JAHSSP

http://jahssp.azaruniv.ac.ir/
http://dx.doi.org/10.22049/jassp.2019.26526.1201

مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش

سال پنجم، شماره اول؛
بهار و تابستان ۱۳۹۷
صفحات ۹۲-۸۳

مقاله پژوهشی

تأثیر سه ماه تمرین هوازی همراه با مکمل‌سازی عصاره‌ی مرزن‌جوش بر آپوپتوز عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی نر

آرمین تمرخانی[۱]، جبار بشیری[۱*]

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۰۲

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر سه ماه تمرین هوازی همراه با مکمل‌سازی عصاره‌ی مرزن‌جوش بر آپوپتوز عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی نر می‌باشد. در این مطالعه تجربی ۳۵ سر موش صحرایی نر سه ماهه به شکل تصادفی در پنج گروه (تمرین هوازی، مکمل مرزن‌جوش، تمرین + مکمل مرزن‌جوش، کنترل شش ماهه و کنترل سه ماهه) جایگزین شدند. گروه‌های تمرین و تمرین+مرزن‌جوش به مدت ۱۲ هفته تمرین هوازی (پنج روز در هفته، شیب ٪۱۵ به مدت ۶۰-۱۰ دقیقه و سرعت ۳۳-۲۴ 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 تجزیه‌وتحلیل 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<۰/۰۵). همچنین، مقدار بیان نسبی کاسپاز ۹ در بین گروه‌ها بعد از دوره مداخله تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). ولی مقدار بیان نسبی سیتوکروم c در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). 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. بااین‌حال، تمرین و مصرف عصاره‌ی مرزن‌جوش تا اندازه‌ای این افزایش‌ها را کمتر می‌کند.

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.
نویسنده مسئول:
bashiri.jabbar@gmail.com

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

تمامی حقوق این مقاله بازمتن برای دانشگاه شهید مدنی آذربایجان محفوظ است.

نحوه ارجاع: بشیری جبار. تأثیر سه ماه تمرین هوازی همراه با مکمل‌سازی عصاره مرزن‌جوش بر آپوپتوز عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی نر. دو فصلنامه مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش ۱۳۹۷؛ ۵(۱): ۹۲-۸۳.

JAHSSP

http://jahssp.azaruniv.ac.ir/
http://dx.doi.org/10.22049/jassp.2019.26526.1201

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

Original Article

Effectiveness of 3 months aerobic exercise with Origanum majorana extract on male rats soleus muscle apoptosis

Armin tamarkhani ،Jabbar bashiri [1]*

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 Cythocrome 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 Cythocrome 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 Cythocrome 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, Cythocrome C, Caspase 9.

All rights are reserved for Azarbaijan Shahid Madani University.

Scan this QR code to see the accompanying video, or visit jahssp.azaruniv.ac.ir

١– Department of Physical Education and Sport Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, 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.

مقدمه

بـه دلیـل توجـه عموم و جـامعـه علمی در یافتن مواد فعال بیولوژیکی طبیعی جدید، دانشـمندان در سرتاسر جهان به بررسی گیاهان برای شناسایی فیتوشـیمیایی‌های جدید روی آورده‌اند. اوریگونام ماجورانا[1] (مرزن‌جوش) یک گیاه سالیانه در اروپای جنوبی و منطقه مدیترانه است. به دلیل تنوع در ساختار معطر و شـیمیایی، گیاه مرزن‌جوش به‌طور گسـترده برای معطّرسـازی مواد غذایی و نوشـیدنی‌های الکلی به کار برده می‌شـوند. این گیاهان همچنین به‌طور سنتی برای خصوصیات دارویی مورد توجه بوده‌اند ازجمله: فعالیت‌های ضـدباکتریـایی، آنتی ترومبین و ضـد قنـد بـالـا (۱،۲). مرزن‌جوش دارای خصـوصیات درمانی مختلفی است که ممکن است در پاتوفیزیولوژی بسیاری از بیماری‌ها را مورد توجه قرار دهد. محمد و همکارانش[2] (۲۰۰۸) بیان داشتند که فعالیت ضـدالتهابی مرزن‌جوش برای بیماران آسمی مفید است (۳). طبق بررسی جامع کالمبا[3] و کونیکا[4] (۲۰۰۳)، این گیاه همراه با آویشن، مریم گلی، مرزه، میخک و کافور جزء قوی‌ترین گیاهان دارای اثرات ضـد میکروبی معرفی شـده‌انـد (۴). آلمـا[5] و همکـاران (۲۰۰۳) نیز در بررسـی اثرات آنتی‌اکسیدان اسانس نوعی مرزنجوش دریافتند که اثرات آنتی‌اکسیدان اسانس وابسـته به غلظت بوده و اندکی کمتر از آسکوربیک اسید یا BHT[6] بود. آن‌ها این اثر را به غلظت بالای ترکیبات فنلی از قبیل carvacrol (۲۶/۹۷ درصـد)، thymol methyl ether (۱/۳ درصد)، در اسانس گیاه نسبت دادند (۵).

