Archive of SID

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:29 IRST on Sunday September 29th 2019

دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وهفتم – شماره ۱۴۱
تیر ۱۳۹۸

تأثیر مکمل یاری عصاره مرزنجوش با و بدون تمرین ورزشی بر بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم c در میوکارد موش‌های صحرایی نر

نویسندگان: جبار بشیری[1*]، حسن‌پور رضی[2]

۱. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲. استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم اجتماعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

* نویسنده مسئول: جبار بشیری **E-mail: jabbar@gmail.com**

دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۷
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۸/۰۳/۲۶
پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۰۲

چکیده

مقدمه و هدف: آپوپتوز نقش بسیار مهمی در پاتوژنز انواع بیماری‌های قلبی-عروقی به ویژه نارسایی قلبی بازی می‌کند؛ بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر مکمل‌یاری عصاره مرزنجوش با و بدون تمرین ورزشی بر بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم c در میوکارد موش‌های صحرایی نر انجام گردید.

مواد و روش‌ها: نوزده موش صحرایی نر سه‌ماهه به شکل تصادفی در سه گروه کنترل (n=۵)، مکمل مرزنجوش (n=۷) و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی (n=۷) جایگزین شدند. طی سه ماه پژوهش، دو گروه مکمل مرزنجوش و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی مقدار ۱ گرم/کیلوگرم وزن بدن از مکمل مرزنجوش را دریافت کردند. همچنین، گروه مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی به مدت ۱۲ هفته در برنامه‌ی تمرین ورزشی شرکت کرد. چهل و هشت ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، عضله قلبی موش‌های صحرایی استخراج و میزان بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم c با استفاده از روش Real Time-PCR بررسی شد. داده‌های حاصله توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند (p<۰/۰۵).

نتایج: بیان ژن p53 در گروه مکمل مرزنجوش و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی به طوری غیر معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود (به ترتیب ٪۲۱ و ٪۲۸؛ p>۰/۰۵). در حالی که بیان ژن سیتوکروم c در گروه مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود (٪۶۲؛ p<۰/۰۱).

نتیجه‌گیری: در کل، ۱۲ هفته مکمل‌یاری عصاره مرزنجوش تأثیری بر بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم c در میوکارد موش‌های صحرایی نر نداشت. با این حال، اضافه شدن تمرین ورزشی به مکمل‌یاری مرزنجوش، بیان ژن سیتوکروم c را به طور قابل توجهی کاهش داد.

واژگان کلیدی: عصاره مرزنجوش، تمرین ورزشی، ژن p53، ژن سیتوکروم c، عضله قلب.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:29 IRST on Sunday September 29th 2019

مقدمه

مهارکننده‌ها یا سرکوب‌گرهای تومور یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های سلولی برای کنترل همئوستاز و نیز تعداد و رفتار سلول‌ها در اغلب بافت‌های موجود زنده به شمار می‌روند. این سرکوب‌گرها معمولاً از طریق تنظیم یک یا چند فرآیند کنترل‌کننده‌ی زایش و تکثیر نابجای سلولی، عمل می‌کنند (۳-۱). در این بین، ژن مهارکننده تومور یا p53 که به عنوان "نگهبان ژنوم" نیز شناخته می‌شود، یکی از مهمترین سرکوب‌گرهای تومور به شمار می‌رود به نحوی که در سال ۱۹۹۳ به عنوان "مولکول سال" گزینش شده است (٤). برخی از شواهد و مدارک حاکی است که پروتئین p53 از طریق القای فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز باعث مرگ سلول و ممانعت از تکثیر سلولی می‌شود. آپوپتوز القا شده توسطp53 از طریق دو سازوکار "وابسته به رونویسی" و "مستقل از رونویسی" صورت می‌گیرد (۳، ۵). در سازوکار وابسته به رونویسی، p53 برای مجموعه‌ای از پروتئین‌های پروآپوپتوزی از خانواده Bcl-2 (Bax، Bid و...) به عنوان عامل رونویسی عمل می‌کند که موجب افزایش بیان این پروتئین‌ها و در نهایت القای نفوذپذیری میتوکندریایی و آزاد شدن سیتوکروم c می‌شود (۵). p53 در مسیر مستقل از رونویسی، به طور مستقیم میتوکندری را هدف قرار می‌دهد و با مهار اثر پروتئین‌های آنتی آپوپتوزی، نفوذپذیری میتوکندریایی و آزاد شدن سیتوکروم c را افزایش می‌دهد (۳). با این حال، اگرچه در شرایط پاتولوژیک مانند بروز انواع سرطان‌ها، این روند می‌تواند به سرکوب تومور و حذف سلول‌های بافت سرطانی کمک نماید، اما تشدید و فعال‌سازی مزمن این مسیر بیولوژیک کلیدی به ویژه در بافت‌های سوماتیک مانند مغز، عضله اسکلتی و قلبی حتی در افراد جوان و میانسال می‌تواند نامطلوب باشد (۱، ۲). در این بین، به دلیل ظرفیت بسیار محدود سلول‌های قلبی در پاسخ به آسیب و باززایی، آپوپتوز یکی از مهمترین عوامل ایجاد بیماری قلبی به ویژه نارسایی قلبی است. Favaloro و همکاران (۲۰۱۲) اشاره داشتند که میزان تقریبی آپوپتوز در بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی احتقانی، بین ۰/۲۵-۰/۰۸ درصد است. همچنین، این پژوهشگران عنوان داشتند که تنها افزایش ۰/۰۲۳ درصدی آپوپتوز در سلول‌های قلبی موش، موجب بروز کاردیومیوپاتی احتقانی پس از دو تا شش ماه شد (٦). فعال‌سازی ژن p53 و افزایش رهایش سیتوکروم c در پاسخ به عوامل مختلفی از استرس سلولی مانند آسیب DNA، هیپوکسی شدید، پیری سلولی و فشارهای اکسایشی بالا مشاهده می‌شود (۷). در این راستا، فشار اکسایشی ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن یکی از مهمترین و شناخته‌ترین عواملی است که می‌تواند موجب آسیب ترمیم نشده DNA و فعال‌سازی ژن p53 و القای آپوپتوز قلبی شود (٦). لذا، در دهه‌های اخیر محققان همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسبی برای حمایت از قلب در مقابل استرس اکسایشی و بروز آپوپتوز شدید و نابجا و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن هستند. در این میان، استفاده از مداخلات غیر دارویی و کاربردی همچون استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدان طبیعی و تمرینات ورزشی منظم توجه محققان را به خود جلب کرده است. مرزنجوش با نام علمی Origanum Vulgare یکی از گیاهان خانواده نعنائیان است که به عنوان یکی از مهمترین و پرفروش‌ترین گیاهان ادویه‌ای و دارویی در جهان به شمار می‌رود (۸). مطالعات فارماکولوژیکی نشان داده‌اند که پتانسیل بالای آنتی اکسیدانی مرزنجوش به دلیل وجود مونوترپن‌های فنولی نظیر تیمول، کارواکرول و برخی دیگر از ترکیبات فنولی مانند اریگانوزاید است (۱۳-۹). Vujicic و همکاران (۲۰۱۵) اشاره داشتند که مصرف عصاره مرزنجوش علاوه بر افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی، دارای تأثیرات ضدالتهابی و ضدآپوپتوزی در موش‌های دیابتی نوع یک شد (١٤). در حالی که Balusamy و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که مصرف مرزنجوش موجب القای آپوپتوز از طریق افزایش بیان پروتئین Bax و کاهش بیان پروتئین Bcl-2 در ردیف سلول‌های سرطانی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:29 IRST on Sunday September 29th 2019

