

مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش

سال پنجم، شماره اول؛

بهار و تابستان ۱۳۹۷

صفحات ۹۲-۸۳

Original Article

Open Access

تأثیر سه ماه تمرین هوازی همراه با مکمل سازی عصاره‌ی مرزن جوش بر آپوپتوز عضله‌ی نعلی موش‌های صحرائی نر

آرمین تمرخانی^۱، جبار بشیری^{۲*}

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۰۲

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۵



با اسکن QR فوق می‌توانید جزئیات مقاله حاضر را در سایت www.jahssp.azaruniv.ac.ir/ مشاهده کنید

۱. کارشناس ارشد، و مدرس، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران.

۲- گروه تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران. نویسنده مسئول:

bashiri.jabbar@gmail.com

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر سه ماه تمرین هوازی همراه با مکمل سازی عصاره‌ی مرزن جوش بر آپوپتوز عضله‌ی نعلی موش‌های صحرائی نر می‌باشد. در این مطالعه تجربی ۳۵ سر موش صحرائی نر سه ماهه به شکل تصادفی در پنج گروه (تمرین هوازی، مکمل مرزن جوش، تمرین + مکمل مرزن جوش، کنترل شش ماهه و کنترل سه ماهه) جایگزین شدند. گروه‌های تمرین و تمرین+مرزن جوش به مدت ۱۲ هفته تمرین هوازی (پنج روز در هفته، شیب ۱۵٪ به مدت ۶۰-۱۰ دقیقه و سرعت ۳۳-۳۴ متر/دقیقه) را انجام دادند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، عضله‌ی نعلی رت‌ها استخراج شد و میزان بیان ژن‌های درگیر در آپوپتوز (کاسپاز ۹ و سیتوکروم C)، از روش RT-PCR بررسی شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس تک راهه در سطح معنی‌داری ۰.۰۵ تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد پس از دوره مداخله، وزن عضله‌ی نعلی و نسبت وزن عضله‌ی نعلی به وزن بدن در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). همچنین، مقدار بیان نسبی کاسپاز ۹ در بین گروه‌ها بعد از دوره مداخله تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). ولی مقدار بیان نسبی سیتوکروم C در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). روند سالمندی باعث افزایش وزن بدن موش‌ها و کاهش نسبت وزن عضله‌ی نعلی به وزن بدن می‌شود و هم‌زمان کاسپاز ۹ افزایش می‌یابد، ولی مقدار بیان سیتوکروم C تغییر نمی‌کند. بالاین‌حال، تمرین و مصرف عصاره‌ی مرزن جوش تا اندازه‌ای این افزایش‌ها را کمتر می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، تمرین هوازی، مکمل مرزن جوش، سیتوکروم C، کاسپاز ۹

نحوه ارجاع: بشیری جبار. تأثیر سه ماه تمرین هوازی همراه با مکمل سازی عصاره مرزن جوش بر آپوپتوز عضله‌ی نعلی موش‌های صحرائی نر. مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش ۱۳۹۷؛ (۱): ۹۲-۸۳.

Journal of Applied Health Studies in Sport PhysiologyVolume 5, Number 1
Spring /Summer 2018
83-92

Original Article

 Open Access**Effectiveness of 3 months aerobic exercise with *Origanum majorana* extract on male rats soleus muscle apoptosis**Armin Tamarkhani¹, Jabbar bashiri^{2*}

Received 6 March 2019; Accepted 22 April 2019

Abstract

The aim of current study is investigation effectiveness of 3 months aerobic exercise with *Origanum majorana* extract on male rats soleus muscle apoptosis. In current experimental study, 35 heads of male rats with 3 month age were alternated randomize in 5 groups(aerobic exercise, *Origanum majorana* extract , exercise+ *Origanum majorana* extract , 6 months controlling and also 3 months controlling. Exercise and exercise+ *Origanum majorana* extract groups implemented aerobic exercises during 12 weeks (5 days per week, 15% inclination, 10-60 minutes and 24-33 m/m speed). After 48 hours of last exercise, male rats soleus muscle were extracted and involved genes expression in apoptosis (Caspase 9 and Cythochrome C) were investigated by PCR. Data were analyzed by one-way variance analysis test at 0.05 significant levels. Results showed that, after intervention; soleus muscle weight and its proportion against body weight had significant difference ($P<0.05$) between groups. Also caspase 9 relative expression amount between groups had significant difference ($P<0.05$) after intervention, but there wasn't significant difference between groups according to Cythochrome C relative expression amount. ($P>0.05$) Aging cause to increasing rats body weight and reducing soleus muscle weight against body weight and also Caspase 9 increase simultaneously, but Cythochrome C expression amount doesn't change. So, exercise and consumption of *Origanum majorana* extract lower mentioned increasing cases.

Keywords: Apoptosis, Aerobic exercise, *Origanum majorana* extract, Cythochrome C, Caspase 9.Scan this QR code to see the accompanying video, or visit jahssp.azaruniv.ac.ir

1- Department of Physical Education and Sport Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Iran.

2- Department of Physical Education, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran. corresponding Author:

bashiri.jabbar@gmail.com

Cite as: bashiri Jabbar. Effectiveness of 3 months aerobic exercise with *Origanum majorana* extract on male rats soleus muscle apoptosis. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2018; 5(1): 83-92.

به دلیل توجه عموم و جامعه علمی در یافتن مواد فعال بیولوژیکی طبیعی جدید، دانشمندان در سرتاسر جهان به بررسی گیاهان برای شناسایی فیتوشیمیایی‌های جدید روی آورده‌اند. اوریکونام ماجورانا^۱ (مرزن جوش) یک گیاه سالیانه در اروپای جنوبی و منطقه مدیترانه است. به دلیل تنوع در ساختار معطر و شیمیایی، گیاه مرزن جوش به‌طور گسترده برای معطر سازی مواد غذایی و نوشیدنی‌های الکلی به کار برده می‌شوند. این گیاهان همچنین به‌طور سنتی برای خصوصیات دارویی مورد توجه بوده‌اند از جمله: فعالیت‌های ضدباکتریایی، آنتی ترومبین و ضد قند بالا (۱،۲). مرزن جوش دارای خصوصیات درمانی مختلفی است که ممکن است در پاتوفیزیولوژی بسیاری از بیماری‌ها را مورد توجه قرار دهد. محمد و همکارانش^۲ (۲۰۰۸) بیان داشتند که فعالیت ضدالتهای مرزن جوش برای بیماران آسمی مفید است (۳). طبق بررسی جامع کالمبا^۳ و کونیکا^۴ (۲۰۰۳)، این گیاه همراه با آویشن، مریم گلی، مرزه، میخک و کافور جزء قوی‌ترین گیاهان دارای اثرات ضد میکروبی معرفی شده‌اند (۴). آلمبا^۵ و همکاران (۲۰۰۳) نیز در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدان اسانس نوعی مرزن جوش دریافتند که اثرات آنتی‌اکسیدان اسانس وابسته به غلظت بوده و اندکی کمتر از آسکوربیک اسید یا BHT^۶ بود. آن‌ها این اثر را به غلظت بالای ترکیبات فنلی از قبیل carvacrol (۲۶/۹۷ درصد)، thymol methyl ether (۱/۳ درصد)، در اسانس گیاه نسبت دادند (۵).

آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یک فرآیند ژنتیکی است که بخش تفکیک‌ناپذیر از رشد، توسعه و هموستاز موجود زنده بوده که برای حذف سلول‌های زائد با روشی هدفمند به کار می‌رود (۶). در این بین سیتوکروم c به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل آپوپتوزی که در فضای بین غشایی میتوکندری قرار دارد، با افزایش نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری به داخل سیتوزول رها می‌شود و موجب راه‌اندازی واکنش‌های کاسپازی در مسیر داخلی می‌شود که رهایش عوامل آپوپتوزی از میتوکندری به سیتوزول، موجب فعال سازی پروکاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۹ به‌عنوان آغازگر آپوپتوز در مسیر میتوکندریایی وارد عمل می‌شود. این روند نهایتاً موجب فعال سازی کاسپاز ۳ به‌عنوان کاسپاز اجرایی و فصل مشترک همه مسیرهای آپوپتوزی می‌گردد. کاسپازها پس از فعال شدن، بسیاری از پروتئین‌های حیاتی سلولی را هیدرولیز و تجزیه می‌کنند و باعث ورود به مرحله غیر قابل برگشت مرگ سلولی می‌شوند (۷،۸،۹).

در دهه‌های اخیر، تأثیر تمرینات ورزشی بر آپوپتوز مورد علاقه‌ی محققان حوزه‌ی ورزش قرار گرفته است (۱۰). در این راستا کین و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که ۷ هفته تمرینات شنا میزان فعالیت کاسپاز-۳ و بیان فاکتور مشتق از آپوپتوزیس^۷، BAX را به‌طور معناداری کاهش می‌دهد، اما موجب افزایش Bcl-2 موش‌های مبتلا به التهاب روده می‌شود (۱۱). همچنین سان^۸ و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که یک جلسه فعالیت وامانده ساز شنا موجب کاهش چشمگیر بیان ژن Bcl-2 در ۶ ساعت پس از ورزش می‌شود اما تأثیری بر BAX و نسبت BAX به Bcl-2 ندارد (۱۲). دملو^۹ و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که ۹ هفته تمرینات ورزشی در موش‌های مبتلا به نارسایی ریوی از طریق افزایش فعالیت Akt1 موجب کاهش آپوپتوزیس میوکاردا می‌شود (۱۳). از طرفی کولوکمبو^{۱۰} و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که ۵ هفته تمرینات هوازی با شدت ۶۰٪ اکسیژن مصرفی بیشینه موجب

افزایش غیرمعنادار کاسپاز-۳، pAkt و کاهش غیرمعنادار Bax/Bcl-2 شد (۱۴). هوانگ و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که ۱۰ هفته فعالیت استقامتی هوازی موجب کاهش معنادار کاسپاز-۳، گیرنده‌های Fas، Bak، Bax، سیتوکروم C و کاسپاز-۹ در بافت قلب موش‌های فاقد تخمدان می‌شود (۱۵). کاتر و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که تمرینات استقامتی با شدت پایین از طریق کاهش فشار اکسایشی و کاهش میزان آپوپتوزیس میوکاردا موجب بهبود عملکرد قلب در موش‌های دیابتی می‌شود (۱۶). حسن و کمال (۲۰۱۳) نشان دادند که ۵ هفته تمرینات شنا موجب کاهش فعالیت کاسپاز-۳ در قلب موش‌های نر ویستار سالم می‌شود (۱۷).

بنابراین بر اساس مطالعات کاسپاز ۹ و سیتوکروم C نقش مهمی در آپوپتوز دارند. همواره از تمرینات ورزشی به‌عنوان مهم‌ترین استراتژی غیردارویی برای بهتر عمل کردن عضله اسکلتی می‌توان استفاده نمود؛ که با توجه به پیشینه مطالعات، تمرینات ورزشی به‌ویژه تمرینات هوازی از طریق کاهش بیان ژن کاسپاز ۹ باعث جلوگیری از ایجاد آپوپتوز می‌گردد، باین‌حال، با توجه به اینکه تأثیر تمرینات استقامتی و مرزن جوش بر مارکر کاسپاز ۹ و سیتوکروم C مشخص نیست و تاکنون مطالعه جامعی به‌ویژه در داخل کشور در زمینه تأثیر تمرینات هوازی همراه با مکمل سازی عصاره مرزن جوش بر آپوپتوز عضله نعلی و تغییرات احتمالی مولکولی و پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز انجام نشده و اغلب مطالعات برخی جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوز عضله اسکلتی در طی فعالیت ورزشی حاد را مورد آزمایش قرار داده‌اند (۱۸،۱۹)، انتظار می‌رود با انجام تحقیق حاضر بتوان ضمن پاسخ به برخی ابهامات موجود و تعیین تأثیر تمرینات ورزشی و مصرف عصاره مرزن جوش بر آپوپتوز عضله نعلی، پیشنهادهای کاربردی متناسبی در راستای نحوه‌ی انجام تمرینات و مکمل‌های غذایی و نیز پیش‌بینی پیامدهای احتمالی ارائه داد.

روش‌شناسی پژوهش

در مطالعه‌ی حاضر، تعداد ۵۰ سر موش صحرایی نر دو ماهه ویستار ۱۴۸۴۸ از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و به‌صورت تجربی در قالب یک طرح پنج گروهی انجام شد. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، حیوانات مورد مطالعه به مدت دو هفته تحت شرایط استاندارد جدید با دمای (۲۲±۲ سانتی‌گراد)، رطوبت نسبی (۵±۵ درصد) و چرخه‌ی تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته در حیوان‌خانه‌ی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تبریز نگهداری شدند. حیوانات به‌صورت آزاد از غذای استاندارد و آب در طول دوره پژوهش استفاده کردند (۲۰).

پس از دو هفته نگهداری آزمودنی‌ها در شرایط جدید، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی قرار گرفتند. این نوارگردان دارای پنج کنال مجزا بود که همه آیت‌های مربوط به آن از قبیل مقدار شیب (مثبت و منفی)، سرعت و زمان توسط برنامه هوشمند کنترل می‌شد. در این دوره مقدار شوک الکتریکی به میزان ۰/۱ میلی ولت ثابت بود. در طی دوره آشنایی، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. روزانه حدود ۲۰ گرم پلت در اختیار هر حیوان موجود در هر قفس (موش صحرایی نر، بالغ دو ماهه یا میانگین وزن ۲۰۰ گرم) قرار داده می‌شد. باین‌حال با افزایش وزن حیوانات به‌مرور مقدار غذای مصرفی روزانه آن‌ها

6. Butylated Hydroxy Toluene
7. poptosis-inducing factor
8. Sun
9. De Melo
10. Colombo

1. Origanum majorana
2. Mohamed et al
3. Kalemba
4. Kunicka
5. Alma

مکمل مرزن جوش، برای پنج 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 فعالیت‌های هوازی در آزمودنی‌های انسانی با استفاده از نسبت‌های مختلف اکسیژن مصرفی بیشینه، ضربان قلب بیشینه، ضربان قلب ذخیره و سرعت عملکرد ورزشی تعیین می‌شود. از آنجاکه تحقیق حاضر بر روی آزمودنی حیوانی انجام می‌شد و امکانات لازم برای تعیین دقیق شدت فعالیت در اختیار نبود، تصمیم بر آن شد تا با استفاده از سرعت دویدن روی نوار گردان و شیب آن، میزان شدت فعالیت استقامتی کنترل شود. هر یک از موش‌ها در ابتدای جلسه تمرین، ۵ دقیقه با سرعت ۱۵-۱۰ متر در دقیقه و شیب صفر درجه، جهت گرم کردن دویند. سپس برای رسیدن به شدت تمرین مورد نظر، سرعت و شیب نوارگردان طی ۱۰-۵ دقیقه به شکل پلکانی افزوده شد. در انتهای برنامه تمرینی، برای سرد کردن آزمودنی‌ها، شیب دستگاه به صفر درجه برگشته و سرعت نیز به آرامی به ۱۵-۱۰ متر در دقیقه رسید. مدت مرحله سرد کردن در هفته‌های ابتدایی حدود ۵ دقیقه و در هفته‌های پایانی حدود ۱۰ دقیقه به طول انجامید. پروتکل تمرینی پژوهش حاضر، بر اساس مطالعه نشیو و همکاران (2001) طراحی گردید (۲۰) (جدول ۱).