آپوپتوز یا مرگ سـلولی برنامه‌ریزی شـده یک فرآیند ژنتیکی است که بخش تفکیک‌ناپذیر از رشـد، توسـعه و هومئوستاز موجود زنده بوده که برای حـذف سـلول‌هـای زائـد با روشـی هدفمند به کار می‌رود (۶). در این بین سـیتوکروم c به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل آپوپتوزی که در فضـای بین غشایی میتوکندری قرار دارد، با افزایش نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری به داخل سـیتوزول رها می‌شـود و موجب راه‌اندازی واکنش‌های کاسپازی در مسـیر داخلی می‌شود که رهایش عوامل آپوپتوزی از میتوکندری به سیتوزل، موجب فعال‌سـازی پروکاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۹ به‌عنوان آغازگر آپوپتوز در مسـیر میتوکندریایی وارد عمل می‌شـود. این روند نهایتاً موجب فعال‌سـازی کاسـپاز ۳ به‌عنوان کاسـپاز اجرایی و فصل مشترک همه مسیرهای آپوپتوزی می‌گردد. کاسـپازها پس از فعال شدن، بسیاری از پروتئین‌های حیاتی سلولی را هیدرولیز و تجزیه می‌کنند و باعث ورود به مرحله غیر قابل برگشـت مرگ سلولی می‌شوند (۷،۸،۹).

در دهه‌ی اخیر، تأثیر تمرینات ورزشی بر آپوپتوز مورد علاقه‌ی محققان حوزه‌ی ورزش قرار گرفته اسـت (۱۰). در این راستا کین و همکاران (۲۰۱۷) نشـان دادند که ۷ هفته تمرینات شـنا میزان فعالیت کاسپاز-۳ و بیان فاکتور مشـتق از آپوپتوزیس[7]، BAX را به‌طور معناداری کاهش می‌دهد، اما موجب افزایش Bcl-2 موش‌های مبتلا به التهاب روده می‌شود (۱۱). همچنین سان[8] و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که یک جلسه فعالیت وامانده ساز شنا موجب کاهش چشـمگیر بیان ژن Bcl-2 در ۶ سـاعت پس از ورزش می‌شـود اما تـأثیری بر BAX و نسـبت BAX به Bcl-2 ندارد (۱۲). دملو[9] و همکاران (۲۰۱۶) نشـان دادنـد کـه ۹ هفته تمرینات ورزشـی در موش‌های مبتلا به نـارسـایی ریوی از طریق افزایش فعـالیت Akt1 موجب کاهش آپوپتوزیس میوکارد می‌شـود (۱۳). از طرفی کولوکمبو[10] و همکاران (۲۰۱۵) نشـان دادند که ۵ هفته تمرینات هوازی با شـدت ۶۰٪ اکسـیژن مصـرفی بیشینه موجب افزایش غیرمعنادار کاسـپاز-۳، pAkt و کاهش غیرمعنادار Bax/Bcl-2 شـد (۱۴). هوانگ و همکاران (۲۰۱۶) نشـان دادند که ۱۰ هفته فعالیت استقامتی هوازی موجـب کـاهش معنـادار کـاسـپاز-۳، گیرنده‌های Fas، Bak، Bax، سـیتوکروم C و کاسـپاز -۹ در بافت قلب موش‌های فاقد تخمدان می‌شـود (۱۵). کانتر و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که تمرینات استقامتی با شدت پایین از طریق کاهش فشـار اکسـایشـی و کاهش میزان آپوپتوزیس میوکارد موجب بهبود عملکرد قلب در موش‌های دیابتی می‌شـود (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 اسـاس مطالعات کاسـپاز ۹ و سـیتوکروم C نقش مهمی در آپوپتوز دارنـد. همواره از تمرینـات ورزشـی بـه‌عنوان مهم‌ترین اسـتراتژی غیردارویی برای بهتر عمل کردن عضله‌ی 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، بااین‌حال، با توجه به اینکه تأثیر تمرینات اسـتقامتی و مرزن‌جوش بر مارکر کاسـپاز ۹ و سیتوکروم C مشخص نیست و تاکنون مطالعه جامعی به‌ویژه در داخل کشور درزمینه‌ی تأثیر تمرینات هوازی همراه با مکمل سـازی عصاره‌ی مرزن‌جوش بر آپوپتوز عضله‌ی نعلی و تغییرات احتمالی مولکولی و پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز انجام نشـده و اغلب مطالعات برخی جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوز عضـله‌ی اسـکلتی در طی فعالیت ورزشـی حاد را مورد آزمایش قرار داده‌اند (۱۸،۱۹)، انتظار می‌رود با انجام تحقیق حاضـر بتوان ضـمن پاسـخ به برخی ابهامات موجود و تعیین تأثیر تمرینات ورزشی و مصرف عصاره مرزنجوش بر آپوپتوز عضـله‌ی نعلی، پیشـنهادهای کاربردی متناسـبی در راسـتای نحوه‌ی انجام تمرینات و مکمل‌های غذایی و نیز پیش‌بینی پیامدهای احتمالی ارائه داد.

