

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^{۱*}، حسن پور رضی^۲

۱. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲. استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم اجتماعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

E-mail: jabbar@gmail.com

* نویسنده مسئول: جبار بشیری

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=5)، مکمل مرزنجوش (n=7) و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی (n=7) 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 ($p < 0/05$).

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٪؛ $p > 0/05$). در حالی که بیان ژن سیتوکروم c در گروه مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0/01$ ؛ ۶۲٪).

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.

دوماهانامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وهفتم - شماره ۱۴۱
تیر ۱۳۹۸

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

مقدمه

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 سلول های قلبی موش، موجب بروز کاردیومیوپاتی احتقانی پس از دو تا شش ماه شد (۶). فعال سازی 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 می شود (۷). در این راستا، فشار اکسایشی ناشی از گونه های فعال اکسیژن یکی از مهمترین و شناخته ترین عواملی است که می تواند موجب آسیب ترمیم نشده DNA و فعال سازی ژن p53 و القای آپوپتوز قلبی شود (۶). لذا، در دهه های اخیر محققان همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسبی برای حمایت از قلب در مقابل استرس اکسایشی و بروز آپوپتوز شدید و نابجا و آسیب های احتمالی مرتبط با آن هستند. در این میان، استفاده از مداخلات غیر دارویی و کاربردی همچون استفاده از مکمل های آنتی اکسیدان 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 پرفروش ترین گیاهان ادویه ای و دارویی در جهان به شمار می رود (۸). مطالعات فارماکولوژیکی نشان داده اند که پتانسیل بالای آنتی اکسیدانی مرزنجوش به دلیل وجود مونوترپن های فنولی نظیر تیمول، کارواکرول و برخی دیگر از ترکیبات فنولی مانند اریگانوزاید است (۹-۱۳). Vujicic و همکاران (۲۰۱۵) اشاره داشتند که مصرف عصاره مرزنجوش علاوه بر افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی، دارای تأثیرات ضدالتهابی و ضدآپوپتوزی در موش های دیابتی نوع یک شد (۱۴). 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 سلول های سرطانی

مهارکننده ها یا سرکوب گره های تومور یکی از مهم ترین پروتئین های سلولی برای کنترل همئوستاز و نیز تعداد و رفتار سلول ها در اغلب بافت های موجود زنده به شمار می روند. این سرکوب گرها معمولاً از طریق تنظیم یک یا چند فرآیند کنترل کننده ی زایش و تکثیر نابجای سلولی، عمل می کنند (۳-۱). در این بین، ژن مهارکننده تومور یا p53 که به عنوان "نگهبان ژنوم" نیز شناخته می شود، یکی از مهمترین سرکوب گره های تومور به شمار می رود به نحوی که در سال ۱۹۹۳ به عنوان "مولکول سال" گزینش شده است (۴). برخی از شواهد و مدارک حاکی است که پروتئین p53 از طریق القای فرآیند مرگ سلولی برنامه ریزی شده یا آپوپتوز باعث مرگ سلول و ممانعت از تکثیر سلولی می شود. آپوپتوز القا شده توسط p53 از طریق دو سازوکار "وابسته به رونویسی" و "مستقل از رونویسی" صورت می گیرد (۳، ۵). در سازوکار وابسته به رونویسی، p53 برای مجموعه ای از پروتئین های پروآپوپتوزی از خانواده Bcl-2، Bax، Bid (...). به عنوان عامل رونویسی عمل می کند که موجب افزایش بیان این پروتئین ها و در نهایت القای نفوذپذیری میتوکندریایی و آزاد شدن سیتوکروم c می شود (۵). p53 در مسیر مستقل از رونویسی، به طور مستقیم میتوکندری را هدف قرار می دهد و با مهار اثر پروتئین های آنتی آپوپتوزی، نفوذپذیری میتوکندریایی و آزاد شدن سیتوکروم c را افزایش می دهد (۳). با این حال، اگرچه در شرایط پاتولوژیک مانند بروز انواع سرطان ها، این روند می تواند به سرکوب تومور و حذف سلول های بافت سرطانی کمک نماید، اما تشدید و فعال سازی مزمن این مسیر بیولوژیک کلیدی به ویژه در بافت های سوماتیک مانند مغز، عضله اسکلتی و قلبی حتی در افراد جوان و میانسال می تواند نامطلوب باشد (۱، ۲). در این بین، به دلیل ظرفیت بسیار محدود سلول های قلبی در پاسخ به آسیب و باززایی، آپوپتوز یکی از مهمترین عوامل ایجاد بیماری قلبی به ویژه نارسایی قلبی است. Favaloro و همکاران (۲۰۱۲)

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 ($n=5$)، مکمل مرزنجوش ($n=7$) و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی ($n=7$) جایگزین شدند.

