

Research Paper

Effect of Continuous Aerobic Exercise with Citrus aurantium L. on some Liver Cellular Senescence Markers of Elderly rats

Zinab Shykhholeslami, Ahmad Abdi*, Alireza Barari

Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

Received: 5/6/2021

Revised: 11/7/2021

Accepted: 6/8/2021

Use your device to scan and read the article online



DOI:

[10.30495/varzesh.2021.1944804.1027](https://doi.org/10.30495/varzesh.2021.1944804.1027)

Keywords:

Training, Citrus aurantium, Liver, p16, p21

Abstract

Introduction: Exercise and Citrus aurantium (CA) have a beneficial effect in delaying the aging process of the liver in elderly. The aim of this study was to investigate the effect of aerobic training (T) with consumption of CA on p16 and p21 gene expression in liver tissue of elderly rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 25 elderly female rats were placed in five groups of 5 rats, including 1) control, 2) sham, 3) CA, 4) T and 5) T+CA. Over the course of eight weeks, groups 4 and 5 ran on the treadmill three sessions per week at 65 to 75 percent of the maximum running speed, and groups 3 and 5 received 300 mg/kg/day of CA extract peritoneal. Forty-eight hours after the last training session and CA consumption, gene expression levels in the liver tissue were measured by real-time PCR method. In order to analyze the findings, the Shapiro-Wilk, one-way ANOVA with Tukey's *post-hoc* tests were used ($P \leq 0.05$).

Findings: P16 expression was significantly reduced in CA ($p=0.048$), T ($p=0.040$) and T+CA ($p=0.007$) groups compared to control group. Also, a significant decrease in p21 expression was observed in CA ($p=0.048$), T ($p=0.032$) and T+CA ($p=0.007$) groups compared to the control group.

Conclusion: Eight weeks of T and CA alone improved the expression of genes involved in Liver cellular senescence markers of elderly rats. However, the combination of T and CA did not have more favorable effects than either alone.

Citation: Shykhholeslami Z , Abdi A. , Barari A. . Effect of Continuous Aerobic Exercise with Citrus aurantium L. on some Liver Cellular Senescence Markers of Elderly rats. Researches in Sport Sciences and Medical Plants. 2021; 1 (4):21-29

Corresponding author: Ahmad Abdi

Address: Department of Exercise Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, I.R. Iran.

Tell: 01143217126

Email: a.abdi58@gmail.com

مقاله پژوهشی

اثر تمرین هوازی تداومی همراه با مصرف بهار نارنج بر برخی نشانگرهای پیری سلولی بافت کبد رت‌های سالمند

زینب شیخ‌الاسلامی، احمد عبدی*، علیرضا براری

گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

چکیده

مقدمه و هدف: فعالیت‌های بدنی و بهار نارنج (CA) تاثیر مفیدی در تاخیر انداختن فرایند پیری کبد در سالمندی دارند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تمرین هوازی (T) همراه با مصرف CA بر بیان ژن p16 و p21 در بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۲۵ سر موش صحرایی ماده سالمند در پنج گروه ۵ سری شامل ۱) کنترل، ۲) شم، ۳) CA، ۴) T و ۵) T+CA قرار گرفتند. در مدت هشت هفته گروه‌های ۴ و ۵ به میزان سه جلسه در هفته با شدت ۶۵ تا ۷۵ درصد حداکثر سرعت دویدن روی نوارگردان دویدند همچنین گروه‌های ۳ و ۵ روزانه ۳۰۰ mg/kg عصاره CA به صورت صفاقی دریافت نمودند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و مصرف CA سطوح بیان ژنی در بافت کبد به روش real-time PCR اندازه گیری شد. جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون‌های آماری شاپیروویلک، آنوای یک‌راهه به همراه آزمون تعقیبی توکی استفاده شد ($P \leq 0.05$).