افزوده می‌شد. علاوه بر غذا بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری آب هر کدام از قفس‌ها به‌طور روزانه از آب‌معدنی پر و تعویض می‌شد. به‌منظور عصاره‌گیری، نمونه خشک شده گیاه مورد نظر توسط دستگاه خرده‌کننده 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 گردید، به‌گونه‌ای که به حجم برسد. بعد از ۲۴ ساعت محلول صاف شد. سپس محلول صاف شده توسط دستگاه تقطیر در خلأ در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۷۰ دور در دقیقه تا ۳/۱ حجم اولیه تغلیظ گردید. تمامی موش‌ها پس از گذراندن دوره آشناسازی با فعالیت روی نوارگردان، به پنج گروه ۱. کنترل پایه، ۲. کنترل شش ماهه، ۳. تمرین هوازی، ۴. تمرین هوازی + مکمل مرزن جوش که گروه تمرین هوازی مرزن جوش علاوه بر شرکت در تمرین در طول تحقیق، مکمل مرزن جوش را به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به میزان یک گرم (۰/۰۹) گرم مرزن جوش+ سی‌سی سالیین) از طریق گاوژ دریافت نموده، ولی در تمرینات هوازی شرکت نکردند و ۵. مرزن جوش که این گروه نیز در طول تحقیق، مکمل مرزن جوش را به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به میزان یک گرم (۰/۰۹) گرم مرزن جوش+ سی‌سی سالیین) از طریق گاوژ دریافت نموده، ولی در تمرینات استقامتی شرکت نکردند تقسیم شدند که گروه‌های تمرین هوازی و تمرین هوازی+

جدول ۱: برنامه ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدتی معادل ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه

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
سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)	۲۴	۲۴	۲۵	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲
شیب نوارگردان (درصد)	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵

و پنج دقیقه در دمای چهار درجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتیفریوژ شد. سپس جداسازی گردید و به میکروتیوب دیگر منتقل شده و به محلول جدا شده حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه انکوبه شد. بعد از آن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتیفریوژ 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 ۱۳۷۰۰ g سانتیفریوژ شده، مایع رویی بیرون ریخته شد و به‌دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. سپس مجدداً به هر میکروتیوب ۰/۰۲ میلی‌لیتر آب تیمار شده

همه حیوانات گروه کنترل و تمرین هوازی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، آزمودنی‌ها توسط روش تنفسی توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش و سپس موش‌ها بلافاصله توسط متخصصین کارآزموده جراحی و عضله‌ی نعلی آن‌ها استخراج شد. سپس بخشی از بافت عضله‌ی نعلی آزمودنی‌ها برای بررسی میزان بیان ژنی یا mRNA پروتئین‌های سیتوکروم C و کاسپاز ۹ از روش Real Time-PCR در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد. برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (Thermo K0731, USA) حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت عضله نعلی در حضور یک میلی‌لیتر از بافر لیز کننده هموژنه شده و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به هر میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفورم افزوده شد و میکروتیوب به‌شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شده

دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. چهار میکرولیتر reaction buffer 5X و دو میکرولیتر dNTP 10mM mix و یک میکرولیتر Ribolock Ribonuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانتیفریژ مختصر، به مدت پنج دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میکرولیتر آنزیم RverrtAid TM H Minus M-MuLV Reverse (Bioneer, Germany) به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از primer oligo (dt) Random hexamer در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از primer در 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 پنج ژن مورد نظر انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های مورد نظر از دستگاه Rotor gene-6000 (USA) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی و توسط بایونیر (Bioneer, Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰nm مورد استفاده قرار گرفتند.

روش آماری پژوهش

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده، ابتدا کلیه داده‌ها برای تعیین نرمال بودن توزیع با استفاده از آزمون (کولموگروف-اسمیرنوف) مورد ارزیابی قرار گرفته، سپس برای تعیین اختلاف میزان شاخص‌های وزن بدن، وزن عضله نعلی و نسبت وزن عضله نعلی به بدن بین گروه‌های کنترل پایه (سه ماهه)، کنترل (شش ماهه)، تمرین هوازی، تمرین هوازی و مکمل سازی مرزن جوش و گروه مرزن جوش، از آزمون تحلیل واریانس تک راهه استفاده می‌شود. تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

یافته‌ها

ابتدا نتایج شکل توزیع تمام داده‌های مورد اندازه‌گیری با استفاده از آزمون k-s (کولموگروف-اسمیرنوف) نشان داد که توزیع تمام داده‌ها طبیعی است ($p > 0.05$). سپس نتایج آزمون تحلیل واریانس در مورد مقایسه وزن بدن، وزن عضله نعلی، نسبت وزن بدن به عضله نعلی و آپوپتوز (کاسپاز ۹ و سیتوکروم c) گروه‌ها پس از کسب اطمینان از توزیع طبیعی داده‌ها انجام گرفت (جدول ۱) و از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه گروه‌ها باهم استفاده شد (جدول ۲).

با دی اتیل پیروکربنات (DEPC¹) افزوده شد. RNA استخراج شده برای استفاده بعدی در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد. برای تعیین مقدار RNA از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی 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^۲ نامیده می‌شود. برای کالیبره نمودن دستگاه، حجم خاصی از آب مقطر یا TE درون کوت کوارتز ریخته و طیف جذبی آن در طول موج‌های 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 همین‌طور نسبت بین این دو از دستگاه خوانده می‌شد. پس از انتخاب محلول‌هایی که نسبت جذبی آن‌ها در محدوده مورد نظر باشد، از اعداد مربوط به طول موج ۲۶۰ نانومتر جهت 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 تک‌رشته‌ای می‌باشد برای تعیین مقدار RNA می‌توان از فرمول زیر استفاده کرد:

$$\text{RNA } (\text{ng}/\mu\text{l}) = \text{ضرب رقت} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 260$$

نمونه‌های RNA استخراج شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی گردید. در روش الکتروفورز روی ژل آگاروز نیز نمونه‌های RNA با غلظت‌های متفاوت بر روی ژل آگاروز (۱/۸ درصد) الکتروفورز شدند. حضور زیرواحدهای RNA تام، مشخص کننده کیفیت مناسب RNA استخراجی است. از کیت RevertAID TM First Standard (Fermentas, Canada) cDNA synthesis و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به صورت 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-treated eater به حجم نه میکرولیتر رسید. یک میکرولیتر DNase به تیوب اضافه 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 سانتیفریژ شد و پس از آن، در زیر هود به مدت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردید. به تیوب مربوطه ۱۱ میکرولیتر DEPC-treated water و یک میکرولیتر oligo primer (dt) یا Random hexamer Primer افزوده شد و پنج دقیقه در

