Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2023 / Vol 24 / No 4

OPEN ACCESS

Original Paper

Effects of Endurance Training and Propolis Against Oxidative and Myocardial Stress in Diabetic Ovariectomized Rats

Fatemeh Hasanzadeh Dolatabadi [1], Khosro Jalali Dehkordi (Ph.D)*[2], Farzaneh Taghian (Ph.D)[3], Seyed Ali Hoseini (Ph.D)[4]

1 Ph.D Candidate in Physical Education and Sport Sciences, Department of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran. 2 Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran. 3 Associate Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Isfahan, Iran. 4 Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Islamic Azad University, Marvdasht Branch, Marvdasht, Iran.

Abstract

Background and Objective: Considering the role of diet and the use of natural antioxidants in addition to exercise, the attention of researchers has been drawn to take further advantage of the effects of exercise to improve cellular metabolism. Despite the favorable role of exercise and antioxidants on heart health, the simultaneous effect of exercise and consumption of propolis (prepared by bees) is not yet known. This study aimed to investigate the effects of endurance training and propolis against oxidative and myocardial stress in diabetic ovariectomized rats.

Methods: This experimental study was conducted on 36 female Sprague Dawley rats aged 12-16 weeks and weighing 220-250 grams. Six rats were included in the healthy control group. Diabetes was induced in 30 overiectomized rats by intraperitoneal injection of streptozotocin (40 mg/kg). Then, the diabetic animals were divided into five groups of six including diabetic ovariectomized control, sham, propolis, endurance training, and endurance training + propolis. Rats in the training groups trained for eight weeks, five sessions per week, with 55-75% VO2 max. Moreover, propolis was administered 100 mg/kg/day by peritoneal injection. The level of Pro-oxidant-antioxidant balance (PAB) and expression of HSP72 and NF-κB genes were measured.

Results: HSP72 expression was significantly higher in the propolis, endurance training, and endurance training + propolis groups. The levels of NF-kB and malonaldehyde were significantly decreased in the ovariectomized diabetic rats ($P<0.05$). Expression of HSP72 in the endurance training and endurance training + propolis groups were significantly higher than in the propolis group. Moreover, NF-kB in the endurance training and endurance training + propolis groups were significantly lower than in the propolis group ($P<0.05$). The value of PAB in the propolis and endurance training + propolis groups were significantly lower than in the ovariectomized diabetic rats ($P<0.05$).

Conclusion: Exercise and consumption of propolis seem to synergistically improve the protective HSP72 pathway and reduce oxidative stress in heart tissue following estrogen dysfunction and diabetes. However, the interaction of the two depends on endurance training.

Keywords: Endurance Training, Propolis, Oxidative Stress, HSP 72, Heart, Ovariectomy, Diabetes Mellitus

***Corresponding Author:** Khosro Jalali Dehkordi (Ph.D), E-mail: khosrojalali@gmail.com

Received 28 Feb 2022
Final Revised 5 Jul 2022
Accepted 6 Jul 2022
Published Online 5 Apr 2023

Cite this article as: Hasanzadeh Dolatabadi F, Jalali Dehkordi Kh, Taghian F, Hoseini SA. [Effects of Endurance Training and Propolis Against Oxidative and Myocardial Stress in Diabetic Ovariectomized Rats]. J Gorgan Univ Med Sci. 2023; 24(4): 51-58. [Article in Persian]

© The author(s)
Owned: Golestan University of Medical Sciences **Publisher:** Deputy of Research and Technology

مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان

زمستان ۱۴۰۱ / دوره ۲۴ / شماره ۴ (پی در پی ۸۴)

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

تحقیقی

اثر تمرین استقامتی و برەموم در برابر استرس اکسایشی و سلولی میوکارد و بیان ژن‌های HSP72 و NF-kB در موش‌های صحرایی اورکتومی دیابتی شده با استروپتوزتوسین

فاطمه حسن زاده دولت آبادی [۱]، دکتر خسرو جلالی دهکردی*[۲]، دکتر فرزانه تقیان [۳]، دکتر سیدعلی حسینی [۴]

[۱] دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. [۲] استادیار، گروه فیزیولوژی ورزش، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. [۳] دانشیار،گروه فیزیولوژی ورزش، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. [۴] استاد، گروه فیزیولوژی ورزش، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: *باتوجه به نقش رژیم غذایی مناسب و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در کنار فعالیت ورزشی، توجه محققین برای بهره‌گیری بیشتر از اثرات تمرین برای بهبود متابولیسم سلولی جلب شده است. علی‌رغم نقش مطلوب تمرینات ورزشی و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها بر سلامت قلب، اثر همزمان تمرینات ورزشی و مصرف برەموم (تهیه شده توسط زنبور عسل)، هنوز شناخته نشده است. این مطالعه به منظور تعیین اثر تمرین استقامتی و برەموم در برابر استرس اکسایشی و سلولی میوکارد و بیان ژن‌های HSP72 و NF-kB در موش‌های صحرایی اورکتومی دیابتی شده با استروپتوزتوسین انجام شد.*

روش بررسی: *این مطالعه تجربی روی ۳۶ سر موش صحرایی ماده نژاد اسپراگو-داولی با سن ۱۶-۱۲ هفته و وزن ۲۵۰-۲۲۰ گرم انجام شد. تعداد ۶ سر موش صحرایی در گروه کنترل سالم (HC) قرار گرفتند. ۳۰ سر موش صحرایی اورکتومی شده با تزریق تک دوز صفاقی استروپتوزتوسین (۴۰ mg/kg) دیابتی شدند. سپس حیوانات اورکتومی دیابتی شده به ۵ گروه ۶ تایی شامل کنترل اورکتومی دیابتی، شم، برەموم، تمرین استقامتی و تمرین استقامتی + برەموم تقسیم شدند. گروه‌های تمرین استقامتی و تمرین استقامتی + برەموم به مدت ۸ هفته، ۵ جلسه در هفته با ۷۵-۵۵ درصد سرعت بیشینه تمرین کردند. گروه‌های برەموم و تمرین استقامتی + برەموم ، برەموم را ۱۰۰ mg/kg/day به صورت تزریق صفاقی دریافت کردند. سپس سطح PAB (Pro-oxidant-antioxidant balance) و بیان ژن‌های HSP72 و NF-kB سنجیده شدند.*