یافته‌ها: بیان p16 در گروه‌های CA ($p=0.048$)، T ($p=0.040$) و T+CA ($p=0.007$) نسبت به گروه Control کاهش معنی‌داری داشت. همچنین کاهش معنی‌داری در بیان p21 در گروه‌های CA ($p=0.048$)، T ($p=0.032$) و T+CA ($p=0.007$) نسبت به گروه Control مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: هشت هفته T و CA به تنهایی منجر به بهبود بیان ژن‌ها مربوط به پیری سلولی در بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند شد، با این وجود اثر همزمان T با مصرف CA دارای اثرات مطلوب‌تری نسبت به هر کدام به تنهایی نبود.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۵

تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۵/۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۲۵

از دستگاه خود برای اسکن و خواندن مقاله به صورت آنلاین استفاده کنید



DOI:

[10.30495/varzesh.2021.1944804.1027](https://doi.org/10.30495/varzesh.2021.1944804.1027)

واژه‌های کلیدی:

تمرین، بهار نارنج، کبد، p16، p21

* نویسنده مسوول: احمد عبدی

نشانی: گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

تلفن: ۰۱۱۴۳۲۱۷۱۲۶

پست الکترونیکی: a.abdi58@gmail.com

مقدمه

بر این مطالعه زاهو و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که بهار نارنج از طریق تاثیر بر تنظیم کاسپاز ۳ و p53 باعث مهار سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۵). با توجه به کاهش فرآیندهای فیزیولوژیکی در اثر پیری، و تاثیر پیری بر عملکرد کبد، به نظر می‌رسد فعالیت‌های بدنی و بهار نارنج تاثیر مفیدی بر بهبود عملکرد متابولیسمی و به تاخیر انداختن فرایند پیری کبد در افراد مسن داشته باشد. با این وجود مکانیسم‌های سلولی فعالیت ورزشی و بهار نارنج به خوبی شناسایی نشده است. همچنین فرض محقق این است که اثر همزمان تمرین هوازی و بهار نارنج تاثیر بهتری بر این عوامل نسبت به اثر هر کدام به تنهایی دارد. بنابراین این پژوهش در نظر دارد تا به بررسی اثر تمرین هوازی تداومی همراه با مصرف بهار نارنج بر نشانگرهای پیری سلولی بافت کبد موش‌های سالمند بپردازد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۲۵ سر موش صحرایی ماده سالمند با میانگین سنی ۱۴ ماهه و میانگین ورزشی ۲۷۰-۳۲۰ خریداری و با آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت انتقال داده شد. تمامی موش‌های صحرایی به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط جدید، در شرایط استاندارد همراه با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. در ادامه موش‌های صحرایی در پنج گروه ۵ سری شامل ۱) کنترل، ۲) شم، ۳) CA، ۴) T و ۵) T+CA قرار گرفتند. در مدت هشت هفته گروه‌های ۴ و ۵ به میزان سه جلسه در هفته با شدت ۶۵ تا ۷۵ درصد حداکثر سرعت دویدن روی نوارگردان دویدند (۱۶). گروه‌های ۳ و ۵ روزانه ۳۰۰ mg/kg عصاره CA به صورت صفاقی دریافت نموده (۱۷) همچنین گروه ۲ در طول دوره تحقیق روزانه ۳۰۰ mg/kg حلال عصاره CA (نرمال سالین) را به صورت صفاقی دریافت نمودند. در پایان دوره تحقیق، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و تزریق CA، موش‌های صحرایی به وسیله کتامین و زایلوزین بیهوش شدند و بافت کبد پس از استخراج در تانک ازت قرار داده شد و جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژنی p16 و p21 به آزمایشگاه انتقال داده شد. سطوح بیان ژنی p16 و p21 به روش real-time PCR اندازه‌گیری شد. توالی پرایمرهای p16 و p21 به همراه ژن کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است.

