



## تغییرات بیان ژن P53 بافت کبد و شاخص مقاومت به انسولین در رت‌های چاق دیابتی پس از تمرین تناوبی و ژل رویال n کروموزومی

**مسعود جهانتاش:** دانشجوی دکتری، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
**حسین عابد نظری:** استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (\* نویسنده مسئول) [abednazari@gmail.com](mailto:abednazari@gmail.com)  
**ماندانا غلامی:** دانشیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
**فرشاد غزالیان:** دانشیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

تمرین تناوبی شدید،  
ژل رویال،  
ژن P53،  
موش دیابتی

**زمینه و هدف:** دیابت نوع دو شایع‌ترین بیماری درون‌ریز است که به دلیل عدم تحمل گلوکز در اثر برهم خوردن تعادل بین ذخایر و تقاضای انسولین رخ می‌دهد. برای درمان هایپرگلیسمی و عوارض ثانویه آن در بیماران دیابتی علی‌رغم تحقیقات گسترده علل این اختلال متابولیک هنوز در سطح مولکولی به خوبی شناخته نشده است. همانطور که P53 یک ژن مهار کننده تومور است که بیشتر با سرطان در ارتباط است، با این حال، آخرین پژوهش‌ها نقش حیاتی P53 را در توسعه دیابت نشان می‌دهد که چگونه سیگنالینگ P53 می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی بالقوه جدید برای دیابت و اختلالات متابولیکی مرتبط با آن عمل کند. هدف پژوهش حاضر مطالعه تغییرات بیان ژن P53 بافت کبد و شاخص مقاومت به انسولین پس از انجام تمرین تناوبی و ژل رویال در رت‌های چاق دیابتی نوع دو بود.

**روش کار:** نمونه آماری پژوهش حاضر ۳۶ سر موش‌های صحرایی نر چاق با میانگین وزن ۴۰۹ گرم بودند. پس از ۲۰ هفته تغذیه با رژیم پرچرب با تزریق درون صفاقی ۲۵ میلی‌گرم STZ به ازای کیلوگرم وزن موش‌ها دیابتی شدند. موش‌هایی که گلوکز ناشتای آن‌ها بین ۱۵۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود دیابتی نوع دوم در نظر گرفته شد. موش‌های دیابتی در ۴ گروه کنترل (۶ سر)، تمرین تناوبی (۸ سر)، ژل رویال (۷ سر)، تمرین تناوبی شدید ژل رویال (۸ سر) گروه‌بندی و پروتکل تمرینی و گاواژ ژل رویال روی آن‌ها اجرا شد. هشت هفته تمرین تناوبی شدید، پنج جلسه در هفته با تناوب شدید ۲ دقیقه‌ای ۸۰ تا ۹۰ درصد  $VO_{2max}$  و تناوب استراحت یک دقیقه‌ای با ۵۰ تا ۵۶ درصد  $VO_{2max}$  اجرا شد. ژل رویال بصورت گاواژ به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم ۵ روز در هفته داده شد.

**یافته‌ها:** تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و دوعاملی و آزمون تعقیبی نشان داد در مقایسه با گروه کنترل، تمرین تناوبی شدید به کاهش معنی‌دار گلوکز و شاخص مقاومت به انسولین منجر شد و تمرین تناوبی به کاهش بیان ژن P53 در سلول‌های کبدی در مقایسه با گروه کنترل منجر شد ( $P=0/001$ ).

**نتیجه گیری:** تمرین تناوبی و مصرف ژل رویال نیز به کاهش غیر معنی‌دار بیان ژن P53 در سلول‌های کبدی در مقایسه با گروه کنترل منجر شد. نتایج ضریب همبستگی نیز بین تغییرات شاخص مقاومت به انسولین و بیان ژن P53 در گروه‌های تجربی معنی‌دار نبود.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.  
**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Jahantash M, Abednatanzi H, Gholami M, Ghazalian F. Changes in Hepatocyte p53 Gene Expression and Insulin Resistance Index in Obese Diabetic Rats after Interval Training and N-Chromosomal Royal Jelly. Razi J Med Sci. 2021;28(12):28-42.

\*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.

## Changes in Hepatocyte p53 Gene Expression and Insulin Resistance Index in Obese Diabetic Rats after Interval Training and N-Chromosomal Royal Jelly

**Masud Jahantash:** PhD Student, Department of Physical Education and Sports Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Hossein Abednatanzi:** Assistant Professor, Department of Physical Education and Sports Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (\* Corresponding author) abednazari@gmail.com

**Mandana Gholami:** Associate Professor, Department of Physical Education and Sports Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Farshad Ghazalian:** Associate Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** Type 2 diabetes is the most common endocrine disease that occurs due to glucose intolerance due to imbalance between reserves and insulin demand. For the treatment of hyperglycemia and its side effects in diabetic patients, despite extensive research, the causes of this metabolic disorder are still not well understood at the molecular level.

Some studies have reported that strenuous exercise leads to apoptosis in rat intestinal lymphocytes in rats, but exercising voluntarily on a treadmill reduces apoptosis. Induction or inhibition of apoptosis is still questionable. One of the ways of treatment and prevention is regular physical activity for patients. But what kind of sport and with what kind of protocol is a question that researchers are always looking for. Considering the role of exercise and sports activities in the prevention and control of obesity and diabetes, adopting different training methods to prevent and reduce the prevalence of obesity and also help reduce the process of obesity and its complications such as cardio metabolic diseases such as fatty liver and diabetes and etc. is necessary in studies.

In traditional medicine, herbal and traditional medicines are used to prevent and treat metabolic diseases such as diabetes and fatty liver. Royal Jelly is a yellowish-white substance secreted by the submandibular glands of worker bees and consumed by queen bees throughout life and larvae during the growing season. Royal gel (RJ) and its bioactive compounds have a wide range of drugs due to their antioxidant effects and antibacterial, anti-diabetic, anti-cancer, anti-inflammatory, anti-hypertensive, and immune system properties. Also plays an important role in protecting the liver and kidneys, and in diabetic patients, it showed a decreasing effect on blood sugar and a decrease in lipid peroxidation levels and an increase in the activity of antioxidant enzymes such as CAT, GSH-PX and SOD.

As p53 is a tumor-inhibiting gene that is more closely associated with cancer, however, recent research shows the vital role of p53 in the development of diabetes, how p53 signaling can serve as a potential new therapeutic target for diabetes and Operate related metabolic disorders.

The P53 gene, a tumor suppressor gene that mutates and inactivates a wide range of cancers, has been dubbed the "genome protector", but new research has shown that it has profound effects on metabolism. Its activation can lead to obesity and type 2 diabetes, which is why the gene has been dubbed the "protector against obesity". While the role of this gene has been well known for decades in cancer research, little is known about its role in metabolism. Previous studies have shown that the role of P53 in metabolism is essential in its function in suppressing tumors. This gene also has effects on heart disease, obesity and type 2 diabetes.

The aim of this study was to study changes in p53 gene expression in liver tissue and insulin resistance index after HIIT and Royal Jelly in obese type 2 diabetic rats.

**Methods:** The statistical subject of the present study consisted of wistar rats. After 20 weeks

### Keywords

High intensity interval training,  
Royal Jelly,  
P53 gene,  
Diabetic rat

Received: 04/10/2021

Published: 22/02/2022

of high-fat diet, rats became diabetic by intraperitoneal injection of 25 mg STZ per kg body weight. Mice with fasting glucose between 150 and 400 mg /dL were considered to have type 2 diabetes. Mice were treated in 4 groups: 6-head diabetic control, 8-period periodic training, 7-head Royal Jelly, 8-head Periodic Exercise, and 8-head Royal Jelly training group and training protocol and gel-royal gavage.

The HIIT protocol consisted of eight weeks of aerobic exercise, five sessions per week with a gradual increase in extreme frequency from 22 to 38 meters per minute and a rest period of 16 to 22 meters per minute for 15 to 34 minutes by running on a treadmill. Running time increased from 16 minutes in the first week to 34 minutes in the eighth week. At the end of the training period and 48 hours after the last training session, the experimental training groups and after 12 hours of fasting, the rats were anesthetized and sacrificed by ether anesthetic. Blood samples were collected from the heart. Glucose was measured using an auto-analyzer. Insulin measured by a special kit of Pars Azmoun Company. The insulin resistance index was calculated using the formula and gene expression was also determined by RT-PCR. To describe the data, descriptive statistics and inferential statistics of one-way analysis of variance and Bonferroni post hoc test were used to compare the differences between groups and two-factor analysis of variance and effect size index were used to compare the effect of each of the independent variables. Significance level it was considered  $p \leq 0.05$ .