معده شد (۱۵). با این حال مکانیسم دقیق اثرگذاری مکمل مرزنجوش بر فرآیند آپوپتوز و پروتئین‌های درگیر در این فرآیند آن هم در بافت بسیار حساس قلب چندان مشخص نیست. از طرفی، شواهد و مدارک حاکی از آن است که تمرینات ورزشی منظم با شدت متوسط نیز می‌توانند با ایجاد سازگاری‌های سلولی باعث تقویت سیستم آنتی اکسیدانی سلولی و کند شدن روند آپوپتوز قلبی شود. با این حال، اثر این مکمل آنتی اکسیدانی مهم همراه با انجام تمرینات ورزشی طولانی‌مدت کمتر مورد توجه قرار گرفته است و بر اساس بررسی‌های انجام شده تحقیقات بسیار اندکی در این خصوص انجام شده است و تاکنون این مطالعه اولین پژوهش داخلی است که تأثیر عصاره مرزنجوش را همراه با تمرین ورزشی بر شاخص‌های مهم آپوپتوز قلبی مورد بررسی قرار می‌دهد. لذا، پژوهش حاضر به دنبال آن است که تأثیر ۱۲ هفته مکمل‌یاری عصاره مرزنجوش با و بدون تمرین ورزشی را بر بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم c در میوکارد موش‌های صحرایی نر مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی: مطالعه حاضر در قالب یک طرح تجربی چند گروهی با گروه کنترل انجام شد. با توجه به شرایط مناسب مدل حیوانی برای مطالعه‌ی حاضر، ۱۹ موش صحرایی نر دوماهه ویستار ۱٤۸٤۸ از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید - دما (۲±۲۲ سانتی‌گراد)، رطوبت محیط (۵±۵۰ درصد) و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲: ۱۲ ساعته - در حیوانخانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز نگهداری شدند. طی این دوره، تمامی موش‌های صحرایی به صورت آزادانه از غذای استاندارد حیوانی (پلت) و آب استفاده می‌کردند. لازم به ذکر است که نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شده است. همچنین تمامی اعمال انجام شده روی حیوانات، مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی بود. همچنین کد اخلاق در پژوهش از کمیته اخلاق علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز اخذ شد (IR.IAU.TABRIZ.REC.124). موش‌ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی به سه گروه کنترل (n=۵)، مکمل مرزنجوش (n=۷) و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی (n=۷) جایگزین شدند.

