سرعت بر اساس متر بر دقیقه، تعداد اینتروال ها بر اساس تکرارهای یک دقیقه‌ای و زمان بر حسب دقیقه در نظر گرفته شد. همچنین زمان گرم کردن و سرد کردن به مدت زمان اصلی تمرین افزوده می‌شد.

همچنین این نکته قابل ذکر است که در طول دوره تحقیق گروه‌هشتم، روزانه حجم معادل محلول عصاره نرمال سالین که حلال عصاره بهار نارنج بود را به صورت روزانه به صورت تزریق صفاقی دریافت کردند.

روش تشریح و نمونه برداری

برای نمونه برداری بافت قلب، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و در حالت ۱۶ ساعت ناشتایی، موش‌های صحرایی توسط ترکیب کتامین و زایلوزین به نسبت ۳ به ۱ بیهوش شدند. پس از اطمینان از بیهوشی کامل موش‌های صحرایی با استفاده از آزمون فشردن دم و پا و اطمینان از بیهوشی کامل، حفره سینهای موش صحرایی با دقت باز گردید، پس از کنترل و کنار زدن بافت‌های دیگر بافت قلب موش‌های صحرایی به دقت استخراج گردید و بلافاصله در دمای 70°C - فریز گردید و تا زمان انتقال به آزمایشگاه سلولی مولکولی در همان دما نگهداری شدند.

مصرف بهار نارنج

برای تهیه بهار نارنج، این گیاه از محل جهاد کشاورزی شهرستان مرودشت تهیه گردید و سپس در سایه خشک گردید؛ در ادامه ۵۰۰ گرم پودر خشک بهار نارنج با حلال اتانول ۹۰ درصد و آب خالص (نسبت ۴ به ۱) مخلوط گردیدند و با روش پرکولاسیون (به مدت ۷۲ ساعت) استفاده شد. در ادامه جهت استخراج عصاره بهار نارنج محلول درون دستگاه خلأ دوار و سپس با آون با حرارت 45°C درجه خشک و سپس پودر شد؛ میزان پودر حاصل $11/2$ درصد بود. سپس جهت رقیق سازی و تزریق عصاره روزانه $1/2$ گرم عصاره با $6/3$ میلی لیتر سرم فیزیولوژی رقیق می‌گردید و به هر موش صحرایی میزان $0/3$ سی سی از محلول تزریق صفاقی می‌شد. بدین ترتیب موش‌های صحرایی با تعداد ۲۱ سر روزانه ۳۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدنشان عصاره بهار نارنج را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت نمودند [۱۸، ۱۹].

(K1621) انجام شد. cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAid™M-MuLV Reverse transcriptase مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا پرایمرهای توسط نرم افزار Allele IDv7.8 طراحی شد و برای بررسی اختصاصی بودن و کارایی پرایمرها با استفاده از نرم افزار موجود در سایت NCBI استفاده شد در ادامه برای بررسی بیان ژنی متغیرها نمونه‌ها در دستگاه قرار داده شدند و پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشرفلورسانس با محاسبه $\Delta\Delta Ct$ میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت به ژن کنترل داخلی و گروه کنترل با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

اندازه گیری مقادیر بیان ژنی PGC-1 α ، SIRT1 و SIRT3

ابتدا برای اندازه گیری متغیرها، بافت قلب با استفاده از هاون و سانترفیوژ هموژن گردید و سپس بر اساس دستور العمل کیت ستونی استخراج RNA (FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit) ساخت کشور هنگ کنگ عمل شد، برای این کار کل محتویات RNA سلول (total RNA) استخراج شد. برای اطمینان از کیفیت RNA، مقدار ۵ میکرولیتر از محلول روی ژل آگارز الکتروفورز قرار داده شد و با استفاده از خاصیت جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه پیکو دراپ شرکت سیگما (ساخت آمریکا) خلوص RNA و برای بررسی کیفیت آن باز فرمول $(A_{260} \times \epsilon \times d / 1000) = C (\mu g / \mu l)$ استفاده شد. در ادامه برای سنتز cDNA طبق پروتکل موجود در کیت فرمنتاز

جدول ۲. توالی پرایمرهای طراحی شده در تحقیق حاضر

Genes	Primer Sequences	Sizes (Bp)
B2m	Forward: 5'- CGTGCTTGCCATTTCAGAAA -3' Reverse: 5'-ATATACATCGGTCTCGGTGG -3'	244
SIRT1	Forward: 5'- TCCTGTGGGATACCTGACTT-3' Reverse: 5'- AAAGGAACCATGACACTGAATGA -3'	300
PGC1a	Forward: 5'- CAGAAGCAGAAAGCAATTGAAGA -3' Reverse: 5'- GTTTCATTTCGACCTGCGTAAAG -3'	230
SIRT3	Forward: 5'- CCCAATGTCGCTCACTACTTCC-3' Reverse: 5'- CGTCAGCCCGTATGTCTTCC -3'	199

($P=0.002$) و تمرین تناوبی+بهار نارنج ($P=0.016$) به طور معنی داری بیشتر از گروه بهار نارنج بود (شکل ۱). سطوح بیان ژنی SIRT1 در گروه‌های تمرین تناوبی+بهار نارنج ($P=0.002$) و تمرین تناوبی+بهار نارنج ($P=0.03$) به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود. همچنین در گروه‌های بهار نارنج ($P=0.009$)، تمرین تناوبی+بهار نارنج ($P=0.001$) و تمرین تناوبی+بهار نارنج ($P=0.004$) به طور معنی داری بالاتر از گروه تمرین تناوبی بود. علاوه بر این در گروه تمرین تناوبی+بهار نارنج به طور معنی داری بالاتر از گروه تمرین تناوبی بود ($P=0.03$) (شکل ۲).