**Results:** Data analysis using one way and two-way analysis of variance test showed that:

1. Mean glucose concentration (mg /dL) in the exercise group compared to the control was significantly reduced ( $P = 0.005$ ) and in the exercise-royal gel group compared to the royal gel group had no significant difference and had a significant decrease compared to the control in the gel exercise group. ( $P = 0.001$ )
2. Mean insulin concentration (IUI / ml) in the exercise group was significantly increased compared to the control ( $P = 0.005$ ) but the royal jelly group had a significant increase compared to the control. In the exercise group, Royal Jelly had a non-significant increase compared to control.
3. The mean insulin resistance index in the exercise group was significantly lower than the control group and Royal jelly ( $P = 0.044$ )
4. Mean P53 gene expression showed that, HIIT reduced P53 gene expression in hepatocytes compared with controls ( $P < 0.001$ ). HIIT and Royal Jelly also reduced P53 gene expression in hepatocytes compared with the control group.

**Conclusion:** Results shown that HIIT and Royal Jelly also reduced P53 gene expression in hepatocytes compared with the control group.

In general, according to the research results, it can be concluded that HIIT as well as interaction with Royal Jelly can reduce the expression of P53 gene and improve glucose levels due to the effect of genetic components effective in the release of hepatic glucose and in Type 2 diabetic patients are effective, although the results showed that the correlation coefficient between changes in insulin resistance index and P53 gene expression was not significant in the experimental groups. Royal jelly due to various vitamin and protein compounds and phenolic compounds and good substitutes for the role of glucose, as well as various antioxidant and anti-inflammatory roles, etc., regulates carbohydrate metabolism, especially glucose, and regulates lipid metabolism and reduces hyperglycemia and dyslipidemia. And reduce insulin resistance and prevent oxidative stress and inflammatory responses in people with type 2 diabetes, which is associated with exercise-related diabetes and is usually associated with overweight and obesity, but Royal Jelly alone cannot be used in these areas. And changes in the P53 gene are effective, and the use of aerobic exercise programs such as interval training can improve its effectiveness, however, further studies are needed in this area.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Jahantash M, Abednatanzi H, Gholami M, Ghazalian F. Changes in Hepatocyte p53 Gene Expression and Insulin Resistance Index in Obese Diabetic Rats after Interval Training and N-Chromosomal Royal Jelly. *Razi J Med Sci.* 2021;28(12):28-42.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

## مقدمه

دیابت نوع دو شایع‌ترین بیماری درون‌ریز است که به دلیل عدم تحمل گلوکز در اثر برهم‌خوردن تعادل بین ذخایر و تقاضای انسولین رخ می‌دهد. این بیماری متابولیکی با هیپرگلیسمی ناشی از نقصان ترشح انسولین، مقاومت به انسولین و یا ترکیبی از هر دو مشخص می‌شود و با افزایش گلوکز خون، اختلال در متابولیسم کربوهیدرات و لیپید همراه می‌باشد (۱). تخمین زده می‌شود تعداد افراد دیابتی در دنیا از ۱۷ میلیون در سال ۲۰۰۰، به ۳۶۶ میلیون در سال ۲۰۳۰ برسد. در افراد مقاوم به انسولین سلول‌های بدن به صورت طبیعی به انسولین پاسخ نداده و گلوکز نمی‌تواند به آسانی به درون سلول جریان یابد. این بیماری متابولیسم درون سلولی اغلب بافت‌ها از جمله کبد را متأثر می‌کند و به‌عنوان یکی از عوامل اصلی شیوع اختلالات کبدی نیز محسوب می‌شود. حفظ ثبات سطح گلوکز خون توسط برداشت و ذخیره‌سازی گلوکز از وظایف کبد به شمار می‌رود. محل ترشح انسولین سلول‌های بتای پانکراس است. به دلیل این که اندام‌های اصلی بدن برای مصرف سوخت خود که عمدتاً گلوکز می‌باشد به هورمون انسولین نیاز دارند، این کاهش منجر به کاهش مصرف گلوکز توسط اندام‌ها و افزایش قند خون و گلوکونئوزن می‌شود لذا کاهش تولید انسولین مهم‌ترین مشخصه‌ی بیماری دیابت می‌باشد (۲).

افزایش قند خون از طریق افزایش تولید محصولات نهایی گلیکوزیله پیشرفته باعث تسهیل در تولید رادیکال‌های آزاد، از طریق اختلال در تولید رادیکال‌های درون‌زاد آزاد مثل سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌گردد که به آسیب سلول منجر می‌شود (۳).

دیابت همچنین می‌تواند باعث صدمه بافتی و مرگ سلولی یا آپوپتوز شود. آپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی و به‌طور کامل حفاظت‌شده سلولی می‌باشد که نقش مهمی را در رشد و نمو اندام‌ها، هومئوستاز و انهدام سلول‌های فرسوده ایفا می‌کند (۴). تحقیقات نشان می‌دهند که نقص در این مسیر می‌تواند باعث تجمع سلول‌های جهش یافته و در نهایت مرگ بیمار شود (۵). تحقیقات نشان‌دهنده افزایش شیوع آپوپتوز در

کبد نمونه‌های دیابتی القا شده به‌وسیله آلوکسان (ALX) در مدل حیوانی هستند (۶). برخی پژوهش‌ها گزارش کرده‌اند فعالیت ورزشی شدید موجب آپوپتوز لنفوسیت‌های موش آزمایشگاهی می‌شود اما دویدن اختیاری بر روی تردمیل آپوپتوز را کاهش می‌دهد، درحالی‌که تمرین ورزشی اجباری سطوح اکسیدان‌ها را افزایش می‌دهد (۷). بنابراین تأثیر فعالیت ورزشی بر القا یا مهار آپوپتوز هنوز مورد تردید است. یکی از راه‌های درمانی و پیشگیری، فعالیت بدنی به شکل منظم برای بیماران می‌باشد. اما اینکه چه ورزشی و با چه نوع پروتکلی، سوالی است که محققین همیشه در پی کشف آن هستند.

با توجه به نقش انجام تمرینات و فعالیت‌های ورزشی در پیشگیری و کنترل چاقی و دیابت، اتخاذ شیوه‌های مختلف تمرینی برای پیشگیری و کاهش شیوع چاقی و نیز کمک به کاهش روند چاقی و عوارض ناشی از آن مانند بیماری‌های کاردیومتابولیک مانند کبد چرب و دیابت و... در مطالعات ضرورت پیدا می‌کند. تمرین استقامتی با حجم بالا کنترل قند خون را در دیابت نوع دو بهبود می‌بخشد، اما بسیاری از افراد «کمبود وقت» را به‌عنوان مانعی برای مشارکت منظم ذکر می‌کنند. تمرین تناوبی با شدت بالا (HIT) در نهایت یک روش با زمان کارآمد برای ایجاد سازگاری‌های فیزیولوژیکی می‌باشد، اما در مورد تأثیر HIT در دیابت نوع دو کمتر شناخته شده است. تمرینات تناوبی شدید که معمولاً با شدت‌های بالاتر از ۹۰ درصد حداکثر ضربان قلب و دوره استراحت‌های کم و مدت زمان تمرینی کمتر از ۲۰ دقیقه انجام می‌گیرد، با بکارگیری و درگیر کردن بهتر و بیشتر تارهای عضلانی و فراخوانی قوی‌تر ارگان‌های سوخت و سازی و متابولیکی می‌تواند از طریق سازوکار سلولی مولکولی، متابولیسم کل بدن را در جهت مثبت تحت تأثیر قرار دهد (۸). از این رو با انجام تمرینات تناوبی شدید، همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، عضلات بیشتری درگیر خواهد شد لذا در پاسخ به درگیری بیشتر عضلات اسکلتی، میزان مایوکین‌های ترشح یافته از عضلات اسکلتی افزایش می‌یابد و با فعال کردن متابولیسم عضلانی بسیاری از مسیرهای مربوط به متابولیسم چربی و جذب گلوکز خون را افزایش و

آهن، روی و منگنز مواد معدنی اصلی RJ هستند (۱۶) و (۱۷) علاوه بر این، RJ فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی از قبیل اثر فشار خون، عملکرد شبیه انسولین دارد؛ بنابراین، ممکن است که RJ تأثیراتی در مقاومت به انسولین داشته باشد که به‌عنوان علت اصلی DM در نظر گرفته می‌شود (۱۸). به‌طور مثال، در یک مطالعه روی موش‌ها، مکمل یاری دوزهای مختلف ژل رویال (۱۰، ۳۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به کاهش فشار خون سیستولیک و سطح انسولین سرم و شاخص مقاومت به انسولین منجر شد. اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌باکتریایی، ضدالتهابی و محافظت‌کننده عصبی ژل رویال نیز به اثبات رسیده است (۱۹، ۲۰).