روشن تهیه عصاره مرزنجوش و پروتکل مکمل‌یاری

ابتدا برگ و سرشاخه‌های جوان گیاه مرزنجوش در سایه خشک شدند. سپس، نمونه خشک شده گیاه توسط دستگاه خورده‌کننده پودر شد. ۱۰۰ گرم از پودر گیاه درون ارلن یک لیتری ریخته شد و به آن الکل اتیلیک ۰/۹۶ و آب مقطر به نسبت ۱ به ۱ اضافه گردید، به گونه‌ای که به حجم برسد. درب ارلن با ورق آلومینیومی پوشانده و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. طی ۲۴ 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.

معه 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 آنتی‌اکسیدانی سلولی و کند شدن روند آپوپتوز قلبی شود. با این حال، اثر این مکمل آنتی‌اکسیدانی 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 نور 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 نور دو ماهه ویستار ۱۴۸۴۸ از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید - دما (22 ± 2 سانتی‌گراد)، رطوبت محیط (50 ± 5 درصد) و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ - ساعت - 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

شیب (۱۵٪) حفظ شد. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته‌ی اول شروع و به ۶۰ دقیقه در روز در هفته‌ی پنجم رسیده و تا انتهای دوره حفظ شد (۱۶). 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 کارآموده جراحی و عضله قلبی آنها استخراج و وزن‌کشی شد. سپس نمونه در کرایوتیوب در نیتروژن مایع قرار داده شده و برای بررسی‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد.

پروتکل تمرین ورزشی: در ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی این دوره، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۰-۱۵ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۵-۱۰ 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 (۳۳-۲۴ متر/دقیقه با

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

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

استخراج RNA

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 سانتیفیوژ 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

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 لایز بافر همورنه شده و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به هر میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم افزوده شد و میکروتیوب به شدت با دست

میکرو لیتر Ribolock Ribonuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانتریفیوژ 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 ۴۲ درجه و در صورت استفاده از Random hexamer primer، ابتدا پنج 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.

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 صحرائی مشخص شده است. به عنوان بلائک 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)، به دست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تأیید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا، ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن GAPDH به عنوان مرجع محاسبه شد.

دمای ۲۰- درجه انکوبه شد. بعد از آن میکرو تیوب 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 میکرو تیوب اضافه گردید. بلافاصله میکرو تیوب به مدت پنج دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شده، مایع روئی 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 میکرو لیتر RNA و یک میکرو لیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و توسط DEPC-treated 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 ۱۴۰۰۰g 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 میکرو لیتر DEPC-treated water و یک میکرو لیتر oligo (dt) 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

جدول ۳. توالی پرایمرهای بیان ژنی عضله نعلی موش های صحرایی

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

تجزیه و تحلیل آماری

در بخش تجزیه و تحلیل داده ها، ابتدا توزیع توأم و بهنجار توسط آزمون شاپیروولک مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس داده های حاصله توسط آزمون تحلیل واریانس یک-طرفه و تعقیبی توکی مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی محاسبات آماری در سطح معنی داری ۰/۰۵ و با استفاده از نرم افزار SPSS22 انجام شد.