جدول ۱: آزمون تحلیل واریانس

نتایج تحلیل واریانس		نتایج آزمون همسانی واریانس (لون)		متغیرها
Sig	F	sig	آماره لون	
* ۰/۰۰۱	۶/۵۵	۰/۱۳	۱/۹۷	وزن بدن
* ۰/۰۰۲	۵/۵۶	۰/۰۵۱	۲/۷۳	وزن نعلی
* ۰/۰۰۱	۱۰/۹۵	* ۰/۰۲۸	۳/۲۵	نسبت وزن بدن به نعلی
* ۰/۰۰۱	۳۷/۷۰	۰/۰۵۹	۲/۶۲	کاسپاز ۹
۰/۷۵	۰/۴۷	۰/۶۲	۰/۶۶	سیتوکروم c

برای بررسی بیشتر و دقیق‌تر بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی استفاده شده است، همچنین، نتایج تحلیل واریانس نشان می‌دهد که در فاکتور سیتوکروم c بین گروه‌ها هیچ اختلافی معناداری وجود ندارد.

نتایج تحلیل واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که در چهار متغیر وزن بدن، وزن عضله نعلی، نسبت وزن عضله نعلی به وزن بدن و کاسپاز ۹ حداقل در بین یکی از گروه‌ها در این شاخص‌ها اختلاف معناداری وجود دارد که

2. Dilution factor

1. Diethylpyrocarbonate

جدول ۲: نتایج آزمون تعقیبی

نتایج آزمون تعقیبی			
گروه‌ها	مقایسه در بین گروه‌های	اختلاف متوسط	sig
وزن بدن	کنترل سه ماهه با تمرین	-۵۵/۱۳±۸/۳۵	* /۰.۰۳
	کنترل سه ماهه با عصاره	-۴۳/۱۳±۳/۴۲	* /۰.۰۲۶
وزن عضله نعلی	کنترل سه ماهه با توأم	۶۱/۱۲±۸/۹۸	* /۰.۰۱
	کنترل سه ماهه با توأم	-۰/۰±۲۴/۰۷	* /۰.۰۳
	کنترل شش ماهه با توأم	-۰/۰±۲۳/۰۷	* /۰.۰۳
	عصاره با توأم	-۰/۰±۲۴/۰۷	* /۰.۰۲۳
نسبت وزن بدن به عضله نعلی	تمرین با کنترل شش ماهه	۰/۰±۰.۰۱۹/۰.۰۰۴	* /۰.۰۱۱
	کنترل شش با توأم	-۰/۰±۰.۰۲/۰.۰۰۴	* /۰.۰۰۶
کاسپاز ۹	کنترل سه ماهه با تمرین	-۰/۰±۲۳/۰۷	* /۰.۰۰۲
	کنترل سه ماهه با کنترل شش ماهه	-۰/۰±۹۳/۰.۸	* /۰.۰۰۱
	کنترل سه ماهه با عصاره	-۰/۰±۴۵/۰.۷	* /۰.۰۰۱
	تمرین با کنترل شش ماهه	-۰/۰±۶۰/۰.۷	* /۰.۰۰۱
	کنترل شش ماهه با عصاره	۰/۰±۴۷/۰.۷	* /۰.۰۰۱
	کنترل شش ماهه با توأم	-۰/۰±۷۴/۰.۷	* /۰.۰۰۱
	عصاره با توأم	۰/۰±۲۶/۰.۷	* /۰.۰۰۹

به‌تنهایی بهتر از اثر عصاره نبود؛ اما اثر توأم بهتر از مصرف عصاره به‌تنهایی بود. کمترین بیان نسبی کاسپاز ۹ در گروه کنترل سه ماهه و بیشترین آن در گروه کنترل شش ماهه مشاهده شد. همچنین، نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که بعد از دوره مداخله، مقدار بیان نسبی سیتوکروم C در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$) و در همه گروه‌ها مشابه بود.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بعد از دوره مداخله، مقدار بیان نسبی کاسپاز ۹ در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری دارد و کاسپاز ۹ پس از سپری شدن سه ماه از دوره زندگی (عمر) رت‌ها افزایش معنی‌داری داشت، ولی در هر سه گروه تمرین، عصاره و توأم از این افزایش جلوگیری شد، همچنین، نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که بعد از دوره مداخله، مقدار بیان نسبی سیتوکروم C در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت و در همه گروه‌ها مشابه بود. در رابطه با ژن کاسپاز ۹ نتایج نشان داد که انجام تمرین استقامتی و مصرف عصاره مرزن‌جوش باعث کاهش این ژن در بدن موش می‌شود، مقایسه بین گروهی نیز نمایانگر وجود تفاوت بین گروه‌های تمرین، عصاره‌ی مرزن‌جوش و توأم با گروه کنترل بود، ولی در رابطه با سیتوکروم C تفاوتی بین گروه‌های مختلف وجود نداشت پس در نتیجه تمرین و استفاده از عصاره مرزن‌جوش میزان این ژن را در بدن در طول دوره مداخله تغییر نمی‌دهد.

نتایج آزمون تعقیبی نشان داد (جدول ۲) که بعد از دوره مداخله، وزن بدن موش‌ها در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). در حقیقت بین گروه کنترل سه ماهه با گروه تمرین ($p = 0.003$)، بین گروه کنترل سه ماهه با عصاره مرزن‌جوش ($p = 0.026$)، بین گروه کنترل سه ماهه با گروه توأم ($p = 0.001$)، در پس‌آزمون اختلاف معناداری وجود دارد. همچنین، نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که بعد از دوره مداخله، وزن عضله‌ی نعلی در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). به‌طوری‌که بین گروه کنترل سه ماهه با گروه توأم ($p = 0.003$)، بین گروه کنترل شش ماهه با گروه توأم ($p = 0.003$)، بین گروه عصاره مرزن‌جوش با توأم ($p = 0.023$)، اختلاف معناداری در وزن عضله نعلی وجود داشت، ولی در بین سایر گروه‌ها تفاوتی از لحاظ وزن بدن مشاهده نشد. کمترین وزن عضله‌ی نعلی در گروه کنترل شش ماهه و بیشترین آن در گروه توأم مشاهده شد. همچنین، نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که بعد از دوره مداخله، نسبت وزن عضله نعلی به وزن بدن در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). به‌طوری‌که بین گروه کنترل شش ماهه با گروه تمرین ($p = 0.011$) و بین گروه کنترل شش ماهه با توأم ($p = 0.006$) اختلاف معناداری در نسبت وزن عضله نعلی به وزن بدن وجود داشت. در گروه‌های تمرین و توأم، بیشتر از گروه‌های کنترل شش ماهه بود، ولی در بین سایر گروه‌ها تفاوتی از این لحاظ مشاهده نشد. کمترین نسبت وزن عضله‌ی نعلی به وزن بدن در گروه کنترل شش ماهه و بیشترین آن در گروه تمرین و توأم مشاهده شد. از طرفی دیگر، نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که بعد از دوره مداخله، مقدار بیان نسبی کاسپاز ۹ در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) و کاسپاز ۹ پس از سپری شدن سه ماه از دوره زندگی (عمر) رت‌ها افزایش معنی‌داری داشت، ولی در هر سه گروه تمرین، عصاره و توأم از این افزایش جلوگیری شد ($p = 0.001$) و همچنین اثر تمرین