ژن P53 که یک ژن سرکوبگر توموراست درطیف وسیعی از سرطان‌ها دچار جهش شده و غیر فعال می‌گردد، به این ژن لقب «محافظ ژنوم» داده شده است، حال تحقیقات جدید نشان داده است که این ژن دارای تأثیرات عمیقی بر متابولیسم است و غیر فعال شدن آن می‌تواند به چاقی و دیابت نوع ۲ بیانجامد و به همین دلیل لقب دیگری به این ژن داده شد «محافظ در برابر چاقی». در حالیکه نقش این ژن در طی دهه‌ها تحقیق بر روی سرطان کاملاً شناخته شده است، درمورد نقش آن در متابولیسم اطلاعات کمی در اختیار است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که نقش P53 در متابولیسم، در عملکرد آن برای سرکوب تومور اساسی است، این ژن همچنین دارای تأثیراتی بر بیماری قلبی، چاقی و دیابت نوع ۲ است. در ژن P53، رایج‌ترین SNP در اسید آمینه ی ۷۲ رخ می‌دهد جایی که یک توالی نوکلئوتیدی یکی از دو اسید آمینه ی پرولین (P72) یا آرژنین (R72) را کد می‌کند. برای دهه‌ها، وارپته ی R72 از p53 در افرادی که از خط استوا دورتر زندگی می‌کردند و درجه حرارت سردتری را در زمستان تجربه می‌کردند، مشاهده شده بود، اما مطالعات نتوانست توضیحی قطعی در مورد علت این پدیده ارائه دهد. علاوه بر این، مطالعات گسترده ی ژنومی نشان داد که بین وارپته ی R72 و استعداد افزایش توده ی بدنی و ابتلا به دیابت نوع ۲ ارتباطی وجود دارد. پرفسور مورفی و همکارانش به مطالعه ی موش‌هایی پرداختند که در جایگاه ۷۲ این پروتئین یا دارای پرولین و یا دارای آرژنین بودند. آن‌ها ابتدا

باعث بالا رفتن هرچه بهتر متابولیسم می‌شود (۹). با توجه به تولید رادیکال‌های آزاد توسط دیابت و فعالیت ورزشی و نهایتاً ایجاد آپوتوز یکی از مواردی که توجه محققین را به خود جلب کرده است یافتن راه‌کارهایی برای کاهش عواقب منفی ناشی از دیابت و تولید رادیکال‌های آزاد است. در همین زمینه، مصرف عوامل آنتی‌اکسیدانی می‌تواند مؤثر باشد. محققان زیادی در سراسر دنیا در تلاش هستند تا با استفاده از روش‌های گوناگون از بیماری دیابت پیشگیری کنند و یا آن را درمان کنند و یا عوارض بیماری دیابت را کاهش دهند. امروزه استفاده از گیاهان دارویی و عصاره‌ها برای درمان بیماری‌ها افزایش یافته است. گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها اگرچه از دیرباز در درمان دیابت قندی و عوارض ناشی از آن مطرح بوده‌اند، ولی در مورد اثربخشی قطعی بسیاری از آن‌ها تاکنون شواهد معتبری یافت نشده است (۱۰).

در طب سنتی برای پیشگیری و درمان بیماری‌های متابولیک از جمله دیابت و کبد چرب از داروهای گیاهی و سنتی استفاده می‌شود (۱۱). ژل رویال (Royal Jelly) ماده سفید مایل به زرد است که توسط غدد تحت‌فکی زنبورهای کارگر ترشح و توسط زنبور ملکه در تمام عمر و لاروها در طول دوره رشد مصرف می‌شود. ژل رویال RJ و ترکیبات فعال زیستی آن به دلیل داشتن اثرات آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضد باکتریایی، ضد دیابتی، ضد سرطان، ضد التهابی، ضد فشار خون و داروهای سیستم ایمنی بدن، داروهای گسترده‌ای را به نمایش می‌گذارند (۱۲ و ۱۳). هم‌چنین نقش مهمی در محافظت از کبد و کلیه، بهبود زخم و سیستم تناسلی دارد و در بیماران دیابتی، اثرات کاهش‌دهنده روی قند خون و کاهش سطح پراکسیداسیون لیپید و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD، GSH-PX، CAT را نشان داد (۱۴، ۱۵). ژل رویال به‌طور عمده از ترکیبات مهم با فعالیت‌های بیولوژیکی و تقویت‌کننده سلامتی مانند پروتئین‌ها، لیپیدها، قندها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و اسیدهای آمینه آزاد تشکیل شده است و حاوی ویتامین‌هایی مانند ربیوفلاوین، تیامین، نیاسین، اسید فولیک، بیوتین و پیریدوکسین و مقادیر کمتری از ویتامین‌های C، D، A و E) و علاوه بر این، کلسیم، سدیم، پتاسیم، مس،



دیابتی و آسیب‌های کبدی مورد استفاده قرار گیرد.

### روش کار

جامعه آماری پژوهش حاضر را موش‌های صحرایی نر تشکیل می‌دهند و نمونه‌های پژوهش ۳۶ سر رت نر نژاد ویستار جوان با دامنه سنی ۳۵ تا ۴۵ روز و میانگینی وزنی  $110 \pm 10$  گرم بودند. پس از دو هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن میانگین  $170 \pm 30$  تحت رژیم پر چرب قرار گرفتند. پس از ۲۰ هفته (۵ ماه) تغذیه با رژیم پرچرب و دسترسی آزاد به مواد غذایی و آب، به ۴ گروه کنترل دیابتی (۸ سر)، تمرین تناوبی شدید (۱۰ سر)، ژل رویال (۸ سر)، تمرین تناوبی شدید و ژل رویال (۱۰ سر) تقسیم شدند که در پایان پروتکل ۲۹ سر در ۴ گروه کنترل دیابتی (۶ سر)، تمرین تناوبی شدید (۸ سر)، ژل رویال (۷ سر)، تمرین تناوبی شدید و ژل رویال (۸ سر) باقی‌ماندند.

**شیوه نگهداری و تغذیه موش‌های صحرایی:** برای نگهداری موش‌های صحرایی از قفس‌های جنس پلی‌کربنات شفاف با قابلیت اتو کلاو استفاده شد. دمای مطلوب محل نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ۶۵ درصد بود چرخه روشنایی نیز هر ۱۲ ساعت یکبار به طور دقیق توسط تنظیم‌کننده الکترونیکی نور سالن نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. جهت تغذیه موش‌های صحرایی از رژیم پر چرب استاندارد استفاده شد. دسترسی موش‌های صحرایی به غذا به صورت نامحدود بود و آب در بطری‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری در تمامی قفس‌ها وجود داشت.

**روش چاق کردن رت‌ها با رژیم پر چرب:** برای این منظور، پس از آشناسازی و سازگاری با محیط جدید، تمامی رت‌ها به مدت ۲۰ هفته (۵ ماه) تحت رژیم غذایی پرچرب تهیه شده توسط پژوهشکده زیست

موش‌ها را با یک رژیم نرمال به مدت ده هفته تغذیه کردند. پس از آن رژیم غذایی موش‌های هردو گروه را به یک رژیم پرچرب به مدت هشت هفته تغییر دادند. درحالی‌که با رژیم غذایی نرمال، موش‌های دارای واریته‌ی R72 اندکی دچار افزایش وزن شدند، اما افزایش وزن بسیار قابل توجه هنگامی مشاهده شد که رژیم غذایی این گروه از موش‌ها به رژیم پرچرب تغییر کرد: حداقل ۲۰ درصد چربی بدنی آن‌ها (R72) نسبت به موش‌های دارای پرولین (P72) بیشتر بود. آزمایشات تحمل گلوکز خوراکی نیز نشان داد بدن‌بال رژیم پرچرب موش‌های R72 دچار علائم پیش‌دیابت و مقاومت به انسولین می‌شوند مورفی و همکارانش همچنین دو ژن دیگر را که بوسیله‌ی p53 کنترل می‌شوند، شناسایی نمودند که در کبد موش‌های R72 نسبت به موش‌های P72 به طرز محسوسی متفاوت می‌باشند: ژن Npc1L1 با جذب کلسترول و ژن Tnf با مقاومت به انسولین ناشی از چاقی ارتباط دارند (۲۱).

اما تاکنون گزارشی مبنی بر اثرات تعاملی تمرین تناوبی شدید و اثرات ضد دیابتی ژل رویال و مصرف طولانی مدت این ماده بر شاخص مقاومت به انسولین و بیان ژن P53 کبدی موش‌های مدل چاق شده با رژیم پر چرب و دیابتی شده نوع دو با دوز پایین استرپتوزوتوسین (STZ) مورد مطالعه قرار نگرفته است. لذا در این مطالعه در نظر است تاثیرات تمرینی تناوبی هوازی شدید بهمراه ژل رویال بر بیان ژن P53 بافت کبد موش‌های دیابتی نوع دو گزارش گردد تا شاید بتوان از اثر بخشی و نقش آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی ژل رویال در کنار طراحی برنامه ورزشی تناوبی متناسب با رژیم غذایی برای دیابتی‌ها استفاده کرد. امید است نتایج حاصل از این پژوهش در علوم پزشکی و ورزشی پس از مطالعات انسانی مشابه به‌عنوان راهی نجات بخش در بهبود عوارض ناشی از دیابت مانند قلب

جدول ۱- ترکیب امولسیون پر چرب جهت گاوژا به موش‌های صحرایی

غذای پرچرب ۶۰٪	غذای پرچرب ۴۵٪	غذای رایج	ماده
۲۶	۴۱	۵۰/۰۳	کربوهیدرات (%)
۲۴	۲۴	۲۳	پروتئین (%)
۳۵	۲۴	۵/۱	چربی (%)
۶۰	۴۵	-	چربی (%Kcal)
۵/۲	۴/۸	۳/۱	کالری (Kcal/g)

