

## تأثیر هم‌زمان تمرین هوازی و مکمل‌سازی عصاره گیاهی مرزنجوش بر بیان ژنی پروتئین‌های آپوپتوز میوکارد موش‌های صحرایی

قادر رحیم‌زاده<sup>۱</sup>، محمدعلی آذربایجانی<sup>۲\*</sup>، حسن متین‌همایی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.

۲. استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.

۳. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.

### چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰۹

**زمینه** امروزه استفاده از مکمل‌ها و عصاره‌های گیاهی مانند مرزنجوش برای مقابله با آپوپتوز ناشی از ورزش و بهبود سازگارهای تمرینی رواج بسیاری یافته است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر هم‌زمان تمرین هوازی و مکمل‌سازی عصاره گیاهی مرزنجوش بر بیان ژنی پروتئین‌های آپوپتوز میوکارد موش‌های صحرایی انجام شد.

**روش کار** در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۸ هفته‌ای) با میانگین وزنی  $(17/86 \pm 129)$  گرم) به صورت تصادفی در ۵ گروه همگن، پایه ( $n=8$ )، کنترل ( $n=8$ )، عصاره ( $n=8$ )، تمرین ( $n=8$ ) و تمرین - عصاره ( $n=8$ ) قرار گرفتند. گروه تمرین و تمرین-عصاره در برنامه‌ای ۱۲ هفته‌ای (هر هفته ۵ جلسه ۶۰-۱۰ دقیقه‌ای با شدت ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) دویدن روی نوارگردان حیوانی (شیب ۱۵ درصد و سرعت ۳۳-۲۴ متر بر دقیقه) شرکت کردند. همچنین، مکمل‌سازی مرزنجوش شامل دریافت عصاره اتانولی مرزنجوش بود. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، بخشی از بافت بطن چپ قلب موش‌ها برداشته شد و بیان پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۹ با استفاده از روش RT-PCR بررسی شد. داده‌ها، با استفاده از آزمون تحلیل واریانس دو راهه تجزیه و تحلیل شد ( $p < 0/05$ ).

**یافته‌ها** نتایج تحقیق نشان داد بیان پروتئین Bax، کاسپاز-۹ و نسبت Bax/Bcl-2 در گروه تمرین و ترکیب تمرین و مکمل‌سازی مرزنجوش نسبت به گروه کنترل کمتر و بیان پروتئین Bcl-2 بیشتر از گروه کنترل بود، اما این تفاوت معنادار نبود. علاوه بر این، تفاوت بین این گروه‌ها در تمامی شاخص‌ها به لحاظ آماری معنادار نبود.

**نتیجه‌گیری** بر اساس این یافته‌ها، به نظر می‌رسد ۱۲ هفته تمرینات هوازی همراه با مکمل‌سازی عصاره مرزنجوش به کاهش فرایندهای آپوپتوزی و بهبود سازگاری‌های میتوکندریایی منجر نشد. بنابراین برای دستیابی به نتایج بهتر و روشن‌تر تحقیقات بیشتری نیاز است.

### کلیدواژه‌ها:

آپوپتوز، تمرینات هوازی، مرزنجوش، موش صحرایی.

### مقدمه

برگشت‌پذیر است که در تنظیم تعادل بین زایش و مرگ سلولی در بافت‌های مختلف به‌ویژه بافت‌هایی مانند مغز، عضله

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده فرایندی زیستی فعال و

\* نویسنده مسئول: محمدعلی آذربایجانی  
نشانی:

دورنگار:

تلفن: ۰۹۱۲۳۱۷۲۹۰۸

رایانه: m\_azarbayjani@iauctb.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-0002-3502-7487

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-9962-4125

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۶، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۸، ص ۱۶۱-۱۷۰  
آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: [journal@medsab.ac.ir](mailto:journal@medsab.ac.ir)  
شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

مرزنجوش به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی میکروبی، آنتی سایتوکسیک و ضد سرطانی اجزای اصلی آن مطالعه و تأیید شده است [۱۱، ۱۲]. همچنین، به‌تازگی تأثیر عصاره‌های گیاهی و تمرینات هوازی بر فرایند آپوپتوز توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. نتایج برخی از مطالعات اشاره دارد که مرزنجوش ممکن است به‌عنوان رویکردی آنتی‌اکسیدانی و ضدآپوپتوزی عمل کند. در این راستا، گزارش شده است که عصاره متانولی مرزنجوش [۱۲] اثر مثبتی روی جزایر لانگرهانس پانکراس داشت و آن را از آپوپتوز حاصل از سایتوکاین از طریق تنظیم کاهشی کاسپاز-۳ حفظ کرد. افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که همراه با تغییرات عملکرد میتوکندریایی است، مهم‌ترین دلیل افزایش فرایند آپوپتوز در سلول‌های قلبی است و استفاده از مرزنجوش با کاهش تولید ROS، از افزایش بی‌رویه فرایند آپوپتوز در این بافت حیاتی ممانعت می‌کند [۱۳]. برخی از محققان معتقدند که بروز فشارهای متابولیکی-کاسایشی-التهابی در حین فعالیت‌های ورزشی نسبتاً سنگین و شدید ممکن است با افزایش عوامل پیش آپوپتوزی یا کاهش پروتئین‌های ضدآپوپتوزی باعث تشدید این فرایند و پیامدهای بعدی آن شود. هر چند نتایج برخی از مطالعات به نقش محافظتی تمرینات بدنی اشاره دارد. این تناقضات ممکن است عمدتاً ناشی از شدت، مدت و نوع تمرینات بدنی (مقاومتی در برابر غیرمقاومتی) یا وضعیت سلامت و آمادگی آزمودنی‌های مورد مطالعه باشد. در این راستا پترسون و همکاران [۹] در سال ۲۰۰۸ اشاره داشتند که نه هفته تمرین هوازی متوسط موجب کاهش سطوح پروتئین Bax میوکارد، فعالیت کاسپاز و قطعه شدن DNA در میوکارد موش‌های چاق می‌شود. واینشتین و همکاران [۱۴] در سال ۲۰۱۱ نیز به کارکرد حفاظتی تمرین استقامتی (۷۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) در مقابله با آپوپتوز میوکارد موش‌های صحرایی پس از آسیب ناشی از ایسکیمی-پرفزیون مجدد اشاره داشتند. با این حال و برخلاف نتایج مطالعات مذکور، برخی از پژوهش‌ها به تسریع فرایند آپوپتوز متعاقب تمرینات ورزشی اشاره دارند.