پیری با کاهش در آمادگی بدن در نتیجه کاهش پیشرونده در عملکرد و توانایی حفظ هومئوستاز همراه است (۱). توانایی بافت‌ها در ترمیم و حفظ ساختار و عملکرد طبیعی خود با افزایش سن کاهش می‌یابد. بنابراین، افراد مسن بیشتر مستعد ابتلا به بیماری‌های مزمن کبدی هستند (۲). التهاب مزمن کبد منجر به فیروز یا حتی سیروز کبدی شده و سالانه بیش از یک میلیون مرگ و میر در جهان ناشی از این بیماری می‌باشد (۳). نشان داده شده که افزایش سن با بی‌ثباتی ژنومی در سلول‌های کبدی همراه می‌باشد. با افزایش سن تعداد سلول‌های کبدی کاهش یافته که همراه با کاهش میزان سنتز و ترمیم DNA می‌باشد (۴). سلول‌های پیر کبدی باعث افزایش تجمع قطرات چربی، کاهش ظرفیت اکسیداسیون میتوکندری، افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (۵). استرس اکسیداتیو منجر به تجمع محصولات پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب DNA شده (۶) و باعث اختلال در تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مربوط به پیری مانند p16، p21 و p53 می‌شود (۷). فعالیت بدنی برای بهبود عملکرد اندام‌های بدن در افراد سالخورده بسیار مهم است (۸). فعالیت‌های ورزشی با تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی در بدن، التهاب سیستمیک را در افراد مسن کاهش می‌دهد (۹). در پژوهشی نشان داده شد که فعالیت ورزشی با شدت متوسط قادر به ترمیم بافت کبد آسیب دیده به وضعیت قبل از القای پیری می‌شود (۱۰). لیندین و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که فعالیت‌های هوازی با شدت متوسط باعث کاهش آستانه استاتوز هپاتیت غیر الکلی و فیروز کبدی در موش‌ها می‌شود (۱۱). علاوه بر فعالیت‌های ورزشی، به موازات افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی کشورها بویژه در حوزه گروه‌های خاص، کاربرد درمان‌های غیردارویی از جمله درمان‌ها و شیوه‌های پیشگیرانه طب سنتی به سرعت در حال گسترش است و به یک صنعت در جوامع مبدل شده است. از مهمترین این روش‌ها می‌توان به استفاده از گیاهان دارویی اشاره کرد (۱۲). بهار نارنج با توجه به ترکیبات مختلفی که دارد در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. روغن‌های اصلی این گیاه لیمونن، لینالول و β -میرسن است. (۱۳). حافید همکاران (۲۰۱۸) اثرات ضد سرطانی لیمونن را در کارسینوم سلول‌های کبدی و HepG2 نشان دادند. این محققین بیان کردند که این اثرات، ناشی از رفتار های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیدانی فلاونوئیدها می‌باشد (۱۴). علاوه

جدول ۱. توالی پرایمرهای p16 و p21 به همراه ژن کنترل

Genes	Primer Sequences	Sizes (Bp)
TBP	Forward: 5'-GCGGGGTCATGAAATCCAGT-3'	147
	Reverse: 5'-AGTGATGTGGGGACAAAACGA-3'	

P16	Forward: 5'- CGTACCCCGATACAGGTGATG -3'	261
	Reverse: 5'- ATACCGCAAATACCGCACGA -3'	
P21	Forward: 5'- GTCTTGCCTCTGGTGTCTC -3'	109
	Reverse: 5'- ATAGAAATCTGTTAGGCTGGTCTG -3'	