از آنجا که هیچ پژوهشی به طور مستقیم تأثیر عصاره مرزن جوش بر آپوپتوز عضله نعلی موش صحرایی نر را بررسی نکرده است، به طور کلی چند پژوهش محدود به تأثیرات مثبت عصاره مرزن جوش بر سلامتی تأکید دارد که با توجه به یافته های این پژوهش مبنی بر تأثیر مثبت عصاره مرزن جوش بر آپوپتوز عضله نعلی موش صحرایی و کاهش بیان کاسپاز ۹ می توان این نتایج را با یافته های رادگری و همکاران (۱۳۹۲) که به بررسی اثرات ناهنجاری زایی عصاره گیاه دارویی مرزن جوش بر موش سوری پرداختند همسو دانست، آن ها دریافته اند که مصرف دوز مناسب عصاره مرزن جوش بر سلامت رت ها تأثیر مثبت دارد (۲۱). همچنین، یافته های این پژوهش در مورد تأثیر تمرینات هوازی بر آپوپتوز عضله نعلی موش صحرایی نر با نتایج مطالعه، سانگ^۱ و همکاران (۲۰۰۶) همسو است. آن ها نشان دادند که ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت نسبی ۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه موجب کاهش معنی دار بیان پروتئین کاسپاز و قطعه قطعه شدن DNA در عضله اسکلتی موش های صحرایی سالخورده (۲۴ ماهه) می شود. کاهش قابل توجه بیان پروتئین کاسپاز ۳ متعاقب تمرین هوازی با کاهش عوامل پیش آپوپتوزی مانند بیان پروتئین Bax و نسبت بیان پروتئین Bax به Bcl 2 و نیز افزایش معنی دار پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 همراه بود. این کاهش پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی متعاقب تمرین هوازی در موش های سالخورده احتمالاً با کاهش رهاش عوامل آپوپتوتیک مانند سیتوکروم c و Apaf-1 در عضله اسکلتی همراه شده و موجب کاهش معنی دار بیان کاسپاز ۳ و متعاقب آن کاهش بیان ژن کاسپاز ۹ شده است (۱۸). همچنین، در تأیید نتایج این پژوهش، هو^۲ و همکاران (۲۰۱۲) اشاره داشتند که بیان پروتئین کاسپاز 3 در گروه تمرین (۱۲ هفته تمرین استقامتی) به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین به این نتایج دست یافتند که بیان پروتئین سیتوکروم c در گروه تمرین (۱۲ هفته تمرین استقامتی) به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود (۱۹) که این نتایج با یافته های مطالعه حاضر ناهمسو است. همچنین نتایج این پژوهش با یافته های کوچرتوک^۳ و همکاران (۲۰۰۸) افزایش معنی دار کاسپاز ۳ و 9 عضله نعلی و دوقلو؛ افزایش کاسپاز 8 - عضله نعلی و دوقلو (3 و 6 ساعت بعد از فعالیت معنی دار بود) افزایش درصد هسته های آپوپتوز شده (۱۰)، ناهمسو است. شاید دلیل ناهمسوایی این نتایج در پروتئین سیتوکروم c و افزایش کاسپاز نوع و شدت تمرینات هوازی یا سن و نژاد موش های صحرایی نر باشد که تفاوتی در بیان سیتوکروم c مشاهده نشد. همچنین نتایج این پژوهش با یافته های کوچرتوک و همکاران (۲۰۰۸) در عدم تغییر معنی دار سیتوکروم c را نشان داد با یافته های این پژوهش همسو است.

نسبت Bax به Bcl-2 شاخصی برای نشان دادن پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی می باشد که Bcl-2 به وسیله ممانعت از آگومری شدن Bax-Bax، با فعالیت پیش آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت می کند (۲۲). همچنین، پروتئین Bcl-2 با ورود به غشای خارجی میتوکندری، یکپارچگی غشا را با خارج ساختن یون های H⁺ از طریق کانال های یونی حفظ کرده و با اتصال به Apaf-1 فعال سازی کاسپاز را مهار می کند. این احتمال وجود دارد که در پاسخ به فشار اکسایشی، جابه جایی و استقرار پروتئین Bax در غشای بیرونی میتوکندری افزایش یابد (۲۲-۲۵). این موضوع تا اندازه ای می تواند ناشی از فعال شدن JNK سیتوزولی باشد، به طوری که JNK در حضور محرک های اثرس سلولی فسفریله شده و موجب مهار پروتئین Bcl-2 می شود، لذا پروتئین Bax اجازه جابه جایی به سمت میتوکندری را می یابد. پروتئین JNK^۴ در داخل میتوکندری، در باز شدن mPTP^۵ دخالت کرده و موجب رهاش عوامل پیش آپوپتوزی مانند سیتوکروم c به داخل سیتوزول می شود. به محض رهاش و ورود عوامل پیش آپوپتوزی به سیتوزول، سیتوکروم c می تواند از طریق

آبشار کاسپازی شامل کاسپاز ۹ و در نهایت کاسپاز ۳ باعث تشدید آپوپتوزیس شود (۲۶). همچنین، کاسپازها به ویژه کاسپاز ۹ و ۳ نقش مهمی در تغییر حالت بافت عضلانی بازی می کنند و برای تمایز سلولی این بار ضروری می باشد؛ بنابراین، این احتمال وجود دارد که حفظ فعالیت کاسپازی پس از تمرینات ورزشی ممکن است برای سایر اعمال سلولی مانند تغییر حالت ناشی از فعالیت ورزشی و تفکیک سلول های ماهوارهای مورد نیاز باشد (۲۷). لذا، احتمالاً سطوح پایینی از کاسپازها برای تحریک برخی فعالیت های سلولی و ترمیم یا رشد بافت متعاقب تمرین ورزشی مناسب باشد. اثبات چنین لئاری نیاز به تحقیق در مورد اثرات هم زمان تمرینات ورزشی بر عضله نعلی همراه با عصاره مرزن جوش را ضروری می سازد، در این راستا با بررسی مقدار نسبی کاسپاز ۹ موجود در عضله نعلی موش های صحرایی تمرین داده و عصاره مرزن جوش تغذیه شده، نتایج نشان می دهد که کاسپاز ۹ موجود عضله نعلی در گروه های تمرین با کنترل شش ماهه، کنترل شش ماهه با عصاره مرزن جوش، کنترل شش ماهه با تمرین عصاره مرزن جوش توأم و عصاره با تمرین عصاره مرزن جوش توأم متفاوت بوده و تمرین با عصاره اثرات خود را به عنوان مکانیزم اثر بر مرگ سلولی گذاشته اند. تفاوت موجود بین گروه کنترل با گروه های تمرین، عصاره و توأم به ترتیب ۶۸٪، ۴۷٪ و ۱۰۰٪ (گروه کنترل نسبت به دیگر گروه ها) بیشتر بوده است که نشان دهنده وجود میزان کم ژن کاسپاز ۹ در عضله نعلی موش های صحرایی است که تمرین کرده و عصاره مرزن جوش به غذای آن ها اضافه شده است، البته وجود مقدار کم کاسپاز ۹ در گروه تمرین، استفاده عصاره مرزن جوش و هر دو با هم نسبت به گروه کنترل روند آپوپتوز را کند کرده است. در این خصوص، ویشستین^۶ و همکاران (۲۰۱۱) اشاره داشتند که آپوپتوز میتوکندریایی اغلب با افزایش گونه های فعال اکسیژن همراه است (۲۶) و از طرفی، ژین^۷ و همکاران (۲۰۰۹) عنوان داشتند که تمرینات هوازی و استقامتی طولانی مدت می تواند با افزایش استرس اکسایشی موجب تشدید آپوپتوز شوند (۲۸) که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر همسو است. همچنین نتایج پژوهش حاضر با یافته های سیو^۸ و همکاران (۲۰۰۴) اشاره به عدم وجود اختلاف بین گروه تمرین و کنترل در بیان و فعالیت کاسپاز پس از هشت هفته تمرین روی نوارگردان داشتند (۲۹) ناهمسو است. همچنین، مک میلان^۹ و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش دادند که شش هفته تمرین استقامتی تأثیر معنی داری بر فعالیت پروتئازای آنزیم کاسپاز ۳ و ۹ و قطعه قطعه شدن DNA در عضله اسکلتی موش های صحرایی جوان (سه ماهه) و سالم ندارد (۲۷) ناهمسو است. به نظر می رسد دلیل اصلی تناقض مطالعه حاضر با نتایج سیو و همکاران (۲۰۰۶) و مک میلان و همکاران (۲۰۱۲) سن موش های صحرایی و پروتکل تمرینی و زمان نمونه گیری باشد به طوری که موش های مورد استفاده در پژوهش حاضر در حدود سه ماهه بودند که به عنوان موش های بالغ جوان محسوب می شوند، ولی سیو از موش های صحرایی ۲۴ ماهه استفاده کرده بودند که به عنوان موش های صحرایی سالخورده و پیر محسوب می شوند. در این راستا، استرس اکسایشی، سایتوکین های التهابی و اختلال در محافظت از استرس سلول سازوکارهای احتمالی هستند که در افزایش آپوپتوز بافت های پیر مشارکت می کنند (۱۸)، افزایش سن و پیری با افزایش قابل توجه آپوپتوز همراه است؛ که در این صورت احتمال تأثیر تمرینات ورزشی بر شاخص های آپوپتوزی مانند بیان ژن پروتئین کاسپاز ۳ و ۹ و قطعه قطعه شدن DNA بیشتر و بارزتر می شود (۳۰)، همچنین، ناهمخوانی نتایج مطالعه حاضر با پژوهش مک میلان و همکاران (۲۰۱۲) در حالی است که در هر دو مطالعه از قراردادهای تمرینی با شدت نسبی تقریباً یکسان و از موش های صحرایی بالغ جوان استفاده شده است. به نظر می رسد آنچه موجب