به هر حال، فشارهای نسبتاً زیاد انواع مختلف تمرینات و همچنین استفاده نادرست از پروتکل‌های فعالیت بدنی و تجویزهای نادرست در ورزشکاران غیرحرفه‌ای و عموم جامعه یکی از نگرانی‌ها و چالش‌های جدی است که ذهن پژوهشگران و متخصصان ورزشی و حتی خود ورزشکاران را به خود جلب کرده است. به‌طوری که برخی محققان معتقدند که با اعمال چنین فشارهایی حین تمرینات بدنی ممکن است میزان

اسکلتی و میوکارد نقش اساسی دارد. این روند با فشرده‌سازی و تکه‌تکه کردن کروماتین‌ها و غلیظ سیتوپلاسم سلولی کار خود را آغاز کرده و با مجاله شدن هسته و غشاهای سلولی و تولید واکوئل‌های محتوی ذرات آپوپتوتیکی خاتمه می‌یابد [۱]. با این حال، نتایج مطالعات موجود حاکی است که میزان آپوپتوز اندک میوکارد ممکن است در اثر عوامل درونی یا بیرونی مانند پرتوافکنی، ایسکمی/خون‌رسانی مجدد، داروهای مختلف، سالخوردگی و فشارهای جسمانی (مکانیکی-متابولیکی) تشدید پیدا کرده و از این طریق مقدمات بروز انواع بیماری‌های قلبی-عروقی را فراهم کند [۲]. این فرایند فیزیولوژیایی از طریق دو مسیر داخل و خارج سلولی رخ می‌دهد. مسیر خارجی با اتصال لیگاند‌های مهم مانند TNF $\alpha$  و Fas به گیرنده‌های غشایی القاکننده مرگ راه‌اندازی می‌شود [۳-۵]. در حالی که مسیر داخلی، مهم‌ترین مسیر ایجاد آپوپتوز، با تغییراتی در نفوذپذیری میتوکندری و رهایش عوامل آپوپتوزی همراه است. به هر حال، رخداد‌های مولکولی آپوپتوز اساساً به واسطه تعادل بین پروتئین‌های ویژه تنظیمی پیش و ضدآپوپتوزی مشخص می‌شود. در این بین پروتئین‌های Bax و Bcl-2، به‌عنوان پروتئین‌های اصلی در شکل‌گیری آپوپتوز و پیام‌های آپوپتوز میتوکندریایی درگیر می‌شوند. تحقیقات نشان داده‌اند که پروتئین Bax با کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکندری به رهایش عوامل آپوپتوزی مانند سیتوکروم C از فضای بین غشایی منتج می‌شود. در حالی که پروتئین Bcl-2 از طریق مقابله با فعالیت پیش‌آپوپتوزی پروتئین Bax به حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری می‌انجامد. در مسیر داخلی یا میتوکندریایی کاسپاز-۹ به‌عنوان کاسپاز آغازگر است [۶]. در این بین، فصل مشترک همه مسیرهای آپوپتوزی، در نهایت فعال‌سازی کاسپاز-۳ و تجزیه پروتئین‌های حیاتی سلول است [۷-۹]. با این حال، پژوهشگران همواره به‌دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای حمایت از میوکارد در مقابل آپوپتوز و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن هستند. درمان سنتی گیاهی به‌عنوان جایگزین یا مکمل درمان، یکی از نگرش‌های بالقوه‌ای است که برای تعدیل آپوپتوز بکار می‌رود. مطالعات وسیعی مصرف غذا و محصولات طبیعی بافت گیاهی غنی از بیوفنل‌ها را با حفاظت علیه امراض مزمن مرتبط کرده‌اند. مرزنجوش (*Origanum vulgare*) گیاهی محلی غنی از ترکیبات استروئولیک است که عاملی ضدآپوپتوزی معرفی شده است [۱۰].

در برخی مطالعات اثر ضد آپوپتوزی عصاره اتانولی

مصرفی بیشینه دوییدن روی نوارگردان حیوانی با شیب ۱۵ درصد و سرعت ۲۴-۳۳ متر بر دقیقه)، عصاره مرزنجوش (روزانه یک گرم مکمل مرزنجوش شامل ۰/۰۹ گرم عصاره مرزنجوش به اضافه ۹ سی‌سی محلول سالین مصرف کردند و در هیچ برنامه ورزشی شرکت نکردند) و تمرین هوازی- عصاره مرزنجوش (۵ جلسه تمرین در هفته و روزانه یک گرم مکمل مرزنجوش مصرف می‌کردند) قرار داده شدند (۸ موش در هر گروه). برای جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید (آزمایشگاه نگهداری حیوانات آزمایشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز) نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت، روی نوارگردان قرار گرفتند. طی این دوره، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۰-۱۵ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. دو گروه تمرین و تمرین-عصاره 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. شدت نسبی کار در سرتاسر برنامه تمرین معادل ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (۳۳-۲۴ متر/دقیقه با شیب ۱۵ درصد) حفظ شد. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته نخست شروع و به ۶۰ دقیقه در روز در هفته پنجم رسیده و تا انتهای دوره حفظ شد [۱۵] (جدول ۱). شایان ذکر است که در طول تحقیق، موش‌ها در قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات شفاف به ابعاد ۱۵×۲۶×۴۲ سانتی‌متر، دمای (۲۲±۱/۴ سانتی‌گراد)، رطوبت محیط (۵±۵۵ درصد) و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ با تهویه مناسب نگهداری شدند.