پروتکل تمرین هوازی

در ابتدا جهت برآورد حداکثر سرعت دویدن آزمون عملکرد ورزشی مدرج با شیب صفر درجه اجرا شد. جهت انجام این آزمون ابتدا موش‌های صحرایی با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه شروع به دویدن کردند و در ادامه سرعت نوارگردان با ازای هر ۱ دقیقه یک متر اضافه شد. این روند تا وقتی ادامه داشت که موش‌های صحرایی دیگر قادر به دویدن نبودند (واماندگی). پس از تعیین حداکثر سرعت دویدن، موش‌ها ابتدا به مدت ۵ دقیقه با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد سرعت بیشینه روی نوارگردان گرم می‌کردند، سپس با شدت ۶۵ درصد سرعت بیشینه در هفته اول؛ ۷۰ درصد سرعت بیشینه در هفته دوم؛ ۷۵ درصد سرعت بیشینه از هفته سوم به بعد تمرین تداومی را انجام می‌دادند (۱۶). در پایان موش‌ها ۵ دقیقه سرد کردن را با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد سرعت بیشینه انجام می‌دادند.

گیاه مورد نظر توسط ترازوی دیجیتال توزین و به بالن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر متصل به کلونجر اضافه شد. عمل استخراج به مدت ۴ ساعت انجام و اسانس جمع‌آوری شده، به وسیله سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری شد و اسانس تهیه شده تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۷).

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 آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام شد و سطح معنی‌داری آزمون‌ها $p \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

روشن تهیه عصاره CA

جهت تهیه عصاره CA، ابتدا مقدار ۵۰ گرم از نمونه پودر شده

جدول ۱. نتایج وزن در گروه‌های مختلف

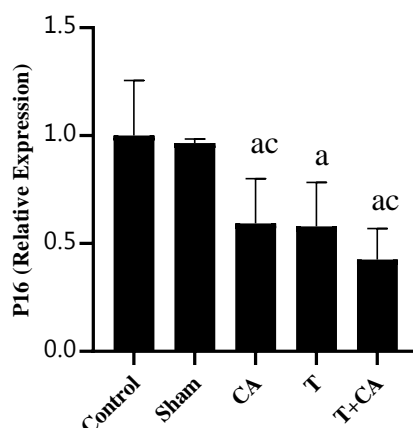
وزن (گرم)		متغیر گروه
پس‌آزمون	پیش‌آزمون	
۲۸۱/۱۷ ± ۳۱/۷۷	۲۵۲/۷۴ ± ۲۶/۱۷	Control
۲۶۱/۴۵ ± ۱۷/۶۷	۲۶۵/۴۵ ± ۱۷/۶۷	Sham
۲۹۸/۵۲ ± ۲۰/۲۰	۲۸۸/۴۸ ± ۲۰/۸۵	CA
۲۷۲/۱۷ ± ۳۱/۷۷	۲۷۴/۷۴ ± ۲۶/۱۷	T
۲۵۰/۲۷ ± ۱۸/۴۹	۲۷۴/۲۲ ± ۱۵/۳۲	T+CA

یافته‌ها
تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان p16 بافت کبد بین گروه‌های مختلف وجود دارد (نمودار ۱). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد بین گروه‌های Control با CA ($p=0/048$)، T ($p=0/032$) و T+CA ($p=0/007$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان p21 بافت کبد بین گروه‌های مختلف وجود دارد ($F=8/694$, $p=0/001$) (نمودار ۱). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد بین گروه‌های Control با CA ($p=0/048$)، T ($p=0/032$) و T+CA ($p=0/007$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

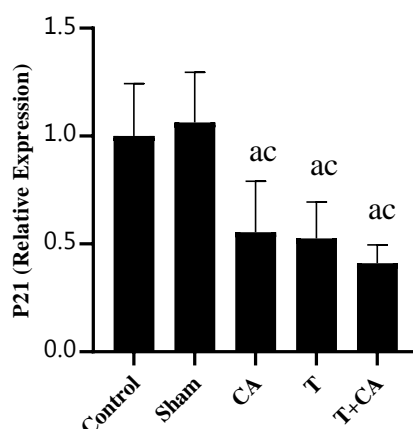
یافته‌ها
تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان p16 بافت کبد بین گروه‌های مختلف وجود دارد (نمودار ۱). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد بین گروه‌های Control با CA ($p=0/048$)، T ($p=0/032$) و T+CA ($p=0/007$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

اختلاف معنی‌داری مشاهده شد.