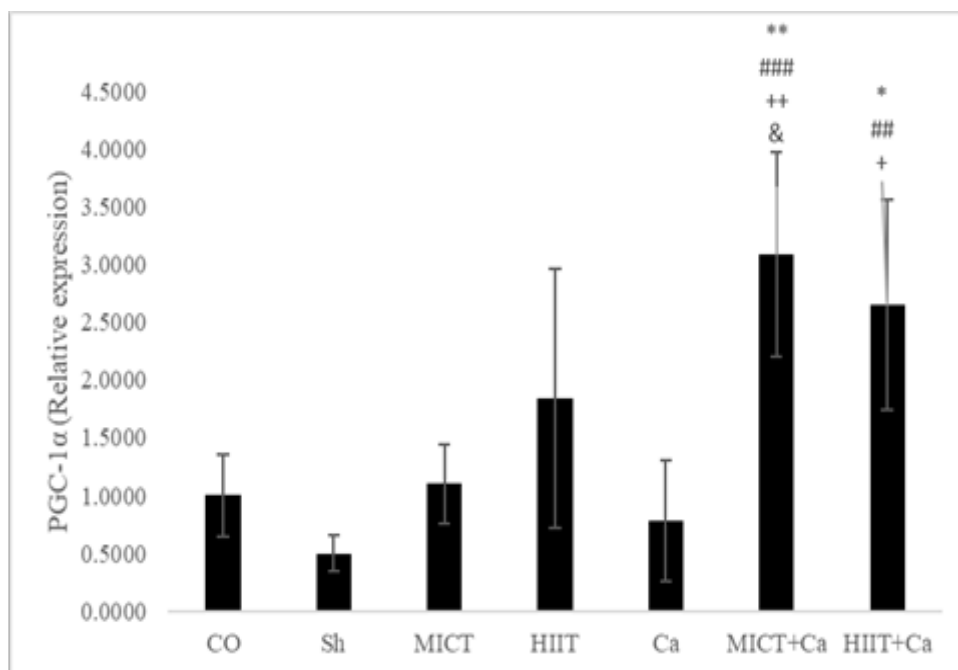
سطوح بیان ژنی SIRT3 در گروه تمرین تناوبی+بهار نارنج تمرین تناوبی+بهار نارنج به طور معنی داری بالاتر از گروه‌های کنترل ($P=0.001$) بود. همچنین در گروه‌های تمرین تناوبی ($P=0.02$)، تمرین تناوبی+بهار نارنج ($P=0.02$) و تمرین تناوبی+بهار نارنج ($P=0.001$) به طور معنی داری بالاتر از گروه تمرین تناوبی بود. علاوه بر این در گروه تمرین تناوبی+بهار نارنج به طور معنی داری بالاتر از گروه تمرین تناوبی بود ($P=0.002$) و تمرین تناوبی ($P=0.02$) بود؛ همچنین در گروه‌های تمرین تناوبی ($P=0.007$)، تمرین تناوبی+بهار نارنج ($P=0.009$) و تمرین تناوبی+بهار نارنج ($P=0.001$) به طور معنی داری بالاتر از گروه بهار نارنج بود؛ همچنین گروه تمرین تناوبی+بهار نارنج به طور معنی داری بالاتر از گروه تمرین تناوبی+بهار نارنج بود ($P=0.012$) (شکل ۳).

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک و برابری واریانس‌ها با آزمون لون بررسی شد. با توجه برقراری شرط استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک راهه، جهت بررسی تفاوت بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک راهه و برای تعیین محل تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی در نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد ($P < 0.05$).

یافته‌ها

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک راهه نشان داد تفاوت معنی داری در سطوح بیان ژنی PGC-1 α ($F=8.02$, $P=0.001$)، SIRT1 ($F=14.35$, $P=0.001$) و SIRT3 ($F=8.49$, $P=0.019$) در بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند بین گروه‌های تحقیق وجود دارد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد تفاوت معنی داری در سطوح بیان PGC-1 α قلبی گروه‌های تمرین، تمرین تناوبی، تمرین تناوبی+بهار نارنج در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد ($P \geq 0.05$). اما در گروه‌های تمرین تناوبی+بهار نارنج ($P=0.006$) و تمرین تناوبی+بهار نارنج ($P=0.04$) به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود. PGC-1 α در گروه تمرین تناوبی+بهار نارنج به طور معنی داری بالاتر از گروه تمرین تناوبی بود ($P=0.009$). در گروه‌های تمرین تناوبی+بهار نارنج