روش تهیه عصاره مرزنجوش و پروتکل مکمل‌یاری

ابتدا برگ و سرشاخه‌های جوان گیاه مرزنجوش در سایه خشک شدند. سپس، نمونه خشک شده گیاه توسط دستگاه خوردکننده پودر شد. ۱۰۰ گرم از پودر گیاه درون ارلن یک لیتری ریخته شد و به آن الکل اتیلیک ۰/۹٦ و آب مقطر به نسبت ۱ به ۱ اضافه گردید، به گونه‌ای که به حجم برسد. درب ارلن با ورق آلومنیومی پوشانده و به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شد. طی ۲٤ ساعت، هر دو ساعت یکبار با یک همزن شیشه‌ای، محتوای ارلن مخلوط گردید. بعد از اتمام مدت مورد نظر، محلول صاف شد. سپس محلول صاف شده توسط دستگاه تقطیر در خلاء در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۷۰ دور در دقیقه تا یک سوم حجم اولیه تغلیظ گردید. برای تعیین ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره تهیه‌شده، مقدار ۱۰ میلی‌گرم از نمونه مورد نظر برداشته شده و پس از رقیق‌سازی با حلال اتانول خالص (٪۹۹)، به مدت ۱۵ دقیقه در حمام التراسونیک سونیکه شد و در نهایت آماده تزریق به دستگاه GC/MS گردید. نام و مشخصات ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره مرزنجوش در جدول ۱ ارائه شده است. دو گروه مکمل مرزنجوش و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی مقدار ۱ گرم/کیلوگرم وزن بدن از مکمل مرزنجوش را به همراه ۹ سی‌سی سالین بعد از اتمام هر جلسه تمرین ورزشی و به مدت ۱۲ هفته از طریق گاواژ دریافت می‌کردند. گروه کنترل نیز حجم معادلی از نرمال سالین را در زمان موردنظر از طریق گاواژ دریافت می‌کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:29 IRST on Sunday September 29th 2019

پروتکل تمرین ورزشی: در ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱٤ روز تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی این دوره، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. آزمودنی‌های گروه مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی برای ۵ روز در هفته (یکشنبه، دوشنبه، سه‌شنبه، پنج‌شنبه و جمعه) و به مدت ۱۲ هفته در برنامه تمرین هوازی روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت کردند (جدول ۲). شدت نسبی کار در سرتاسر برنامه‌ی تمرین معادل ۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (۳۳-۲٤ متر/دقیقه با شیب ٪۱۵) حفظ شد. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته‌ی اول شروع و به ٦۰ دقیقه در روز در هفته‌ی پنجم رسیده و تا انتهای دوره حفظ شد (۱٦).

جراحی و استخراج نمونه: تمامی موش‌های صحرایی پس از اتمام سه ماه دوره پژوهش، توسط روش تنفسی بیهوش و پس از آن بلافاصله توسط متخصصین کارآزموده جراحی و عضله قلبی آنها استخراج و وزن‌کشی شد. سپس نمونه در کرایوتویوب در نیتروژن مایع قرار داده شده و برای بررسی‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد.

جدول ۱. نام و مشخصات ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره مرزنجوش

نام ترکیب	نام لاتین	زمان بازداری	فرمول مولکولی	ترکیب درصد
سایمن	Cymene	۹/۱۲	C10H14	۸/۹۴
اکالیپتول	Eucalyptol	۹/۲۷	C10H18O	۱/۰۲
آلفا ترپینول	Alpha.-Terpineol	۱۲/۵۱	C10H18O	۲/۸۶
تیمول	Thymol	۱۴/۵	C10H14O	۸۸/۵
کاریوفیلن	Caryophyllene	۱۶/۷	C15H24	۶/۲۲
کاریوفیلن اکسید	Caryophyllene oxide	۱۹/۹۸	C15H24O	۲/۶۶

جدول ۲. برنامه ۱۲ هفته تمرین ورزشی روی نوارگردان

	هفته‌های تمرین											
	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم	نهم	دهم	یازدهم	دوازدهم
مدت تمرین (دقیقه در روز)	۱۰	۲۰	۳۵	۴۵	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)	۲۴	۲۴	۲۵	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳
شیب نوارگردان (درصد)	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵

استخراج RNA

برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (ThermoK0731. USA) و با اندکی تغییرات به شرح زیر عمل شد. حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت عضله قلبی در حضور یک میلی‌لیتر لایزز بافر هموژنه شده و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به هرمیکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفروم افزوده شد و میکروتیوب به شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شده و پنج دقیقه در دمای چهار درجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به دقت و بدون تکان دادن تیوب، فاز روئی که حاوی RNA بود، جداسازی گردید و به میکروتیوب دیگر منتقل شده و به محلول جداشده حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و برای ۱۰ دقیقه در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:29 IRST on Sunday September 29th 2019

دمای ۲۰-درجه انکوبه شد. بعد از آن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شده و سپس یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت پنج دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شده، مایع رویی بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. سپس مجدداً در آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) حل شد. پس از استخراج RNA، مقدار و خلوص آن توسط روش اسپکتروفتومتری (Bio-Rad, CA, USA) بررسی شد. همچنین،RNA تام به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید و مشاهده دو باند مشخص ۱۸s و ۲۸s مربوط به RNA ریبوزومی کنترل شد. RNA استخراج شده برای استفاده بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد.