نتایج

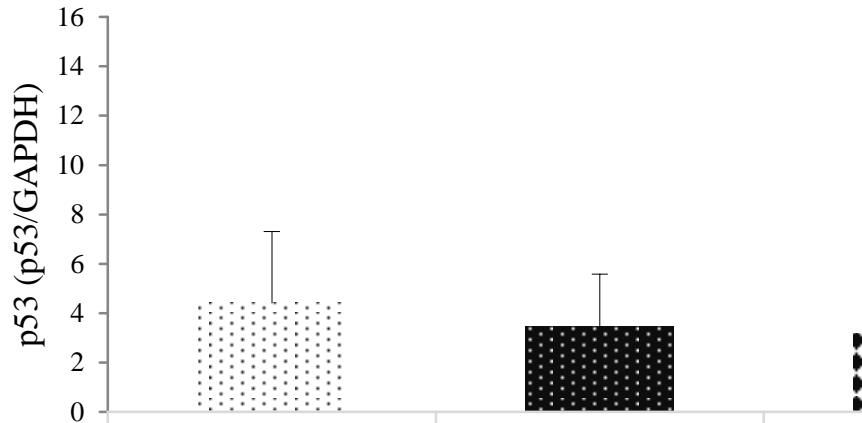
بر اساس نتایج حاصل از آزمون شاپیروولک، اختلاف معنی داری بین نمونه ی در دسترس با جامعه ی مورد نظر مشاهده نشد؛ بنابراین داده های جمع آوری شده همگن بوده و منحنی مربوط به این نمونه طبیعی فرض شد. برخی از ویژگی های موش های صحرایی مورد مطالعه در جدول ۴ نشان داده شده است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، تفاوت معنی داری 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 معنی داری بین گروه های مورد مطالعه در رابطه با وزن قلب مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

در رابطه با شاخص های مربوط به آپوتوز، نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری 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 معنی داری 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 معنی داری کمتر بود (حدود ۶۲٪؛ P=۰/۰۰۸) اما تفاوت معنی داری 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 معنی داری نیز بین گروه مکمل مرزنجوش و مکمل مرزنجوش+تمرین ورزشی در رابطه با بیان ژن سیتوکروم c مشاهده نشد (P=۰/۱۰۸).

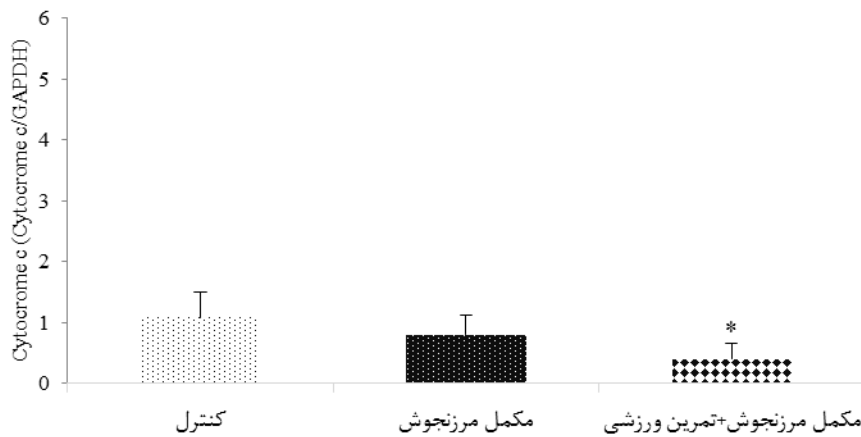
جدول ۴. مشخصات موش های صحرایی در گروه های مورد مطالعه

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

نسبت به دو گروه دیگر: *p<۰/۰۵



نمودار ۱. میزان بیان ژن p53 در گروه‌های مورد مطالعه



نمودار ۲. میزان بیان ژن سیتوکروم c در گروه‌های مورد مطالعه؛ نسبت به گروه کنترل: $p < 0.01$ *

بحث

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.

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

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 آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی و محتوی ترکیبات فنلی ۲۱ عصاره مورد استفاده در فیتوتراپی عنوان داشتند مرزنجوش از جمله گیاهانی است که دارای بیشترین محتوی فنلی و خواص آنتی‌اکسیدانی 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 گلوکوتیون 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 هیدروکسیلی بستگی دارد. لذا، گیاه مرزنجوش دارای ترکیبات فنولی با وزن مولکولی بالا می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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

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

دارند که مصرف عصاره مرزنجوش می‌تواند موجب القای آپوپتوز از طریق افزایش بیان پروتئین 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.

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 می‌تواند با کاهش تولید ROS و افزایش دفاع ضداکسایشی، روند آپوپتوز را کندتر کند. در پاسخ به فشار اکسایشی و افزایش پروتئین p53، جابه‌جایی 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) سیتوزولی باشد به طوری که 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 قطعه‌قطعه 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

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, Abdoliazade 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. Favalaro 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. Vujcic 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):497-7.
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.

Daneshvar
Medicine

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

Received: 27/04/2019

Last revised: 16/06/2019

Accepted: 23/06/2019

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 Pourrazi²

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 *Origanum 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 *Origanum 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