یافته‌ها: *در گروه‌های برەموم، تمرین استقامتی و تمرین استقامتی + برەموم مقادیر بیان ژنی HSP72 به‌طور معنی‌داری بالاتر و مقادیر NF-kB و MDA به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل اورکتومی دیابتی تعیین شد (P<۰/۰۵). مقادیر HSP72 در گروه‌های تمرین استقامتی و تمرین استقامتی + برەموم به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه برەموم و مقادیر NF-kB در گروه‌های تمرین استقامتی و تمرین استقامتی + برەموم به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه برەموم تعیین شد (P<۰/۰۵). همچنین مقادیر PAB در گروه‌های تمرین استقامتی و تمرین استقامتی + برەموم به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل اورکتومی دیابتی بود (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد تمرین و مصرف برەموم به‌طور سینرژیستی موجب بهبود مسیر محافظتی HSP72 و کاهش استرس اکسیداتیو در بافت قلب متعاقب شرایط نقص عملکرد استروژن و دیابت می‌گردد. هر چند اثر تعاملی این دو به انجام تمرین استقامتی وابسته است.*

واژه‌های کلیدی: *تمرین استقامتی ، برەموم ، استرس اکسیداتیو ، HSP72 ، قلب ، اورکتومی ، دیابت*

* نویسنده مسؤول: دکتر خسرو جلالی دهکردی ، پست الکترونیکی khosrojalali@gmail.com

نشانی: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، تلفن ۰۳۱-۳۵۰۰۲۳۶۴، نمابر ۳۵۳۵۴۱۳۵

وصول ۱۴۰۰/۱۲/۹ اصلاح نهایی ۱۴۰۱/۴/۱۴ پذیرش ۱۴۰۱/۴/۱۵ انتشار ۱۴۰۲/۱/۱۶

مقدمه

یکی از اصلی‌ترین دلایل مرگ و میر در زنان یائسه بیماری‌های قلبی - عروقی است.[۱و۲] در پاتوژنز ابتلا به بیماری‌های متابولیکی و قلبی - عروقی در این افراد اختلالات هورمونی، اختلال در هموستاز سلول، افزایش چربی احشایی، افزایش مقاومت به انسولین و افزایش عوامل التهابی نقش دارند.[۱] اختلال در متابولیسم گلوکز و چربی‌ها در این شرایط، با اختلال در تری‌گلیسرید، حساسیت به انسولین، عوامل التهابی، افزایش مالون دی آلدئید (MDA)، کاهش مقاومت سلول در برابر استرس اکسیداتیو و آپوپتوز از مسیر کاهش پروتئین شوک حرارتی – ۷۲ (HSP72) در عملکرد قلبی اثرگذارند.[۳و۴] افزایش سن در شرایط یائسگی با ابتلا به دیابت به طور سینرژیستی موجب افزایش MDA، قندخون، افزایش لیپوپروتئین کم چگال

(LDL)، کاهش لیپوپروتئین پرچگال (HDL)، کاهش HSP72، اختلال در آپولیپوپروتئین‌ها، هورمون‌های جنسی و مقادیر هموسیستئین می‌گردد.[۴و۵]

فعالیت‌های ورزشی منظم و طولانی‌مدت با مکانیسم تنظیم ردوکس سلولی منجر به افزایش بیان سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (Cat) و افزایش HSP72 می‌گردند. این امر با کاهش MDA، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) و در نهایت تعدیل مقادیر عامل هسته‌ای رونویسی کاپا – B (NF-κB) و در نهایت محافظت سلولی همراه است.[۶] در این راستا نتایج مطالعه‌ای نشان داد مقادیر Cat و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) سرمی متعاقب تمرین هوازی در موش‌های صحرایی اورکتومی شده افزایش یافته است.[۷] در مطالعه‌ای دیگر تمرین تداومی و تناوبی موجب افزایش بیوژنز میتوکندریایی و افزایش بیان NF-κB در بافت کبد موش‌های صحرایی گردید.[۸] همچنین تمرینات ترکیبی موجب افزایش اکسیژن مصرفی، کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش HSP72 در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به سکته قلبی شده است.[۹] در مطالعه‌ای دیگر تمرینات ورزشی با شدت پایین موجب افزایش GPx در بافت قلب موش‌های صحرایی تیمار شده با دوکسوروبیسین شد؛ ولی اثر معنی‌داری بر SOD، HSP72 و پراکسیداسیون لیپیدی نداشت.[۱۰] به‌نظر می‌رسد اثرگذاری تمرینات ورزشی بر HSP72 و مکانیسم محافظتی آن وابسته به سن، جنسیت، نوع تمرین، شدت تمرین و اختلالات متابولیک پایه وابسته است و هنوز این مکانیسم به خوبی شناخته نشده است.[۶]

