

Protective Effect of Aerobic Training and Royal Jelly on Oxidative Stress in Cardiomyocytes in Obese Rats

Iraj Hoseinzade¹,
Ahmad Abdi²,
Asieh Abbassi Daloui²

¹ PhD in Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Science, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

² Associate Professor, Department of Physical Education and Sport Science, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

(Received October 30, 2021 ; Accepted February 1, 2022)

Abstract

Background and purpose: Obesity leads to a variety of metabolic changes that may contribute to abnormalities in the structure and function of the heart. The aim of this study was to investigate the effect of royal jelly and aerobic training on oxidative stress in cardiomyocytes in high-fat diet-induced obese rats.

Materials and methods: In this experimental study, 45 male 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). The supplement groups received 100 mg of royal jelly (kg/body weight) diluted in distilled water orally during the intervention period. The aerobic exercise program included treadmill running with an intensity of 50-60% oxygen consumption (VO₂max), 5 days/week for 8 weeks.

Results: Significant increases were seen in Nrf2 and HO-1 gene expression levels in HFDT (P=0.049 and P=0.029, respectively), HFDRJ (P=0.000 and P=0.041, respectively), and HFDTRJ (P=0.000 and P=0.000, respectively). This increase was also observed in HFDTRJ group compared with HFDT group (P=0.039 and P=0.003, respectively) and HFDRJ group (P=0.038 and P=0.002, respectively). Also, significant decrease was observed in MDA values (P=0.001). Findings showed significant increase in SOD, GPX, and CAT in HFDT, HFDRJ and HFDTRJ groups compared with HFD group in HFDTRJ group compared with HFDT and HFDRJ groups (P=0.001).

Conclusion: Combining RJ with aerobic training may possibly inhibit HFD-induced cardiomyocytes damage by up-regulating the Nrf2/HO-1 pathway and improving oxidative state.

Keywords: Royal Jelly, aerobic training, oxidative stress and obesity

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (206): 30-42 (Persian).

* Corresponding Author: Ahmad Abdi - Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran (E-mail: a.abdi58@gmail.com)

اثر محافظتی ژل رویال و تمرین هوازی بر فشار اکسایشی کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرایی چاق

ایرج حسین‌زاده¹احمد عبدی²آسیه عباسی دلویی²

چکیده

سابقه و هدف: چاقی منجر به تغییرات متابولیکی مختلفی می‌شود و ممکن است باعث ناهنجاری در ساختار و عملکرد قلب شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی ژل رویال (RJ) و تمرین هوازی بر استرس اکسیداتیو کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرایی چاق ناشی از رژیم غذایی پرچرب بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، 45 موش صحرایی نر به طور تصادفی به پنج گروه (n=9): رژیم غذایی نرمال (ND)، رژیم غذایی پرچرب (HFD)، رژیم غذایی پرچرب+تمرین (HFDT)، رژیم غذایی پرچرب+ژل رویال (HFDJR) و رژیم غذایی پرچرب+تمرین+ژل رویال (HFDTRJ) تقسیم شدند. گروه‌های مکمل، طی دوره مداخله روزانه 100 میلی‌گرم RJ (به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) رقیق شده در آب مقطر را به صورت خوراکی دریافت کردند. برنامه تمرین هوازی شامل دویدن روی تردمیل با شدت 60-50 درصد اکسیژن مصرفی (VO2max)، پنج روز در هفته به مدت هشت هفته بود.

یافته‌ها: بیان ژن HO-1 و Nrf2 در گروه‌های HFDT (به ترتیب P=0/049 و P=0/029)، HFDRJ (به ترتیب P=0/000 و P=0/041) و HFDTRJ (به ترتیب P=0/000 و P=0/000) افزایش معنی‌داری داشت. این افزایش در گروه‌های HFDTRJ نسبت به HFDT (به ترتیب P=0/003 و P=0/039) و HFDRJ (به ترتیب P=0/002 و P=0/038) نیز مشاهده شد. همچنین کاهش معنی‌داری در مقادیر مالون‌دی‌آلدئید (MDA) (P=0/001)، افزایش معنی‌دار میزان سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز GPX و کاتالاز (CAT) در گروه‌های HFDT، HFDRJ و HFDTRJ نسبت به گروه HFD و گروه HFDTRJ نسبت به گروه‌های HFDT، HFDRJ مشاهده شد (P=0/001).

استنتاج: RJ همراه با تمرین هوازی ممکن است از طریق تنظیم افزایشی مسیر Nrf2/HO-1 و بهبود وضعیت اکسیداتی، بتواند آسیب کاردیومیوسیت‌های ناشی از HFD را مهار کند.

واژه‌های کلیدی: ژل رویال، تمرین هوازی، فشار اکسایشی و چاقی

مقدمه

چاقی و اضافه وزن، اختلالات مزمن با منشأ چند عاملی هستند که با وضعیت اکسیداتیو بالا و فعال شدن ماکروفاژها در بافت‌های محیطی مشخص می‌شوند (1). تاکنون مکانیسم‌های مولکولی زمینه‌ساز چاقی و

E-mail: a.abdi58@gmail.com

مؤلف مسئول: احمد عبدی - آمل: دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، گروه فیزیولوژی ورزش

1. دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

2. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

تاریخ دریافت: 1400/8/8 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/8/19 تاریخ تصویب: 1400/11/12