آپوپتوز و استرس اکسایشی و عواقب بعدی آن بیشتر شود. تاکنون مطالعه جامعی در این زمینه انجام نشده است و مطالعات اندکی اثر تمرین ورزشی و عصاره‌های گیاهی مختلفی را بر فرایندهای آپوپتوزی به شکل مجزا یا با هم بررسی کرده‌اند و همچنین تاکنون مطالعه جامعی روی مصرف عصاره مرزنجوش و تمرین هوازی با توجه به رویکرد آپوپتوزیس بافت میوکاردی صورت نگرفته است. از این‌رو شناسایی اثر تمرینات هوازی در حضور عصاره مرزنجوش بر آپوپتوز میوکارد برای کاهش بیماری‌ها و آسیب‌های ناشی از آن ضرورت انکارناپذیری به نظر می‌رسد. از این‌رو، با انجام تحقیق حاضر می‌توان انتظار داشت که ضمن پاسخ به برخی ابهامات موجود، پیشنهادهای کاربردی متناسبی در راستای نحوه انجام تمرینات و پیشگیری از پیامدهای منفی احتمالی آن به دست آید.

### روش تحقیق

مطالعه تجربی حاضر به صورت پس‌آزمون همراه با گروه کنترل، روی ۴۰ سر موش صحرایی نر دو ماهه نژاد ویستار (میانگین وزن ۱۷/۸۶±۱۲۹ گرم) انجام شد. حجم نمونه مطالعه حاضر براساس نتایج تحقیقات پیشین، در سطح معناداری (خطای نوع نخست) ۵ درصد و توان آماری (خطای نوع دوم) و با استفاده از نرم‌افزار Medcalc18.2.1 تعیین شد [۲۰]. سپس برای تعیین گروه‌های تجربی و کنترل، از موش‌های موجود در هر یک از قفس‌ها (با مقادیر وزنی نزدیک به هم) به صورت تصادفی یک نمونه انتخاب و در یکی از گروه‌های پایه (در بدو پروتکل پس از ۴۸ ساعت استقرار کشته و بافت‌برداری شدند)، کنترل ۱۲ هفته‌ای (در هیچ‌گونه برنامه فعالیت ورزشی شرکت نکردند)، تمرین هوازی (هر هفته ۵ جلسه ۶۰-۱۰ دقیقه‌ای با شدت ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن

جدول ۱. مشخصات پروتکل تمرینی

هفته‌های تمرین												متغیرهای تمرین
۱۲	۱۱	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۴۵	۳۵	۲۰	۱۰	مدت تمرین (دقیقه در روز)
۳۳	۳۲	۳۱	۳۰	۲۹	۲۸	۲۷	۲۶	۲۵	۲۵	۲۴	۲۴	سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)
۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	شیب نوارگردان (درصد)

پس از آخرین جلسه تمرین به روش بدون درد کشته و جراحی کردند. سپس بخشی از بافت بطن چپ آزمودنی‌ها با دقت برداشته شده و برای بررسی میزان ژنی یا mRNA

آزمودنی‌های گروه کنترل و تمرین به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول دوره پژوهش استفاده کردند. متخصصان کارآزموده، تمامی موش‌های صحرایی را ۴۸ ساعت

به میکروتیوب اضافه شد. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتیفریژ شده، مایع رویی بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر شود. سپس مجدداً به هر میکروتیوب ۰/۰۲ میلی لیتر آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC)<sup>۱</sup> افزوده شد. RNA استخراج شده برای استفاده بعدی در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد.

### تعیین کمیت و کیفیت RNA استخراج شده:

پس از استخراج RNA لازم است، کیفیت و کمیت RNA استخراج شده تعیین شود. برای تعیین مقدار RNA از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر ژل آگاروز استفاده شد. در روش اسپکتروفتومتری از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد، به طوری که حجم معینی از RNA استخراج شده را با آب مقطر یا بافر TE رقیق کرده و به حجم خاصی رسانده شد. نسبت مذکور فاکتور رقت<sup>۲</sup> نامیده می شود. برای کالیبره کردن دستگاه، حجم خاصی از آب مقطر یا TE درون کوت کوارتز ریخته و طیف جذبی آن در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر روی صفر تنظیم شد. ۲۶۰، میزان جذب نور متوسط DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰، میزان جذب نور متوسط RNA در طول موج ۲۸۰ نانومتر است. پس از کالیبره شدن، حجم خاصی از نمونه RNA رقیق شده داخل کوت ریخته شده، ۲۶۰ و ۲۸۰ و همین طور نسبت بین این دو از دستگاه خوانده می شود. نسبت ۲۶۰/۲۸۰ برآوردی از خلوص RNA است. این نسبت در RNA بین ۱/۸ تا ۲ است. مقادیر کمتر از ۱/۸ نشانگر وجود آلودگی های پروتئینی، فنلی یا دیگر جذب کننده های اشعه ماوراءبنفش است. مقادیر بیشتر از ۲ نیز نشانگر وجود RNA در نمونه استخراج شده است پس از انتخاب محلول هایی که نسبت جذبی آن ها در محدوده مورد نظر باشد، از اعداد مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر برای محاسبه میزان غلظت RNA طبق روابط زیر استفاده شد: از آنجایی که هر یک واحد جذب در طول ۲۶۰ نانومتر متناظر با حدود ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر از RNA تک رشته ای است برای تعیین مقدار RNA می توان از فرمول زیر استفاده کرد:

$$۲۶۰ \times ۵۰ \text{ ng/}\mu\text{l} \times \text{ضریب رقت} = \text{غلظت RNA (ng/}\mu\text{l)}$$

نمونه های RNA استخراج شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. در بیشتر موارد کیفیت نمونه ها مطلوب بود به طوری که نسبت ۲۶۰/۲۸۰، مناسب و بین

پروتئین های Bcl-2، Bax، کاسپاز-۹، از روش PCR Real Time استفاده شد. تمامی مراحل تحقیق با رعایت دستورالعمل سازمانی در خصوص مراقبت و استفاده از حیوانات انجام شد.