رودریگرز و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد. برای اندازه‌گیری حداکثر اکسیژن مصرفی ( $VO_{2max}$ ) به دلیل عدم دسترسی به ابزار مستقیم (مانند دستگاه آنالیز گازهای تنفسی) و با توجه به پژوهش‌های انجام شده، پروتکل غیرمستقیم با دقت زیاد مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب که هر دو هفته یکبار موش‌ها در یک وهله تمرینی پس از ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۰ متر در دقیقه سپس با سرعت ۱۵ متر در دقیقه به مدت ۲ دقیقه شروع به دویدن کردند و هر ۳ دقیقه ۳ متر در دقیقه به سرعت افزوده شد تا این که هر کدام از موش‌ها که نتوانستند ادامه دهند و روی شوکر باقی ماندند و به واماندگی رسیدند، آن سرعت به‌عنوان سرعت حداکثر آنان در نظر گرفته می‌شد و سرعت حداکثر برای شدت تمرین بین ۸۰ تا ۹۵ درصد MERT در نظر گرفته شد که خلاصه پروتکل در جدول ۲ آمده است. با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته، ارتباط بالایی بین سرعت نوارگردان و  $VO_{2max}$  رت‌ها وجود دارد ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.94-0.98$ ). از این رو می‌توان با توجه به سرعت دویدن، میزان  $VO_{2max}$  رت‌ها را برآورد کرد (۲۸).

**پروتکل تمرین تناوبی شدید:** برنامه هشت هفته تمرین هوازی، پنج جلسه در هفته با افزایش تدریجی تناوب شدید از سرعت ۲۲ الی ۳۸ متر بر دقیقه (۸۰ تا ۹۰ درصد  $VO_{2max}$ ) و تناوب استراحت با سرعت ۱۶ تا ۲۲ متر در دقیقه (۵۰ تا ۵۶ درصد  $VO_{2max}$ ) زمان ۱۵ الی ۳۴ دقیقه به صورت دویدن روی تردمیل انجام شد، به طوری که زمان دویدن از ۱۶ دقیقه در هفته اول، به ۳۴ دقیقه در هفته هشتم افزایش یافت. رت‌ها یک هفته قبل از شروع پروتکل به‌منظور آشنایی با تردمیل سه روز در هفته با سرعت ۵ متر در دقیقه با شیب صفر درصد با زمان ۱۰ و ۱۲ و ۱۵ دقیقه روی تردمیل راه رفتند. گروه کنترل نیز در طول اجرای پروتکل به‌همین ترتیب روی تردمیل راه رفتند (۲۹، ۳۰) (جدول ۲).

**نمونه‌گیری:** با خاتمه دوره تمرینی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین گروه‌های تجربی تمرینی و پس از ۱۲ ساعت ناشتایی موش‌ها توسط ماده بی‌هوشی اثر بی‌هوش و قربانی شدند. نمونه‌های خون از طریق خون-گیری از قلب جمع‌آوری شد و در دمای ۲۰- نگهداری

فناوری رویان قرار گرفتند که شامل ۴۵ درصد انرژی کل از چربی مشتق شده از روغن حیوانی حاوی ۲۴ گرم چربی، ۲۴ گرم پروتئین و ۴۱ گرم کربوهیدرات در هر ۱۰۰ گرم می‌باشد رژیم پر چرب ۴۵ درصد به مدت ۳ ماه و رژیم پر چرب ۶۰ درصد به مدت ۲ ماه داده شد (جدول ۱) (۲۲، ۲۳).

**روش دیابتی کردن رت‌ها از طریق تزریق استرپتوزوسین (STZ):** برای القای دیابت از رژیم غذایی پر چرب به مدت ۲۰ هفته و سپس تزریق محلول تازه تهیه شده از STZ در سرم فیزیولوژیکی قابل تزریق و به‌صورت داخل صفاقی (۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) استفاده شد. یک هفته پس از تزریق، گلوکز خون ناشتایی با ایجاد جراحت کوچک در دم رت‌ها یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار گرفته و توسط دستگاه گلوکومتر نوار خوانده شد و اندازه‌گیری گردید و قند خون بین ۱۵۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم/دسی لیتر به‌عنوان معیاری برای اطمینان از ابتلای رت‌ها به دیابت در نظر گرفته شد. برای اطمینان بیشتر از دیابتی شدن موش‌ها و دقت کار از ۱۰ سر موش به‌طور تصادفی خون‌گیری از دم به‌عمل آمد و گلوکز و انسولین و شاخص مقاومت به انسولین آن‌ها اندازه‌گیری شد که اطلاعات آن در جداول یافته‌ها آمده است (۲۴، ۲۵).

**پروتکل مصرف ژل رویال n کروموزومی:** در طی دوره آزمایش به موش‌های گروه ژل رویال، وگروه ژل رویال و تمرین تناوبی شدید، ژل رویال با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۱۰۰ mg/kg) رقیق شده در آب مقطر و به روش گاواژ ۵ روز در هفته برای گروه ژل رویال و تمرین - ژل قبل از شروع تمرین خوراندند. ژل رویال نیز حاوی مقادیر فراوانی ترکیبات فنلی از خانواده فلاونوئیدها است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان کوئرستین، کامفرول، آپیزین و لوتولین را نام برد. ژل رویال آنالیز شده و در دمای منفی ۲۰ و به‌صورت سرد نگهداری شده و هنگام گاواژ طبق دوز لازم با توجه به پروتکل رفرنس‌ها در آب مقطر حل و گاواژ شد (۲۶) و (۲۷).

**آزمون تمرین دویدن با سرعت حداکثر برای تعیین شدت تمرین (MERT (Maximal Exercise Running Test):** برای تعیین سرعت حداکثر از پروتکل

جدول ۲- پروتکل تمرین تناوبی شدید

هفته	شدت گرم کردن	تعداد تناوب شدید	زمان تناوب شدید	سرعت تناوب شدید	زمان تناوب	شدت تناوب	شدت سرد کردن	زمان کل (دقیقه)
اول و دوم	۱۰ متر در دقیقه	۲ تناوب	۲ دقیقه	۸۰٪ سرعت بیشینه (۳۰ متر در دقیقه)	۱ دقیقه	۵۰٪ (۱۶ متر در دقیقه)	۱۰ متر در دقیقه	۱۶
سوم و چهارم	۱۰	۴ تناوب	۲ دقیقه	۸۵٪ (۳۲ متر در دقیقه)	۱ دقیقه	۵۲٪ (۱۸ متر در دقیقه)	۱۰	۲۲
پنجم و ششم	۱۰	۶ تناوب	۲ دقیقه	۹۰٪ (۳۴ متر در دقیقه)	۱ دقیقه	۵۴٪ (۲۰ متر در دقیقه)	۱۰	۲۸
هفتم و هشتم	۱۰	۸ تناوب	۲ دقیقه	۹۵٪ (۳۶ متر در دقیقه)	۱ دقیقه	۵۶٪ (۲۲ متر در دقیقه)	۱۰	۳۴

جدول ۳- پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

Oligo Name Genes	Primer Sequence (5' → 3')	Product size
P53	For: CCCAGGGAGTGCAAAGAGA Rev: CAGCTCTCGGAACATCTCGA	133 bp
GapDh	For: GCCTGGAGAAACCTGCCA Rev: GGAAGAATGGGAGTTGCTGT	137 bp

در این مطالعه ابتدا مطابق برنامه دمایی ذکر شده، واکنش PCR Housekeeping جهت تایید کیفیت ساخت cDNA انجام شد (جدول ۳) پس از تعیین کیفیت cDNA سنتز شده، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن آنتی بادی واکنش PCR انجام شد.

**روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:** داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS22 تجزیه و تحلیل شدند. برای توصیف داده‌ها از آمار توصیفی (میانگین و انحراف استاندارد) استفاده شد. آزمون شاپیرو ویلک جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها و آزمون لوین برای تجانس واریانس‌ها و از آمار استنباطی تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی بن فرونی جهت مقایسه تفاوت بین گروه‌ها و از آزمون تحلیل واریانس دو عاملی و شاخص تعیین اندازه اثر جهت مقایسه میزان تاثیر هر یک از متغیرهای مستقل استفاده گردید. آنالیز آماری ژن P53 با استفاده از نرم‌افزار SPSS22 انجام شد. در اینجا گروه شاهد به عنوان رفرنس سایر گروه‌ها می‌باشد و برحسب این گروه P-Value سایر گروه‌ها به دست آورده شد سطح معنی داری  $p \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

لازم به ذکر است که طرح تحقیق حاضر موفق به اخذ کد اخلاق به شماره ی IR.SSRC.REC.1400.037 از پژوهشگاه تربیت بدنی شد.

شد. گلوکز با استفاده از دستگاه اتو آنالیزر و انسولین توسط کیت مخصوص شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شدند. شاخص مقاومت به انسولین (HOMA-IR) با استفاده از فرمول محاسبه شد (۱۲).