اختلالات متابولیک مرتبط با چاقی به‌طور کامل روشن نشده است و رویکردهای درمانی موثر برای کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو در حال حاضر مورد توجه عمومی است (2). چاقی در طولانی مدت باعث افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive oxygen species) شده و تولید بیش از حد ROS باعث آسیب بافت قلب می‌شود (3). تعدیل رونویسی ژن‌هایی که آنتی‌اکسیدان‌ها را کد می‌کنند، تا حدی توسط عناصر پاسخ آنتی‌اکسیدانی (ARE: Antioxidant Response Element) کنترل می‌شوند (4). فاکتور رونویسی Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) تنظیم‌کننده اصلی اثرات دفاعی آنتی‌اکسیدان بوده که بیش از 200 ژن محافظ سلول را در برابر فشار اکسایشی تنظیم می‌کند. Nrf2 یک فاکتور رونویسی متعلق به خانواده زیپ لوسینی بازی (bZIP: Basic-Leucine zipper protein) می‌باشد (5). Nrf2 با اتصال به Keap1 (Kelch like ECH-associated protein 1) در سیستوزول مهار می‌شود. استرس اکسیداتیو انتقال Nrf2 را به هسته باعث شده، جایی که در آن آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی و هم-اکسیژناز 1 (HO-1: Heme oxygenase-1) تنظیم افزایشی دارد (6). Nrf2 یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی محافظت سلولی در دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و در تنظیم سیگنال‌های بیان ژنی مربوط به دفاع آنتی‌اکسیدانی به واسطه ARE نقش دارد. در شرایط فشار اکسایشی از قبیل چاقی، Nrf2 با اتصال به پروموتور ARE در هسته باعث تنظیم طیف وسیعی از ژن‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز (SOD: Superoxide dismutase)، کاتالاز (CAT: Catalase)، گلوکاتایون سولفیدریل ترانسفراز (Glutathione S-transferase: GST) و گلوکاتایون پراکسیداز (Glutathione peroxidase: GPX) می‌شود (7). به نظر اختلال Nrf2 در چاقی باعث تجمع رادیکال‌های پراکسید و صدمات بافتی می‌شود. از این رو بهبود مسیر Nrf2/HO-1 روش درمانی مناسب برای کنترل و درمان چاقی و آسیب‌های قلبی ناشی از این عارضه می‌باشد.

در سال‌های اخیر، توجه به محصولات طبیعی به عنوان درمان‌های ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی در سراسر جهان افزایش یافته است. علاوه بر این، محصولات طبیعی به راحتی به دست می‌آیند و نسبتاً بی‌خطر هستند. ژل رویال (RJ) مخلوطی از محصولات طبیعی است که از غدد زیر حلق و فک پایین زنبورها ترشح شده و برای تکثیر ملکه و رشد لارو در کلنی‌های زنبور عسل ضروری است. RJ در حال حاضر به‌طور گسترده‌ای به عنوان مکمل غذایی و محصولات آرایشی استفاده می‌شود (8) و به عنوان یک غذای کاربردی مورد علاقه برای بهبود سلامت انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد. RJ حاوی ترکیبی از آب، قندها، پروتئین‌ها و لیپیدها است و تقریباً 90 درصد لیپیدهای RJ اسیدهای چرب آزاد هستند که حاوی 8 تا 12 اتم کربن بوده و معمولاً به شکل هیدروکسیل یا دی‌کربوکسیلیک می‌باشند (9). 10-هیدروکسی-2-دکنوئیک اسید (10-hydroxy-2-decenoic acid)، شناخته شده‌ترین جزء فعال زیستی RJ، نقش مهمی در فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف از جمله التهاب و استرس اکسیداتیو دارد (10). RJ طیف وسیعی از اثرات دارویی را در شرایط آزمایشگاهی و در برخی از مطالعات انسانی نشان داد. از جمله این اثرات افزایش رشد سلولی و ترمیم زخم، فعالیت ضد باکتریایی و ضدقارچی، اثرات هیپوکلسترولمی، فعالیت ضدتوموری، گشادای عروقی و ضد فشارخون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضد التهابی می‌باشد (10). علاوه بر ژل رویال، بیان شده که فعالیت ورزشی نیز دارای اثرات مختلفی از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. مطالعات نشان داده که فعالیت ورزشی با تنظیم افزایشی Nrf2، HO-1 و SOD باعث کاهش فشار اکسایشی می‌شود (11).

Wafi و همکاران (2019) بیان کردند که تمرین ورزشی باعث تنظیم بیان Nrf2 و سطح آنتی‌اکسیدان موش‌ها می‌شود (12). همچنین نشان داده شد که تمرین هوازی باعث افزایش سیگنالینگ Nrf2 و دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت قلب (13) و تنظیم افزایشی مسیر Nrf2/HO-1 و PPAR γ

موش‌ها با شرایط محیطی جدید (پس از یک هفته)، موش‌ها به دو گروه رژیم غذایی نرمال (ND n=8) و رژیم غذایی پرچرب (HFD, n=36) تقسیم شدند. موش‌های گروه ND به مدت هشت هفته با غذای استاندارد (23 درصد پروتئین، 65 درصد کربوهیدرات و 12 درصد چربی) تغذیه شدند. در همین مدت موش‌های گروه HFD از رژیم غذایی پرچرب استفاده کردند. غذای پرچرب شامل 17 درصد پروتئین، 43 درصد کربوهیدرات و 40 درصد چربی بود (16). غذای استاندارد و غذای پرچرب با هماهنگی موسسه پاستور تهیه شد. بعد از هشت هفته موش‌ها در گروه HFD به 4 گروه: پرچرب (HFD)، پرچرب+تمرین (HFDT)، پرچرب+ژل رویال (HFDRJ) و پرچرب+تمرین+ژل رویال (HFDTRJ) تقسیم شدند.

مصرف ژل رویال

پودر ژل رویال از شرکت Bulk Supplements Co, Ltd (Henderson, USA) خریداری شد. گروه مکمل، روزانه 100 میلی گرم ژل رویال (به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) رقیق شده در آب مقطر را به صورت خوراکی دریافت کردند (17).