### روش تهیه عصاره اتانولی و مکمل دهی مرزنجوش

نمونه خشک شده گیاه مورد نظر با دستگاه خردکننده پودر شد، ۱۰۰ گرم از پودر گیاه درون ارلن یک لیتری ریخته شد و به آن الکل اتیلیک ۹۶ درصد و آب مقطر به نسبت ۱ به ۱ اضافه شد، به گونه ای که به حجم برسد. بعد از ۲۴ ساعت محلول صاف شد. سپس محلول صاف شده توسط دستگاه تقطیر در خلأ در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و سرعت چرخش ۷۰ دور در دقیقه تا ۱/۳ حجم اولیه تغلیظ شد.

گروه مرزنجوش و ترکیبی یک گرم مکمل مرزنجوش (۰/۰۹ گرم عصاره مرزنجوش به اضافه ۹ سی سی محلول سالین) که به وسیله ترازوی حساس دیجیتالی اندازه گیری شده بود بعد از اتمام هر پروتکل تمرینی از طریق گاواژ دریافت کرده، در طول دوره های این پروتکل تمرینی هیچ گونه مکمل غذایی دیگری به موش ها خوراندن نشد و در ضمن در تمامی گروه های آزمودنی ها به غیر از گروه تمرین و کنترل این امر رعایت شد.

### استخراج RNA:

نخست حیوانات با استفاده از تزریق زایلازین و کتامین بی هوش و سپس فدا شدند. پس از شکافتن حفره سینه ای، بافت قلب (بخش بطن چپ) به دقت جدا شدند. برای استخراج RNA از نمونه ها، طبق روش پیشنهادی کیت (Thermo K0731, USA) و با اندکی تغییرات به شرح زیر عمل شد. حدود ۵۰ میلی گرم از بافت عضله قلبی در حضور یک میلی لیتر از بافر لیز کننده همورنه شده و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس به هر میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتر کلروفرم افزوده شد و میکروتیوب به شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شده و ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه شد و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتیفریژ شد. سپس به دقت و بدون تکان دادن تیوب، فاز رویی که حاوی RNA بود، جداسازی شد و به میکروتیوب دیگر منتقل شده و به محلول جدا شده حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه انکوبه شد. بعد از آن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتیفریژ شده، مایع رویی بیرون ریخته شده و سپس ۱ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد

۱. Diethylpyrocarbonate

۲. Dilution factor

شد. ۱ میکرولیتر آنزیم RverertAid TM H Minus M- MuLV Reverse به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر oligo (dt)، ۶ دقیقه در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از Random hexamer primer، نخست ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در ۴۲ 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. ساخت cDNA برای همه ۵ ژن مورد نظر انجام شد.

### Real-time PCR

برای اندازه گیری میزان بیان ژنی پروتئین های مورد نظر از دستگاه مربوطه Rotor gene-6000 (Corbett, USA) استفاده شد. برای ژن های مورد مطالعه، پرایمرهای اختصاصی طراحی شد و توسط شرکت بایونیر (Bioneer, Germany) سنتز شدند. سپس هر پرایمر توسط نرم افزار Primer 3 برای اطمینان از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها ارزیابی شد (جدول ۲). طبق دستورالعمل مشخص شده از شرکت سنتز کننده پرایمرها، مقدار لازم آب مقطر فاقد DNase، RNase به منظور رقیق سازی به آن اضافه شد. سپس از این استوک ۱۰۰ Mμ، رقت ۱۰ Mμ تهیه کرده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در این تحقیق از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد که همیشه در تمامی سلول ها بیان می شود.

در روش الکتروفورز روی ژل آگاروز نیز نمونه های RNA با غلظت های متفاوت بر ژل آگاروز (۱/۸ درصد) الکتروفورز شدند. حضور زیر واحدهای RNA تام، مشخص کننده کیفیت مناسب RNA استخراجی است.

### ساخت cDNA

از کیت RevertAID TM First (Fermentas., Canada) Standard cDNA synthesis و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به صورت زیر استفاده شد: ۱ میکرولیتر DNA و ۱ میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در تیوبی ۱/۵ میلی لیتری ریخته شده و توسط DEPC-treated water به حجم ۹ میکرولیتر رسید. ۱ میکرولیتر DNase به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن ۱ میلی لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه قرار گرفت. تیوب مربوطه به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۴۰۰۰g سانترفوز شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر شود.

به تیوب مربوطه ۱۱ میکرولیتر DEPC-treated water و ۱ میکرولیتر oligo (dt) Primer یا Random hexamer Primer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه روی Dry block انکوبه شد. ۴ میکرولیتر 5X reaction buffer و ۲ میکرولیتر dNTP 10mM mix و ۱ میکرولیتر Ribolock و ۱ میکرولیتر Ribonuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانترفوز مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه

جدول ۲. توالی پرایمرهای ژن ها مورد بررسی

ژن	توالی پرایمر
Bcl2	5'-TGCAGAGATGTCCAGTCA-3' For: 5 5'-CCCACCGAACTCAAAGAAG-3' Rev: 5
Bax	5'-TGCTACAGGGTTTCATCCA-3' For: 5 5'-GTCCAGTTCATCGCCAATTC-3' Rev: 5
Caspase-9	5'-CCTCACTTTGCTCTTCTAC-3' For: 5 5'-GTAACCAACAGACAGGAGAC-3' Rev: 5
GAPDH	5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATG-3' For: 5 5'-CAGCATCAAAGGTGGAAGAA-3' Rev: 5

معناداری  $p < 0/05$  انجام شد.