$405 / \text{mg/dl} \times \text{انسولین} (\mu\text{UI/ml}) = \text{مقاومت به انسولین (HOMA-IR)}$

روش بیان ژن P53 بافت کبد: بافت کبد نیز به منظور اندازه‌گیری بیان ژن جدا و بلافاصله توسط ازت مایع به فریزر منفی ۸۰ منتقل شد. مقداری از بافت کبد برای انجام مراحل ریل تایم درون RNA later قرار داده شد و سپس در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد RNA با استفاده از کیت (GeneAll RiboEx Total RNA isolation solution) استخراج شد و در نهایت بررسی کمی و کیفی آن با استفاده از دستگاه نانودارپ و ژل آگارز یک درصد انجام شد. پس از اطمینان از خلوص و کیفیت RNA استخراج شده، cDNA با استفاده از کیت (Script RT cDNA Synthesis Solis BioDyne) ساخته شد و به فریزر منفی ۲۰ انتقال داده شد. سپس برای بررسی ژن P53، پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش توسط نرم افزار Primer3 طراحی شد و توسط شرکت بیوتکنولوژی پیشگام سنتز گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۳ آورده شده است.



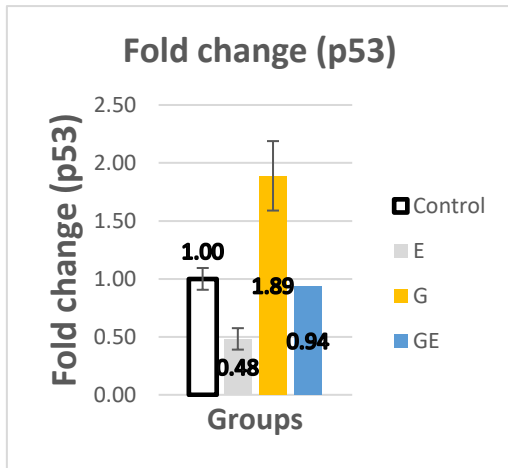
## یافته‌ها

میانگین وزن موش‌های مورد مطالعه در جدول ۴ ارائه شده است.

در جدول ۴ نیز میانگین وزن موش‌ها (گرم) قبل و پس از رژیم پرچرب را نشان می‌دهد. این جدول نشان می‌دهد وزن بعد از اعمال رژیم پرچرب افزایش قابل مشاهده داشته است. اطلاعات توصیفی گلوکز و انسولین و شاخص مقاومت انسولین موش‌ها که پس از خون‌گیری از دم اندازه‌گیری شده نیز در جدول ۴- مشاهده می‌شود که حاکی از دیابتی شدن موش‌ها می‌باشد.

جدول ۵ وزن پس از رژیم پرچرب، وزن پس از هشت هفته، گلوکز، انسولین، HOMA.IR و P53.gen.Fold.cheng را در گروه کنترل، تمرین تناوبی شدید، ژل رویال و گروه ترکیبی تمرین و ژل رویال نشان می‌دهد.

میانگین وزن (گرم) در گروه‌های تجربی تمرین (۳۷۳/۱۲)، ژل رویال (۳۴۴/۵۷) و تمرین - ژل رویال (۳۳۴/۲۵) نسبت به کنترل (۳۱۷) افزایش غیر معنی‌دار داشت. میانگین غلظت گلوکز (میلی‌گرم بر دسی لیتر) در گروه تمرین (۱۳۸/۲۵) نسبت به کنترل (۳۳۳/۸۳) کاهش معنی‌دار داشت (C&E. P=۰/۰۰۵) و در گروه تمرین - ژل رویال (۱۳۴) نسبت به گروه ژل رویال (۱۳۱/۵۷) تفاوت معنی‌داری نداشت داشت (G&EG. P=۰/۹۹۲) و در گروه تمرین ژل نسبت به



شکل ۱- بیان ژن p53 را در گروه‌های مختلف

کنترل کاهش معنی‌دار (C&EG. P=۰/۰۰۱) داشت. میانگین غلظت انسولین ( $\mu\text{UI/ml}$ ) در گروه تمرین (۶/۲۲) نسبت به کنترل (۳/۸۹) افزایش معنی‌دار داشت (C&E. P=۰/۰۰۵) و در گروه تمرین - ژل رویال (۵/۱۲) نسبت به گروه ژل رویال (۷/۳۶) تفاوت معنی‌داری نداشت (G&EG. P=۰/۹۹۲) اما گروه ژل رویال نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری داشت؛ و در گروه تمرین ژل رویال نسبت به کنترل افزایش غیرمعنی‌دار داشت. میانگین شاخص مقاومت به انسولین (HOMA) در گروه تمرین (۲/۰۴) نسبت به گروه کنترل (۳/۱۸) و ژل رویال (۲/۳۱) کاهش معنی‌دار داشت (P=۰/۰۴۴) (E&G). میانگین نسبت بیان ژن P53 (Fold cheng) در گروه تمرین (۰/۴۸) نسبت به کنترل (۱) کاهش معنی‌دار و در گروه تمرین - ژل رویال (۰/۹۴) تفاوت

جدول ۴- اطلاعات توصیفی موش‌های صحرایی پس از رژیم پرچرب HFD و القای دیابت با STZ برای تشخیص دیابت نوع دوم

HOMA.IR	انسولین ( $\mu\text{UI/ml}$ )	گلوکز (mg/dl)	وزن پس از چاقی (گرم)	وزن شروع پروتکل (گرم)
۳/۵۶ ± ۱/۴۳	۳/۹۲ ± ۰/۴۹	۳۶۳ ± ۱۲۴/۵	۴۰۹/۰۳ ± ۵۱/۶۹	۱۹۳/۳۴ ± ۱۹/۴۶

جدول ۵- توصیف متغیرهای پژوهش در گروه‌های مختلف

متغیر / گروه	کنترل (۶ سر)	تمرین تناوبی (۸ سر)	ژل رویال (۷ سر)	تمرین و ژل رویال (۸ سر)
وزن پس از رژیم پرچرب (گرم)	۳۸۶/۶۶ ± ۴۸/۴۲	۴۰۷/۳۷ ± ۶۴/۶۴	۴۱۷/۴۲ ± ۳۳/۶۹	۴۲۰/۴۲۰ ± ۵۶/۰۵
وزن پس از هشت هفته (گرم)	۳۱۷ ± ۷۱/۳	۳۷۳/۱۲ ± ۵۴/۲۸	۳۴۴/۵۷ ± ۳۵/۱۷	۳۳۴/۲۵ ± ۳۲/۲۷
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی لیتر)	۳۳۳/۸۳ ± ۳۹/۳۹	۱۳۸/۲۵ ± ۴۰/۰۴	۱۳۱/۵۷ ± ۱۵/۷۴	۱۳۴/۰۰ ± ۱۴/۸۷
انسولین ( $\mu\text{UI/ml}$ )	۰/۵۳ ± ۳/۸۹	۱/۳۵ ± ۶/۲۲	۲/۸۷ ± ۷/۳۶	۰/۸۹ ± ۵/۱۲
HOMA.IR	۰/۳۳ ± ۳/۱۸	۰/۳۵ ± ۲/۰۴	۰/۶۸ ± ۲/۳۱	۰/۳۶ ± ۱/۶۹
P53.gen.Fold.cheng	۱	۰/۴۸ ± ۰/۲۷	۱/۸۹ ± ۰/۸	۰/۹۴ ± ۰/۵۱

جدول ۶- نتایج آزمون تحلیل واریانس یکطرفه

متغیر / آماره	جمع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	معنی داری	نتیجه
وزن	بین گروهها	۳	۴۶۸۱٫۷۸	۱٫۹۲	۰٫۱۵	
	درون گروهها	۲۵	۲۴۳۰٫۷۲			
گلوکز	بین گروهها	۳	۶	۷۱٫۴۴	۰٫۰۰۰۱	**
	درون گروهها	۲۵	۸۸۰٫۸			
انسولین	بین گروهها	۳	۱۴٫۶۱	۵٫۲۶	۰٫۰۰۶	**
	درون گروهها	۲۵	۲٫۷۷			
شاخص مقاومت	بین گروهها	۳	۲٫۶۶	۱۲٫۸	۰٫۰۰۰۱	**
	درون گروهها	۲۵	۰٫۲			
به انسولین	بین گروهها	۳	۲٫۲۹	۹٫۳۵	۰٫۰۰۰۱	**
	درون گروهها	۲۵	۰٫۲۴			
ژن P53	بین گروهها	۳	۶٫۸۸			
	درون گروهها	۲۵	۵٫۶۳			