پروتکل تمرین

بعد از القای چاقی و قبل از شروع تمرین اصلی و به منظور آشنایی با چگونگی فعالیت توسط تردمیل، موش‌ها در یک هفته طی پنج جلسه، به مدت پنج دقیقه با سرعت 8-10 متر بر دقیقه با شیب صفر فعالیت داشتند. برنامه فعالیت ورزشی هوازی شامل دویدن روی تردمیل با شیب صفر درصد به مدت هشت هفته (پنج روز در هفته) بود. در هفته اول موش‌ها یک برنامه تمرینی هوازی فزاینده را روی تردمیل با شدت 15 متر در دقیقه به مدت 30 دقیقه انجام دادند. بعد از آن شدت فعالیت از 15 متر در دقیقه به 25 متر در دقیقه در هفته هفتم رسید و زمان فعالیت نیز به 60 دقیقه افزایش یافت (جدول شماره 1) (18). به منظور تحریک موش‌ها برای دویدن، از محرک

(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) بافت کبدی موش‌ها می‌شود (14). با این وجود Gomes و همکاران (2016) بیان کردند که تمرین مقاومتی در موش‌های صحرایی جوان تاثیری در بیان Nrf2 نداشت، در حالی که در موش‌های پیر Nrf2 کاهش یافت (15). به نظر می‌رسد Nrf2 نقش اساسی در پاسخ‌های التهابی و اکسایشی ناشی از چاقی داشته، از این رو به عنوان هدف درمانی احتمالی در برابر بسیاری از بیماری‌های مختلف از جمله چاقی باشد. با توجه به تناقض در یافته‌ها و همچنین محدود بودن اثر همزمان تمرین و ژل رویال بر فشار اکسایشی کاردیومیوسیت‌ها، از آنجایی که تمرین هوازی (11) و ژل رویال (10) دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی هستند، فرض محقق این است که ترکیب تمرین و مکمل تاثیر بیش‌تری بر فشار اکسایشی داشته باشد. از آنجاکه رویکردهای درمانی موثر برای استرس اکسیداتیو در حال حاضر مورد توجه عمومی است و با توجه به اثرات مفید بالقوه مصرف RJ و تمرین ورزشی، هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی ژل رویال و تمرین هوازی بر فشار اکسایشی کاردیومیوسیت‌های موش‌های چاق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع تجربی بود و تمامی آزمایش‌های مربوط به حیوانات با توجه به سیاست‌های مربوط به حمایت از حیوانات (براساس خط مشی‌های قرارداد هلسینگی) انجام شد و قوانین راهنمای انستیتوی ملی سلامت در نگهداری حیوانات آزمایشگاهی نیز رعایت شده است. تعداد 45 سر موش صحرایی نر 8 هفته‌ای با نژاد ویستار و میانگین وزن $187/51 \pm 9/37$ گرم از انستیتو پاستور تهیه شد و به آزمایشگاه حیوانی منتقل شدند. حیوانات مورد آزمایش در گروه‌های 4 تایی در قفس‌های پلی کربنات نگهداری شدند. دمای محیط $22 \pm 1/4$ درجه سانتی گراد و چرخه روشنایی به تاریکی 12:12 ساعت و رطوبت $55/6 \pm 4$ درصد بود. تمامی حیوانات به آب و غذای ویژه موش دسترسی آزاد داشتند. بعد از سازگاری

جدول شماره 2: الگوی پرایمر PPAR γ و Nrf2

Sequence (5' $\rightarrow$ 3')	GenBank Accession number	ژن‌ها
TTGTAGATGACCATGAGTCGC	NM_031789.2	Forward Nrf2
TGTCCTGCTGTATGCTGCTT		Reverse Nrf2
GTAATGTCAGTGTGGCCCC	NM_012580.2	Forward HO-1
ATGTGCCAGGATCTCTCTTC		Reverse HO-1
AGGAGTACGATGAGTCCGGC	NM_031144	Forward β -Actin
CGCAGCTCAGTAACAGTCCG		Reverse β -Actin

انجام Real time-PCR

20 میلی گرم از بافت با استفاده از اسکالپر خرد و وارد میکروتیوپ شد، سپس با استفاده از محلول تیزول، RNA کل سلول‌ها استخراج و با استفاده از کیت RNeasy (کیژن، آلمان) خالص سازی شد. به منظور اطمینان از غلظت مناسب RNA استخراج شده، جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ (ND-1000 NANODROP spectrophotometer 385) خوانده شد. cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Thermo Scientific, USA) سنتز شد و جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. cDNA سنتز شده با استفاده از SYBR Green master mix (Thermo Scientific, USA) و آغازگرهای ذکر شده در جدول شماره 2 تکثیر شد. Real-time PCR با استفاده از دستگاه Roche LightCycler 480 Real Time PCR Detection System برای اندازه گیری mRNA، 1 میکروگرم از کل RNA بافتی با آنزیم RQ1 RNase-free DNase-I (Promega) با آنزیم (RT) retro-transcribed تیمار شد. واکنش Real-time PCR با استفاده از دستگاه SYBR Green qPCR Master Mix انجام شد. پروتکل چرخه حرارتی مورد استفاده Real time-PCR شامل: 95 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه و به دنبال آن 35 سیکل 30 ثانیه‌ای در حرارت 95 درجه سانتی گراد، 30 ثانیه در 60 درجه سانتی گراد و 5 ثانیه در 72 درجه سانتی گراد بود. سپس در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه نگهداری شد. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش اندازه گیری شاخص‌های اکسیداتیو

غلظت بافتی GPX، CAT، SOD و مالون‌دی‌آلدئید (MDA: Malondialdehyde) به روش الایزا با استفاده

صوتی (ضربه به دیواره نوارگردان) استفاده شد. بدین صورت که در جلسات اول، از محرک الکتریکی با ولتاژ کم، همراه با محرک صوتی استفاده شده و پس از شرطی نمودن موش‌ها به همراه بودن دو محرک، در سایر جلسات به منظور رعایت نکات اخلاقی کار با حیوان آزمایشگاهی، فقط از محرک صوتی استفاده شد.

جدول شماره 1: پروتکل تمرین

هفته	هفته	هفته	هفته	هفته	هفته	هفته	هفته
اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
15	16	18	20	21	23	25	25
مدت (دقیقه)	30	35	40	45	50	55	60

روش نمونه‌گیری از بافت قلب

پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (48 ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و 12 تا 14 ساعت ناشتایی) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین (60mg/kg) و زایلازین (5mg/kg) بیهوش شدند. بافت مورد نظر بلافاصله پس از جداسازی و شست و شو با سالین فوراً در تیوب‌های حاوی RNA later جهت جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شده و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای -80 درجه سانتی گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد. برای جلوگیری از تاثیر آهن‌گش شبانه‌روزی، نمونه‌گیری از ساعت 8 آغاز و 11:30 به اتمام رسید.