دارد. همچنین بین گروه‌های Sham با گروه‌های CA ($p=0/021$)، T ($p=0/014$) و T+CA ($p=0/003$)



نمودار ۱. تغییرات بیان p16 بافت کبدی در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح $P < 0/05$).
a تفاوت با Control، c تفاوت با گروه Sham.



نمودار ۲. تغییرات بیان p21 بافت کبدی در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح $P < 0/05$).
a تفاوت با Control، c تفاوت با گروه Sham.

پیر p16 و p21 چرخه سلولی را از طریق مهار کیناز وابسته به سیکلین (CDK) مهار می‌کنند (۲۱). اثر مفید فعالیت‌های ورزشی بر طول عمر غیر قابل انکار است، با این وجود مکانیزم بیولوژیکی آن به خوبی درک نشده است. به طور خاص مکانیزم پیری و بهبود آن از طریق فعالیت‌های ورزشی به خوبی شناسایی نشده است (۲۲). هر دو مهار کننده CDK پیشرفت چرخه سلولی را در درجه اول از طریق مهار فعالیت CDK مهار می‌کنند و منجر به فسفوریلاسیون پروتئین رتینوبلاستوما (RB) و فعال‌سازی بیان ژن وابسته به E2f می‌شوند (۲۳). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که پیری سلولی ناشی از محرک‌های مختلف با مقادیر این پروتئین‌ها در ارتباط است (۲۳). فعالیت‌های ورزشی مزمن باعث کاهش مقادیر p16 و p21 در موش‌های مسن می‌شود. شفر و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که تنظیم

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین هوازی باعث کاهش معنی‌داری در بیان p16 و p21 کبدی موش‌های مسن شده است. p16 و p21 اغلب به عنوان نشانگر پیری استفاده می‌شوند. افزایش سلول‌های پیر طی دوره سالمندی با تغییر در فنوتیپ بافت‌های مختلف همراه است و باعث بیماری‌های مختلف مربوط به پیری می‌شود (۱۸). به نظر می‌رسد تجزیه ملکول‌های بزرگ پروتئین باعث افزایش اتوفاژی در افراد مسن می‌شود (۱۹). نتایج مطالعه‌ای نشان داده که شرکت در فعالیت‌های ورزشی منظم می‌تواند از اثرات منفی پیری جلوگیری کند (۲۰). با این وجود چگونگی فعال‌شدن مسیرهای کاتابولیکی ناشی از فعالیت‌های ورزشی به خوبی شناسایی نشده است. در سلول‌های

کاهش ROS می‌تواند روند پیری را به تاخیر اندازد (۳۶). همچنین کوئرتستین می‌تواند باعث کاهش بیان p21 و مهار کننده‌های چرخه سلولی Cdkn1a، Cdkn2a و Cdkn3a شده و پیشرفت فیروز را در موش‌ها مهار کند (۳۷). از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم اندازه‌گیری سطوح پروتئینی متغیرهای مورد مطالعه به روش‌های الایزا و وسترن بلات اشاره نمود، از این رو پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی به بررسی اثر T همراه مصرف CA بر سطوح پروتئینی پرداخته شود. همچنین با توجه به اثرات تمرین و بهار نارنج بر نشانگرهای پیری سلولی بافت کبد موش‌های سالمند، توصیه می‌شود به T و مکمل CA در پژوهش‌های بعدی بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که T و CA با تغییراتی که در سطوح p16 و p21 به وجود آورد، روش مناسبی برای بهبود عملکرد سلول‌های کبدی و با به تاخیر انداختن فرایند پیری سلولی در حیوانات سالمند باشد. با این وجود، اثر همزمان T و CA بر تغییرات متغیرهای مربوط به پیری نسبت به هر کدام به تنهایی معنی‌دار نشد. به نظر پژوهش‌های بیشتری در این زمینه لازم است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این تحقیق در قالب رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله املی و با تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت با کد IR.IAU.M.REC.1399.032 انجام شده است. بدین وسیله، نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحدهای دانشگاهی اعلام می‌دارند.