جدول ۷- نتایج تحلیل واریانس دو عاملی و تعقیبی بنفرونی و نیز اندازه اثر گروهها

متغیر/شاخص آماری	گروه	گروه	گروه	F	Sig.	اندازه اثر	نتایج آزمون تعقیبی
وزن (گرم)	کنترل	تمرین	ژل رویال	۰/۹۴۳	۰/۳۴۱	۰/۰۳۶	P= ۰/۶۲۷
			تمرین*ژل رویال	۰/۳۳۴	۰/۵۶۹	۰/۰۱۳	
				۴/۲۹	۰/۰۴۹	۰/۱۴۷	
گلوکز(میلی گرم بر دسی لیتر)	کنترل	تمرین	ژل رویال	۷۵/۷۰	۰/۰۰۰۱	۰/۷۵۲	C&E. P= ۰/۰۰۰۱
			تمرین*ژل رویال	۸۶/۵۳	۰/۰۰۰۱	۰/۷۷۶	E & EG. P= ۰/۹۹۲
				۷۹/۵۵	۰/۰۰۰۱	۰/۷۶۱	C&EG. P= ۰/۰۰۰۱
انسولین (میکرو واحد بر میلی لیتر)	کنترل	تمرین	ژل رویال	۰/۰۰۵	۰/۹۴۶	۰/۰۰	C&G. P= ۰/۰۰۱
			تمرین*ژل رویال	۳/۶۲	۰/۰۶۹	۰/۱۲۷	
				۱۳/۴۵	۰/۰۰۱	۰/۳۵۰	
شاخص مقاومت به انسولین	کنترل	تمرین	ژل رویال	۲۶/۲۳	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰۱	C&E. P= ۰/۰۰۱
			تمرین*ژل رویال	۱۲/۷۸	۰/۱۶۷	۰/۰۰۱	C&G. P= ۰/۰۰۱
				۲/۲۶	۰/۳۹۴	۰/۱۴۵	E&EG. P= ۰/۰۰۱
بیان ژن P53 (Fold Cheng)	کنترل	تمرین	ژل رویال	۱۵/۴۹	۰/۰۰۱	۰/۳۹۲	C&E. P= ۰/۰۵۳
			تمرین*ژل رویال	۱۱/۷۵	۰/۰۰۲	۰/۳۲۹	G&EG. P= ۰/۰۰۲
				۰/۹۸۱	۰/۳۳۲	۰/۰۳۹	G&E. P= ۰/۰۰۱

تمرین و ژل رویال EG، ژل رویال G، تمرین E، کنترل C

کبدی کاهش داد اما در گروه ژل افزایش معنی دار داشت و در گروه تعاملی کاهش بیان مشاهده شد. اولین مدرک مرتبط با p53 و ابتلا به دیابت نوع ۲ در سال ۲۰۰۹ منتشر شد، زمانی که مینا مینو و همکارانش نشان دادند مهار فعالیت P53 بوسیله حذف siRNA در سلولها و یا بوسیله حذف ژن TP53 در موش ها، حساسیت را افزایش داده و باعث کاهش بیان سایتوکاین های التهاب زا در بافت چربی موش ها می شود و بطور مناسبی از توسعه مقاومت به انسولین آن ها جلوگیری می کند.

سلولهای بتا لوزالمعده مسئول ترشح انسولین در جریان خون هستند. این با تحریک جذب گلوکز سطح

معنی داری نداشت و در گروه ژل رویال (۱/۸۹) نسبت به کنترل افزایش معنی دار داشت. نتایج ضریب همبستگی نیز بین تغییرات شاخص مقاومت به انسولین و بیان ژن P53 در گروههای تجربی معنی دار نبود.

## بحث

یافته های پژوهش حاضر نشان داد که تمرین تناوبی شدید و ژل رویال منجر به کاهش معنی دار گلوکز و افزایش انسولین و کاهش معنی دار مقاومت به انسولین موش های دیابتی نوع دوم تغذیه شده با رژیم پر چرب گردید و بیان ژن سرکوبگر تومور و مرتبط با چاقی P53 را در گروه تمرین تناوبی نسبت به کنترل در بافت

جدول ۸- نتایج ضریب همبستگی

متغیر	P53.HIIT	P53.Royal.Jelly	P53.HIIT.Royal.Jelly
HOMA.HIIT	r = -0,467	r = 0,09	r = -0,39
	Sig = 0,244	Sig = 0,85	Sig = 0,52
HOMA.Royal.Jelly	r = 0,31	r = 0,14	r = 0,62
	Sig = 0,48	Sig = 0,78	Sig = 0,13
HOMA.HIIT.Royal.Jelly	r = -0,3	r = -0,33	r = -0,24
	Sig = 0,46	Sig = 0,51	Sig = 0,59

انسولین ایجاد می‌شود که بسیار مهم است (مینامینو و همکاران ۲۰۰۹). پیری با واسطه P53 در بافت چربی با افزایش بیان p21 / Cdkn1A و سیتوکین‌های پیش التهابی و همچنین کاهش بیان سیتوکین‌های ضد التهابی ارتباط دارد. این گروه نشان داد که بیان بیش از حد p53 مخصوص بافت چربی با تنظیم بیان آنزیم‌های گلوکونئوزنیک به روش پاراکرین بر عملکرد کبد تأثیر می‌گذارد. بعداً همان گروه دریافتند که التهاب مزمن با واسطه p53 در بافت چربی منجر به نارسایی قلبی می‌شود و این نشان‌دهنده ارتباط بین مقاومت به انسولین / دیابت و بیماری‌های قلبی عروقی است (Shimizu و همکاران ۲۰۱۲). (۳۱). چندین مطالعه نشان داده است که p53 مسیرهای متابولیسمی اولیه را هم به‌عنوان بخشی از نقش ضد توموری و هم به‌عنوان پروتئینی مسئول حفظ هموستاز گلوکز تنظیم می‌کند (وانگ و همکاران، ۲۰۱۳). در یک مطالعه تحقیقاتی، جوندگانی که با رژیم غذایی پرچرب، ساکارز بالا تغذیه می‌شدند و یا با چاقی همراه بودند، میزان فراوانی پروتئین p53 در کبد افزایش یافت، در حالی که AMPK و SIRT1 تنظیم منفی داشتند (ویلا و همکاران، ۲۰۱۴؛ نلسون و همکاران، ۲۰۱۲). بیان بیش از حد p53 باعث کاهش فراوانی SIRT1 می‌شود و توانایی متفورمین برای فعال کردن AMPK و کاهش تری‌گلیسیریدهای سلولی محدود می‌کند. اینها یافته‌ها حاکی از وجود یک رابطه متقابل بین سیگنالینگ AMPK-SIRT1 کبدی و پروتئین p53 در شرایط مصرف مواد مغذی اضافی و در پاسخ به متفورمین وجود دارد (۳۲). نقش P53 در ایجاد مقاومت به انسولین در کبد در بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) نیز نشان داده شده است. ناهنجاری‌های کبدی مانند استئاتوز کبدی و استئو هپاتیت غیر الکلی

گلوکز در گردش خون را کاهش می‌دهد (Cnop و همکاران ۲۰۰۵). از دست دادن عملکرد سلول‌های بتا در پانکراس، ترشح انسولین را کاهش می‌دهد و منجر به افزایش قند خون و دیابت می‌شود. مسیرهای متعدد سیگنالینگ برای تنظیم عملکرد سلول‌های بتای لوزالمعده بر روی p53 جمع می‌شوند. همچنین ژن P53 ناقل‌های گلوکز را تنظیم می‌کند. حفظ عملکرد مناسب ناقلین گلوکز در هموستاز گلوکز و سرکوب دیابت بسیار حیاتی است (Shepherd & Kahn 1999). P53 با تأثیرگذاری بر رونویسی و انتقال آن‌ها، عملکرد ناقلین گلوکز را تنظیم می‌کند (Kawauchi et al. 2008). گلدشتاین و همکاران دریافتند ژن P53 به طور منفی گلیکولیز را تنظیم می‌کند. P53 با تنظیم مستقیم تخریب (گلیکولیز) و سنتز (گلوکونئوزن) بر سطح گلوکز تأثیر می‌گذارد. همچنین ژن P53 به طور مثبت گلوکونئوزن را تنظیم می‌کند. مطالعات اخیر در مورد گلوکونئوزن، راهی مستقیم برای p53 برای افزایش سطح گلوکز کشف کرده است. علاوه بر این، این گروه دریافتند که p53 فعال باعث افزایش تولید گلوکز کبدی در سلول‌های HepG2 و سلول‌های کبدی موش در محیط گلوکونئوزن می‌شود (گلدشتاین و همکاران ۲۰۱۳). القای آنزیم‌های گلوکونئوزنیک با واسطه P53 در کبد نیز در مدل موش تراریخته ay منجر به چاقی و دیابت شد که ارتباط فیزیولوژیکی گلوکونئوزن تنظیم شده با p53 در ایجاد دیابت را نشان می‌دهد (مینامینو و همکاران ۲۰۰۹). به خوبی شناخته شده است که افزایش بیان و فعالیت p53 در سلول‌های چربی موش‌های چاق اتفاق می‌افتد (Yahagi et al. 2003). در موش‌های تراریخته Ay که با رژیم غذایی پرچرب / ساکارز تغذیه می‌شوند، پیری با واسطه p53 در بافت چربی با ایجاد فنوتیپ‌های دیابت مانند و مقاومت به

آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آن انجام تمرینات تناوبی می‌توان اثر بخشی آن را از طریق کاهش بیشتر بیان ژن P53 بهبود بخشد. سرکوب تولید گلوکز کبدی توسط همراه با کاهش بیان ژن P53 می‌تواند به طور مؤثر دیابت را بهبود بخشد برای درمان آن مورد سوء استفاده قرار گیرد (۳۸،۳۹).