### نتایج و یافته های تحقیق

نتایج آزمون شاپیرو-ویلک و آزمون لوین در تمامی شاخص ها ( $p > 0/05$ ) بود که دلالت بر توزیع نرمال داده ها و تجانس واریانس ها داشت. با توجه به ارزش F محاسبه شده حاصل از

### تجزیه و تحلیل های آماری

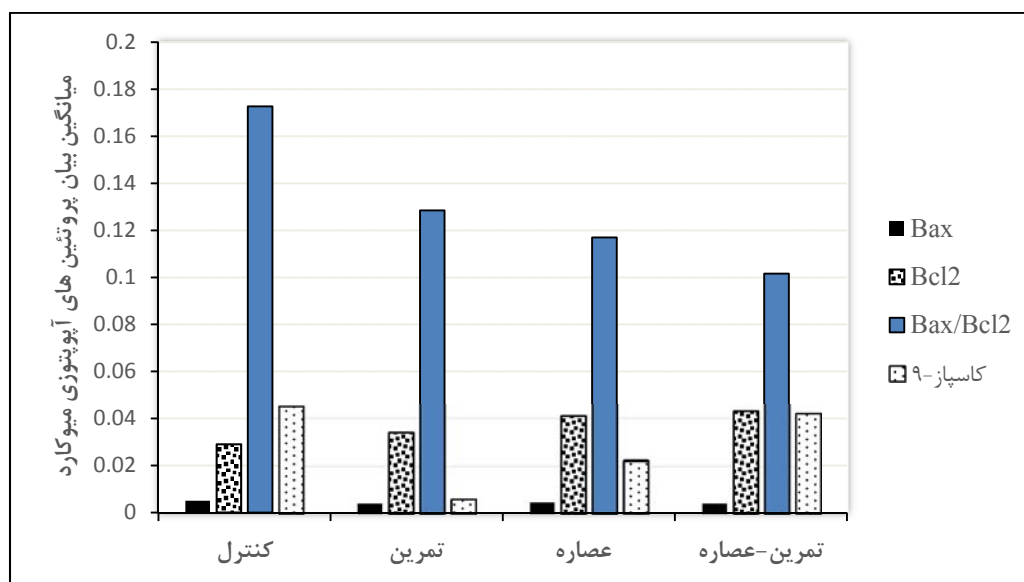
برای بررسی نرمال بودن توزیع داده ها و تجانس واریانس ها به ترتیب از آزمون های شاپیرو-ویلک و لوین استفاده شد. همچنین مقایسه میانگین داده ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه (ANOVA) انجام شد. تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و در سطح

بین گروهی، بیان پروتئین Bax، کاسپاز ۹- و نسبت Bax/Bcl-2 در گروه تمرین و ترکیب تمرین و مکمل سازی مرزنجوش نسبت به گروه کنترل کمتر و بیان پروتئین Bcl-2 بیشتر از گروه کنترل بود (شکل ۱ و جدول ۳).

آزمون تحلیل واریانس دو طرفه، تفاوت معناداری بین میانگین مقادیر بیان پروتئین های Bax، Bcl-2، نسبت Bax/Bcl-2 و کاسپاز-۹ قلبی موش های صحرایی پس از ۱۲ هفته مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). به طوری که با وجود معنادار نبودن تفاوت

جدول ۳. تحلیل واریانس دوره مقادیر بیان پروتئین های Bax، Bcl-2، نسبت Bax/Bcl-2 و کاسپاز-۹ قلبی موش های صحرایی متعاقب تمرین هوازی و مکمل سازی مرزنجوش

شاخص ها	میانگین مجذورات	F	P
Bcl2	تمرین هوازی	۰/۰۲۶	۲/۱
	مکمل سازی مرزنجوش	۰/۰۳۱	۲/۵۶
	تمرین هوازی × مکمل سازی مرزنجوش	۰/۰۲۱	۱/۷۵
Bax	تمرین هوازی	۰/۰۰۱	۰/۵۸
	مکمل سازی مرزنجوش	۰/۰۳۴	۰/۲۲
	تمرین هوازی × مکمل سازی مرزنجوش	۰/۰۰۳	۰/۸۴
Bax/Bcl-2	تمرین هوازی	۵/۶۶	۰/۲۳۰
	مکمل سازی مرزنجوش	۵/۳۵	۱/۲۱
	تمرین هوازی × مکمل سازی مرزنجوش	۵/۶۶	۱/۲۳
کاسپاز-۹	تمرین هوازی	۲/۷۸	۰/۷۲
	مکمل سازی مرزنجوش	۱/۷۸	۰/۶۶
	تمرین هوازی × مکمل سازی مرزنجوش	۳۵/۲	۱/۳۴



شکل ۱. تغییرات بیان Bax، Bcl-2، نسبت Bax/Bcl-2 و کاسپاز ۹- در گروه تمرینات هوازی، مکمل سازی مرزنجوش و ترکیبی

کاسپاز-۹ قلبی موش های صحرایی پس از ۱۲ هفته وجود ندارد. به طوری که با وجود معنادار نبودن تفاوت بین گروهی، بیان پروتئین Bax، کاسپاز ۹- و نسبت Bax/Bcl-2 در گروه

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تفاوت معناداری بین میانگین مقادیر بیان پروتئین های Bax، Bcl-2، نسبت Bax/Bcl-2 و

### بحث

میتوکندری تعامل دارد [۱۹].