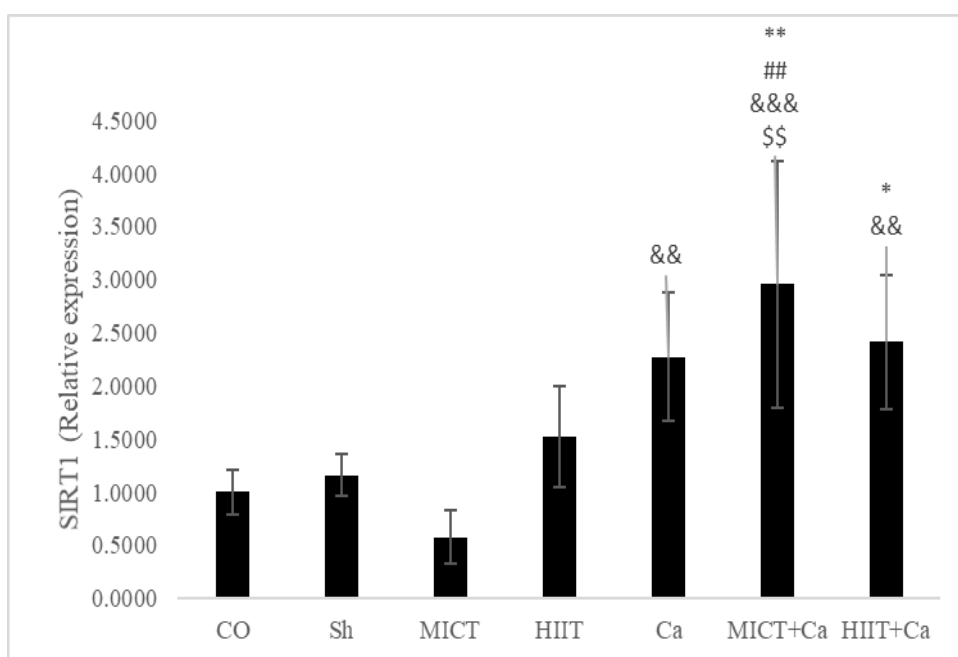
شکل ۱. سطوح بیان ژنی PGC-1α در بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند در گروه‌های تحقیق Co: گروه کنترل؛ Sh: گروه‌هشتم؛ MICT: تمرین تداومی با شدت متوسط؛ HIIT: تمرین تناوبی شدید؛ Ca: بهارنارنج؛ MICT+Ca: تمرین تداومی + بهارنارنج؛ HIIT+Ca: تمرین تناوبی + بهارنارنج

* (P < 0.05), ** (P < 0.01) افزایش معنی دار نسبت به گروه Co

(P < 0.01), ### (P < 0.001) افزایش معنی دار نسبت به گروه Sh

+ (P < 0.05), ++ (P < 0.01) افزایش معنی دار نسبت به گروه Ca

& (P < 0.05) افزایش معنی دار نسبت به گروه MICT



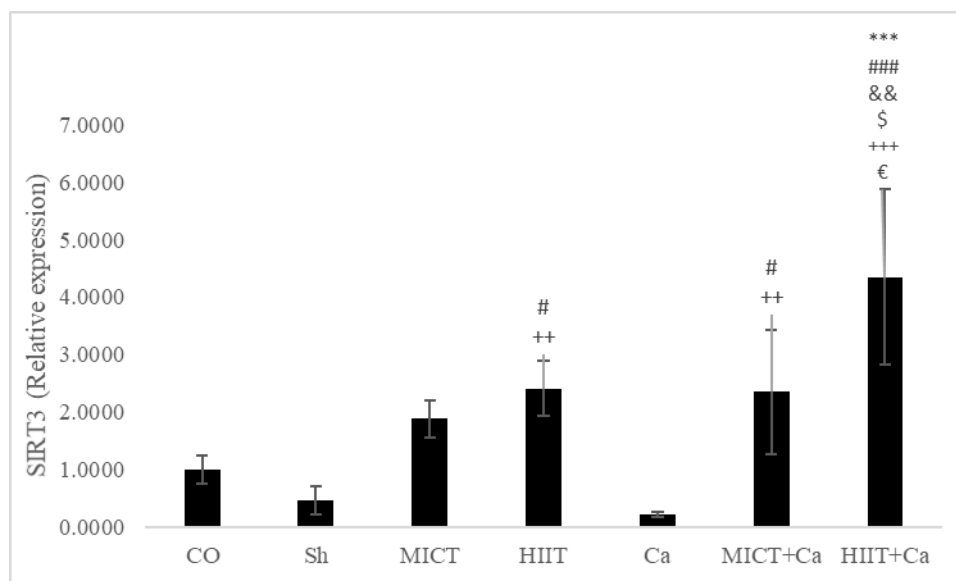
شکل ۲. سطوح بیان ژنی SIRT1 در بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند در گروه‌های تحقیق Co: گروه کنترل؛ Sh: گروه‌هشتم؛ MICT: تمرین تداومی با شدت متوسط؛ HIIT: تمرین تناوبی شدید؛ Ca: بهارنارنج؛ MICT+Ca: تمرین تداومی + بهارنارنج؛ HIIT+Ca: تمرین تناوبی + بهارنارنج