ژل رویال نیز حاوی مقادیر فراوانی ترکیبات فنلی از خانواده فلاونوئیدها است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان کوئرستین، کامفرول، آپیزنین و لوتولین را نام برد (۴۰). فلاونوئیدها از چند جهت بر دیابت تأثیر می‌گذارند، این ترکیبات موجب تنظیم متابولیسم کربوهیدرات و لیپید و کاهش هیپرگلیسمی، دیس لیپیدمی و مقاومت به انسولین می‌شوند و از استرس اکسیداتیو و پاسخ های التهابی ممانعت می‌کنند. فلاونوئیدها (به‌خصوص کوئرستین) از کاهش وزن در دیابت نیز جلوگیری می‌کنند (۴۱،۴۲) بنابراین ممکن است ژل رویال با محتوای فلاونوئیدی خود از کاهش وزن موش‌های دیابتی در مطالعه حاضر جلوگیری کرده باشد و حتی افزایش غیر معنی دار وزن هم در گروه تمرین و ژل رویال داشتیم و در گروه تمرین هم احتمالاً به دلیل افزایش اشتها در نتیجه افزایش فعالیت هورمون‌ها و نروپپتاید های اشتها در نتیجه انجام فعالیت‌های ورزشی میزان و رفتار دریافت غذا توسط موش‌ها افزایش یافته و احتمالاً گروه تمرین و نیز ژل رویال بیشتر غذا مصرف می‌کردند که لازم است در پژوهش‌های آتی و تکمیلی هورمون‌ها و نروپپتاید های مرتبط با چاقی و اشتها اندازه گیری و ارتباط سنجی شود و نیز میزان غذای مصرفی هر یک از موش‌ها به طریقی اندازه گیری شود که جزو محدودیت‌های این پژوهش بود. آپی ژنین و کوئرستین استرس اکسیداتیو ناشی از استرپتوزوتوسین را در سلول‌های بتا، کبد و کلیه مهار می‌کنند و رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهند (۴۳،۴۴) آپیزنین و کامفرول اثر هیپوگلیسمیک در رتهای دیابتی دارند و می‌توانند گلوکز ناشتا را کاهش دهند که در این پژوهش هم این نتیجه مشاهده شد (۴۵). ژل رویال با خاصیت قوی آنتی‌اکسیدانی، در برابر گونه‌های فعال اکسیژن نظیر رادیکال هیدروکسیل و آنیون سوپراکسید مبارزه می‌کند (۴۶) و به میزان قابل توجهی موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و

(NASH) می‌تواند به فیروز، سیروز و سرطان سلولهای کبدی منجر شود. بیماری NAFLD به دلیل تجمع تری گلیسیرید کبدی با افزایش سطح اسیدهای چرب آزاد در گردش، به مقاومت به انسولین مرتبط است. هر دو این عوامل باعث تشدید وضعیت التهاب و در نهایت تشکیل یک چرخه معیوب می‌شود. نقش P53 برای القا سمیت سلولی که باعث تشدید آسیب کبدی در مدل‌های مختلف موش NAFLD تایید شد. در مطالعه دیگری تأثیر P53 بر روی آپوپتوز بررسی شد، مکانیزمی اساسی که باعث حذف سلولهای کبدی در NAFLD می‌شود نشان داد مقدار P53 به شدت به استئاتوز کبد بستگی داشت و در نتیجه به التهاب مرتبط بود. در حالی که تنظیم مجدد P53 با کاهش تنظیم ضد آپوپتوز Bcl-2 همراه بود (۳۳).

مطالعات نشان داده است که روش‌های مختلف تمرینی، تأثیر مثبتی بر حساسیت به انسولین، کنترل گلیسمی و سایر عوامل خطر مرتبط با دیابت نوع دو دارد. به خوبی نشان داده شده است که تمرین ورزشی، حتی تمرین حاد، می‌تواند حساسیت به انسولین در عضله موش‌های چاق را بهبود بخشد. ورزش هوازی باید یکی از ویژگی‌های کلیدی برنامه‌های تمرینی در دیابت نوع دو باشد. با اینکه اثربخشی و مقرون به صرفه بودن ورزش برای پیشگیری دیابت نوع دو به خوبی شناخته شده است. در رابطه به مکانیزم‌های سلولی مولکولی برای افزایش برداشت گلوکز توسط انسولین با تمرین ورزشی می‌توان گفت ممکن است این کار تا حدودی به افزایش بیان و فعالیت پروتئین‌های کلیدی شناخته شده برای تنظیم متابولیسم گلوکز در عضلات و کبد مرتبط باشد (۳۴،۳۵،۳۶،۳۷).

بنابراین نتایج پژوهش حاضر نیز که کاهش معنی دار بیان ژن P53 را در بافت کبد در گروه تمرین تناوبی شدید نشان می‌دهد و همچنین کاهش بیان این ژن در گروه تعاملی تمرین تناوبی - ژل رویال از این مباحث حمایت می‌کند و می‌تواند اثر گذاری انجام تمرین تناوبی را بر کاهش بیان ژن P53 بافت کبدی بر طبق مسیرهای تنظیمی اشاره شده نشان دهد ولی در گروه ژل رویال تنها، کاهش معنی داری در بیان این ژن مشاهده نشد که می‌توان استنباط کرد در هنگام استفاده از ژل رویال جهت استفاده از خواص دارویی و

ورزشی هوازی از نوع تمرینات تناوبی می تواند اثر بخشی آن را بهبود بخشد با این وجود انجام مطالعات بیشتر و تکمیلی در این زمینه ضروری می باشد.

### تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از رساله دکتری بود و با کد اخلاق IR.SSRC.REC.1400.037 در کمیته اخلاق پزشکی پژوهشگاه تربیت بدنی وزارت علوم تایید شد. از تمام همکاران پژوهشی و پرسنل آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می شود.

### References

1. Shokrolahi Ardakani A, Abednatanzi H, and et al. The Effect of Resistance Training on G6Pase Gene Expression in Liver Hepatocytes, Glucose and Insulin Resistance Levels in Type 2 Diabetic Rats. Iran J Diabetes Obes. 2020;12(14).
2. Chahardoli M, Mahmoodi M, Hajizadeh M, Khoramdel Azad H, Khoshdel A, Mirzaei M. Effect of Aloe Vera Hydroalcoholic Extract on Blood Glucose, Serum Insulin and the Key Enzymes in Metabolic Pathways of Glycolysis and Gluconeogenesis in Hepatocytes of Type 1 Diabetic Rats. JRUMS. 2015;13(8):669-682 (Persian).
3. jabbari E, gholami M, Nikbakht H, shakeri N, ghazaliyan F. Effect of aerobic training and L-carnitine supplementation on some apoptotic factors in diabetic rat liver. Razi J Med Sci. 2019;26(7):131-140.
4. Doustar, Y. Mohajeri, D. Rezaei, A. Effects of grape seed extract on heart cells apoptosis in streptozotocin induced diabetic rats. Med Sci J Islam Azad Uni. 2012;21(3):168-74.
5. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A. Myocardial cell death in human diabetes. Circ Res. 2000;87:1123-32.
6. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. J.Gastroen. Hepatol. 2000;15:718-24.
7. Mirdar Harijani Sh, Musavi N, Hamidian Gh. Effect of endurance swimming training during pregnancy on histology and apoptotic index of rats' liver. ISMJ. 2015;18(1):54-63.
8. Godin G, Desharnais R, Valois P, Lepage L, Jobin J, Bradet R. Differences in perceived barriers to exercise between high and low intenders: observations among different populations. Am J Health Prom. 1994;(8)4:279-285.
9. Khajehlandi A, Abed Natanzi H, Nikbakht H. The Effect of Swimming Training and Aloe Vera Extract on Lipid Profile of Male Diabetic Rats. J Isfahan Med School. 2017; 34(411).

افزایش آنتی اکسیدانها در بافت پانکراس بیماران دیابتی تیپ ۲ می شود که با توجه به مطالب ذکر شده، بخشی از این اثرات احتمالاً به علت وجود فلاونوئیدها در ژل رویال ایجاد شده است. اثر هیپوگلیسمیک ژل رویال را به ویتامین های موجود در آن نیز می توان نسبت داد (۴۷،۴۸). مطالعات نشان داده است که ویتامین های E،D،C،B، بیوتین و نیاسین به فراوانی در ژل رویال یافت می شود. ویتامین C سطح گلوکز سرم را در دیابت نوع دو کاهش می دهد (۴۹) و در بسیاری از واکنش های شیمیایی به صورت رقابتی جانشین گلوکز می شود و از گلیکوزیلاسیون پروتئین ها به خصوص هموگلوبین و لیپوپروتئین ها ممانعت می کند. ویتامین های B1، B6، B12، D، E، بیوتین و نیاسین نیز عملکرد سلول های بتا را تقویت می کنند و با تحریک تولید گلیکوژن و مهار گلوکونئوز، سطح گلوکز را در بیماران مبتلا به دیابت کاهش می دهد. (۵۰)؛ بنابراین بخشی از نقش مصرف ژل رویال بر کاهش گلوکز را می توان به ترکیبات ویتامینی موجود در آن نسبت داد.