Bcl-2 به‌طور مستقیم در غشای خارجی میتوکندری هموالیگومریزه شده و نقشی حیاتی در نفوذپذیری غشاء خارجی میتوکندری ایفا کرده‌اند [۱۸]. افزایش Bcl-2 افزایش در اثر بهبود عملکرد میتوکندری ناشی از سازگاری با تمرین باعث مهار Bax/ Bak شده که آن نیز تغییر پتانسیل غشاء میتوکندریایی و رهاسازی سیتوکروم C را در پی داشته است، که در نهایت کاسپاز-۹ را مهار کرده است [۱]. بهبود عملکرد میتوکندری در اثر سازگاری با تمرین هوازی باعث القاء عوامل بالادستی در افزایش تولید Bcl-2 شده که در نتیجه آن کاهش بیان ژن‌های محرک آپوپتوز مانند Bax و در نتیجه کاهش آسیب بافت میوکاردی و بهبود عملکرد سلول‌های میوکاردی می‌شود. با توجه به نتایج پژوهش حاضر تمرین هوازی روش مناسبی برای بهبود بیان پروتئین‌هایی است که برای تعدیل و کاهش فرایندهای آپوپتوزی عمل می‌کنند.

همچنین، در راستای تقویت آثار تمرین هوازی توسط مکمل‌سازی و دریافت عصاره گیاهی مرزنجوش برخی مطالعات نشان داده‌اند که این ترکیب گیاهی دارای ترکیباتی است که ویژگی‌های آنتی‌باکتریال، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوزی مانند کارواکرول<sup>۴</sup>، تیمول<sup>۵</sup>، گاما-ترپین<sup>۶</sup>، ترپنین-۴-اول<sup>۷</sup>، میرسن<sup>۸</sup> و لینالیل-استات<sup>۹</sup> دارد [۱۱، ۲۰]. البته ممکن است نسبت به نحوه عصاره‌گیری (آبی-الکلی یا ترکیبی) اجزای متفاوتی در عصاره حاصل استخراج شده باشد. کارواکرول یکی از ترکیبات موجود در عصاره مرزنجوش است که دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و دارای توانایی اتصال به باکتری‌ها و گیرنده‌های سلولی مرتبط با بروز آپوپتوز است و همچنین در برخی مطالعات گزارش شده است که از طریق کاهش بیان اینترلوکین-۶ (IL-6) و عامل نکروزی توموری-آلفا (TNF- $\alpha$ ) است که با بروز آپوپتوز حین فعالیت ورزشی ارتباط نزدیکی دارد [۲۱، ۲۲]. همچنین، برخی مطالعات گزارش کرده‌اند که کارواکرول ممکن است از طریق مهار آنزیم Cyclooxygenase-2 بر فرایند التهاب و از طریق کاهش فعال‌سازی Erk1/2 فسفوریله و تعدیل فعالیت P38 باعث تعدیل فرایند آپوپتوز شود [۲۳]. به علاوه، در برخی از مطالعات پیشین نشان داده شده است که فرم فسفوریله Akt در ممانعت از القاء آپوپتوز نقش مهمی دارد و کارواکرول باعث

تمرین و ترکیب تمرین و مکمل‌سازی مرزنجوش نسبت به گروه کنترل کمتر و بیان پروتئین Bcl-2 بیشتر از گروه کنترل بود. با این حال، مطالعات بسیار اندکی درباره تأثیر تمرینات ورزشی و مصرف عصاره مرزنجوش بر بیان پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۹ وجود دارد که اغلب نتایج متناقضی را گزارش کرده‌اند [۱، ۱۶، ۱۷].

به طوری که نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعه سیو<sup>۳</sup> که افزایش Bcl-2 و کاهش Bax و همچنین عدم تغییر معنادار کاسپاز-۳ در عضله قلبی و اسکلتی موش‌ها پس از ۸ هفته تمرین هوازی (۵ روز در هفته) را گزارش کردند هم‌راستا است [۱۶]. همچنین با نتایج مطالعه فرناندز مبنی بر افزایش Bcl-2، کاهش Bax و در کل مهار آپوپتوز متعاقب ۱۰ هفته تمرین هوازی شنا در موش‌های صحرایی نر همسو است [۱۷]، اما با نتایج پژوهش فانواف و همکاران مبنی بر کاهش Bcl-2 و افزایش Bax بلافاصله بعد از جلسه تمرینی هوازی همخوانی نداشت. همچنین، علت تناقض را می‌توان در این مدت زمان و طول دوره تمرین دانست. به طوری که در این مطالعه تنها پاسخ به یک جلسه فعالیت بدنی بررسی شد [۱].

به نظر می‌رسد در پژوهش حاضر تمرین باعث القاء عوامل مؤثر در افزایش بیان ژن Bcl-2 شده است. همچنین کاهش بیان ژن محرک Bax در گروه ترکیب تمرین و مرزنجوش مشاهده شد. تمرین هوازی مهم‌ترین نوع تمرین به لحاظ شدت تمرینی در افزایش چگالی و محتوای میتوکندریایی و همچنین بهبود عملکرد آن است [۱۸]. میتوکندری نقش بسیار حیاتی در آپوپتوز ایفا می‌کند. میتوکندری جزء لاینفک مسیر داخلی بروز آپوپتوز و محل استقرار بسیاری از پروتئین‌های درگیر در مراحل اولیه این فرایند از جمله اعضا خانواده Bcl-2 است [۱۹]. به نظر می‌رسد بهبود عملکرد میتوکندری در اثر ۱۲ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط باعث افزایش مقادیر Bcl-2 و در نتیجه مهار آپوپتوز شده باشد و Bax نیز به صورت هم‌زمان کاهش یافته است. احتمالاً گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) ایجاد شده در اثر تمرین خیلی شدید باعث افزایش مقادیر بیان ژن Bax شده باشد. احتمالاً در اثر تمرین، مسیرهای آپوپتوز داخلی، مولکول‌های سیگنالی پیش آپوپتوز مانند پروتئین‌های پیش آپوپتوزی خانواده Bcl-2 مانند Bax/Bak (به میتوکندری منتقل شده) و رهایش سیتوکروم C را مهار و به کاهش فعالیت کاسپاز-۹ منجر شده‌اند. سیتوکروم C علاوه بر اینکه بازیگر اصلی فرایند فعال ساختن آبشار کاسپازهای میتوکندریایی است با فسفولیپید اختصاصی