حامی مالی

هزینه‌های پژوهش توسط محققین پرداخت شده است.

مشارکت نویسندگان

طراحی و ایده پردازی: احمد عبدی، سیدعلی حسینی و زینب شیخ الاسلامی. روش شناسی و تجزیه و تحلیل داده‌ها: احمد عبدی، سیدعلی حسینی و علیرضا براری؛ سرپرستی و نگارش پایانی: احمد عبدی و سیدعلی حسینی.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان مقاله حاضر فاقد هر گونه تعارض منافع بوده است.

چرخه سلولی وابسته به p21 از پیری بافت چربی ناشی از رژیم غذایی جلوگیری می‌کند (۲۲). هم راستا با پژوهش حاضر روسمن و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که فعالیت ورزشی با تأثیر بر p53، p21 و p16 باعث محافظت عروق در افراد پیر می‌شود (۲۴). علاوه بر این در موش‌های جوان نشان داده شده که فعالیت ورزشی باعث کاهش بیان p53 و p16 آئورت شده (۲۵) و از افزایش پیری ناشی از رژیم غذایی پر چرب جلوگیری می‌کند (۲۲). جانگ و همکاران (۲۰۱۹) نیز نشان دادند که فعالیت ورزشی استقامتی باعث کاهش بیان p53، p21 و p16 هیپوکمپ موش‌های چاق می‌شود (۲۶). همچنین در پژوهشی نشان داده شد که ۱۴ هفته تمرین ورزشی باعث کاهش شاخص‌های پیری بافت چربی احشایی می‌شود (۲۲). میزان بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی در سالمندی افزایش می‌یابد (۲۷). در کبد نیز، ماکروفاژها باعث تولید سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی شده، که نقش مهمی در ایمنی ذاتی دارند. هر دو نوع ماکروفاژهای کبدی می‌تواند از شکلی به شکل دیگر تغییر کرده تا بتواند سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی را همزمان ترشح کند. پیری بسیاری از فرایندهای سلولی از جمله این عمل دوگانه (پلاریزاسیون) ماکروفاژهای کبد را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۸). فعالیت بدنی نیز بر پلاریزاسیون ماکروفاژها تأثیر دارند. فعالیت ورزشی با شدت متوسط در زنان بی‌تحرک باعث بهبود شرایط التهاب می‌شود (۲۹). به نظر می‌رسد کاهش التهاب با کاهش بیان p53، p21 و p16 همراه است.

از دیگر نتایج پژوهش حاضر کاهش معنی‌دار بیان p21 و p16 بافت کبدی موش‌های مسن به دنبال مصرف بهار نارنج و ترکیب تمرین هوازی و بهار نارنج بود. فلاونون‌ها، فلاونوئیدهای اصلی موجود در بهار نارنج هستند (۳۰). فراوان‌ترین فلاونون‌های آزاد شناسایی شده عبارتند از: هسپیرین (۴-متیوکسی-۳، ۵،۷-تری هیدروکسی فلاونون) و نارنژین (۴، ۵،۷-تری هیدروکسی فلاونون) (۳۱). در پژوهشی نشان داده شده که نارنژین می‌تواند باعث تعدیل در تنظیم کننده‌های چرخه سلولی شده و باعث کاهش نشانگرهای آسیب قلبی ناشی از پیری از جمله گونه‌های فعال اکسیژن شود (۳۲). همچنین نشان داده شده که نارنژین همانند رزوراترول و کوئرتستین باعث فعال کردن SIRT1 می‌شود (۳۳، ۳۴). در همین راستا، دا پوززو و همکارانش (۲۰۱۸)، برای اولین بار اثر ضد پیری نارنژین را در مدل آزمایشگاهی نشان دادند (۳۵). علاوه بر این، بهار نارنج ممکن است حاوی مقادیر کمی از فلاونول‌ها کائمپرفرول و کوئرتستین، به شکل گلیکوزیدی باشد. در مطالعه‌ای نشان داده شده که کوئرتستین باعث مهار بیان p16 و p21 می‌شود. در این مطالعه بیان شد که کوئرتستین با