### نتیجه گیری

به طور کلی با توجه به نتایج تحقیق می توان نتیجه گرفت که تمرینات تناوبی و همینطور در تعامل با ژل رویال می تواند باعث کاهش بیان ژن P53 گردد و در بهبود سطوح گلوکز بواسطه تاثیر مولفه های ژنتیکی مؤثر در رهایی گلوکز کبدی و در بیماران دیابتی نوع دو مؤثر می باشد هر چند نتایج نشان داد ضریب همبستگی نیز بین تغییرات شاخص مقاومت به انسولین و بیان ژن P53 در گروه های تجربی معنی دار نبود. ژل رویال هم بدلیل ترکیبات متنوع ویتامینی و پروتئینی و ترکیبات فنلی و جایگزین خوب برای نقش گلوکز و نیز نقش های متعدد آنتی اکسیدانی و ضد التهابی و ... موجب تنظیم متابولیسم کربوهیدرات ها بویژه گلوکز و نیز تنظیم متابولیسم لیپید و کاهش هیپرگلیسمی و دیس لیپیدمی و کاهش مقاومت به انسولین می شوند و از استرس اکسیداتیو و پاسخ های التهابی افراد دیابتی نوع دو که دیابت مرتبط با ورزش و معمولاً همراه با اضافه وزن و چاقی نیز می باشد ممانعت می کنند اما مصرف ژل رویال به تنهایی نمی تواند در این زمینه ها و تغییرات ژن P53 مؤثر باشد و استفاده از برنامه های تمرینی



10. Shapiro K, Gong WC. Natural products used for diabetes. *J Am Pharmacol Assoc.* 2002;42:217-26.
11. Khajehlandi A, Abed Natanzi H, Nikbakht H. The Effect of Swimming Training and Aloe Vera Extract on Lipid Profile of Male Diabetic Rats. *J Isfahan Med School.* 2017;34(411). [Persian].
12. Yeylaghi Ashrafi M R, Abednatanzi H, Ghazalian F. The effect of eight weeks of high intensity interval training and n-chromosomal royal jelly on G6Pase gene expression in hepatocytes, glucose levels and insulin resistance in type 2 diabetic rats. *Razi J Med Sci.* 2020;27(8). [Persian].
13. Khazaei M, Ansarian A, Ghanbari E. New findings on biological actions and clinical applications of royal jelly: a review. *J Diet Suppl.* 2018;15(5):757-75.
14. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci.* 2008;73(9):117-24.
15. Izuta H, Chikaraishi Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Evid-Based Complement Altern Med.* 2009;6(4):489-94.
16. 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;26:9(4).
17. Nagai T, Inoue R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chem.* 2004;84(2):181-6.
18. Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: a review. *J Funct Foods.* 2012;4:39-52.
19. Shidfar F, Jazayeri Sh, Musavi SN, Malek M, and et.al. Does Supplementation with Royal Jelly Improve Oxidative Stress and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients? *Iran J Public Health.* 2015;44(6):797-803.
20. Nomura M, Maruo N, Zamami Y, Takatori S, Kawasaki H. Effect of long-term treatment with royal jelly on insulin resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Yakugaku zasshi: J Pharm Soc Jpn.* 2007;127(11):1877-82.
21. Kung CP, Leu JI, Basu S, et al. The P72R Polymorphism of p53 Predisposes to Obesity and Metabolic Dysfunction. *Cell Rep.* 2016;14(10):2413-2425.
22. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, et al. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* 2006 Aug 8;79(11):1100-1107.
23. Gheibi S, Bakhtiari Zadeh F, Ghasemi A. A review of the high-fat diet model - Streptozotocin for type 2 diabetes in rats. *Journal of Endocrinology and Metabolism of Iran. Shahid Beheshti Univ Med Sci Health Serv.* July 2016;18(2):135-148. [Persian].
24. Aghanouri Z, Nouredini M, Salami M. Effect of *Citrullus Colocynthis* on diabetic rat's plasma glucose. *Feyz.* 2009;12(4):1-6. [Persian].
25. Moeini Fard M, Hedayati M. Aluxan and Streptozotocin, Diabetes Research Tool. *J Appl Sports Physiol.* 2014;10(20):13-22. [Persian].
26. Asgari M, Asle-Rousta M, Sofiabadi M, Effect of Royal Jelly on Blood Glucose and Lipids in Streptozotocin Induced Type 1 Diabetic Rats. *Arak Med Uni J.* 2017;20(122):48-56.
27. Baburao Waykar B. and Alqadhi YA, Administration of Honey and Royal Jelly Ameliorate Cisplatin Induced Changes in Liver and Kidney Function in rats. *Biomed Pharmacol J.* 2018;11(4):2191-2199.
28. Rodrigues B, Figueroa DM, et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in Streptozotocin -diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2007;6:38
29. Akbarzadeh A, Fattahi bafghi A. The effect of high intensity interval training combined with curcumin supplementation on Plasma glucose concentration and insulin resistance in diabetic rats. *JSSU.* 2018;25(12):961-969 [Persian].
30. Rezaei R, Norshahi M, Bigdeli MR, Khodaghali F, Haghparast. A, Effect of eight weeks of continuous and interval intense aerobic exercise on VEGFR-2 and VEGF-A values in the brain tissue of wistar rats. *Journal of Exercise Physiology and Physical Activity. Physiol Exerc Physic Act.* 2015;8(2):1213-1221. [Persian].
31. Kung CP, Murphy ME. The role of the p53 tumor suppressor in metabolism and diabetes. *J Endocrinol.* 2016 Nov;231(2):R61-R75.
32. Murtaza, I. P53 transcription factor and diabetes: Is there any link? *JAB* 2016, 9, 1825-1833.
33. Strycharz J, Drzewoski J, Szmraj J, Sliwiska A. Is p53 involved in Tissue-Specific Insulin Resistance Formation? *Oxid Med Cell Longev.* 2017;9:270549.
34. Wu H, Deng X, Shi Y, Su Y, Wei J, Duan H. PGC-1 $\alpha$ , glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol.* 2016;229(3):R99-R115.
35. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature.* 2001;413(6852):131.
36. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Comprehens Physiol.* 2014;4(1):177.
37. Aoi W, Ichiishi E, Sakamoto N, Tsujimoto A, Tokuda H, Yoshikawa T. Effect of exercise on hepatic gene expression in rats: a microarray analysis. *Life Sci.* 2004;75(26):3117-28.
38. Sharabi K, Lin H, Tavares CD, Dominy JE, Camporez JP, Perry RJ, et al. Selective chemical

inhibition of PGC-1 $\alpha$  gluconeogenic activity ameliorates type 2 diabetes. *Cell*. 2017;169(1):148-60. e15.

39. Way KL, Hackett DA, Baker MK, Johnson NA. The effect of regular exercise on insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *J Diabetes Metab*. 2016;40(4):253-71.

40. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*. 2008;73(9):117-24.

41. Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;1-29.

42. Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, De Nigris V, Ceriello A. The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complic. *Nutr*. 2016;8(5):310.

43. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res*. 2005;51(2):117-23.

44. Rauter AP, Martins A, Borges C, Mota-Filipe H, Pinto R, Sepodes B, et al. Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res*. 2010;24(S2):S133-8.

45. De Sousa E, Zanatta L, Seifriz I, Creczynski-Pasa TB, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, Silva FR. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3, 7-O-( $\alpha$ -dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. *J Nat Prod*. 2004;67(5):829-32.

46. Nagai T, Inoue R, Suzuki N, Nagashima T. Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly. *J Med Food*. 2006;9(3):363-7.

47. Amirshahi T, Nejati V, Najafi G. Biochemical and Histological Evaluation of Protective Effect of Royal Jelly on Pancreas-Induced Oxidative Stress in Male Rat Pancreas. *J Mazandaran Uni Med Sci*. 2013;23(107).

48. Afkhami-Ardekani M, Shojaoddiny Ardekani A. Effect of vitamin C on blood glucose, serum lipids & serum insulin in type 2 diabetes patients. *Indian J Med Res*. 2007;126(5):471.

49. Dakhale GN, Chaudhari HV, Shrivastava M. Supplementation of vitamin C reduces blood glucose and improves glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind study. *Adv Pharmacol Sci*. 2011;1-5.

50. Xiang X, Liu Y, Zhang X, Zhang W, Wang Z. Effects of biotin on blood glucose regulation in type 2 diabetes rat model. *J Hyg Res*. 2015;44(2):185-9.