6. Vainshtein
7. Xin
8. Siu
9. McMillan

1. Song
2. Ho
3. Koçtürk
4. c-Jun-N-Terminal Kinase
5. Mitochondrial Permeability Transition Pore

۲۹، ۲۷، ۳۱، ۲۶). برخی از این پژوهشگران در بخشی از نتایج خود به افزایش یا عدم تغییر معنادر بیان پروتئین کاسپاز ۹ و یا تغییر معنادر سیتوکروم c دست یافتند که ممکن است دلیل این ناهمسانی نوع و شدت تمرینات هوازی، نوع مصرف مکمل، سن موش‌های صحرایی نر، نوع موش‌ها و یا زمان نمونه‌گیری باشد.

از طرفی دیگر، نتایج پژوهش نشان داد که وزن بدن موش‌ها در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری دارند، تمرین و مصرف عصاره مرزن‌جوش پس از سه ماه باعث کاهش وزن در هر سه گروه تمرین، مصرف عصاره مرزن‌جوش و توأم نسبت به گروه کنترل شده است. همچنین، نتایج پژوهش نشان داد که بعد از دوره مداخله، وزن عضله‌ی نعلی در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری دارد و اینکه بعد از دوره مداخله، نسبت وزن عضله نعلی به وزن بدن در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری دارد. در رابطه با وزن عضله‌ی نعلی نتایج نشان داد که در هر دو وضعیت (وزن عضله‌ی نعلی به‌تنهایی و نسبت آن به وزن بدن) با گذشت زمان از حجم عضله‌ی نعلی کاسته می‌شود ولی با استفاده از تمرین، عصاره مرزن‌جوش و این دو فرآیند باهم، وزن عضله‌ی نعلی کمتر کاهش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های رادگری و همکاران (۱۳۹۲) که به بررسی اثرات ناهنجاری زای عصاره گیاه دارویی مرزن‌جوش بر جنین‌های موش سوری پرداختند همسو است. آن‌ها دریافتند گروه دریافت‌کننده دوز بالای عصاره گیاه مرزن‌جوش در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنادر وزن و طول سری-دمی را دارند (۲۱).

با توجه به اینکه نتایج مربوط به این پژوهش نشان داد که ۳ ماه تمرین هوازی همراه با مکمل سازی عصاره مرزن‌جوش باعث تغییر در وزن بدن موش‌های صحرایی نسبت به گروه کنترل می‌شود و موجب افزایش معنادر وزن عضله‌ی نعلی نسبت به گروه کنترل شده (۱۰۱٪) و از همه مهم‌تر اثر مثبت و معنادر بر افزایش وزن عضله‌ی نعلی نسبت به وزن بدن، موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل گذاشت (۱۵۴٪)، به‌عبارت‌دیگر اگرچه ۳ ماه تمرین هوازی همراه با مکمل سازی عصاره مرزن‌جوش موجب تغییر بااهمیتی در وزن بدن موش‌ها در گروه‌های مختلف شد، این مداخله باعث شد که وزن عضله‌ی نعلی موش‌ها افزایش قابل‌توجهی داشته باشد. این نتایج با یافته‌های آرانج‌و و همکاران (۱۹۹۶) که دریافتند مصرف عصاره مرزن‌جوش موجب کاهش وزن رت‌ها می‌شود همسو است. مکانیسم احتمالی تأثیر عصاره مرزن‌جوش در کاهش وزن، وجود Alpha-Terpinene به‌عنوان یکی از ترکیبات عصاره مرزن‌جوش پیشنهاد شده است (۳۷).

در کل می‌توان نتیجه گرفت، تمرین و مصرف عصاره مرزن‌جوش تا اندازه‌ای احتمالاً می‌تواند آپوپتوز را کمتر کند و با کاهش وزن و افزایش نسبت وزن بدن به عضله نعلی همراه است. به‌علاوه در مورد جلوگیری از افزایش آپوپتوز ناشی از سن در مورد بیان نسبی سیتوکروم c و کاسپاز ۹، اثر مصرف هم‌زمان عصاره مرزن‌جوش و تمرین بهتر از مصرف عصاره به‌تنهایی به نظر می‌رسد. با این حال، با توجه به محدودیت‌های پژوهش حاضر مانند محدودیت‌های قلیل کنترل از جمله: کنترل و ثبت ویژگی‌های جسمانی گونه، نژاد، جنس، سن، وزن، کنترل عوامل محیطی (نور، دما و رطوبت)، کنترل رژیم غذایی و میزان غذای مصرفی روزانه، کنترل شرایط تمرین (شدت، مدت و نوع تمرین) و ابزار تمرین یکسان، کنترل نوع و محل بافت عضلانی استخراج شده، استفاده از وسایل و ابزار آزمایشگاهی، زمان و مکان اندازه‌گیری و آزمونگر یکسان برای همه‌ی آزمودنی‌ها و همچنین محدودیت‌های غیرقابل کنترل مانند عدم تعیین برخی از ظرفیت‌های فیزیولوژیک پایه، احتمال تأثیر و تداخل شوک الکتریکی، عدم اندازه‌گیری تغییرات مورفولوژیکی، عدم اندازه‌گیری برخی تغییرات آنزیمی و هیستوشیمیایی، عدم اندازه‌گیری سایر پروتئین‌های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز، عدم بررسی پروتئین‌های درگیر در مسیر خارجی آپوپتوز و