4. Carvacrol  
5. Thymol  
6. gamma-terpiene  
7. Terpinin-4-ol  
8. Myricine  
9. Linalyl-acetate

3. Siu

عملکرد میتوکندریایی شده است. این نکته باید خاطر نشان شود که عصاره آویشن دارای ترکیباتی مانند کارواکرول و تیمول است که در عصاره مرزنجوش نیز حضور دارند. علاوه بر این، برخلاف نتایج تحقیق حاضر، نتایج برخی مطالعات مانند جعفری و همکاران (۲۰۱۵) و سونگ و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که پس از تمرینات هوازی یا مکمل سازی با مواد آنتی اکسیدانی باعث کاهش معناداری نسبت Bax/Bcl2 می شود [۲۸-۳۰]. این مطالعات نشان داده اند که این شاخص ممکن است نشان دهنده افزایش مقاومت سلولی در برابر بروز آپوپتوز باشد. در مقابل، برخی محققان افزایش این نسبت پس از مکمل سازی با برخی مواد آنتی اکسیدانی مانند کرومیوم گزارش شده است. این تناقض ممکن است ناشی از محل اندازه گیری نسبت Bax/Bcl2 باشد؛ به طوری که در این مطالعه این نسبت در دیواره میتوکندری اندازه گرفته شده است [۳۱]. با این حال، به دلیل محدود بودن مطالعات انجام شده در این زمینه، تا زمان روشن شدن ابعاد بیشتر این حیطة از نتیجه گیری قطعی در این مورد اجتناب شود.

### نتیجه گیری

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان می دهد ۱۲ هفته تمرینات هوازی همراه با مکمل سازی عصاره مرزنجوش به کاهش فرایندهای آپوپتوزی و بهبود سازگاری های میتوکندریایی منجر نشد. بنابراین نتیجه می گیریم که برای دستیابی به نتایج بهتر و روشن تر تحقیقاتی با تعداد آزمودنی و میزان عصاره مرزنجوش مصرفی بیشتری مورد نیاز است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری مصوب گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی است، از همکاری گروه های مختلف که در این تحقیق همکاری داشته اند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

کاهش معنادار فرم فسفوریله Akt، بروز خاصیت ضد التهابی، القاء استرس اکسایشی از طریق افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن، مسیرهای مرتبط با پروتئین کینازها و فعال سازی کاسپاز-۳ می شود [۲۳].

همچنین، تیمول، ترکیب مونوترپننولی موجود در عصاره مرزنجوش است که آثار ضد اکسایشی و ضد آپوپتوزی دارد. برخی مطالعات نشان داده اند که این مصرف ترکیب با افزایش بیان و فعالیت آنزیم کاتالاز باعث سم زدایی رادیکال های آزاد پراکسید هیدروژن و کاهش بروز استرس اکسایشی و آپوپتوز متعاقب آن می شود [۲۴].

علاوه بر این، برخی تحقیقات نشان داده اند که ایزومرهای ترکیبات فنولی حاضر در ساختار این ترکیب گیاهی دارای ویژگی های آنتی اکسیدانی برای مقابله با رادیکال های آزاد ناشی از پراکسید هیدروژن است [۱۱]. در این راستا، پراسانا و همکاران [۲۵] در سال ۲۰۱۶ گزارش کردند که شش هفته مصرف عصاره مرزنجوش به مقدار ۳۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم باعث کاهش شاخص پرو آپوپتوزی Bax و افزایش شاخص آنتی آپوپتوزی Bcl-2 در موش های مبتلا به دیابت شده است.

با توجه به مطالب فوق و بر خلاف نتایج تحقیق حاضر می توان ابراز داشت که دریافت و مکمل سازی عصاره اتانولی مرزنجوش همراه با تمرینات هوازی با شدت متوسط نمی تواند باعث بهبود فرایندهای مرتبط با کاهش آپوپتوز ناشی از فعالیت ورزشی و بهبود عملکرد میتوکندریایی و متعاقب آن کاهش فرایندهای مرتبط با آپوپتوز شود. با این حال مطالعات متعددی که از دیگر ترکیبات گیاهی استفاده کرده اند که دارای اجزای مشابهی با مرزنجوش هستند، نشان از تأثیر مثبت این مکمل ها را داشتند [۲۶، ۲۷]. برای مثال، خانی و همکاران [۲۶] در سال ۲۰۱۷ گزارش کردند که ترکیب هشت هفته مکمل سازی آویشن (۴۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) با فعالیت ورزشی هوازی باعث افزایش ظرفیت ضد اکسایشی، کاهش شاخص های اکسایشی و بهبود بیوزن و

### References

- [1]. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2001; 33(3):393-6.
- [2]. Kwak H-B. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *Journal of exercise rehabilitation*. 2013; 9(2): 212.
- [3]. Farrell P, Joyner J, Caiozzo V. *ACM's advanced exercise physiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2012.
- [4]. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997; 91(4):479-89.
- [5]. Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P. Exercise and interleukin-6. *Current opinion in hematology*. 2001; 8(3):137-41.
- [6]. Navalta I, Sedlock D, Park K-S. Effect of exercise intensitv on exercise-induced lymphocyte apoptosis. *International journal of sports medicine*. 2007; 28(06): 539-42.
- [7]. Kwak H-B, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *The FASEB Journal*. 2006; 20(6):791-3.
- [8]. Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AI, Willis WT, et al. Exercise protects cardiac mitochondria against