* (P < 0.05), ** (P < 0.01) افزایش معنی دار نسبت به گروه Co

(P < 0.01) افزایش معنی دار نسبت به گروه Sh

&& (P < 0.01) و (P < 0.001) افزایش معنی دار نسبت به گروه MICT

\$\$\$ (P < 0.001) افزایش معنی دار نسبت به گروه HIIT



شکل ۳. سطوح بیان ژنی SIRT3 در بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند در گروه‌های تحقیق Co: گروه کنترل؛ Sh: گروه شام؛ MICT: تمرین تناوبی با شدت متوسط؛ HIIT: تمرین تناوبی شدید؛ Ca: بهار نارنج؛ MICT+Ca: تمرین تناوبی + بهار نارنج؛ HIIT+Ca: تمرین تناوبی + بهار نارنج

*** ($P < 0.001$) افزایش معنی دار نسبت به گروه Co
($P < 0.05$) و ### ($P < 0.001$) افزایش معنی دار نسبت به گروه Sh
++ ($P < 0.01$) و +++ ($P < 0.001$) افزایش معنی دار نسبت به گروه Ca
\$ ($P < 0.05$) افزایش معنی دار نسبت به گروه HIIT
€ ($P < 0.05$) افزایش معنی دار نسبت به گروه MICT+Ca

از بیماری‌ها به شدت کاهش می‌یابد [۲۲]. با توجه به نقش مطلوب فعالیت‌های ورزشی به نظر می‌رسد فعالیت‌های استقامتی با مکانیسم تنظیم افزایشی cAMP، فسفریلاسیون پروتئین کینازها، AMPK، فعال سازی زیر واحد $\text{p38}\gamma$ MAPK و PGC-1 α نقش دارند و در ادامه خود PGC-1 α در فعال سازی پروتئین‌هایی مانند کلسیم، SIRT1 و SIRT3 در بافت قلب نقش دارد [۲۳، ۲۲]. اما اطلاعات موجود نشان می‌دهد فعال سازی مسیر PGC-1 α متعاقب فعالیت ورزشی به حساسیت انسولین و مسیر متابولیسم گلوکز، نوع زیر واحد PGC-1 α فعال شده توسط فعالیت ورزشی، نوع فعالیت ورزشی [۲۴] وابسته است. نتایج مطالعه حاضر مبنی بر عدم افزایش معنی دار PGC-1 α و SIRT1 نسبت به گروه کنترل را می‌توان اینگونه توجیه نمود که به نظر می‌رسد در شرایط سالمندی انجام تمرینات ورزشی از مسیرهایی به جز PGC-1 α نیز می‌تواند قابلیت میتوکندری را بهبود بخشد و عدم بیان آن می‌تواند به طول دوره تمرین نیز وابسته باشد [۲۴]. در این زمینه محققین نشان دادند که متعاقب تمرینات ورزشی در موش‌های صحرایی سالمند که با حذف ژنتیکی زیر واحد PGC1 همراه بودند با افزایش پروتئین‌های زنجیره انتقال الکترون موجب بهبود کارایی میتوکندری شدند [۲۴]. همچنین فعالیت ورزشی می‌تواند با فعال سازی مسیر MAPK-2/ERK1 زیر واحد δ پروتئین کیناز C ($\text{PKC-}\delta$)، پروتئین کیناز A، کلسیم-کالمودولین کیناز ۲ (CaM-KII) و تعدیل میزان کلسیم گردد که این امر می‌تواند در میزان استیلایسیون نقش داشته باشد و پروتئین‌های داستیلایسیون را تحت تأثیر قرار دهد و این امر در میزان بیان سیرتوئین‌ها نقش دارد [۲۵]. همسو با مطالعه حاضر مطالعه آذریان و همکاران نشان دادند هشت هفته تمرین هوازی در افزایش بیان ژنی PGC1- α اثر معنی‌داری ندارد