تناقض نتایج مطالعه حاضر با مطالعه مک میلان و همکاران (۲۰۱۲) شده است، تفاوت در نوع بافت مورد مطالعه و زمان برداشت بافت باشد، به‌طوری که در مطالعه حاضر، بافت عضله نعلی 48 ساعت پس از آخرین جلسه تمرین هوازی استخراج شد، ولی مک میلان و همکاران (۲۰۱۲) بلافاصله بعد از آخرین جلسه تمرین بافت عضله را استخراج کرده بودند. لذا، این احتمال دور از انتظار نمی‌باشد که در مطالعه مک میلان و همکاران (۲۰۱۲)، کاهش معنی‌دار بیان پروتئین سیتوکروم c و افزایش بیان کاسپاز ۳ و ۹ در گروه تمرین ناشی از اثرات آخرین جلسه تمرین هوازی با شدت بالای متوسط (60 دقیقه با سرعت 30 متر/دقیقه و شیب 3%) باشد، به‌طوری که اغلب مطالعات قبلی نیز اشاره به افزایش شاخص‌های مختلف؛ آپوپتوزی بلافاصله پس از یک جلسه فعالیت ورزشی متوسط به بالا و شدید داشتند (۲۴). در این راستا، ویلوگی^۱ و همکاران (۲۰۰۳) اشاره داشتند که بیان ژن کاسپاز ۳ در عضله پهن جانی متعاقب فعالیت ورزشی برون‌گرا، بلافاصله پس از فعالیت افزایش یافته و زمان اوج آن حدود 24 ساعت پس از فعالیت ورزشی می‌باشد (۳۱). لذا، با توجه به زمان برداشت بافت در مطالعه حاضر که 48 ساعت پس از آخرین جلسه تمرین نسبتاً شدید بود، این احتمال وجود دارد که کاهش بیان ژن کاسپاز 3 در گروه تمرین و توأم ناشی از آخرین جلسه تمرین، به‌طور کامل به مقادیر پایه برگشته باشد. به‌علاوه، اگرچه در مطالعه حاضر به دلیل برخی محدودیت‌ها امکان ارزیابی شاخص‌های التهابی مانند TNF- α و IL-6 نبود، این احتمال نیز دور از انتظار نیست که افزایش TNF- α و IL-6 پلاسما با فعال کردن مستقیم کاسپاز ۳ و متعاقب آن کاسپاز ۹ از طریق مسیر خارجی میانجی‌گری کرده باشد (۱۰). افزایش سطوح TNF- α گردش خون، منجر به افزایش لیگاند متصل شونده به گیرنده TNF- α در سارکولما شده و باعث افزایش آپوپتوز از طریق مسیر خارجی می‌شود. همه این اثرات ممکن است باعث فعال شدن کاسپاز ۸ و کاسپاز ۳ از طریق مسیر خارجی شود. در کل، کنترل کاسپاز ۳ فرآیند پیچیده‌ای است و چندین مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز را درگیر می‌کند. نشان داده شده است که کاسپاز ۳ به‌وسیله فعال شدن کاسپاز ۱۲ از طریق مسیر آزادسازی کلسیم یا به‌وسیله فعال شدن کاسپاز ۹ در مسیر داخلی و یا افزایش TNF- α سرم در مسیر خارجی فعال می‌شود (۱۰). همچنین، کاسپاز ۹ نقش مهمی در تغییر حالت بافت عضلانی به‌ویژه در عضلات اسکلتی بازی می‌کند و برای تمایز سلولی عضله اسکلتی ضروری می‌باشد؛ بنابراین، حفظ فعالیت کاسپاز ۹ پس از تمرینات ورزشی ممکن است برای سایر اعمال سلولی مانند تغییر حالت ناشی از فعالیت ورزشی و تفکیک سلول‌های ماهواره‌ای مورد نیاز باشد (۲۷). لذا، احتمالاً سطوح پائینی از کاسپاز ۹ برای تحریک برخی فعالیت‌های سلولی و ترمیم یا رشد بافت متعاقب تمرین ورزشی مناسب باشد. لذا به نظر می‌رسد که در گذر از نوع و شکل تمرین، تمرین هوازی بر سازوکارهای کاسپازی در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی جوان تأثیر داشته باشد، اما بر بیان پروتئین سیتوکروم c تأثیر چندانی نداشته باشد.

به‌طور کلی نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های دوستار و همکاران (۲۰۰۸)، کوچتورک و همکاران (۲۰۰۸)، لی^۲ و همکاران (۲۰۱۳)، پترسون^۳ و همکاران (۲۰۰۸)، رادگری و همکاران (۱۳۹۲)، سلفنگ و همکاران (۲۰۰۶)، هو و همکاران (۲۰۱۲)، ژین و همکاران (۲۰۰۹)، وینشتین و همکاران (۲۰۱۱)، کیم^۴ و همکاران (۲۰۱۰) همسو است (۳۳، ۱۰، ۳۳، ۲۲، ۲۱، ۱۸، ۱۹، ۲۸، ۲۶، ۳۴). برخی از این پژوهشگران در بخشی از نتایج خود به کاهش بیان پروتئین کاسپاز ۹ و یا عدم تغییر معنادر سیتوکروم c دست یافتند. همچنین نتایج این پژوهش با یافته‌های کوادریلاترو^۵ و همکاران (۲۰۱۰)، کوچتورک و همکاران (۲۰۰۸)، ارسلان و همکاران (۲۰۰۲)، پترسون و همکاران (۲۰۰۸)، سیو و همکاران (۲۰۰۴)، مک میلان و همکاران (۲۰۱۲) و ویلوگی و همکاران (۲۰۰۳)، وینشتین و همکاران (۲۰۱۱)، ناهمسو است (۳۵)، ۱۰، ۳۶، ۲۲.