روش اندازه‌گیری بیان ژن‌ها

اثر ژل رویال همراه با تمرین هوازی بر بیان ژن‌های Nrf2 و HO-1 کاردیومیوسیت‌های موش‌های چاق با استفاده از روش کمی RT-PCR با β -actin به عنوان ژن کنترل اندازه‌گیری شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل شد. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت.

طراحی، آماده‌سازی پرایمر: جدول شماره 2 الگوی پرایمر را نمایش می‌دهد.

از کیت‌های مخصوص موش‌های صحرایی (شرکت ZellBio GmbH، آلمان) اندازه‌گیری شد. دامنه تغییرات و حساسیت اندازه‌گیری به ترتیب برای GPX، 500-20 U/mL و 5 U/mL؛ برای CAT، 100-1 U/mL و 0/5 U/mL؛ برای SOD، 100-5 U/mL و 1 U/mL و برای MDA، 100-20 U/mL و 5 U/mL بود.

تجزیه و تحلیل یافته‌ها

پس از تأیید توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون لون، برای تجزیه و تحلیل آماری از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه 21 انجام شد و سطح معنی‌داری آزمون‌ها $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین وزن گروه‌ها قبل و در دوره القای چاقی و همچنین بعد از القای چاقی در جداول شماره 3 و 4 ارائه شده است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان Nrf2 کاردیومیوسیت‌ها بین گروه‌های مختلف وجود دارد ($F=11/930$ ، $P=0/0001$) (نمودار شماره 1). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد بین گروه‌های ND با HFD ($P=0/0001$)، HFDTRJ ($P=0/039$) و HFDJR ($P=0/39$) و همچنین بین گروه HFD با

HFDTRJ ($P=0/049$)، HFDTRJ ($P=0/049$) و HFDTRJ ($P=0/0001$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. علاوه بر این بین گروه HFDTRJ با گروه‌های HFDTRJ ($P=0/039$) و HFDTRJ ($P=0/038$) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان HO-1 کاردیومیوسیت‌ها بین گروه‌های مختلف وجود دارد ($P=0/0001$)، $F=20/215$ (نمودار شماره 2). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد بین گروه‌های ND با HFD ($P=0/0001$)، HFDTRJ ($P=0/0001$) و HFDTRJ ($P=0/0001$) و همچنین بین گروه HFD با HFDTRJ ($P=0/029$)، HFDTRJ ($P=0/041$) و HFDTRJ ($P=0/0001$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. علاوه بر این بین گروه HFDTRJ با گروه‌های HFDTRJ ($P=0/003$) و HFDTRJ ($P=0/002$) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.

نتایج نشان داد بین میانگین تغییرات SOD در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($F=18/270$) و $P=0/0001$. نتایج آزمون تعقیبی نشان داد کاهش معنی‌داری در میزان SOD در گروه‌های HFD ($P=0/0001$)، HFDTRJ ($P=0/001$) و HFDTRJ ($P=0/001$) نسبت به گروه ND مشاهده شد. همچنین افزایش معنی‌داری در مقادیر SOD در گروه‌های HFDTRJ ($P=0/013$)، HFDTRJ ($P=0/017$) و HFDTRJ ($P=0/0001$) نسبت به گروه HFD؛ و گروه HFDTRJ نسبت به گروه‌های HFDTRJ ($P=0/023$)، HFDTRJ ($P=0/018$) مشاهده شد (نمودار شماره 3).

جدول شماره 3: میانگین وزن گروه‌ها قبل و در دوره القای چاقی

دوره	قبل از القای چاقی			القای چاقی		
	موش 8 هفته‌ای	بعد از سازگاری	گروه بندی	هفته اول	هفته دوم	هفته چهارم
سن (هفته)	187/51 ± 9/37	200/51 ± 16/26	ND (n=9)	211/33 ± 19/34	216/33 ± 17/66	245/22 ± 16/51
گروه‌ها	ND	HFD	HFDTRJ	HFDTRJ	HFDTRJ	HFDTRJ

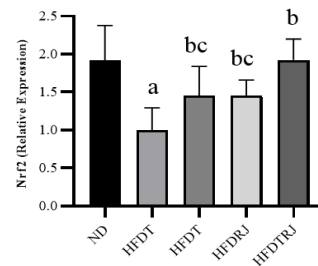
جدول شماره 4: میانگین وزن گروه‌ها بعد از القای چاقی

سن (هفته)	اعمال متغیر مستقل				
	شروع هفته اول	هفته دوم	هفته چهارم	هفته ششم	هفته هشتم
ND (n=9)	270/11 ± 27/55	281/78 ± 24/13	291/55 ± 32/94	297/88 ± 36/06	310/88 ± 38/95
HFD (n=9)	343/66 ± 50/90	384/33 ± 23/54	410/44 ± 47/65	435/11 ± 81/86	461/11 ± 37/94
HFDTRJ (n=9)	352/88 ± 42/72	374/22 ± 23/38	389/77 ± 43/33	411/55 ± 37/56	414/00 ± 49/05
HFDJR (n=9)	348/44 ± 37/98	377/11 ± 23/12	398/88 ± 51/68	415/88 ± 51/68	423/77 ± 49/11
HFDTRJ (n=9)	358/33 ± 36/97	368/44 ± 21/48	378/66 ± 45/43	387/22 ± 50/31	390/55 ± 40/12

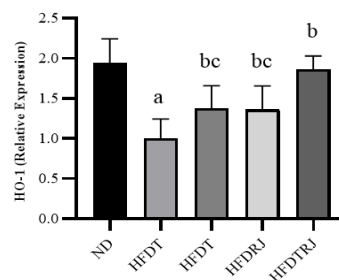
نتایج نشان داد بین میانگین تغییرات GPX در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P=0/0001$ و $F=19/483$). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد کاهش معنی‌داری در میزان SOD در گروه‌های HFD ($P=0/0001$)، HFDT ($P=0/003$) و HFDRJ ($P=0/001$) نسبت به گروه ND مشاهده شد. همچنین افزایش معنی‌داری در مقادیر SOD در گروه‌های HFDT ($P=0/0001$)، HFDRJ ($P=0/013$) و HFDTJR ($P=0/004$) نسبت به گروه HFD و گروه HFDTJR نسبت به گروه‌های HFDT ($P=0/026$)، HFDRJ ($P=0/008$) مشاهده شد (نمودار شماره 4).