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تمرین تناوبی و تناوبی اثر معنی‌داری بر افزایش بیان PGC-1 α و SIRT1 قلبی در موش‌های صحرایی سالمند ماده ندارد. اما در گروه HIIT سطوح SIRT3 نسبت به گروه شام به طور معنی‌داری بالاتر بود. بر اساس مطالعات انجام شده یکی از دلایل اصلی مرگ و میر افراد بالای ۶۵ سال پدیده قلب سالمند و یکی از کلیدی‌ترین مکانیسم‌های این اتفاق بیان غیر طبیعی RNA های غیر کد شونده است که می‌توانند به نقص بیان بسیاری از پروتئین‌های حیاتی درون سلول، آسیب به تلومر، موتاسیون DNA میتوکندریایی، اکسیداسیون پروتئین‌های میتوکندریایی، کاهش حجم و تعداد میتوکندری، کاهش قابلیت سنتز ATP، افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و در کل نقص عملکرد بیولوژیکی سلول قلبی می‌گردد؛ همچنین افزایش ROS متعاقب نقص بیولوژیک به طور سینرژیستی با دیگر اختلالات قلب سالمند موجب افزایش بی‌رویه اتوفاژی و آپوپتوز سلول قلبی می‌شود [۱]. علاوه بر این محققین بر این اعتقادند که نقص عملکرد سلول در سنتز پروتئین‌های متابولیک مانند تغییر در زیر واحدهای PGC1 با کاهش زیر واحد PGC-1 α و افزایش PGC-1 β شده و همچنین با کاهش شارژ انرژی سلول در شبکه سارکوپلاسمی مقادیر NAD^+ که به فعال سازی SIRT1 در DNA سلول و SIRT3 در میتوکندری کاهش می‌یابد و مسیرهای مختلف بیوژنز میتوکندری مثل کیناز فعال شده توسط AMP (AMPK)، کلسیم/کالمودولین و پروتئین‌های داستیلایسونی متوقف می‌شود [۲۰، ۲۱]. همچنین مسیر فعال سازی PGC-1 α وابسته به فعال شدن زیر واحد $\text{p38}\gamma$ در پروتئین AMPK بوده که در شرایط اتوفاژی و استرس اکسیداتیو ناشی

1a، کارنیتین پالمیتوئیل ترانسفراز ۱ (CPT1) و آدیپونکتین شد. همچنین این محققین بیان نمودند که Ca می‌تواند از مسیر فعال سازی ترموژن وابسته به پروتئین غیر جفتی ۱ (UCP1) منجر به افزایش بیان PGC-1 α و PGC-1 β گردد [۳۰]؛ مطالعات محدودی در ارتباط با این مکانیسم سلولی مولکولی وجود داشت، لذا محقق در مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر دچار محدودیت شد.

همچنین نتایج نشان داد تمرین تداومی+بهار نارنج و تمرین تناوبی+بهار نارنج موجب افزایش معنی دار PGC-1 α ، SIRT1 و SIRT3 در بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند شد. بررسی مطالعات نشان می‌دهد تمرینات ورزشی با مکانیسم افزایش cAMP، پروتئین کینازها، AMPK، p38 γ MAPK موجب افزایش PGC-1 α ، SIRT1 و SIRT3 می‌شوند [۲۲، ۲۳]؛ و بهار نارنج با مکانیسم بهبود پروستاگلاندین‌ها، افزایش آنتی اکسیدان‌ها، تنظیم کانال‌های یونی [۲۷]، فعال‌سازی AMPK موجب فسفریلاسیون PGC-1 α و SIRT1 گردد [۲۸]. در تأیید یافته مطالعه حاضر مبنی بر اثر سینرژیستی تمرین و بهار نارنج محققین نشان دادند تعامل MICT و Ca موجب افزایش بیان PGC-1 α گردید ولی اثر معنی داری بر مقادیر بیان ژنی SIRT1 در بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند نداشت [۲۸]؛ علاوه بر این تمرین HIIT و تداومی کم شدت همراه با مصرف کروسین (ماده مؤثره گیاه زعفران) دارای اثر تعاملی بر افزایش PGC-1 α و UCP1 در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت می‌باشد [۳۱]. تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی با شدت متوسط همراه با بهار نارنج دارای اثر تعاملی در بهبود وزن قلب، توان هوازی، کاهش وزن و کاهش وزن چربی احشایی در موش‌های صحرایی سالمند بود [۳۲]؛ علاوه بر این مصرف حاد و مزمن بهار نارنج طی دوره تمرینات ورزشی موجب بهبود عملکرد متابولیکی و فیزیکی ورزشکاران گردید [۳۳]. در ارتباط با افزایش SIRT3 که در این تحقیق بیشتر به تمرین به ویژه تمرین تناوبی شدید وابسته بود، به گونه‌ای که تمرین موجب تقویت اثر بهار نارنج می‌گردد. به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی تمرین تناوبی شدید با توجه به سازگاری آن که بیشتر سیستم استرس اکسیداتیو را به چالش می‌کشد و منجر به فعال سازی مسیر FOXO3a می‌شود، احتمالاً نسبت به تمرینات تداومی با شدت متوسط اثر مطلوب‌تری بر پروتئین SIRT3 به عنوان یک پروتئین اختصاصی میتوکندریایی نقش ایفا کند [۲۶]. بنابراین به نظر می‌رسد متعاقب تمرینات تناوبی شدید همراه با بهار نارنج به طور همزمان مسیر ردوکس سلولی فعال شده و از مسیر FOXO3a به فعال سازی مسیر سیرتوئین‌ها منجر می‌شود؛ اما تمرینات تداومی کم شدت همراه بهار نارنج با مکانیسم افزایش فسفوریلاسیون AMPK در بیوژن میتوکندریایی سهیم است [۲۵، ۲۷، ۲۸]. به با توجه به سازگاری‌های غیر وابسته به PGC-1 α ، SIRT1 و SIRT3 ناشی از ورزش در شرایط سالمندی، عدم اندازه گیری ظرفیت و عملکرد زنجیره انتقال الکترون و آنزیم‌های مرتبط با آن از محدودیت‌های مطالعه حاضر باشد. از این رو پیشنهاد می‌گردد متغیرهای سیکل کرپس، زنجیره انتقال الکترون نیز مورد ارزیابی قرار گیرند. با توجه به چالش‌های سالمندی و مکانیسم‌های پیچیده ورزش، به نظر می‌رسد عدم اندازه گیری پروتئین‌های تأثیر گذار در محور PGC-1 α ، SIRT1 و SIRT3 پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی

[۲۵]؛ در مطالعه‌ای دیگر ۱۲ هفته تمرین شنا موجب کاهش FOXO3a در عضله دوقلو و نعلی موش‌های صحرایی ۳، ۱۲ و ۱۸ ماهه گردید؛ این محققین نشان دادند که به خاطر تفاوت در سازگاری‌های نوع عضله، تفاوت در بیان نیز وجود دارد؛ به گونه‌ای که FOXO3a در عضله دوقلو بیشتر از عضله نعلی کاهش یافت در حالی که SIRT1 در عضله نعلی بیشتر افزایش داشت [۱۰]. از این رو به نظر می‌رسد تمرینات شدید با مکانیسم درگیر کردن حساسیت ردوکس سلولی به نسبت تمرینات کم شدت و با شدت متوسط ارجحیت دارد. با این حال علی‌رغم اینکه هشت هفته تمرین هوازی و ترکیبی موجب افزایش PGC-1 α و SIRT1 در بیماران قلبی عروقی گردید؛ تفاوت معنی داری در دو نوع تمرین مشاهده نشد [۲۶]. به نظر می‌رسد تفاوت در شیوه اندازه گیری و شدت ورزش از دلایل تناقض در نتایج این دو مطالعه با مطالعه حاضر باشد. به طور کلی به نظر می‌رسد در شرایط سالمندی مکانیسم‌های متعددی در عملکرد میتوکندری و دخیل هستند که بعضاً غیر وابسته به PGC-1 α و سیرتوئین‌ها هستند و بررسی‌های بیشتری در این زمینه با توجه به شدت و مدت زمان دوره تمرین نیاز است [۲۲]. علاوه بر این به نظر می‌رسد عدم افزایش معنی دار این نشانگرهای بیوژن میتوکندریایی، نشان دهنده مهار و به تأخیر انداختن نقص عملکرد عضله قلبی نیز باشد.

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد بهار نارنج اثر معنی داری بر افزایش مقادیر بیان ژنی PGC-1 α ، SIRT1 و SIRT3 در بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند ندارد. بر اساس مطالعات از اصلی‌ترین مواد مؤثر موجود در بهار نارنج را می‌توان *p-synephrine*، *ephedrine*، *salicin* و کافئین دانست که بیشترین اثرات بیولوژیکی را در این گیاه دارند؛ همچنین این گیاه دارویی می‌تواند با مکانیسم بهبود عملکرد پروستاگلاندین F2a اثرات مطلوبی در سیستم قلبی - عروقی داشته باشد. این آنتی اکسیدان طبیعی می‌تواند با کاهش ROS، افزایش آنزیم نیتریک اکسید، فعال سازی گوانیل سیکلاز، موجب مهار Ca^{2+} وابسته خارج سلولی، تعدیل K^{+} و سازگاری‌های آن در کانال‌های کلسیم-پتاسیم و همچنین بهبود عملکرد گیرنده رایانودین در قلب می‌گردد [۲۷]. همچنین به نظر می‌رسد بهار نارنج با مکانیسم فعال سازی AMPK در فسفریلاسیون PGC-1 α و SIRT1 نقش دارد، اما این مکانیسم وابسته به دوز مصرفی و طول دوره مصرف است [۲۸]. در این زمینه مطالعاتی انجام شده است، به عنوان مثال مطالعه شیخ الاسلامی در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که مصرف ۳۰۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی بهار نارنج منجر به کاهش سطوح بیان ژنی SIRT1 در بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند شد در حالی که موجب افزایش معنی دار PGC-1 α گردید [۲۸]؛ به نظر می‌رسد این آنتی اکسیدان منجر به خنثی سازی گونه‌های فعال اکسیژن منجر شده است، و توانسته است از مسیر مهار پروتئین‌های خانواده سرچنگالی موجب مهار بیان سیرتوئین‌ها گردد. بر اساس مطالعات انجام شده، آفدرین‌های موجود در بهار نارنج بیشتر بر محور AMPK/PGC-1 α /SIRT1/3 اثر گذار باشد [۲۹]، لذا تأثیر آفدرین‌ها با سازگاری‌های سلولی مولکولی کاتکولامین‌ها در تعامل می‌باشد و می‌تواند منجر به افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام، افزایش بیان پروتئین‌های خانواده زنجیره انتقال الکترون، افزایش میزان فسفریلاسیون اکسایشی در بافت قلب می‌گردد [۳۰]. همچنین محققین نشان داده‌اند که Naringin موجب PGC-

دو سیرتوئین به نظر می‌رسد تمرین موجب تعدیل اثر بهار نارنج در SIRT1 می‌گردد در حالی که بهار نارنج موجب تعدیل اثر تمرین در افزایش بیوژنز میتوکندریایی می‌گردد. همچنین تأثیرپذیری SIRT3 به تمرین تداومی کمتر است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همه کسانی که ما را در این مطالعه یاری کردند تشکر می‌کنیم

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافع اعلام نکردند.