ساخت cDNA

از کیت RevertAID TM First (Fermentas., Canada) Standard cDNA synthesis و طبق دستورالعمل شرکت سازنده بصورت زیر استفاده شد: یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و توسط DEPC-traeted eater به حجم نه میکرو لیتر رسید. یک میکرو لیتر DNase به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن یک میلی‌لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه قرار گرفت. تیوب مربوطه به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱٤۰۰۰g سانتریفیوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردید. به تیوب مربوطه ۱۱ میکرولیتر DEPC-treated water و یک میکرو لیتر oligi (dt) Primer یا Random hexamer Primer افزوده شد و پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. چهار میکرو لیتر reaction buffer 5X و دو میکرو لیتر dNTP 10mM mix و یک میکرو لیتر Ribolock RibonucleaseTranscription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانترفیوژ مختصر، به مدت پنج دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میکرو لیتر آنزیم RverertAid TM H Minus M-MuLV Reverse به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر oligo (dt)، شش دقیقه در ٤۲ درجه و در صورت استفاده از Random hexamer primer، ابتدا پنج دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در ٤۲ درجه انکوباسیون صورت گرفت. واکنش با قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه پایان پذیرفت و نمونه در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد.

Real-time PCR

برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن پروتئین‌های p53 و سیتوکروم c از دستگاه مربوطه Corbett-Rotor gene-6000 (Corbett., ResearchAustralia) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی شده و توسط بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰nm مورد استفاده قرار گرفتند.

پرایمرها

واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ SYBR green I انجام شد. SYBR green طی واکنش Real-time PCr به DNA دو رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند. در جدول ۳ توالی پرایمرهای بیان ژنی برای موش‌های صحرایی مشخص شده است. به عنوان بلانک از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود، استفاده شد و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC water افزوده شد. در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve)، به‌دست‌آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تائید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا، ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن GAPDH به عنوان مرجع محاسبه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:29 IRST on Sunday September 29th 2019

جدول ۳. توالی پرایمرهای بیان ژنی عضله نعلی موش‌های صحرایی

genes	Primer sequence Product	length (bp)
614	F: 5' GGATGTTGCAGAGTTGTTAG 3'	p53
	R: 5' TTTGAGAAGGGACGGAAG 3'	
341	F:5' CGTGCTTCAGTGTGTGTA 3'	Cytocrome-c
	R: 5' GTAAATGCCTTTCAGTGGTG 3'	
138	F: 5' GGAAAGCCTGCCGGTGACTA 3' R:5' CACCCGGAGGAGAAATCGGG 3'	GAPDH

تجزیه و تحلیل آماری

در بخش تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا توزیع توأم و بهنجار توسط آزمون شاپیروولک مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس داده‌های حاصله توسط آزمون تحلیل واریانس یک-طرفه و تعقیبی توکی مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی محاسبات آماری در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و با استفاده از نرم‌افزار SPSS22 انجام شد.

نتایج

بر اساس نتایج حاصل از آزمون شاپیروولک، اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ی در دسترس با جامعه‌ی مورد نظر مشاهده نشد؛ بنابراین داده‌های جمع‌آوری شده همگن بوده و منحنی مربوط به این نمونه طبیعی فرض شد. برخی از ویژگی‌های موش‌های صحرایی مورد مطالعه در جدول ٤ نشان داده شده است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، تفاوت معنی‌داری بین گروه مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی با دو گروه کنترل و مکمل مرزنجوش در رابطه با وزن نهایی بدن مشاهده شد (P=۰/۰۰۳) به طوری که گروه کنترل و گروه مکمل مرزنجوش دارای وزن بدنی بزرگتری نسبت به گروه مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی بودند. با این حال تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه در رابطه با وزن قلب مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

در رابطه با شاخص‌های مربوط به آپوپتوز، نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین سه گروه کنترل، مکمل مرزنجوش و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی در بیان ژن p53 وجود ندارد (P=۰/۷۲۷). با این حال، میزان بیان p53 در گروه مکمل مرزنجوش و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی نسبت به گروه کنترل به ترتیب حدود ٪۲۱ و ٪۲۸ کمتر بود (نمودار ۱). این در حالی است که تفاوت معنی‌داری بین سه گروه کنترل، مکمل مرزنجوش و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی در بیان ژن سیتوکروم c مشاهده شد (P=۰/۰۱). در این راستا، میزان بیان ژن سیتوکروم c در گروه مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کمتر بود (حدود ٪۶۲؛P=۰/۰۰۸) اما تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه مکمل مرزنجوش وجود نداشت (P=۰/۳۷۰). با این حال میزان بیان ژن سیتوکروم c در گروه مکمل مرزنجوش نسبت به گروه کنترل حدود ٪۲۵ کمتر بود (نمودار ۲). این در حالی بود که تفاوت معنی‌داری نیز بین گروه مکمل مرزنجوش و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی در رابطه با بیان ژن سیتوکروم c مشاهده نشد (P=۰/۱۰۸).