باتوجه به نقش رژیم غذایی مناسب و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در کنار فعالیت ورزشی، توجه محققین برای بهره‌گیری بیشتر از اثرات تمرین برای بهبود متابولیسم سلولی جلب شده است.[۱۱] از بین این آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، بره‌موم که توسط زنبور عسل از برگ، گل، ساقه، گرده و جوانه گیاهان تهیه می‌شود؛ در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی - عروقی و بیماری آلزایمر مورد استفاده قرار گرفته است.[۱۲و۱۳] بره‌موم به دلیل دارا بودن فلاونوئیدها و انواع ویتامین‌ها دارای خاصیت ضدباکتریایی، ضدالتهابی، خنثی کننده رادیکال‌های آزاد، ضد آپوپتوز، کاهنده چربی و بهبود متابولیسم چربی‌ها است.[۱۲] به نظر می‌رسد بره‌موم با کاهش LDL، VLDL، تری گلیسرید، کلسترول و افزایش HDL متعاقب بهبود متابولیسم چربی‌ها، به کاهش پرکسیداسیون لیپیدی منجر می‌شود و در ادامه این روند سبب کاهش MDA، افزایش آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی و در نهایت مهار NF-κB به عنوان عامل راه‌انداز مسیرهای التهابی در شرایط بیماری در سلول می‌گردد.[۱۴] در این زمینه مصرف g/kg/day ۳ بره‌موم موجب بهبود متابولیسم گلوکز، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش عوامل التهابی در بافت پانکراس موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت شده است.[۱۵] همچنین مصرف mg/kg ۳۰۰ بره‌موم موجب کاهش MDA، بهبود متابولیسم گلوکز، بهبود نیمرخ چربی در موش‌های صحرایی باردار مبتلا به دیابت گردید.[۱۶] افزایش غلظت SOD، کاتالاز و کاهش MDA در بافت کبد و عضله اسکلتی در موش‌های صحرایی گزارش شده است.[۱۷] این مطالعه به منظور تعیین اثر تمرین استقامتی و بره‌موم در برابر استرس اکسایشی و سلولی میوکارد و بیان ژن‌های HSP72 و NF-kB در موش‌های صحرایی اورکتومی دیابتی شده با استروپتوزتوسین انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۶ سر موش صحرایی ماده نژاد اسپراگو-داولی با محدوده سنی ۱۶-۱۲ هفته و محدوده وزنی ۲۵۰-۲۲۰ گرم تهیه شده از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت در آزمایشگاه تخصصی فیزیولوژی ورزشی این واحد دانشگاهی طی سال ۱۴۰۰ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (IR.IAU.KHUISF.REC.1400.235) قرار گرفت. پروتکل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

حیوانات در شرایط استاندارد شامل چرخه روشنایی – تاریکی ۱۲ ساعته، دمای محیط ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵۵ درصد و دسترسی آزاد به آب و غذا، نگهداری شدند و به مدت یک هفته در این محیط سازگار شدند.

در روز هشتم پس از سازگاری حیوانات، موش‌های صحرایی تحت عمل اورکتومی (عمل برداشت تخمدان) قرار گرفتند. برای برداشت تخمدان، ابتدا موش‌های صحرایی با محلول کتامین mg/ml ۵۰ و زیلازین mg/ml ۲۰، بیهوش شدند. سپس محل جراحی با بتادین اسکراب ضدعفونی گردید و در ادامه شکافی در ناحیه شکم به اندازه ۳ سانتی‌متر روی خط سفید وسط شکم از کلیه به پایین ایجاد شد. بعد از ایجاد برش در لایه‌های عضلانی و پرده صفاق، تخمدان‌ها و رحم مشاهده و با قیچی جراحی، جدا شدند. آنگاه شکاف مربوطه با الگوی بخیه ساده تکی با نخ ویکریل ۳ صفر دوخته شد. همچنین پوست حیوان با نخ جراحی نایلن ۲ صفر دوخته شد. برای جلوگیری از عفونت از محلول OTC در محل جراحی استفاده شد. پس از اورکتومی، حیوانات به مدت ۱۲ هفته با هدف ایجاد یائسگی کامل تحت شرایط کنترل شده نگهداری شدند. در ادامه موش‌های صحرایی در حالت ۱۲ ساعت ناشتا تحت تزریق صفاقی تک دوز mg/kg ۴۰ استروپتوزتوسین (STZ) حل شده در بافر سیترات قرار گرفتند و ۴ روز پس از تزریق STZ گلوکز خون موش‌های صحرایی با استفاده از گلوکومتر اندازه‌گیری شد.

موش‌های صحرایی با گلوکز خون بالای ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان موش‌های دیابتی شناخته شدند.[۱۸]

در ابتدا ۴۰ سر موش صحرایی وارد مطالعه شدند. تعداد ۴ سر موش صحرایی پس از القای دیابت به دلیل واکنش فردی به STZ تلف شدند. تعداد ۳۶ سر موش صحرایی به صورت تصادفی در ۶ گروه ۶ تایی به شرح زیر قرار گرفتند.

گروه کنترل سالم (HC): موش‌های صحرایی سالم بودند که برای ارزیابی اثر اورکتومی و القا دیابت، هیچ مداخله‌ای دریافت نکردند.

گروه COD: گروه کنترل اورکتومی دیابتی شده.

گروه Sh: گروه شم اورکتومی دیابتی شده.

گروه Pr: گروه اورکتومی دیابتی شده دریافت کننده برهموم.

گروه ET: گروه اورکتومی دیابتی شده اجرا کننده تمرین استقامتی.

گروه ET+Pr: گروه اورکتومی دیابتی شده اجرا کننده تمرین استقامتی توام با دریافت برهموم.

پروتکل تمرین استقامتی: برای اندازه‌گیری حداکثر سرعت دویدن، گروه‌های تمرین پس از یک هفته آشناسازی با نوار گردان آزمون وامانده ساز را تمرین کردند. به صورتی که با سرعت ۸ متر بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه دویدند. برای به دست آوردن حداکثر سرعت دویدن موش‌های صحرایی، ابتدا به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵ متر بر دقیقه گرم کردند و در ادامه به ازای هر سه دقیقه یک متر بر دقیقه به سرعت آنها افزوده شد تا به واماندگی برسند. واماندگی به حالتی اطلاق گردید که موش صحرایی دیگر قادر به دویدن بر نوار گردان نباشد و یا در یک دقیقه سه بار متوالی به انتهای نوارگردان برخورد نماید. در ادامه برای انجام تمرین استقامتی موش‌های صحرایی برای هفته اول با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه معادل ۵۵ درصد حداکثر سرعت دویدن بر روی نوار گردان تمرین کردند. سپس هر هفته ۱۰ دقیقه به مدت زمان تمرین افزوده شد تا در هفته چهارم سرعت دویدن به حداکثر سرعت دویدن که در ابتدای دوره تمرینی اندازه‌گیری شده بود؛ رسیدند. در ادامه تا هفته هشتم موش‌های صحرایی تمرینات را با همان شدت تمرین نمودند. این نکته قابل ذکر است که شدت تمرین در هفته هشتم معادل ۵۵ تا ۷۵ درصد حداکثر سرعت دویدن به مدت ۶۰ دقیقه بود. تمرینات استقامتی برای هشت هفته، پنج جلسه در هفته انجام شد و ۵ دقیقه در ابتدای تمرین برای گرم کردن و ۵ دقیقه در انتهای تمرین برای سرد کردن در نظر گرفته شد. شدت تمرین برای گرم کردن و سرد کردن معادل ۵۰ درصد حداکثر سرعت دویدن در نظر گرفته شد.[۱۹]