Reference

1. Ko I-G, Kim S-E, Kim C-J, Jee Y-S. Treadmill exercise alleviates aging-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. *International journal of gerontology*. 2013;7(3):152-7.
2. Kim H, Kisseleva T, Brenner DA. Aging and liver disease. *Current opinion in gastroenterology*. 2015;31(3):184.
3. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(1):55-64.
4. Basso A, Piantanelli L, Rossolini G, Roth GS. Reduced DNA synthesis in primary cultures of hepatocytes from old mice is restored by thymus grafts. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 1998;53(2):B111-B6.
5. Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonja T, Tiniakos D, Wilson CL, Lahat A, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nature communications*. 2017;8(1):1-12.
6. Lebel M, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Metabolism, genomics, and DNA repair in the mouse aging liver. *Current gerontology and geriatrics research*. 2011;2011.
7. Wang MJ, Chen F, Li JX, Liu CC, Zhang HB, Xia Y, et al. Reversal of hepatocyte senescence after continuous in vivo cell proliferation. *Hepatology*. 2014;60(1):349-61.
8. Dimitrijević M, Stanojević S, Blagojević V, Čuruvija I, Vujnović I, Petrović R, et al. Aging affects the responsiveness of rat peritoneal macrophages to GM-CSF and IL-4. *Biogerontology*. 2016;17(2):359-71.
9. He F, Li J, Liu Z, Chuang C-C, Yang W, Zuo L. Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise. *Frontiers in physiology*. 2016;7:486.
10. Wasityastuti W, Habib NA, Sari DC, Arfian N. Effects of low and moderate treadmill exercise on liver of d-galactose-exposed aging rat model. *Physiological reports*. 2019;7(21):e14279.
11. Linden MA, Sheldon RD, Meers GM, Ortinau LC, Morris EM, Vieira-Potter VJ, et al. Exercise Training As A Mitigator Of Liver Fibrosis In Western Diet Fed OLETF Rats: 1783 Board# 3 June 2, 1: 00 PM-3: 00 PM. *Medicine and science in sports and exercise*. 2016;48(5 Suppl 1):485-.
12. Upchurch DM, Chyu L. Use of complementary and alternative medicine among American women. *Women's Health Issues*. 2005;15(1):5-13.
13. Suntar I, Khan H, Patel S, Celano R, Rastrelli L. An overview on Citrus aurantium L.: its functions as food ingredient and therapeutic agent. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018.
14. Hafidh RR, Hussein SZ, MalAllah MQ, Abdulmir AS, Abu Bakar F. A high-throughput quantitative expression analysis of cancer-related genes in human HepG2 cells in response to limonene, a potential anticancer agent. *Current cancer drug targets*. 2018;18(8):807-15.
15. Zhao H-Y, Yang L, Wei J, Huang M, Jiang J-G. Bioactivity evaluations of ingredients extracted from the flowers of Citrus aurantium L. var. amara Engl. *Food chemistry*. 2012;135(4):2175-81.
16. 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. *Report of Health Care*. 2018;4(1):26-35.
17. 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. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(10):3057.
18. Franco I, Johansson A, Olsson K, Vrtačnik P, Lundin P, Helgadóttir HT, et al. Somatic mutagenesis in satellite cells associates with human skeletal muscle aging. *Nature communications*. 2018;9(1):800.