نتایج نشان داد بین میانگین تغییرات CAT در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P=0/0001$ و $F=18/331$). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد کاهش معنی‌داری در میزان CAT در گروه‌های HFD ($P=0/0001$)، HFDT ($P=0/004$) و HFDRJ ($P=0/0001$) نسبت به گروه ND مشاهده شد. همچنین افزایش معنی‌داری در مقادیر CAT در گروه‌های HFDT ($P=0/005$)، HFDRJ ($P=0/041$) و HFDTJR ($P=0/0001$) نسبت به گروه HFD؛ و گروه HFDTJR نسبت به گروه‌های HFDT ($P=0/049$)، HFDRJ ($P=0/006$) مشاهده شد (نمودار شماره 5).

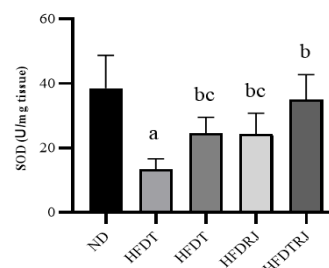
نتایج نشان داد بین میانگین تغییرات MDA در گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P=0/0001$ و $F=15/629$). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد افزایش معنی‌داری در میزان MDA در گروه‌های HFD ($P=0/0001$)، HFDT ($P=0/007$) و HFDRJ ($P=0/005$) نسبت به گروه ND مشاهده شد. همچنین کاهش معنی‌داری در مقادیر MDA در گروه‌های HFDT ($P=0/013$)، HFDRJ ($P=0/017$) و HFDTJR ($P=0/0001$) نسبت به گروه HFD و گروه HFDTJR نسبت به گروه‌های HFDT ($P=0/046$)، HFDRJ ($P=0/036$) مشاهده شد (نمودار شماره 6).



نمودار شماره 1: تغییرات بیان Nrf2 کاردیومیوسیت در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (در سطح $P<0/05$). تفاوت a، تفاوت با ND؛ b، تفاوت با گروه HFD؛ تفاوت با گروه HFDTJR. رژیم غذایی نرمال، HFD؛ رژیم غذایی پرچرب، HFDT؛ رژیم غذایی پرچرب+تمرین، HFDRJ؛ رژیم غذایی پرچرب+ژل رویال، HFDTJR؛ رژیم غذایی پرچرب+تمرین+ژل رویال.



نمودار شماره 2: تغییرات بیان HO-1 کاردیومیوسیت در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (در سطح $P<0/05$). تفاوت a، تفاوت با ND؛ b، تفاوت با گروه HFD؛ تفاوت با گروه HFDTJR. رژیم غذایی نرمال، HFD؛ رژیم غذایی پرچرب، HFDT؛ رژیم غذایی پرچرب+تمرین، HFDRJ؛ رژیم غذایی پرچرب+ژل رویال، HFDTJR؛ رژیم غذایی پرچرب+تمرین+ژل رویال.

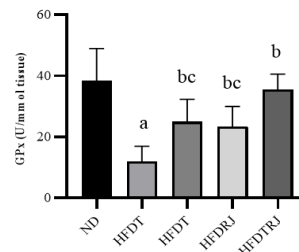


نمودار شماره 3: تغییرات SOD کاردیومیوسیت در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (در سطح $P<0/05$). تفاوت a، تفاوت با ND؛ b، تفاوت با گروه HFD؛ تفاوت با گروه HFDTJR. رژیم غذایی نرمال، HFD؛ رژیم غذایی پرچرب، HFDT؛ رژیم غذایی پرچرب+تمرین، HFDRJ؛ رژیم غذایی پرچرب+ژل رویال، HFDTJR؛ رژیم غذایی پرچرب+تمرین+ژل رویال.

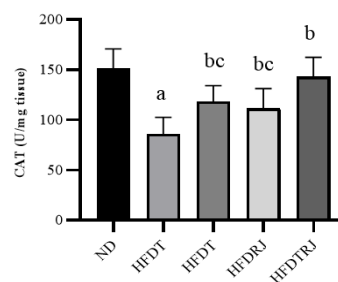
بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که القای چاقی باعث کاهش معنی‌دار بیان Nrf2 و HO-1 بافت قلب موش‌ها شده است. همچنین سطوح MDA افزایش معنی‌داری داشت. این تغییرات باعث افزایش فشار اکسایشی و التهاب شده و نقش مهمی را در برهم خوردن ردوکس سلولی ایفا می‌کند (19). در این شرایط، تولید ROS افزایش یافته و می‌تواند باعث آسیب DNA شده و واسطه‌های التهابی مانند سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها را تولید کند و در نهایت آسیب را در بافت‌ها افزایش دهد. همراستا با پژوهش حاضر Tanaka و همکاران (2008) نیز نشان دادند که HFD باعث کاهش بیان Nrf2 و ژن‌های هدف آن در بافت کبد موش‌ها می‌شود (20). احتمال دارد کاهش بیان ژن Nrf2 باعث افزایش تولید ROS و تشدید چاقی شود. نشان داده شده که حذف Nrf2 در موش‌ها باعث افزایش ROS، رسوب اسیدهای چرب در کبد و افزایش ژن‌های مربوط به سنتز چربی‌ها و کلسترول شود (20). با این وجود، Du و همکاران (2020) نشان دادند که HFD علی‌رغم کاهش معنی‌دار HO-1 تاثیر معنی‌داری بر Nrf2 ندارد (21). همچنین مطالعه‌ای دیگر بیان کرد که HFD، بیان Nrf2 و ژن‌های هدف آن مانند Gstm2 (Glutathione S-transferase Mu 2) و Gstm6 (Glutathione S-transferase Mu 6) را افزایش می‌دهد (22). شاید تفاوت در مدت زمان تغذیه و همچنین ترکیبات مواد غذایی برای القای HFD باعث تناقض در یافته‌ها شده است. به طوری که در پژوهش Kim و همکاران (2008) (22) از یک برنامه دوازده هفته‌ای و در پژوهش تاناکا و همکاران (2008) (20) از برنامه چهار هفته‌ای استفاده شده است.