جدول ٤. مشخصات موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه

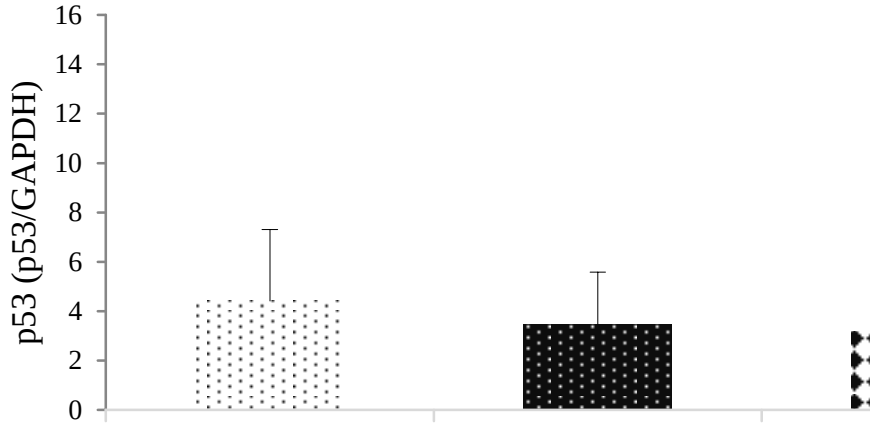
	کنترل (n=۵)	مکمل مرزنجوش (n=۷)	مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی (n=۷)
وزن ابتدایی بدن (گرم)	۲۳۹/۱۵±۱۶/۴۴	۲۳۳/۲۳±۲۰/۱۴	۲۲۸/۳۶±۱۷/۴۵
وزن نهایی بدن (گرم)	۳۱۴/۵±۲۴/۳	۳۰۹/۲۸±۲۲/۰۹	۲۸۷/۶±۱۹/۴۲ *
وزن قلب (گرم)	۱/۰۲±۰/۱۱	۰/۹۹±۰/۱۳	۱/۰۹±۰/۱۵

نسبت به دو گروه دیگر: p<۰/۰۵*

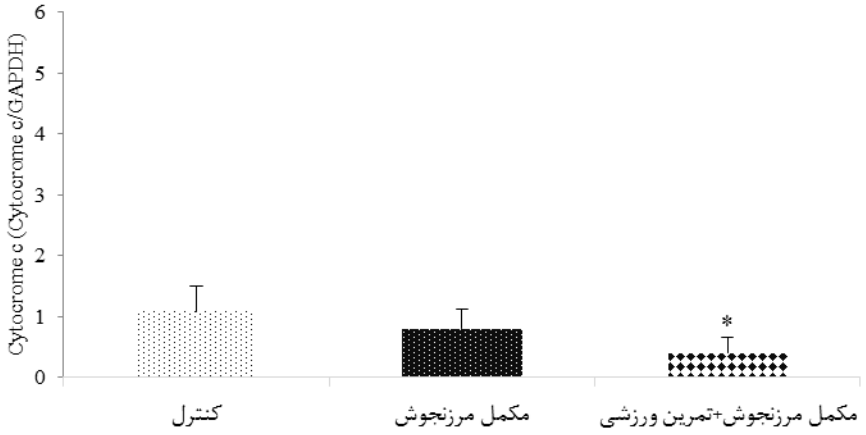
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:29 IRST on Sunday September 29th 2019



نمودار ۱. میزان بیان ژن p53 در گروه‌های مورد مطالعه



نمودار ۲. میزان بیان ژن ستوکروم c در گروه‌های مورد مطالعه؛ نسبت به گروه کنترل: ۰/۰۱>p*

بحث

پژوهش حاضر با هدف تعیین تأثیر ۱۲ هفته مکمل‌یاری عصاره مرزنجوش به عنوان یک مکمل آنتی‌اکسیدانی قوی با و بدون تمرین ورزشی بر بیان دو ژن مهم در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز (p53 و سیتوکروم c) در میوکارد موش‌های صحرایی نر انجام شد. علاوه بر هدف اصلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مکمل‌یاری عصاره مرزنجوش تأثیری بر وزن بدن و وزن قلب موش‌های صحرایی نر ندارد. در این راستا فروزنده و همکاران (۱۳۹۵) نیز گزارش دادند که مصرف یک ماه عصاره هیدروالکلی مرزنجوش با دوزاج مختلف تأثیری بر وزن بدن موش‌های صحرایی نر ویستار نداشت (۱۷). با این حال و طبق پیش‌فرض‌های موجود، نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن بود زمانی که عصاره مرزنجوش همراه با تمرین ورزشی مصرف شد، وزن نهایی بدن موش‌های صحرایی نر کاهش قابل توجهی نشان داد؛ اگرچه تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه در رابطه با وزن قلب مشاهده نشد. براساس شواهد و مدارک موجود، کاهش وزن در گروه مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی به دلیل افزایش هزینه انرژی برای اجرای ۱۲ هفته تمرین ورزشی هوازی با شدت متوسط است. با این وجود، بدون بررسی وضعیت ترکیب بدنی آزمودنی‌ها به ویژه تعیین تغییرات بافت چربی و بافت بدون چربی کل بدن متعاقب دوره مصرف مکمل مرزنجوش با و بدون تمرین ورزشی، اظهار نظر دقیق در رابطه با تغییرات وزن بدن و وزن قلب دشوار است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:29 IRST on Sunday September 29th 2019