4. Kim
5. Quadrilatero
6. Araujo

1. Willoughby
2. Lee
3. Peterson



11. Qin L, Yao Z, Chang Q, Zhao Y, Liu N, Zhu X, et al. Swimming attenuates inflammation, oxidative stress, and apoptosis in a rat model of dextran sulfate sodium-induced chronic colitis. *Oncotarget*. 2017;8(5):73-91.
12. Sun Y, Cui D, Zhang Z, Zhang T, Shi J, Jin H, et al. Attenuated Oxidative Stress following Acute Exhaustive Swimming Exercise Was Accompanied with Modified Gene Expression Profiles of Apoptosis in the Skeletal Muscle of Mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
13. de Melo BL, Vieira SS, Antônio EL, dos Santos LF, Portes LA, Feliciano RS, et al. Exercise training attenuates right ventricular remodeling in rats with pulmonary arterial stenosis. *Frontiers in Physiology*. 2016;7.
14. Colombo R, Siqueira R, Conzatti A, Fernandes TRG, Tavares AMV, da Rosa Araújo AS, et al. Aerobic exercise promotes a decrease in right ventricle apoptotic proteins in experimental cor pulmonale. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2015;66(3):53-246.
15. Huang C-Y, Lin Y-Y, Hsu C-C, Cheng S-M, Shyu W-C, Ting H, et al. Antiapoptotic effect of exercise training on ovariectomized rat hearts. *Journal of Applied Physiology*. 2016;12 (2):65-457.
16. Kanter M, Aksu F, Takir M, Kostek O, Kanter B, Oymagil A. Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2016.
17. Hassan A, Kamal MM. Effect of exercise training and anabolic androgenic steroids on hemodynamics, glycogen content, angiogenesis and apoptosis of cardiac muscle in adult male rats. *Ijohs*. 2013;7(1):47-60.
18. Song, K., Kwak, H., Lawler, J.M. 2006. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal*, 8(3): 517-528.
19. Ho, T. J., Huang, C. C., Huang, C. Y., Lin, W. T. 2012. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, protects against excessive endurance exercise training-induced cardiac hypertrophy, apoptosis and fibrosis in rats. *European journal of applied physiology*, 112(8): 2943-2955.
20. Natio, H., Powers, S.K., Demirel, H.A., Aoki, J. 2001. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Med Sci Sports Exerc*, 33(5): 729-734.
21. Radgari Kashani, A., Ansari, M., Mahranniya, K., Moazami, K., Joybari, S.(2014). Evaluation of the anomaly effects of Marjoram medicinal extract on mice embryos. *Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences*.71(8).P 502-508.
22. 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. *J Appl Physiol* 2008; 105: 1934-19.
23. García-Sáez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ* 2012; 19(11): 1733-40.
24. Kwak, H. B. 2013. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *Journal of exercise rehabilitation*, 9(2): 212-219.
25. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2011; 351(1-2):41-58.
26. Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. *J Appl Physiol* 2011; 110(6):1638-1645.
27. McMillan EM, Graham DA, Rush JWE, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of

از طرفی با توجه به این محدودیت‌های امکان ارزیابی شاخص‌های التهابی مانند TNF- α و IL-6، عدم اندازه‌گیری تغییرات مورفولوژیکی، ارزیابی بیان سایر پروتئین‌های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز، بررسی بیان پروتئین‌های درگیر در مسیر خارجی آپوپتوز و اندازه‌گیری محتوای پروتئین‌های مورد نظر، اظهار نظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری وزن و شاخص‌های مربوط به آپوپتوز مانند کاسپاز ۹ و سیتوکروم C عضله‌ی نعلی از تمرینات ورزشی مختلف و عصاره‌ی مرزن‌جوش و یا تحلیل و تبدیل این نتایج به موارد خوراکی و مورد استفاده ورزشکاران و جوامع انسانی منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد. از طرفی، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از تفاوت معنی‌دار شاخص‌های آپوپتوزی بین گروه تمرین هوازی، مصرف عصاره مرزن‌جوش و توأم با گروه کنترل احتمالاً استفاده از تمرینات ورزشی هوازی به‌جای سایر تمرینات و مصرف عصاره مرزن‌جوش، تغییراتی را در آپوپتوز عضله اسکلتی ایجاد خواهد کرد. اگرچه امکان بروز آپوپتوز شدید در این مرحله زندگی (جوانی) به‌ندرت وجود دارد، ولی از آنجایی که اثر فزاینده تمرین هوازی بر بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 و نسبت بیان ژن Bax به Bcl-2 عضله‌ی نعلی قابل توجه بود، لذا به نظر می‌رسد که می‌توان از تمرینات هوازی به‌عنوان یک عامل پیشگیرانه و مداخله کاربردی غیربایستی برای محافظت از سلول‌های عضله اسکلتی بهره برد. در این راستا، با توجه به نتایج حاصل، امکان حصول شرایط و محیط مطلوب‌تر برای بقای سلول‌های عضلانی حتی در بیماران مبتلا به نارحتی‌های عضلانی مانند سارکوپنیا، پس از تمرینات هوازی نیز وجود دارد.

منابع

1. Dorman HJ, Deans SG. *J. Appl. Microbiol.* Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. 2000; 88: 308-316.
2. Lemhadri A, Zeggwagh NA, Maghrani M, Jouad H, Eddouks M. *J. Ethnopharmacol.* study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. 2004; 92: 251-256.
3. Mohamed M, Saad H & Abd El Khalek M. Daily consumption of marjoram oil improves the health status of patients with asthma. *Pak J Nutr.*2008;7: 312-316.
4. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10: 813 - 29.
5. Alma MH, Mavi A, Yildirim A, Digrak M, Hirata T. Screening Chemical Composition and in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils from *Origanum syriacum* L. Growing in Turkey. *Biol. Pharm. Bull.* 2003; 26:1725 - 9.
6. Cerella C, Grandjenette C, Dicato M, Diederich M. Roles of Apoptosis and Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Curr Drug Targets* 2016; 17(4):405-15.
7. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* 2013; 14: 32.
8. Parrish AB, Freel CD, Kombluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(6): a008672.
9. Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res* 2012; 318(11): 1213-20.
10. Koçtürk, S., Kayatekin, B. M., Resmi, H., Açıkgöz, O., Kaynak, C., Özer, E. 2008. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats. *European journal of applied physiology*, 102(5): 515-524.

- treadmill training. *J Appl Physiol* 2012; 113(7): 1048-1057.
28. Xin L, Jian LU, Wei WU. Effect of Long-term Endurance Exercise on Cardiac Apoptosis. *J Mian Nor Univ* 2009; 7(2): 2009-2011.
 29. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J* 2004; 18(10): 1150-1152.
 30. Marzetti, E., Groban, L., Wohlgemuth, S. E., Lees, H. A., Lin, M., Jobe, H., et al. 2008. Effects of short-term GH supplementation and treadmill exercise training on physical performance and skeletal muscle apoptosis in old rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(2): 558-567.
 31. Willoughby, N., Taylor, M., Taylor, L. 2003. Glucocorticoid receptor and ubiquitin expression after repeated eccentric exercise. *Med Sci in Sports and Exer*, 35(12): 2023-31.
 32. Dostar, Y., Mohajeri, D., Rezaei, A., Hashemi, M.(2008). The role of endurance swimming sport on occurrence of apoptosis in experimental rat diabetic myopathy. *Veterinary Journal of Tabriz Islamic Azad University*, 3(4), p 630-636.
 33. Lee, S. D., Shyu, W. C., Cheng, I. S., Kuo, C. H., Chan, Y. S., Lin, Y. M., et al. 2013. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(6): 566-573.
 34. Kim, KB., Kim, YA., Park, JJ. 2010. Effects of 8 week exercise on bcl-2, bax, caspase-8, caspase-3 and HSP70 in mouse gastrocnemius muscle. *Journal of Life Science*; 20(9): 1409-1414.
 35. Quadriatero, J., Bombardier, E., Norris, S.M., Talanian, J.L., Palmer, M.S., Logan, H., et al. 2010. Prolonged moderate-intensity aerobic exercise does not alter apoptotic signaling and DNA fragmentation in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(3): 534-547.
 36. Arslan, S., Erdem, S., Sivri, A., Hasçelik, Z., Tan, E. 2002. Exercise-induced apoptosis of rat skeletal muscle and the effect of meloxicam. *Rheumatology international*, 21(4): 133-136.
 37. Araujo IB, Souza CA, De-Carvalho RR, Kuriyama SN, Rodrigues RP, Vollmer RS, et al. Study of the embryofetotoxicity of alphaterpinene in the rat. *Food Chem Toxicol* 1996;34(5):477-82.