روش‌شناسی پژوهش

در مطالعه‌ی حاضـر، تعداد ۵۰ سـر موش صـحرایی 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 شـرایط استاندارد جدید با دمای (۲±۲۲ سـانتی‌گراد)، رطوبت نسـبی (۵±۵۰ درصـد) و چرخه‌ی تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته در حیوان‌خانه‌ی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تبریز نگهداری شـدند. 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 هوشـمنـد حیوانی قرار گرفتند. این نوارگردان دارای پنج کانال مجزا بود که همه آیتم‌های مربوط به آن از قبیل مقدار شـیب (مثبت و منفی)، سـرعت 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 درصـد، سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. روزانـه حـدود ۲۰ گرم پلـت در اختیـار هر حیوان موجود در هر قفس (موش صـحرایی نر، بـالغ دو مـاهه با میانگین وزن ۲۰۰ گرم) قرار داده می‌شـد. بااین‌حال با افزایش وزن حیوانات به‌مرور مقدار غذای مصـرفی روزانه آن‌ها

1. Origanum majorana
2. Mohamed et al
3. Kalemba
4. Kunicka
5. Alma
6. Butylated Hydroxy Toluene
7. poptosis-inducing factor
8. Sun
9. De Melo
10. Colombo

افزوده می‌شـد. 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 خرده کننده 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 مرزن‌جوش که گروه تمرین هوازی مرزن‌جوش علاوه بر شرکت در تمرین در طول تحقیق، مکمل مرزن‌جوش را به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به میزان یک گرم (۰/۰۹ گرم مرزن‌جوش+۹ سی‌سی سالین) از طریق گاواژ دریافت نموده، ولی در تمرینات هوازی شرکت نکردند و ۵. مرزن‌جوش که این گروه نیز در طول تحقیق، مکمل مرزن‌جوش را به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به میزان یک گرم (۰/۰۹ گرم مرزن‌جوش+۹ سی‌سی سالین) از طریق گاواژ دریافت نموده، ولی در تمرینات استقامتی شرکت نکردند تقسیم شدند که گروه‌های تمرین هوازی و تمرین هوازی+ مکمل مرزن‌جوش، 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. ازآنجاکه 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 دویدند. سپس برای رسیدن به‌شدت 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 به‌آرامی 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).

جدول ۱: برنامه‌ی 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	٤٥	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠
سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)	٢٤	٢٤	٢٥	٢٥	٢٦	٢٧	٢٨	٢٩	٣٠	٣١	٣٢	٣٣
شیب نوارگردان (درصد)	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥	١٥

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 کلروفروم افزوده شد و میکروتیوب به‌شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شده و پنج دقیقه در دمای چهار درجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتریفیوژ 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 سانترفوژ 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 سانترفوژ 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

با دی اتیل پیروکربنات (DEPC[1]) 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، به‌طوری‌که 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[2] نامیده می‌شود. برای کالیبره نمودن دستگاه، حجم خاصی از آب مقطر یا TE درون کوت کوارتز ریخته و طیف جذبی آن در طول‌موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر روی صفر تنظیم شد. A۲۶۰، میزان جذب نور متوسط DNA در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر و A۲۸۰، میزان جذب نور متوسط RNA در طول‌موج ۲۸۰ نانومتر است. پس از کالیبره شدن، حجم خاصی از نمونه RNA رقیق شده داخل کوت ریخته شده، A۲۶۰ و A۲۸۰ 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 طول‌موج ۲۶۰ نانومتر جهت محاسبه میزان غلظت RNA طبق روابط زیر استفاده شد: ازآنجایی‌که 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:

غلظت RNA (ng/µl) = ضریب رقت × ۵۰ ng/µl × ۲۶۰

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، مشخص‌کننده کیفیت مناسب RNA استخراجی است. از کیت RevertAID TM Firs Standard (Fermentas. Canada) cDNA synthesis و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به‌صورت زیر استفاده شد: یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و توسط DEPC-traeted eater به حجم نه 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 سانتریفوژ شد و پس‌ازآن، در زیر هود به‌دقت 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 oligi Primer (dt) یا Random hexamer Primer افزوده شد و پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. چهار میکرولیتر reaction buffer 5X و دو میکرولیتر dNTP 10mM mix و یک میکرولیتر Ribolock RibonucleaseTranscription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانترفوژ مختصر، به مدت پنج دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میکرولیتر 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. ساخت cDNA برای همه پنج ژن موردنظر انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های مورد نظر از دستگاه Rotor gene-6000 (Corbett, 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 تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های به‌دست‌آمده، ابتدا کلیه داده‌ها برای تعیین نرمال بودن توزیع با استفاده آزمون (کولموگروف- اسمیرنوف) مورد ارزیابی قرار گرفته، سپس برای تعیین اختلاف میزان شاخص‌های وزن بدن، وزن عضله‌ی نعلی و نسبت وزن عضله‌ی نعلی به بدن بین گروه‌های کنترل پایه (سه ماهه)، کنترل (شش ماهه)، تمرین هوازی، تمرین هوازی و مکمل‌سازی مرزن‌جوش و گروه مرزن‌جوش، 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>۰/۰۵). 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).

جدول ۱: آزمون تحلیل واریانس

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

نتایج تحلیل واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که در چهار متغیر وزن بدن، وزن عضله‌ی 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 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.

1. Diethylpyrocarbonate

2. Dilution factor

جدول ۲: نتایج آزمون تعقیبی

نتایج آزمون تعقیبی			
گروه‌ها	**مقایسه در بین گروه‌های**	**اختلاف متوسط**	**sig**
وزن بدن	**کنترل سه ماهه با تمرین**	−۵۵/۸±۱۳/۳۵	۰/۰۰۳ *
	کنترل سه ماهه با عصاره	-۴۳/۳±۱۳/۴۲	۰/۰۲۶ *
	کنترل سه ماهه با توأم	۶۱/۸±۱۲/۹۸	۰/۰۰۱ *
وزن عضله نعلی	**کنترل سه ماهه با توأم**	−۰/۲۴±۰/۰۷	۰/۰۳ *
	کنترل شش ماهه با توأم	-۰/۳۲±۰/۰۷	۰/۰۰۳ *
	عصاره با توأم	−۰/۲۴±۰/۰۷	۰/۰۲۳ *
نسبت وزن بدن به عضله نعلی	**تمرین با کنترل شش ماهه**	۰/۰۰۱۹±۰/۰۰۰۴	۰/۰۱۱ *
	کنترل شش با توأم	−۰/۰۰۲±۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۶ *
	کنترل سه ماهه با تمرین	−۰/۳۲±۰/۰۷	۰/۰۰۲ *
کاسپاز ۹	**کنترل سه ماهه با کنترل شش ماهه**	−۰/۹۳±۰/۰۸	۰/۰۰۱ *
	کنترل سه ماهه با عصاره	−۰/۴۵±۰/۰۷	۰/۰۰۱ *
	تمرین با کنترل شش ماهه	۰/۶۰±۰/۰۷	۰/۰۰۱ *
	کنترل شش ماهه با عصاره	۰/۴۷±۰/۰۷	۰/۰۰۱ *
	کنترل شش ماهه با توأم	۰/۷۴±۰/۰۷	۰/۰۰۱ *
	عصاره با توأم	۰/۲۶±۰/۰۷	۰/۰۰۹ *