مصرف برهموم: برای مکمل دهی برهموم روزانه ۳۰۰ میلی‌گرم برهموم تازه تهیه شده از جهاد کشاورزی شهرستان مرودشت نگهداری شده در دمای ۱۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری، بلافاصله با ۳/۶ میلی لیتر سدیم کلراید ۹ درصد قابل تزریق توسط شیکر حل شد و در سریع‌ترین زمان ممکن به هر موش ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول به صورت صفاقی تزریق شد. این نکته قابل ذکر است که گروه‌های مصرف کننده برهموم روزانه ۱۰۰ mg/kg برهموم را به صورت صفاقی دریافت کردند.[۲۰]

تشریح و نمونه برداری: ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و در حالت ۱۲ ساعت ناشتایی، موش‌های صحرایی به وسیله محلول کتامین ۵۰ mg/ml و زیلازین ۲۰ mg/ml بیهوش شدند. برای تشخیص بیهوشی از روش‌های آزمون درد استفاده شد و پس از اطمینان از بیهوشی کامل، حفره سینه‌ای موش‌های صحرایی شکافته شد و پس از کنار زدن سایر بافت‌ها و قطع شریان‌های ورودی و خروجی به قلب، بافت قلب حیوانات به دقت استخراج شد و بلافاصله در تانک ازت غوطه‌ور گردید. در ادامه بافت قلب تا زمان اندازه‌گیری متغیرها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

روش اندازه‌گیری مقادیر بیان ژنی HSP72 و NF-kB : برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژنی HSP72 از روش qReal Time PCR استفاده شد. برای این منظور ابتدا مقدار ۵۰ میلی‌گرم بافت از قلب جدا شد. استخراج RNA از بافت‌ها در همه گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن، آلمان) انجام شد. برای اطمینان از کیفیت RNA، با استفاده از ژل آگارز الکتروفورز و با استفاده از خاصیت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه پیکودراپ شرکت سیگما (ساخت امریکا) استفاده شد. علاوه بر این برای بررسی کیفیت RNA از فرمول $(C\ (\mu g/\mu l) = A260\times \varepsilon\times d/1000)$ استفاده گردید. در ادامه پس از سنتز cDNA با استفاده از پروتکل شرکت سازنده در کیت فرمنتاز (K1621) و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (جدول یک) بر اساس راهنمای ژن‌های PGC1α و AMPK در سایت PUBMED واکنش رونویسی معکوس انجام شد. برای تعیین کارایی و اختصاصی بودن پرایمرها از پیش پرایمرها توسط نرم‌افزار موجود در سایت NCBI استفاده شد. همچنین برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژنی متغیرهای تحقیق با استفاده از ژن کنترل داخلی TBP استفاده گردید. پس از اطمینان از اتمام کار دستگاه qReal Time PCR و پس از رسیدن نمونه‌ها به آستانه بیان (Cycle Treshold) برای کمی‌سازی نسبت ژن مورد نظر به ژن مرجع از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد.

جدول ۱: توالی پرایمر متغیرهای تحقیق

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
TBP	Forward: 5'- GCGGGGTCATGAAATCCAGT-3' Reverse: 5'- AGTGATGTGGGGACAAAACGA -3'	147
HSP72	Forward: 5'- GGCCTTGAGGACTTTGGGTT-3' Reverse: 5'- CTGGGAATGCAAAGCACACG-3'	131
NF-kB	Forward: 5'- AGGCCATTGAAGTGATCCAG -3' Reverse: 5'- GAGCTCATCTATGTGCTGTCTT -3'	128

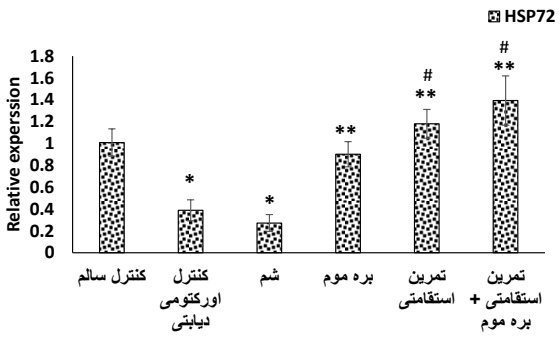
روش اندازه‌گیری MDA و PAB :

روش PAB (Pro-oxidant-antioxidant balance) یک آزمایش برای تعیین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها به‌طور همزمان در یک آزمایش واحد است. واحد اندازه‌گیری این آزمایش واحد قراردادی HK (Hamidi-Koliakos) است که تغییرات OD نمونه به نسبت OD محلول استاندارد (H2O2 با غلظت‌های مختلف) است. واحد HK براساس استاندارد بوده که برای برآورد آن از H_2O_2 استفاده می‌شود و با مقیاس صفر تا ۱۰۰ درصد OD ارزیابی می‌گردد. علاوه بر این محلول استاندارد برای ارزیابی PAB ترکیبی از ۲۵۰ میکرومول پراکسید هیدروژن و ۳ میلی‌مول اسید اوریک (در ۱۰ میکرومول NaOH) طراحی گردید. همچنین برای اندازه‌گیری MDA از کیت کیازیست ایران به روش اسپکتوفتومتری، با استفاده از کمپلکس پروتئین هیدروژن در طول موج ۳۴۰ تا ۵۳۵ نانومتر استفاده شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8.3.3 تجزیه و تحلیل شدند. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو–ویلک استفاده شد. در ادامه با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک راهه و برای تعیین محل تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقادیر بیان ژنی HSP72 در گروه کنترل اورکتومی دیابتی به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل سالم بود (P<۰/۰۰۱)؛ اما تفاوت معنی‌داری در گروه کنترل اورکتومی دیابتی و شم مشاهده نشد و در گروه‌های برەموم (P<۰/۰۰۱)، تمرین استقامتی (P<۰/۰۰۱) و تمرین استقامتی + برەموم (P<۰/۰۰۱) به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل اورکتومی دیابتی بود. همچنین در گروه‌های تمرین استقامتی (P<۰/۰۱۶) و تمرین استقامتی + برەموم (P<۰/۰۰۱) به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه برەموم بود (شکل یک).