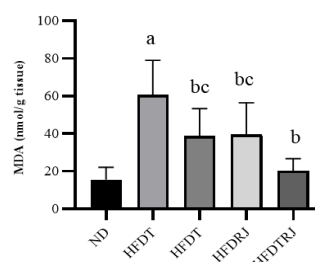
باتوجه به شواهد زیادی که نشان می‌دهد Nrf2 نقش کلیدی در تنظیم وضعیت اکسیدانی دارد، استفاده از فعال‌کننده‌های مختلفی از قبیل فعالیت ورزشی و ترکیبات طبیعی که بتواند میزان Nrf2 را در مدل‌های جوندگان چاق ناشی از HFD افزایش دهد، برای کاربرد بالینی



نمودار شماره 4: تغییرات GPx کاردیومیوسیت در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (در سطح $P < 0/05$). تفاوت با ND، b تفاوت با گروه HFD، تفاوت با گروه HFDTRJ. ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFDT: رژیم غذایی پرچرب+تمرین، HFDRJ: رژیم غذایی پرچرب+ژل رویال، HFDTRJ: رژیم غذایی پرچرب+تمرین+ژل رویال.



نمودار شماره 5: تغییرات CAT کاردیومیوسیت در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (در سطح $P < 0/05$). تفاوت با ND، b تفاوت با گروه HFD، تفاوت با گروه HFDTRJ. ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFDT: رژیم غذایی پرچرب+تمرین، HFDRJ: رژیم غذایی پرچرب+ژل رویال، HFDTRJ: رژیم غذایی پرچرب+تمرین+ژل رویال.



نمودار شماره 6: تغییرات MDA کاردیومیوسیت در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (در سطح $P < 0/05$). تفاوت با ND، b تفاوت با گروه HFD، تفاوت با گروه HFDTRJ. ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFDT: رژیم غذایی پرچرب+تمرین، HFDRJ: رژیم غذایی پرچرب+ژل رویال، HFDTRJ: رژیم غذایی پرچرب+تمرین+ژل رویال.

احتمالی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که RJ باعث بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش معنی‌دار بیان Nrf2 و HO-1 بافت قلب موش‌های HFD شده است. به نظر ترکیبات طبیعی عناصر امیدوارکننده در فعال‌سازی Nrf2 در چاقی هستند. در همین راستا، در پژوهشی که توسط Petelin و همکاران (2019) انجام شد، نشان داده شد که RJ با تأثیر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و التهاب در بزرگسالان دارای اضافه وزن باعث افزایش سطح سلامتی می‌شود (23). همچنین Jenkhetkan و همکاران (2017) با استفاده از نفوسیت‌های انسانی در شرایط آزمایشگاهی، نشان دادند که درمان با RJ باعث افزایش طول عمر و افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (24). همچنین در پژوهشی دیگر، ژل رویال توانست با افزایش Nrf2، از اثرات ژنوتوکسیک (Genotoxic) ناشی دوکسوروبیسین (Doxorubicin) محافظت کند. محققین اعلام کردند که یکی از علل اثر محافظتی RJ مربوط به خاصیت ضد اکسایشی RJ می‌باشد (25). RJ با افزایش Nrf2 از طریق مکانیزم‌های مختلفی از جمله افزایش سنتز GSH، تنظیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تجزیه رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید توسط GPx و SOD باعث محافظت سلول در برابر ROS می‌شود (26). در پژوهش حاضر RJ باعث کاهش MDA و افزایش فعالیت GPx، SOD و CAT در بافت قلب موش‌های صحرایی چاق ناشی از HFD شد؛ که این نتایج توسط محققین دیگر نیز تایید شد (27). فعالیت آنتی‌اکسیدانی RJ به محتوای اسیدهای آمینه آزاد آن نسبت داده شده است (27). بیان شده که RJ فعالیت SOD و GPx را افزایش داده و غلظت MDA را در موش‌های صحرایی دیابتی ماده کاهش داد (28). به نظر می‌رسد RJ با افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا استرس اکسیداتیو را بهبود بخشیده و سطح آنتی‌اکسیدان تام (TAC: Total Antioxidant Capacity) را افزایش می‌دهد (29).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مصرف RJ باعث

افزایش معنی‌داری در HO-1 بافت قلب شد. به نظر می‌رسد، 4-هیدروپراکسی-2-دکنوئیک اسید اتیل استر (4-hydroperoxy-2-decenoic acid ethyl ester) که یک اسید چرب مشتق از RJ است، به‌طور معنی‌داری باعث افزایش بیان HO-1 می‌شود (30). RJ با تأثیر بر آدیپونکتین (31)، pAMPK (phosphorylated AMPK) و PPAR- α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha) (32) می‌تواند التهاب و فشار اکسایشی را کاهش داده و استفاده از چربی‌ها را بهبود بخشد. در پژوهش حاضر افزایش Nrf2 ناشی از مصرف RJ با افزایش HO-1 همراه بود. در شرایط فیزیولوژیکی، Nrf2 توسط Keap1 مهار می‌شود. زمانی که Nrf2 افزایش یافته و یا فعال شود از Keap1 جدا شده و به هسته منتقل می‌شود تا بیان HO-1 را القا کند (6). از دیگر نتایج پژوهش حاضر افزایش معنی‌دار بیان Nrf2 و HO-1 بافت قلب به دنبال هشت هفته فعالیت ورزشی هوازی در موش‌های HFD بود. فعالیت ورزشی هوازی نقش مهمی در بهبود وضعیت اکسیدانی بافت قلب دارند. همراستا با پژوهش حاضر Alexandre و همکاران (2020) نشان دادند که تمرین هوازی با شدت پایین با افزایش سیگنالینگ Nrf2، دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت قلب را افزایش داده و باعث بهبود ردوکس سلولی قلب می‌شود (13). همچنین صحرایی و همکاران (2020) نشان دادند که فعالیت ورزشی باعث تنظیم افزایشی مسیر Nrf2/HO-1 و PPAR γ بافت کبدی در موش‌های دیابتی می‌شود (14). افزایش بیان پروتئین‌های Nrf2 و ژن‌های هدف Nrf2 قلب پس از فعالیت ورزشی در موش‌های پیر (33)، سالم جوان (34) و همچنین در مدلی از کاردیومیوپاتی ناشی از ایزوپروترونول (Isoproterenol) (34) نشان داده شد. با این وجود، پژوهشی بیان کرد که حجم بالای تمرین هوازی علیرغم عدم تغییر در سیگنالینگ Nrf2، وضعیت اکسیداسیون قلب را بهبود بخشیده، که نشان می‌دهد مکانیزم‌های دیگری نیز در کاهش تولید ROS و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی نقش دارند (13). به نظر می‌رسد