همچنین، یافته‌های مطالعه حاضر حاکی از آن بود که مصرف عصاره مرزنجوش چه با و چه بدون تمرین ورزشی تأثیری بر بیان ژن p53 ندارد. اگرچه، میزان بیان p53 در دو گروه مکمل مرزنجوش و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی نسبت به گروه کنترل به ترتیب حدود ٪۲۱ و ٪۲۸ کمتر بود. این در حالی بود که مصرف این مکمل همراه با تمرین ورزشی باعث کاهش قابل توجه بیان ژن سیتوکروم c در میوکارد موش‌های صحرایی نر شد. به طوری که میزان بیان ژن سیتوکروم c در گروه مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی نسبت به گروه کنترل حدود ٪۶۲ کمتر بود؛ اما تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه مکمل مرزنجوش مشاهده نشد. با این حال میزان بیان ژن سیتوکروم c در گروه مکمل مرزنجوش نسبت به گروه کنترل نیز حدود ٪۲۵ کمتر بود. لذا در رابطه با بیان ژن سیتوکروم c به نظر می‌رسد که افزوده شدن تمرین ورزشی به مکمل‌یاری مرزنجوش، اثر کاهنده این مکمل بر بیان ژن سیتوکروم c را تقویت کرده است. اگرچه در پژوهش حاضر مصرف مکمل مرزنجوش تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم c نشان نداد، اما Vujicic و همکاران (۲۰۱۵) اشاره داشتند که مصرف عصاره مرزنجوش علاوه بر افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، دارای تأثیرات ضدآپوپتوزی در موش‌های دیابتی نوع یک شد. این پژوهشگران گزارش کردند که مصرف این مکمل با تنظیم کاهشی بیان و فعالیت کاسپاز-۳ می‌تواند روند کاهش فرآیند آپوپتوز را فراهم نماید (۱۴). به نظر می‌رسد یکی از دلایل اصلی اثربخشی قابل توجه مکمل مرزنجوش در مطالعه مذکور و ایجاد تناقض با نتایج مطالعه حاضر، نوع آزمودنی‌های مورد استفاده باشد به طوری که Vujicic و همکاران تأثیر این مکمل را در موش‌های دیابتی نوع اول مورد بررسی قرار داده بودند اما آزمودنی‌های مطالعه حاضر موش‌های صحرایی نر سالم بودند. بیماری دیابت نوع اول یک بیماری التهابی خودایمنی است که می‌تواند از طریق افزایش عوامل التهابی و استرس اکسایشی موجب تشدید فرآیند آپوپتوز و مرگ سلولی گردد (۱۴). لذا احتمال اثرگذاری مکمل مرزنجوش در شرایط تشدید آپوپتوز و موش‌های دیابتی قابل توجه خواهد بود. البته در مطالعه حاضر نیز میزان بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم c در گروه مکمل مرزنجوش به ترتیب ۲۱ و ۲۵ درصد کاهش نشان داد. با این حال مکانیسم دقیق اثرگذاری مکمل مرزنجوش بر فرآیند آپوپتوز و پروتئین‌های درگیر در این فرآیند آن هم در بافت بسیار حساس قلب چندان مشخص نیست. بر اساس شواهد و مدارک موجود، مهم‌ترین خاصیت مرزنجوش خواص آنتی اکسیدانی آن است که احتمالاً می‌تواند با کاهش فعالیت ROS و استرس اکسایشی باعث کاهش بیان پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی و کاهش نفوذپذیری غشای میتوکندریایی شود. Ivanova و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوی ترکیبات فنلی ۲۱ عصاره مورداستفاده در فیتوتراپی عنوان داشتند مرزنجوش از جمله گیاهانی است که دارای بیشترین محتوی فنلی و خواص آنتی اکسیدانی است (۱۸). مکمل مرزنجوش مورد استفاده در مطالعه حاضر نیز دارای درصد بالایی از تیمول، سایمن و کاریوفیلین بود. Mecocci و همکاران (۲۰۰۴) نیز گزارش دادند که تجویز خوراکی تیمول در موش‌های صحرایی غلظت سوپراکسیددسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز را کاهش می‌دهد (۱۹). ترکیبات فنولی موجود در مرزنجوش مانند تانن، با وزن مولکولی بالا توانایی بالایی برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد داشته و فعالیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولکس دارند و این موضوع به تعداد حلقه‌های آروماتیک و ماهیت گروه‌های جابه‌جاشونده هیدروکسلی بستگی دارد. لذا، گیاه مرزنجوش دارای ترکیبات فنولی با وزن مولکولی بالا می‌تواند فعالیت آنتی اکسیدانی منحصر به فردی داشته باشد (۲۰). البته براساس نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که افزوده شدن تمرین ورزشی به مکمل مرزنجوش، اثر ضدآپوپتوزی این مکمل بویژه در رابطه با کاهش بیان ژن سیتوکروم c را تقویت کرده است. تمرین ورزشی منظم و با شدت متوسط یکی از

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:29 IRST on Sunday September 29th 2019