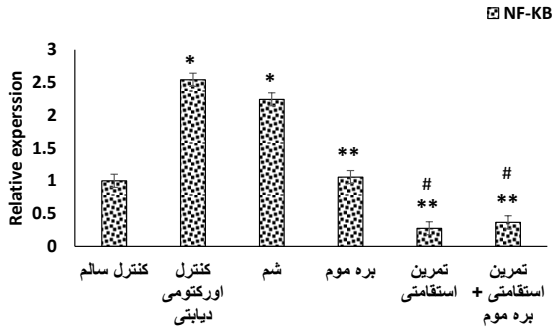


شکل ۱ : مقادیر بیان ژنی HSP72 در بافت قلب موش‌های صحرایی
* کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم
** افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل اورکتومی دیابتی
# افزایش معنی‌دار نسبت به گروه برەموم

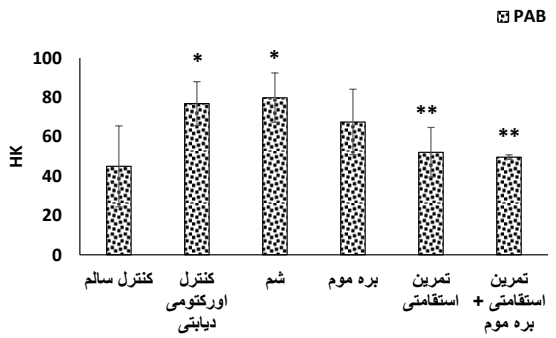
مقادیر بیان ژنی NF-kB در گروه کنترل اورکتومی دیابتی به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل سالم بود (P<۰/۰۰۱). همچنین در گروه کنترل اورکتومی دیابتی و شم تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد؛ اما در گروه‌های برەموم (P<۰/۰۰۱)، تمرین استقامتی (P<۰/۰۰۱) و تمرین استقامتی + برەموم (P<۰/۰۰۱) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل اورکتومی دیابتی بود. همچنین در گروه‌های تمرین استقامتی (P<۰/۰۰۱) و تمرین استقامتی + برەموم (P<۰/۰۰۴) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه برەموم بود (شکل ۲).

مقادیر PAB در گروه کنترل اورکتومی دیابتی به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل سالم بود (P<۰/۰۰۵)؛ اما تفاوت آماری معنی‌داری در گروه‌های کنترل اورکتومی دیابتی در مقایسه با شم و برەموم مشاهده نشد و در گروه‌های تمرین استقامتی (P<۰/۰۰۱) و تمرین استقامتی + برەموم (P<۰/۰۰۱) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل اورکتومی دیابتی بود (شکل ۳).

مقادیر MDA در گروه کنترل اورکتومی دیابتی به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل سالم بود (P<۰/۰۰۱)؛ ولی تفاوت معنی‌داری

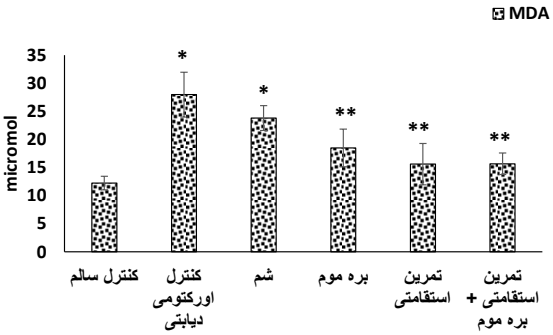


شکل ۲ : مقادیر بیان ژنی NF-kB در بافت قلب موش‌های صحرایی
* افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم
** کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل اورکتومی دیابتی
# کاهش معنی‌دار نسبت به گروه برەموم



شکل ۳ : مقادیر PAB در بافت قلب موش‌های صحرایی
* افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم
** کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل اورکتومی دیابتی

بین گروه کنترل اورکتومی دیابتی و شم مشاهده نشد. مقادیر MDA در گروه‌های بره‌موم (P<۰/۰۰۱)، تمرین استقامتی (P<۰/۰۰۱) و تمرین استقامتی + بره‌موم (P<۰/۰۰۱) به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل اورکتومی دیابتی بود (شکل ۴).



شکل ۴ : مقادیر MDA در بافت قلب موش‌های صحرایی
* افزایش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم
** کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل اورکتومی دیابتی