References

- Yan M, Sun S, Xu K, Huang X, Dou L, Pang J, et al. Cardiac Aging: From Basic Research to Therapeutics. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:9570325. DOI: 10.1155/2021/9570325 PMID: 33777324
- Hosseini SA, Salehi O, Keikhosravi F, Hassanpour G, Ardakani HD, Farkhaie F, et al. Mental Health Benefits of Exercise and Genistein in Elderly Rats. *Exp Aging Res*. 2022;48(1):42-57. DOI: 10.1080/0361073X.2021.1918473 PMID: 33888036
- Díez-Villanueva P, Jiménez-Méndez C, Alfonso F. Heart failure in the elderly. *J Geriatr Cardiol JGC*. 2021;18(3):219.
- Rizvi F, Preston CC, Emelyanova L, Yousufuddin M, Viqar M, Dakwar O, et al. Effects of Aging on Cardiac Oxidative Stress and Transcriptional Changes in Pathways of Reactive Oxygen Species Generation and Clearance. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(16):e019948. DOI: 10.1161/JAHA.120.019948 PMID: 34369184
- Alam F, Syed H, Amjad S, Baig M, Khan TA, Rehman R. Interplay between oxidative stress, SIRT1, reproductive and metabolic functions. *Curr Res Physiol*. 2021;4:119-124. DOI: 10.1016/j.crphys.2021.03.002 PMID: 34746831
- Yu M, Zhang H, Wang B, Zhang Y, Zheng X, Shao B, et al. Key Signaling Pathways in Aging and Potential Interventions for Healthy Aging. *Cells*. 2021;10(3). DOI: 10.3390/cells10030660 PMID: 33809718
- Hosseini SA, Zar A, Darakhshandeh M, Salehi OR, Amiri R. The Effect of Volume and Intensity Changes of Exercises on Lipid Profile of Elderly Men. *J Gerontol*. 2017;1(4):38-46. DOI: 10.18869/acadpub.joge.1.4.38
- Vargas-Ortiz K, Perez-Vazquez V, Macias-Cervantes MH. Exercise and Sirtuins: A Way to Mitochondrial Health in Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11). DOI: 10.3390/ijms20112717 PMID: 31163574
- 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):350-357. DOI: 10.1139/H10-030 PMID: 20555380
- Huang CC, Wang T, Tung YT, Lin WT. Effect of Exercise Training on Skeletal Muscle SIRT1 and PGC-1alpha Expression Levels in Rats of Different Age. *Int J Med Sci*. 2016;13(4):260-270. DOI: 10.1155/ijms.14586 PMID: 27076782
- Davari F, Alimanesht Z, Alimanesht Z, Salehi O, Hosseini SA. Effect of training and crocin supplementation on mitochondrial biogenesis and redox-sensitive transcription factors in liver tissue of type 2 diabetic rats. *Arch Physiol Biochem*. 2020;1-6. DOI: 10.1080/13813455.2020.1762663 PMID: 32401063
- Bogdanis GC, Stavrinou P, Fatouros IG, Philippou A, Chatzinikolaou A, Draganidis D, et al. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food Chem Toxicol*. 2013;61:171-177. DOI: 10.1016/j.fct.2013.05.046 PMID: 23747717
- Chaabane M, Elweji A, Ghorbel I, Boudawara T, Zeghal N, Soudani N, et al. Peel extract mitigates hexavalent chromium-induced oxidative stress and cardiotoxicity in adult rats. 2017.
- Soudani N, Raftafi M, Ben Amara I, Hakim A, Troudi A, Zeghal KM, et al. Oxidative stress-related lung dysfunction by chromium(VI): alleviation by Citrus aurantium L. *J Physiol Biochem*. 2013;69(2):239-253. DOI: 10.1007/s13105-012-0207-6 PMID: 22972417
- Giannakoula A, Therios I, Chatzissavvidis C. Effect of Lead and Copper on Photosynthetic Apparatus in Citrus (Citrus aurantium L.) Plants. The Role of Antioxidants in Oxidative Damage as a Response to Heavy Metal Stress. *Plants (Basel)*. 2021;10(1). DOI: 10.3390/plants10010155 PMID: 33466929
- Yazdanparast Chaharmahali B, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi Arkhazloo P. The Effect of Moderate and High Intensity Interval Trainings on Cardiac Apoptosis in the Old Female Rats. *Rep Heal Care*. 2018;4(1):26-35.
- Sadoughi SD. Investigation the effect of curcumin on the hormones of pituitary-ovarian axis in alloxan-induced diabetic rats. 2017.
- Azadbakht M, Khoori V, Nayeb Pour SM, Pourabook M, Fazelinejad S. The role of adrenoceptors in the electrophysiological effects of hydroalcoholic extract of Citrus bigaradia in experimental model of atrial fibrillation of isolated atrioventricular node of rabbits. *J Maz Univ Med Sci*. 2009;18(68):1-10.
- He W, Li Y, Liu M, Yu H, Chen Q, Chen Y, et al. Citrus aurantium L. and Its Flavonoids Regulate TNBS-Induced Inflammatory Bowel Disease through Anti-Inflammation and Suppressing Isolated Jejunum Contraction. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10). DOI: 10.3390/ijms19103057 PMID: 30301267
- Oka SI, Sabry AD, Cawley KM, Warren JS. Multiple Levels of PGC-1alpha Dysregulation in Heart Failure. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:2. DOI: 10.3389/fcvm.2020.00002 PMID: 32083094
- Xu R, Luo X, Ye X, Li H, Liu H, Du Q, et al. SIRT1/PGC-1alpha/PPAR-gamma Correlate With Hypoxia-Induced Chemoresistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:682762. DOI: 10.3389/fonc.2021.682762 PMID: 34381712
- Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A. PGC-1alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(2):E145-161. DOI: 10.1152/ajpendo.00755.2009 PMID: 20371735
- Naaz S, Mishra S, Pal PK, Chattopadhyay A, Das AR, Bandyopadhyay D. Activation of SIRT1/PGC 1alpha/SIRT3 pathway by melatonin provides protection against mitochondrial dysfunction in isoproterenol induced myocardial injury. *Heliyon*. 2020;6(10):e05159. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05159 PMID: 33088945
- Ballmann C, Tang Y, Bush Z, Rowe GC. Adult expression of PGC-1alpha and -1beta in skeletal muscle is not required for endurance exercise-induced enhancement of exercise capacity.

- Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;**311**(6):E928-E938. **DOI:** [10.1152/ajpendo.00209.2016](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00209.2016) **PMID:** 27780821
25. Azarian F, Farsi S, Hosseini SA, Azarbayjani MA. Effect of endurance training with saffron consumption on PGC1- α gene expression in hippocampus tissue of rats with Alzheimer's disease. *Ann Mil Heal Sci Res.* 2020;**18**(1). **DOI:** [10.5812/amh.99131](https://doi.org/10.5812/amh.99131)
 26. Alavizadeh NS, Rashidlamir A, Hejazi SM. Effect of eight weeks aerobic and combined training on serum levels of sirtuin 1 and PGC-1 α in coronary artery bypass graft patients. *Med Lab J.* 2018;**12**(5):50-56. **DOI:** [10.29252/mlj.12.5.50](https://doi.org/10.29252/mlj.12.5.50)
 27. Suntar I, Khan H, Patel S, Celano R, Rastrelli L. An Overview on Citrus aurantium L.: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;**2018**:7864269. **DOI:** [10.1155/2018/7864269](https://doi.org/10.1155/2018/7864269) **PMID:** 29854097
 28. Shykhosleslami Z, Abdi A, Barari A, Hosseini SA. The effect of aerobic training with Citrus aurantium L. on Sirtuin 1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α gene expression levels in the liver tissue of elderly rats. 2018.
 29. Wu H, Liu Y, Chen X, Zhu D, Ma J, Yan Y, et al. Neohesperidin Exerts Lipid-Regulating Effects in vitro and in vivo via Fibroblast Growth Factor 21 and AMP-Activated Protein Kinase/Sirtuin Type 1/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 α Signaling Axis. *Pharmacology.* 2017;**100**(3-4):115-126. **DOI:** [10.1159/000452492](https://doi.org/10.1159/000452492) **PMID:** 28554169
 30. Rebello CJ, Greenway FL, Lau FH, Lin Y, Stephens JM, Johnson WD, et al. Naringenin Promotes Thermogenic Gene Expression in Human White Adipose Tissue. *Obesity (Silver Spring).* 2019;**27**(1):103-111. **DOI:** [10.1002/oby.22352](https://doi.org/10.1002/oby.22352) **PMID:** 30506905
 31. Alaie M, Gaeini AA, Nouri R, Chobineh S. Interaction Effect of High Interval and Low Intensity Continuous Trainings with Crocin on the Expressions of PGC-1 α and UCP1 in Heart Tissue of Male Diabetic Rats. *Res Med.* 2020;**44**(3):423-429.
 32. Hosseini SA. The effects of continued training and high intensity interval training along with Citrus aurantium on aerobic power, heart weight, adipose tissue weight and body weight of elderly rats. *Jorjani Biomed J.* 2020;**8**(4):17-25.
 33. Ruiz-Moreno C, Del Coso J, Giraldez-Costas V, Gonzalez-Garcia J, Gutierrez-Hellin J. Effects of p-Syneprine during Exercise: A Brief Narrative Review. *Nutrients.* 2021;**13**(1). **DOI:** [10.3390/nu13010233](https://doi.org/10.3390/nu13010233) **PMID:** 33467423