فعالیت ورزشی هوازی با کنترل فشار اکسایشی و بهبود وضعیت التهابی (35) از طریق افزایش بیان HO-1 Nrf2 آسیب ناشی از چاقی را کاهش می‌دهد. تمرین منظم هوازی با افزایش فعالیت مسیر Nrf2/Keap-1/HO-1 در کبد، کلیه و قلب نقش مهمی در جلوگیری از آسیب اکسایشی سلولی دارد (35).

در پژوهش حاضر سطح Nrf2 و HO-1 بافت قلب در گروه HFDTR نسبت به دیگر گروه‌ها افزایش بیش‌تری داشت. مطالعاتی که به بررسی اثر همزمان RJ و تمرین هوازی بر این متغیرهای پرداخته باشند، مشاهده نشد. با این وجود، سلیمانی و همکاران (1397) روی موش‌های صحرایی نر ویستار نشان دادند که دوازده هفته تمرین هوازی همراه با مکمل‌یاری ژل رویال بر SOD و TCA تأثیر معنی‌داری داشته و باعث کاهش استرس اکسایشی می‌شود (36). همچنین عظیم‌پور و همکاران (2021) بیان کردند که هشت هفته تمرین دویدن داوطلبانه روی چرخه دوار به همراه مصرف ژل رویال باعث بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در موش‌های مبتلا به آلزایمر می‌شود (37). علاوه بر این، Pala و همکاران (2016) نشان دادند که تمرین و مکمل Q10 سطوح Nrf2 و HO-1 در بافت قلب، کبد و عضلات اسکلتی افزایش داده و در گروه ترکیب تمرین همراه با مکمل Q10 این افزایش بیش‌تر بود (34). همچنین اثر همزمان برترین کلراید و تمرین ورزشی بر بیان Nrf2/HO-1 و PPAR γ بیش‌تر از اثر هر کدام به تنهایی بود (14). به نظر می‌رسد RJ و تمرین هوازی با اثرات هم‌افزایی که داشتند باعث بهبود بیان Nrf2/HO-1 در بافت قلب شده و وضعیت اکسایشی را در این بافت بهبود بخشید.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر مدت زمان مطالعه (هشت هفته) بود که نمی‌تواند درک دقیقی از اثرات

تمرین هوازی و RJ را در مدت طولانی نشان دهد. همچنین از آنجایی که دوزهای مختلف RJ می‌تواند تأثیر متفاوتی بر عملکرد سلولی داشته باشد توصیه می‌شود دوزهای دیگر نیز مورد بررسی قرار گیرد. مسیر Nrf2 از نظر فیزیولوژیکی برای دفاع در برابر استرس اکسیداتیو مهم است. مطالعه حاضر نشان داد که Nrf2 در قلب ممکن است به عنوان یک مکانیسم جبرانی در پاسخ به استرس اکسیداتیو در موش‌های تغذیه شده با HFD عمل کند. RJ و تمرین هوازی باعث فعال شدن Nrf2 شده و متعاقباً به هسته منتقل شد و منجر به تنظیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پایین دست مانند HO-1 شد. به‌طور کلی، بر اساس این یافته‌ها، RJ و تمرین هوازی دارای اثرات محافظتی در برابر آسیب قلب ناشی از چاقی دارد که ممکن است به دلیل تأثیر آن در کاهش اختلالات متابولیک و افزایش عملکرد آنتی‌اکسیدان درون‌زا باشد. با این حال مطالعات بیش‌تری برای روشن شدن اثر RJ و تمرین هوازی در تنظیم سیگنالینگ Nrf2/HO-1 مورد نیاز است.

سپاسگزاری

این مطالعه با تایید کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت با کد IR.IAU.M.REC.1400.020 و در قالب رساله دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی انجام شد. بدین‌وسیله، نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحد دانشگاهی اعلام می‌دارند.

تعارض منافع

در این پژوهش هیچ گونه تضاد منافی برای نویسندگان وجود ندارد.

References

1. D'Archivio M, Annuzzi G, Vari R, Filesi C, Giacco R, Scazzocchio B, et al. Predominant role of obesity/insulin resistance in oxidative

stress development. Eur J Clin Invest 2012; 42(1): 70-78.