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، مقادیر NF-kB، PAB و MDA در گروه تمرین به‌طور معنی‌داری کمتر و مقادیر HSP72 به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل اورکتومی دیابتی شده بود. همسو با مطالعه حاضر محققین عنوان نمودند که تمرینات ورزشی کوتاه مدت با نوارگردان سبب افزایش HSP72، کاهش MDA و افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها در بافت میوکارد موش‌های صحرایی در معرض اختلال قلبی القا شده با دوکسوروبیسین می‌گردد.[۲۱] در مطالعه‌ای دیگر محققین نشان دادند که ۱۵ هفته تمرین تداومی و تمرین شنا اثر معنی‌داری بر بهبود HSP72 درون سلولی میوکارد، نیمرخ لیپیدی و فشارخون در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت دارد. همچنین اثر تمرین تداومی تا حدی مطلوب‌تر از اثر تمرین شنا بود.[۲۲] با این‌حال ناهمسو با مطالعه حاضر محققین نتیجه گرفتند که یک دوره تمرین کوتاه مدت استقامتی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اثر معنی‌داری بر افزایش غلظت HSP72 کلیوی ندارد؛ اما تمرین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد موجب افزایش HSP72 گردید.[۲۳] به نظر می‌رسد تغییرات HSP72 و مکانیسم‌های مرتبط با آن متعاقب تمرین به دمای محیط تمرین و طول دوره تمرین وابسته است و این امر از دلایل ناهمسو بودن نتایج آن مطالعه با مطالعه حاضر است. علاوه بر این در مطالعه‌ای دیگر محققین نشان دادند که تزریق N (گاما)-نیترو-آرژنین-متیل استر (N(ω)-nitro-L-arginine-methyl ester) به منظور ایجاد بیماری قلبی به مدت هشت هفته موجب افزایش HSP72 و افزایش استرس اکسیداتیو گردید، اما تمرین با نوارگردان به مدت هشت هفته، موجب افزایش SOD، GPx، کاهش MDA، PC و تعدیل HSP72 در بافت قلب گردید.[۲۴] به‌نظر می‌رسد HSP72 در برابر عوامل سمی واکنش نشان داده و برای خنثی‌سازی آنها افزایش یافته است؛ اما با انجام تمرینات ورزشی، افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها، کاهش استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی مقادیر آن نیز تعدیل شده است. به عقیده محققین تمرینات ورزشی می‌توانند با مکانیسم فسفریله کردن cAMP، AMPK و NRF1 موجب افزایش بیان پروتئین‌های بیولوژیکی گردند و در بیوژنز میتوکندریایی موثر باشند. همچنین فعال‌سازی NRF2 متعاقب تمرینات ورزشی می‌تواند به افزایش رونویسی از پروتئین‌های SOD، کاتالاز و GPx گردد. علاوه بر این به نظر می‌رسد افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام متعاقب تمرینات ورزشی از مسیر بیان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مکانیسم بالقوه تمرینات ورزشی باشد. همچنین اثرات ضد التهابی تمرینات ورزشی با مکانیسم مهار پروتئین تنفسی نوتروفیل‌ها، مهار اینترلوکین – ۶، مهار NF-κB، عامل فعال‌سازی کلنی گرانولوسیت‌ها Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)، کاهش گیرنده اینترلوکین ۱ بتا و همچنین کاهش مولکول‌های چسبان درون عروقی باشد.[۲۵]

نتایج مطالعه حاضر نشان داد مقادیر MDA و NF-kB در گروه بره‌موم به طور معنی‌داری کمتر و مقادیر HSP72 به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل اورکتومی دیابتی شده بود. همسو با مطالعه حاضر محققین نشان دادند مصرف روزانه ۱۲/۵ mg/kg بره‌موم به مدت چهار هفته با کاهش گونه‌های فعال اکسیژن، افزایش SIRT1، کاهش متالوپروتئاز غشایی-۲ (MMP-2) در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به سکته قلبی همراه بوده است.[۲۶] همچنین در مطالعه‌ای نشان داده شد که بره‌موم منجر به کاهش هیدروژن پراکسید، یون کلسیم درون سلولی و کاهش نشانگرهای آپوپتوزی در بافت قلب موش‌های صحرایی در معرض استرس اکسیداتیو می‌گردد.[۲۷] همچنین در این زمینه در مطالعه‌ای مروری اثرات ضدآپوپتوزی و آنتی‌اکسیدانی بره‌موم گزارش شده است.[۲۸] لذا به‌نظر می‌رسد اثرات مطلوب بره‌موم به دوز مصرفی و طول دوره مصرف آن وابسته است. محققین بر این عقیده‌اند که بره‌موم با دارا بودن ایزوفلاون‌ها و فلاونوئیدهای فراوان، به‌طور اختصاصی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی را افزایش می‌دهد و همچنین اولین مسیر حفاظتی خود را از طریق بهبود نیمرخ چربی، افزایش HDL، کاهش اکسیداسیون LDL و کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و در ادامه با بهبود عملکرد لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها اعمال می‌کند و با بهبود عملکرد سیستم ایمنی موجب تعدیل مقادیر NF-kB می‌گردد. همچنین بره‌موم با مسیرهای بهبود ناقلین ATP با ایزوفرم A1 و G1 به افزایش آپولیپوپروتئین‌ها و افزایش HDL منجر می‌شود. بره‌موم می‌تواند با مکانیسم افزایش عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)،

کاهش متالوپروتئازها، تعدیل ماکروفاژها به کاهش مقادیر NF-kB منجر شود.[۲۰و۲۹]