- ischemia-reperfusion injury. *Medicine and science in sports and exercise*. 2012; 44(3):397-405.
- [9]. Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *Journal of applied physiology*. 2008; 105(6):1934-43.
- [10]. Abdel-Massih RM, Fares R, Bazzi S, El-Chami N, Baydoun E. The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line. *Leukemia research*. 2010; 34(8): 1052-6.
- [11]. Coccimiglio I, Alipour M, Jiang Z-H, Gottardo C, Suntres Z. Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its major constituents. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016.
- [12]. Miraj S. Antioxidant, anticancer, antimicrobial potential of *Origanum vulgare*. *Der Pharmacia Lettre*. 2016; 8(13):89-97.
- [13]. 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.
- [14]. 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.
- [15]. 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.
- [16]. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *The FASEB Journal*. 2004; 18(10):1150-2.
- [17]. Fernandes T, Magalhães FdC, Carmo ECd, Oliveira EMd. Aerobic exercise training inhibits skeletal muscular apoptotic signaling mediated by VEGF-VEGR2 in spontaneously hypertensive rats. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 2012; 18(6):412-8.
- [18]. Bavlr H, Kagan VE. Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis—there is nothing more practical than a good theory. *Critical care*. 2008; 12(1):206.
- [19]. Soberanes S, Panduri V, Mutlu GkM, Ghio A, Bundinger GS, Kamp DW. p53 mediates particulate matter-induced alveolar epithelial cell mitochondria-regulated apoptosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006; 174(11):1229-38.
- [20]. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*. 2004; 94(3):223-53.
- [21]. Arunasree K. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine*. 2010; 17(8-9):581-8.
- [22]. Aristatile B, Al-Assaf AH, Pugalendi KV. Carvacrol suppresses the expression of inflammatory marker genes in D-galactosamine-hepatotoxic rats. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2013; 6(3): 205-11.
- [23]. Yin Q-h, Yan F-x, Zu X-Y, Wu Y-h, Wu X-p, Liao M-c, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*. 2012; 64(1):43-51.
- [24]. Jamhiri M, Hafizibarjin Z, Ghobadi M, Moradi A, Safari F. Effect of Thymol on Serum Antioxidant Capacity of Rats Following Myocardial Hypertrophy. *Majallah-i dānīshgāh-i 'ulūm-i pīzīshkī-i Arāk*. 2017; 20(4):10-9.
- [25]. Prasanna R, Ashraf EA, Essam MA. Chamomile and oregano extracts synergistically exhibit antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and renal protective effects in alloxan-induced diabetic rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2016; 95(1):84-92.
- [26]. Khani M, Motamedi P, Dehkoda MR, Nikukheslat SD, Karimi P. Effect of thyme extract supplementation on lipid peroxidation, antioxidant capacity, PGC-1 $\alpha$  content and endurance exercise performance in rats. *Journal of the international society of sports nutrition*. 2017; 14(1):11.
- [27]. Sellami M, Slimeni O, Pokrywka A, Kuvačić G, Haves LD, Milic M, et al. Herbal medicine for sports: a review. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2018; 15(1):14.
- [28]. 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).
- [29]. Song W, Kwak H-B, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxidants & redox signaling*. 2006; 8(3-4):517-28.
- [30]. Kandeil MA, Hassanin KM, Mohammed ET, Safwat GM, Mohamed DS. Wheat germ and vitamin E decrease BAX/BCL-2 ratio in rat kidney treated with gentamicin. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2018.
- [31]. Zhu L, Han MB, Gao Y, Wang H, Dai L, Wen Y, et al. Curcumin triggers apoptosis via upregulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in SW872 human adipocytes. *Molecular medicine reports*. 2015; 12(1):1151-6.

## The effect of concurrent aerobic training with *Origanum vulgare* Hydro Ethanolic Extract supplementation on gene expression of myocardial apoptosis proteins in male rats

Ghader Rahimzadeh<sup>1</sup>, Mohamad Ali Azarbaijani<sup>2\*</sup>, Hasan Matin Homaei<sup>3</sup>

1. Ph.D. Student, Department of Sport Sciences, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID: 0000-0002-9962-4125
2. Professor, Department of Sport Sciences, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID: 0000-0002-3502-7487
3. Associate Professor, Department of Sport Sciences, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background** Today, the use of supplements and herbal extracts has been widely used to prevent exercise induced apoptosis and improve exercise training adaptations. Thus, the present study examined the effect of the 12 weeks aerobic training with *Origanum vulgare* Ethanolic Extract supplementation on the myocardial apoptosis in young male rats.

**Methods** . In this experimental study, 40 male Wistar rats (8 weeks old) with an average weight  $129 \pm 17.86$  gr randomly divided in five equal groups: basic (n=8), control (n=8), *Origanum vulgare* (n=8), aerobic training (n=8) and aerobic training- *Origanum vulgare* (n=8). The aerobic training and aerobic training- *Origanum vulgare* groups participated in a 12-week program (5 sessions of 10-60 min each week, with an intensity of 75-80% of maximum oxygen consumption) running on animal treadmill (15% incline and 24-33 m/s). Also, *Origanum vulgare* Ethanolic extract was used for supplementation. Forty-eight hours after the last exercise session, a part of the left ventricular tissue of the heart was removed and expression of Bax, Bcl2 and caspase-9 proteins was investigated using RT-PCR method. Data were analyzed by Two-way ANOVA test ( $P < 0.05$ ).

**Results** The results showed that expression of Bax, caspase-9 and Bax/ Bcl-2 ratio in the training and training- *Origanum vulgare* groups was lower than the control group and expression of Bcl-2 protein was higher than the control group, but this difference was not significant. In addition, the difference between these groups in all indices was not statistically significant.

**Conclusion** . Based on these findings, it seems that 12 weeks of aerobic training with supplementation of *Origanum vulgare* extract did not lead to apoptotic processes and improved mitochondrial adaptations. Therefore, more research is needed to achieve better and clearer results.

**Received:** 2018/12/14

**Accepted:** 2019/01/29

**Keywords:** aerobic exercise, apoptosis, *Origanum vulgare*, rat.