مداخلات غیر بالینی برای مقابله با آپوپتوز در بافت قلبی به شمار می‌رود (۲۱). اگرچه سازوکارهای متعددی مانند تغییر مستقیم در بیان ژن‌های مربوط به آپوپتوز، کاهش آزادسازی عوامل آپوپتوتیک میتوکندری، تغییرات تولید ROS و وضعیت ضداکسایشی برای اثرات محافظتی تمرینات ورزشی در مقابل آپوپتوز مطرح شده است (۲۲)، ولی هنوز ابهامات بسیاری در این زمینه وجود دارد. در این راستا، Vainshtein و همکاران (۲۰۱۱) اشاره داشتند که آپوپتوز میتوکندریایی اغلب با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن همراه است و تمرینات ورزشی می‌توانند با کاهش تولید ROS و افزایش دفاع ضداکسایشی، روند آپوپتوز را کندتر کند. در پاسخ به فشار اکسایشی و افزایش پروتئین p53، جابه جایی و استقرار پروتئین Bax در غشای بیرونی میتوکندری افزایش می‌یابد. این موضوع تا اندازه‌ای می‌تواند ناشی از فعال شدن JNK (c-Jun-N-terminal kinase) سیتوزلی باشد به طوری که JNK در حضور محرک‌های استرس سلولی فسفریله شده و موجب مهار پروتئین Bcl-2 می‌شود، لذا پروتئین Bax اجازه جابه‌جایی به سمت میتوکندری را می‌یابد. پروتئین JNK در داخل میتوکندری، در باز شدن mtPTP (Mitochondrial permeability transition pore) دخالت کرده و موجب رهایش عوامل پیش‌آپوپتوزی AIF و سیتوکروم c به داخل سیتوزول می‌شود. به محض رهایش و ورود به سیتوزول، AIF و سیتوکروم c موجب قطعه قطعه شدن DNA به طور مستقیم یا از طریق آبشار کاسپازی می‌شوند. در پاسخ به تمرین ورزشی، سطوح مشابهی از فشار اکسایشی با فسفریله شدن کمتر JNK در عضله قلبی مشاهده می‌شود. این مسئله با کاهش بیان و رهایش سیتوکروم c در عضله قلبی موش‌های تمرین کرده همراه است که نشانگر مهار پیام‌رسانی آپوپتوتیک است (۲۳). لذا این احتمال وجود دارد که تعامل دو عامل آنتی‌اکسیدانی مهم – مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی_ موجب کاهش ۲۸ درصدی بیان ژن p53 و ۶۲ درصدی بیان ژن سیتوکروم c شده باشد. با این حال، برخی از مطالعات اخیر اشاره دارند که مصرف عصاره مرزنجوش می‌تواند موجب القای آپوپتوز از طریق افزایش بیان پروتئین p53 و Bax و کاهش بیان پروتئین Bcl-2 در ردیف سلول‌های سرطانی شده و موجب حذف سریع‌تر این سلول‌ها شود (۱۴، ۱۵، ۲۴). اگرچه مکانیسم القا و تشدید آپوپتوز توسط عصاره مرزنجوش در سلول‌های سرطانی هنوز به طور دقیق مشخص نشده است و نمی‌توان اظهار نظر دقیقی در این خصوص داشت. همچنین در پژوهش حاضر نیز با توجه به محدودیت‌های مانند عدم اندازه‌گیری تغییرات مورفولوژیکی، ارزیابی بیان سایر ژن‌های درگیر در مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز و اندازه‌گیری محتوی پروتئین‌های موردنظر توسط روش وسترن بلات، اظهار نظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری شاخص‌های مربوط به مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز در عضله قلبی از عصاره مرزنجوش با یا بدون تمرینات ورزشی، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه است.

نتیجه‌گیری

در کل، بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان عنوان کرد که ۱۲ هفته مکمل‌یاری عصاره مرزنجوش تأثیر قابل توجهی بر بیان دو ژن مهم در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز شامل p53 و سیتوکروم c در میوکارد موش‌های صحرایی نر ندارد. اگرچه کاهش ۲۱ و ۲۵ درصدی به ترتیب در بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم c متعاقب مکمل‌دهی عصاره مرزنجوش مشاهده شد. در این بین، اضافه شدن تمرین ورزشی هوازی به مکمل‌دهی عصاره مرزنجوش می‌تواند بیان ژن سیتوکروم c را در میوکارد موش‌های صحرایی نر به طور قابل توجهی کاهش دهد. با این حال، اظهار نظر قطعی در زمینه القای آپوپتوز و پروتئین‌های مختلف درگیر در این فرآیند متعاقب مکمل‌دهی عصاره مرزنجوش با یا بدون تمرینات ورزشی مختلف، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:29 IRST on Sunday September 29th 2019