در مطالعه حاضر مقادیر NF-kB، PAB و MDA در گروه تمرین استقامتی+بره‌موم به طور معنی‌داری کمتر و مقادیر HSP72 به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل اورکتومی دیابتی شده بود. همچنین اثر تمرین استقامتی و تمرین استقامتی+بره‌موم بر افزایش HSP72 و کاهش NF-kB مطلوب‌تر از گروه بره‌موم به تنهایی بود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که تمرینات ورزشی با افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها، کاهش استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی، فسفریله کردن cAMP، AMPK و NRF1/2 سبب افزایش رونویسی از پروتئین‌های SOD، کاتالاز و GPx می‌گردد. علاوه بر این تمرینات ورزشی با فعال‌سازی لیپاز حساس به هورمون منجر به افزایش لیپولیز می‌گردد و این امر به کاهش ماکروفاژها در بافت قلب منجر می‌شود. در پاسخ به افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از فعالیت ورزشی، HSP72 نیز افزایش یافته و به مهار NF-Kb منجر می‌شود.[۲۵] از سویی بره‌موم با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی، افزایش HDL، کاهش اکسیداسیون LDL، کاهش ROSها، تعدیل مقادیر NF-kB، بهبود آپولیپوپروتئین‌ها، افزایش VEGF، کاهش متالوپروتئازها و تعدیل ماکروفاژها به کاهش مقادیر NF-kB منجر می‌شود.[۲۰و۲۹] از این رو به‌نظر می‌رسد تمرین استقامتی و مصرف بره‌موم با مکانیسم‌هایی که بعضاً مسیری مشابه دارند؛ به طور همزمان منجر به بهبود مکانیسم محافظتی HSP72 می‌گردند. در زمینه اثر همزمان تمرین و بره‌موم مطالعه‌ای نشان داد که مصرف ۴۵۰ mg در ورزشکاران منجر به افزایش سینرژیستی توده مواد معدنی و افزایش توان هوازی آنها شده است.[۳۰] همچنین همسو با مطالعه حاضر عصاره آبی بره‌موم و تمرینات استقامتی به طور سینرژیستی منجر به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در عضله اسکلتی و کبد موش‌های صحرایی گردید و این اثرات بیشتر در گروه تمرین و تمرین+بره‌موم مشاهده شد.[۱۷] علاوه بر این در مطالعه‌ای دیگر تمرین استقامتی و بره‌موم به‌طور همزمان منجر به بهبود برخی از عوامل التهابی در بافت قلب و بهبود آنژیوژنز در بافت قلب گردید.[۲۹] با توجه به نقش پروتئین‌های دخیل در NF-kB و پیچیدگی مسیر زیردست آن عدم اندازه‌گیری برخی از عوامل التهابی و آنژیوژنزی از محدودیت‌های این مطالعه محسوب می‌شود. با توجه به نقش تمرین و بره‌موم در مکانیسم‌های ضدالتهابی و بیوژنز میتوکندریایی عدم ارزیابی این مسیر از دیگر محدودیت‌های این مطالعه است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این مطالعه، به‌نظر می‌رسد تمرین هوازی با شدت متوسط و مصرف بره‌موم به طور سینرژیستی موجب بهبود مسیر محافظتی HSP72 و کاهش استرس اکسیداتیو در بافت قلب متعاقب شرایط نقص عملکرد استروژن و دیابت می‌گردد. هرچند اثر تعاملی این دو بیشتر تحت تاثیر تمرین استقامتی قرار می‌گیرد. لذا استفاده از بره‌موم به همراه تمرین استقامتی، برای پیشگیری از افزایش استرس اکسیداتیو و محافظت سلولی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم فاطمه حسن‌زاده دولت‌آبادی برای اخذ درجه دکتری در رشته فیزیولوژی ورزشی از دانشکده علوم ورزشی (شماره ۱۷۵۴۸۴۶۲۰۱۵۵۴۹۷۱۳۹۸۱۶۲۲۹۳۲۱۵) دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان بود. بین نویسندگان تضاد منافعی وجود ندارد.

References

1. Sinatora RV, Chagas EFB, Mattera FOP, Mellem LJ, Santos AROD, Pereira LP, et al. Relationship of Inflammatory Markers and Metabolic Syndrome in Postmenopausal Women. Metabolites. 2022 Jan; 12(1): 73. doi: 10.3390/metabo12010073
2. El Khoudary SR, Aggarwal B, Beckie TM, Hodis HN, Johnson AE, Langer RD, et al. Menopause Transition and Cardiovascular Disease Risk: Implications for Timing of Early Prevention: A Scientific Statement From the American Heart Association. Circulation. 2020 Dec; 142(25): e506-e532. doi: 10.1161/CIR.0000000000000912
3. Conti FF, Brito Jde O, Bernardes N, Dias Dda S, Sanches IC, Malfitano C, et al. Cardiovascular autonomic dysfunction and oxidative stress induced by fructose overload in an experimental model of hypertension and menopause. BMC Cardiovasc Disord. 2014 Dec; 14: 185. doi: 10.1186/1471-2261-14-185
4. Anklam CFV, Lissarassa YPS, Dos Santos AB, Costa-Beber LC, Sulzbacher LM, Goettems-Fiorin PB, et al. Oxidative and Cellular Stress Markers in Postmenopause Women with Diabetes: The Impact of Years of Menopause. J Diabetes Res. 2021 Sep; 2021: 3314871. doi: 10.1155/2021/3314871
5. Bourgonje AR, Abdulle AE, Al-Rawas AM, Al-Maqbali M, Al-Saleh M, Enriquez MB, et al. Systemic Oxidative Stress Is Increased in Postmenopausal Women and Independently Associates with Homocysteine Levels. Int J Mol Sci. 2020 Jan; 21(1): 314. doi: 10.3390/ijms21010314
6. Szyller J, Bil-Lula I. Heat Shock Proteins in Oxidative Stress and Ischemia/Reperfusion Injury and Benefits from Physical Exercises: A Review to the Current Knowledge. Oxid Med Cell Longev. 2021 Jan; 2021: 6678457. doi: 10.1155/2021/6678457
7. Salehi OR, Ghabezi S, Khajehlandi A, Mohammadi A. Interactive effect of aerobic training and estrogen consumption on serum levels of catalase and glutathione peroxidase enzymes in. Jorjani Biomed J. 2020; 8(2): 38-47. doi: 10.52547/jorjanibiomedj.8.2.38
8. Davari F, Alimanesh Z, Alimanesh 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. 2022 Oct; 128(5): 1215-20. doi: 10.1080/13813455.2020.1762663
9. Stefani GP, Capalonga L, da Silva LR, Heck TG, Frizzo MN, Sulzbacher LM, et al. Effects of aerobic and resistance exercise training associated with carnosine precursor supplementation on maximal strength and V̇O2max in rats with heart failure. Life Sci. 2021 Oct; 282: 119816. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119816
10. Chicco AJ, Hydock DS, Schneider CM, Hayward R. Low-intensity exercise training during doxorubicin treatment protects

against cardiotoxicity. J Appl Physiol (1985). 2006 Feb; 100(2): 519-27. doi: 10.1152/japplphysiol.00148.2005