19. Jiao J, Demontis F. Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging. *Current opinion in pharmacology*. 2017;34:1-6.
20. Murillo ALP, Eckstein F, Wirth W, Beavers D, Loeser RF, Nicklas BJ, et al. Impact of diet and/or exercise intervention on infrapatellar fat pad morphology: secondary analysis from the intensive diet and exercise for arthritis (IDEA) trial. *Cells Tissues Organs*. 2017;203(4):258-66.
21. Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, et al. Aging of mice is associated with p16 (Ink4a)-and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(7):1294.
22. Schafer MJ, White TA, Evans G, Tonne JM, Verzosa GC, Stout MB, et al. Exercise prevents diet-induced cellular senescence in adipose tissue. *Diabetes*. 2016;65(6):1606-15.
23. Calbo J, Serna C, Garriga J, Grana X, Mazo A. The fate of pancreatic tumor cell lines following p16 overexpression depends on the modulation of CDK2 activity. *Cell Death & Differentiation*. 2004;11(10):1055-65.
24. Rossman MJ, Kaplon RE, Hill SD, McNamara MN, Santos-Parker JR, Pierce GL, et al. Endothelial cell senescence with aging in healthy humans: prevention by habitual exercise and relation to vascular endothelial function. *American journal of physiology-Heart and circulatory physiology*. 2017;313(5):H890-H5.
25. Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, Hanhoun M, et al. CLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation*. 2009;120(24):2438-47.
26. Jang Y, Kwon I, Cosio-Lima L, Wirth C, Vinci DM, Lee Y. Endurance Exercise Prevents Metabolic Distress-induced Senescence in the Hippocampus. *Medicine and science in sports and exercise*. 2019;51(10):2012-24.
27. Ren J-L, Pan J-S, Lu Y-P, Sun P, Han J. Inflammatory signaling and cellular senescence. *Cellular signalling*. 2009;21(3):378-83.
28. Mahbub S, Deburghgraeve CR, Kovacs EJ. Advanced age impairs macrophage polarization. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2012;32(1):18-26.
29. Ruffino J, Davies N, Morris K, Ludgate M, Zhang L, Webb R, et al. Moderate-intensity exercise alters markers of alternative activation in circulating monocytes in females: a putative role for PPAR γ . *European journal of applied physiology*. 2016;116(9):1671-82.
30. Jayaprakasha G, Mandadi K, Poulouse S, Jadegoud Y, Gowda GN, Patil BS. Novel triterpenoid from *Citrus aurantium L.* possesses chemopreventive properties against human colon cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2008;16(11):5939-51.
31. Lee SH, Yumnam S, Hong GE, Raha S, Venkataram Gowda Saralamma V, Lee HJ, et al. Flavonoids of Korean *Citrus aurantium L.* induce apoptosis via intrinsic pathway in human hepatoblastoma HepG2 cells. *Phytotherapy research*. 2015;29(12):1940-9.
32. Da Pozzo E, Costa B, Cavallini C, Testai L, Martelli A, Calderone V, et al. The citrus flavanone naringenin protects myocardial cells against age-associated damage. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017.
33. Feng K, Chen Z, Pengcheng L, Zhang S, Wang X. Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis via SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(10):18192-205.
34. Afra HS, Zangoeei M, Meshkani R, Ghahremani MH, Ilbeigi D, Khedri A, et al. Hesperetin is a potent bioactivator that activates SIRT1-AMPK signaling pathway in HepG2 cells. *Journal of physiology and biochemistry*. 2019;75(2):125-33.
35. Da Pozzo E, De Leo M, Faraone I, Milella L, Cavallini C, Piragine E, et al. Antioxidant and antisenescence effects of

bergamot juice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018.

36. Cao H, Jia Q, Yan L, Chen C, Xing S, Shen D. Quercetin Suppresses the Progression of Atherosclerosis by Regulating MST1-Mediated Autophagy in ox-LDL-Induced RAW264. 7 Macrophage Foam Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(23):6093.

37. Hohmann MS, Habel DM, Coelho AL, Verri Jr WA, Hogaboam CM. Quercetin enhances ligand-induced apoptosis in senescent idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts and reduces lung fibrosis in vivo. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2019;60(1):28-40.