2. Roberto CA, Swinburn B, Hawkes C, Huang

- TT, Costa SA, Ashe M, et al. Patchy progress on obesity prevention: emerging examples, entrenched barriers, and new thinking. *Lancet* 2015; 385(9985): 2400-2409.
3. Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutierrez J, Brandan E, et al. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PloS one* 2013;8(4):e60931.
 4. Tan Y, Ichikawa T, Li J, Si Q, Yang H, Chen X, et al. Diabetic downregulation of Nrf2 activity via ERK contributes to oxidative stress-induced insulin resistance in cardiac cells in vitro and in vivo. *Diabetes* 2011; 60(2): 625-633.
 5. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT, et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic Biol Med* 2015; 88(00): 108-146.
 6. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012; 24(5): 981-990.
 7. Luo Q, Li Y, Huang C, Cheng D, Ma W, Xia Y, et al. Soy isoflavones improve the spermatogenic defects in diet-induced obesity rats through Nrf2/HO-1 pathway. *Molecules* 2019; 24(16): 2966.
 8. Šimúth J. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie* 2001; 32(1): 69-80.
 9. Melliou E, Chinou I. Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *J Agric Food Chem* 2005; 53(23): 8987-8992.
 10. Honda Y, Araki Y, Hata T, Ichihara K, Ito M, Tanaka M, et al. 10-Hydroxy-2-decenoic acid, the major lipid component of royal jelly, extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through dietary restriction and target of rapamycin signaling. *J Aging Res* 2015; 2015: 425261.
 11. Ryu J-S, Kang H-Y, Lee JK. Effect of Treadmill Exercise and Trans-Cinnamaldehyde against d-Galactose-and Aluminum Chloride-Induced Cognitive Dysfunction in Mice. *Brain Sci* 2020; 10(11): 793.
 12. Wafi AM, Yu L, Gao L, Zucker IH. Exercise training upregulates Nrf2 protein in the rostral ventrolateral medulla of mice with heart failure. *J Appl Physiol* 2019; 127(5): 1349-1359.
 13. Alexandre-Santos B, Alves R, Matsuura C, Sepúlveda-Fragoso V, Velasco LL, Machado MV, et al. Modulation of cardiac renin-angiotensin system, redox status and inflammatory profile by different volumes of aerobic exercise training in obese rats. *Free Radic Biol Med* 2020; 156: 125-136.
 14. Sahraei M, Abdi A, Jalal H. Protective Effect of Berberine Chloride and Aerobic Training on Liver Nrf2/HO-1 Pathway and PPAR γ in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *J Ardabil Uni Med Sci* 2020; 20(3): 296-306.
 15. Gomes FC, Chuffa LGA, Scarano WR, Pinheiro PFF, Fávaro WJ, Domeniconi RF. Nandrolone decanoate and resistance exercise training favor the occurrence of lesions and activate the inflammatory response in the ventral prostate. *Andrology* 2016; 4(3): 473-480.
 16. Mostafavian M, Abdi A, Mehrabani J, Barari A. Effect of Eight Weeks of Aerobic Progressive Training with Capsaicin on changes in PGC-1 α and UPC-1 Expression in Visceral Adipose Tissue of Obese Rats With Diet. *Complement Med J* 2020; 10(2): 106-117.

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 (Lond)* 2020; 17: 42.
18. 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: 100-108.
19. Tu W, Wang H, Li S, Liu Q, Sha H. The anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases. *Aging Dis* 2019; 10(3): 637-651.
20. Tanaka Y, Aleksunes LM, Yeager RL, Gyamfi MA, Esterly N, Guo GL, et al. NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325(2): 655-664.
21. Du J, Zhu M, Li H, Liang G, Li Y, Feng S. Metformin attenuates cardiac remodeling in mice through the Nrf2/Keap1 signaling pathway. *Exp Ther Med* 2020; 20(2):838-845.
22. Kim S, Sohn I, Ahn J-I, Lee K-H, Lee YS, Lee YS. Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model. *Gene* 2004; 340(1): 99-109.
23. Petelin A, Kenig S, Kopinč R, Deželak M, Černelič Bizjak M, Jenko Pražnikar Z. Effects of royal jelly administration on lipid profile, satiety, inflammation, and antioxidant capacity in asymptomatic overweight adults. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019; 2019: 4969720.
24. Jenkhetkan W, Thitiorul S, Jansom C, Ratanavalachai T. Molecular and cytogenetic effects of Thai royal jelly: modulation through c-MYC, h-TERT, NRF2, HO-1, BCL2, BAX and cyclins in human lymphocytes in vitro. *Mutagenesis* 2017; 32(5): 525-531.
25. Jenkhetkan W, Thitiorul S, Jansom C, Ratanavalachai T. Genoprotective effects of thai royal jelly against doxorubicin in human lymphocytes in vitro. *Nat Prod Commun* 2018; 13(1): 79-84.
26. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013; 53: 401-426.
27. Tamura S, Kono T, Harada C, Yamaguchi K, Moriyama T. Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee *Apis merifera*. *Food Chem* 2009; 114(4): 1491-1497.
28. Pourmoradian S, Mahdavi R, Mobasser M, Faramarzi E, Mobasser M. Effects of royal jelly supplementation on glycemic control and oxidative stress factors in type 2 diabetic female: a randomized clinical trial. *Chin J Integr Med* 2014; 20(5): 347-352.
29. Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement Altern Med* 2009; 9: 4.
30. Inoue Y, Hara H, Mitsugi Y, Yamaguchi E, Kamiya T, Itoh A, et al. 4-Hydroperoxy-2-decenoic acid ethyl ester protects against 6-hydroxydopamine-induced cell death via activation of Nrf2-ARE and eIF2 α -ATF4 pathways. *Neurochem Int* 2018;112: 288-296.
31. Nakaya M, Onda H, Sasaki K, Yuki Yoshi A, Tachibana H, Yamada K. Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(1): 253-255.
32. Yoshida M, Hayashi K, Watadani R, Okano Y, Tanimura K, Kotoh J, et al. Royal jelly

- improves hyperglycemia in obese/diabetic KK-Ay mice. *J Vet Med Sci* 2017; 79(2): 299-307.
33. Gounder SS, Kannan S, Devadoss D, Miller CJ, Whitehead KS, Odelberg SJ, et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. *PLoS One* 2012; 7(9): e45697.
 34. Pala R, Orhan C, Tuzcu M, Sahin N, Ali S, Cinar V, et al. Coenzyme Q10 Supplementation Modulates NFκB and Nrf2 pathways in exercise training. *J Sports Med* 2016; 15(1): 196-203.
 35. Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients. *Exp Diabetes Res* 2011; 2012: 941868.
 36. Soleimani P, Shemshaki A, Hedayati M, Astinchap A. Effect of two-week exercise and supplementation of royal jelly on total antioxidant capacity of plasma and superoxide dismutase in obese male rats. *J Applied Health Stu Sport Physiol* 2018; 5(1): 77-82.
 37. Azimpour M, Fathi M, Dezfoulan O. The Effect of Eight Weeks of Voluntary Wheel Running Exercise with Royal Jelly Consumption on Behavioral Disorders and Antioxidant Capacity in Rats with Trimethytin Model of Alzheimer's Disease. *J Advanced Biomed Sci* 2021; 11(1): 3702-3714.