11. 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 Jan-Feb; 48(1): 42-57. doi: 10.1080/0361073X.2021.1918473

12. Oršolić N, Landeka Jurčević I, Đikić D, Rogić D, Odeh D, Balta V, et al. Effect of Propolis on Diet-Induced Hyperlipidemia and Atherogenic Indices in Mice. Antioxidants (Basel). 2019 Jun; 8(6): 156. doi: 10.3390/antiox8060156

13. Hosseini SA, Salehi OR, Farzanegi P, Farkhaie F, Darvishpour AR, Roozegar S. Interactive Effects of Endurance Training and Royal Jelly Consumption on Motor Balance and Pain Threshold in Animal Model of the Alzheimer Disease. Arch Neurosci. 2020; 7(2): e91857. doi: 10.5812/ans.91857

14. Kitamura H. Effects of Propolis Extract and Propolis-Derived Compounds on Obesity and Diabetes: Knowledge from Cellular and Animal Models. Molecules. 2019 Dec; 24(23): 4394. doi: 10.3390/molecules24234394

15. Al-Hariri MT, Eldin TAG, Al-Harb MM. Protective effect and potential mechanisms of propolis on streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Taibah University Medical Sciences. 2016 Feb; 11(1): 7-12. doi: 10.1016/j.jtumed.2015.11.002

16. Usman UZ, Bakar ABA, Mohamed M. Propolis improves pregnancy outcomes and placental oxidative stress status in streptozotocin-induced diabetic rats. BMC Complement Altern Med. 2018 Dec; 18(1): 324. doi: 10.1186/s12906-018-2391-6

17. Kwon TD, Lee MW, Kim KH. The effect of exercise training and water extract from propolis intake on the antioxidant enzymes activity of skeletal muscle and liver in rat. J Exerc Nutrition Biochem. 2014 Mar; 18(1): 9-17. doi: 10.5717/jenb.2014.18.1.9

18. Barthem CS, Rossetti CL, Carvalho DP, da-Silva WS. Metformin ameliorates body mass gain and early metabolic changes in ovariectomized rats. Endocr Connect. 2019 Dec; 8(12): 1568-78. doi: 10.1530/EC-19-0470

19. Souza CS, de Sousa Oliveira BS, Viana GN, Correia TML, de Bragança AC, Canale D, et al. Preventive effect of exercise training on diabetic kidney disease in ovariectomized rats with type 1 diabetes. Exp Biol Med (Maywood). 2019 Jun; 244(9): 758-69. doi: 10.1177/1535370219843830

20. Pahlavani N, Sedaghat A, Bagheri Moghaddam A, Mazloumi Kiapey SS, Gholizadeh Navashenaq J, Jarahi L, et al. Effects of propolis and melatonin on oxidative stress, inflammation, and clinical status in patients with primary sepsis: Study protocol and review on previous studies. Clin Nutr ESPEN. 2019 Oct; 33: 125-31. doi: 10.1016/j.clnesp.2019.06.007

21. Kavazis AN, Smuder AJ, Min K, Tümer N, Powers SK. Short-term exercise training protects against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial damage independent of HSP72. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010 Nov; 299(5): H1515-24. doi: 10.1152/ajpheart.00585.2010

22. Costa-Pereira LV, Melo DS, Santos CS, Mendes BF, Esteves EA, Lacerda ACR, et al. Distinct beneficial effects of continuous vs accumulated exercise training on cardiovascular risk factors in Wistar rats. Scand J Med Sci Sports. 2017 Nov; 27(11): 1384-94. doi: 10.1111/sms.12737

23. Akin S, Naito H, Ogura Y, Ichinoseki-Sekine N, Kurosaka M, Kakigi R, et al. Short-term treadmill exercise in a cold environment does not induce adrenal Hsp72 and Hsp25 expression. J Physiol Sci. 2017 May; 67(3): 407-13. doi: 10.1007/s12576-016-0473-0

24. Gholitabar S, Roshan VD. Effect of treadmill exercise and Ferula gummosa on myocardial HSP72, vascular function, and antioxidant defenses in spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Hypertens. 2013; 35(5): 347-54. doi: 10.3109/10641963.2012.732643

25. Zeng Z, Centner C, Gollhofer A, König D. Effects of Dietary Strategies on Exercise-Induced Oxidative Stress: A Narrative Review of Human Studies. Antioxidants (Basel). 2021 Mar; 10(4): 542. doi: 10.3390/antiox10040542

26. Wang Q, Sui X, Sui DJ, Yang P. Flavonoid Extract from Propolis Inhibits Cardiac Fibrosis Triggered by Myocardial Infarction through Upregulation of SIRT1. Evid Based Complement Alternat Med. 2018 Jun; 2018: 4957573. doi: 10.1155/2018/4957573

27. Sun L, Wang K, Xu X, Ge M, Chen Y, Hu F. Potential Protective Effects of Bioactive Constituents from Chinese Propolis against Acute Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide in Cardiac H9c2 Cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2017; 2017: 7074147. doi: 10.1155/2017/7074147

28. Silva H, Francisco R, Saraiva A, Francisco S, Carrascosa C, Raposo A. The Cardiovascular Therapeutic Potential of Propolis-A Comprehensive Review. Biology (Basel). 2021 Jan; 10(1): 27. doi: 10.3390/biology10010027

29. Silva DB, Miranda AP, Silva DB, D'Angelo LR, Rosa BB, Soares EA, et al. Propolis and swimming in the prevention of atherogenesis and left ventricular hypertrophy in hypercholesterolemic mice. Braz J Biol. 2015 May; 75(2): 414-22. doi: 10.1590/1519-6984.15313

30. Soleimani D, Miryan M, Hadi V, Gholizadeh Navashenaq J, Moludi J, Sayedi SM, et al. Effect of propolis supplementation on athletic performance, body composition, inflammation, and oxidative stress following intense exercise: A triple-blind randomized clinical trial. Food Sci Nutr. 2021 May; 9(7): 3631-40. doi: 10.1002/fsn3.2319