منابع

1. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis. Oncogene 2003;22(56):9030.
2. Moll UM, Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways. FEBS letters 2001;493(2-3):65-9.
3. Speidel D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. Trends in Cell Biology 2010;20(1):14-24.
4. Noori DM, Abdoliahzade R. Role of p53 in apoptosis and cancer therapy. Ofogh-e-Danesh 2014;20(3):191-201. [Persian]
5. Tiwari M. Apoptosis, angiogenesis and cancer therapies. Journal of Cancer Therapeutics and Research 2012;13(1):1-10.
6. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. Aging (Albany NY) 2012;4(5):330.
7. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? Cell Death and Differentiation 2018;25(1):104.
8. Vasudeva N. Origanum majorana L.-Phyto-pharmacological review. Indian Journal of Natural Products and Resources 2015;6(4):261-267.
9. Abidin Z. A review on bioactive compounds isolated from plants against plant pathogenic fungi. Journal of Medicinal Plants Research 2011;5(30):6584-9.
10. Ličina BZ, Stefanović OD, Vasić SM, Radojević ID, Dekić MS, Čomić LR. Biological activities of the extracts from wild growing Origanum vulgare L. Food Control 2013;33(2):498-504.
11. Masoudi M, Saiedi M. Anti-inflammatory, Antioxidant, anticancer and anti-microbial effect of Origanum vulgare: a systematic review. Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre 2017;9(4):85-94.
12. Sharifi-Rigi A, Heidarian E, Amini SA. Protective and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic leaf extract of Origanum vulgare on oxidative stress, TNF-α gene expression and liver histological changes in paraquat-induced hepatotoxicity in rats. Archives of Physiology and Biochemistry 2018:1-8.
13. Yan F, Azizi A, Janke S, Schwarz M, Zeller S, Honermeier B. Antioxidant capacity variation in the oregano (Origanum vulgare L.) collection of the German National Genebank. Industrial Crops and Products 2016;92:19-25.
14. Vujicic M, Nikolic I, Kontogianni VG, Saksida T, Charisiadis P, Orescanin-Dusic Z, et al. Methanolic extract of Origanum vulgare ameliorates type 1 diabetes through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity. British Journal of Nutrition 2015;113(5):770-82.
15. Balusamy SR, Perumalsamy H, Huq MA, Balasubramanian B. Anti-proliferative activity of Origanum vulgare inhibited lipogenesis and induced mitochondrial mediated apoptosis in human stomach cancer cell lines. Biomedicine & Pharmacotherapy 2018;108:1835-44.
16. Naito H, Powers SK, Demirel HA, Aoki J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. Medicine and Science in Sports and Exercise 2001;33(5):729-34.
17. Foroozandeh M, Bigdeli M, Rahnema M. The effect of hydro alcoholic extract of Origanum vulgare on weight and serum lipid profile in male Wistar rats. Pars Journal of Medical and Sciences 2016;14(2):50-55. [Persian]
18. Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 2005;96(1-2):145-50.
19. Mecocci P, Mariani E, Cornacchiola V, Polidori M. Antioxidants for the treatment of mild cognitive impairment. Neurological Research 2004;26(5):598-602.
20. Lagouri V, Boskou D. Nutrient antioxidants in oregano. International Journal of Food Sciences and Nutrition 1996;47(6):49۳-7.
21. Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. Effect of exercise training on Bcl-2 and bax gene expression in the rat heart. Gene, Cell and Tissue 2015;2(4):e32833.
22. McMillan EM, Graham DA, Rush JW, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. Journal of Applied Physiology 2012;113(7):1048-57.
23. Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. Journal of Applied Physiology 2011;110(6):1638-45.
24. Han X, Parker TL. Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (Origanum vulgare) essential oil in a human skin disease model. Biochimie Open 2017;4:73-7.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:29 IRST on Sunday September 29th 2019

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
27th Year, No.141
June- July 2019

The effect of *Origanum vulgare* extract supplementation with and without exercise training on p53 and cytochrome c gene expression in myocardium of male rats

Jabbar Bashiri[1*], Hassan Pourrazi[2]

1. **Associate Professor- Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.**
2. **Assistant Professor - Department of Physical Education, Faculty of Social Sciences, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.**

*** Corresponding author e-mail: bashiri.jabbar@gmail.com**

Abstract

Background and Objective: Apoptosis plays a key role in the pathogenesis of a variety of cardiovascular diseases, especially cardiac failure. Therefore, the purpose of this study was investigating the effect of O*riganum vulgare* extract supplementation with and without exercise training on p53 and cytochrome c gene expression in myocardium of male rats.

Materials and Methods: Nineteen three-month old male rats were randomly divided into three groups: control (Con), *Origanum vulgare* supplementation (OVS) and *Origanum vulgare* supplementation+exercise training (OVS+EX). Within three months of research, OVS and OVS+EX groups received 1 g/kg body weight of O*riganum vulgare* extract. Rats in OVS+EX group participated in the exercise training program for 12 weeks. Forty-eight hours after the last training session, the heart muscle of rats were extracted and mRNA of p53 and cytochrome c was evaluated by Real Time-PCR. One-way ANOVA and Tukey post-hoc tests were applied for statistical analysis of the data ($p<0.05$).

Results: p53 gene expression in OVS and OVS+EX groups was non-significantly lower than the Con group (21% and 28%, respectively, $p>0.05$). However, cytochrome c gene expression in OVS+EX group was significantly lower than the Con group (62%, $p<0.01$).

Conclusion: Overall, 12 weeks of *Origanum vulgare* extract supplementation did not affect the p53 and cytochrome c gene expression in myocardium of male rats. However, the addition of exercise training to *Origanum vulgare* extract supplementation significantly reduces the expression of cytochrome c.

Keywords: *Origanum vulgare* extract**,** Exercise training**,** p53 gene, Cytochrome c gene, Heart muscle

Received: 27/04/2019
Last revised: 16/06/2019
Accepted: 23/06/2019

www.SID.ir