نتایج آزمون تعقیبی نشان داد (جدول ۲) که بعد از دوره مداخله، وزن بدن موش‌ها در بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در حقیقت بین گروه کنترل سه ماه با گروه تمرین (p=۰,۰۰۳)، بین گروه کنترل سه ماه با عصاره مرزن‌جوش (p=۰,۰۲۶)، بین گروه کنترل سه ماه با گروه توأم (p=۰,۰۰۱)، 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<۰/۰۵). به‌طوری‌که بین گروه کنترل سه ماه با گروه توأم (p=۰,۰۳)، بین گروه کنترل شش ماه با گروه توأم (p=۰,۰۰۳)، بین گروه عصاره مرزن‌جوش با توأم (p=۰,۰۲۳)، 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<۰/۰۵). به‌طوری‌که بین گروه کنترل شش ماه با گروه تمرین (p=۰,۰۱۱) و بین گروه کنترل شش ماه با گروه توأم (p=۰,۰۰۶) 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<۰/۰۵) 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=۰,۰۰۱) و همچنین اثر تمرین 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>۰/۰۵) 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 گروه های مختلف وجود نداشت پس درنتیجه تمرین و استفاده از عصاره مرزن‌جوش میزان این ژن را در بدن در طول دوره مداخله تغییر نمی‌دهد.

از آنجاکه هیچ پژوهشی به‌طور مستقیم تأثیر عصاره مرزن‌جوش بر آپوپتوز عضله نعلی موش صحرایی نر را بررسی نکرده است، به‌طورکلی چند پژوهش محدود به تأثیرات مثبت عصاره مرزنجوش بر سلامتی تأکید دارد که با توجه به یافته‌های این پژوهش مبنی بر تأثیر مثبت عصاره مرزنجوش بر آپوپتوز عضله نعلی موش صحرایی و کاهش بیان کاسپاز ۹ می‌توان این نتایج را با یافته‌های رادگری و همکاران (۱۳۹۲) که به بررسی اثرات ناهنجاری زایی عصاره گیاه دارویی مرزنجوش بر موش سوری پرداختند همسو دانست، آن‌ها دریافتند که مصرف دوز مناسب عصاره مرزن‌جوش بر سلامت رت‌ها تأثیر مثبت دارد (۲۱). همچنین، یافته‌های این پژوهش در مورد تأثیر تمرینات هوازی بر آپوپتوز عضله نعلی موش صحرایی نر با نتایج مطالعه، سانگ[1] و همکاران (2006) همسو است. آن‌ها نشان دادند که 12 هفته تمرین استقامتی با شدت نسبی 75 درصد اکسیژن مصرفی بیشینه موجب کاهش معنی‌دار بیان پروتئین کاسپاز و قطعه‌قطعه شدن DNA در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی سالخورده (24ماهه) می‌شود. کاهش قابل‌توجه 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 معنی‌دار پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl- 2 همراه بود. این کاهش پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی متعاقب تمرین هوازی در موش‌های سالخورده احتمالاً با کاهش رهایش عوامل آپوپتوتیک مانند سیتوکروم c و Apaf-1 در عضله اسکلتی همراه شده و موجب کاهش معنی‌دار بیان کاسپاز ۳ و متعاقب آن کاهش بیان ژن کاسپاز ۹ شده است (۱۸). همچنین، در تائید نتایج این پژوهش، هو[2] و همکاران (۲۰۱۲) اشاره داشتند که بیان پروتئین کاسپاز 3در گروه تمرین (12هفته تمرین استقامتی) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین به این نتایج دست یافتند که بیان پروتئین سیتوکروم c در گروه تمرین (12هفته تمرین استقامتی) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (۱۹) که این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر ناهمسو است. همچنین نتایج این پژوهش با یافته‌های کوچرتورک[3] و همکاران (۲۰۰۸) افزایش معنی‌دار کاسپاز ۳ و 9 عضله‌ی نعلی و دوقلو؛ افزایش کاسپاز 8 -عضله‌ی نعلی و دوقلو (3 و 6 ساعت بعد از فعالیت معنی‌دار بود) افزایش درصد هسته‌های آپوپتوز شده (۱۰)، ناهمسو است. شاید دلیل ناهمسویی این نتایج در پروتئین سیتوکروم c و افزایش کاسپاز نوع و شدت تمرینات هوازی یا سن و نژاد موش‌های صحرایی نر باشد که تفاوتی در بیان سیتوکروم c مشاهده نشد. همچنین نتایج این پژوهش با یافته‌های کوچرتوک و همکاران (۲۰۰۸) در عدم تغییر معنی‌دار سیتوکروم c را نشان داد با یافته‌های این پژوهش همسو است.

نسبت Bax به Bcl-2 شاخصی برای نشان دادن پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی می‌باشد که Bcl-2 به‌وسیله ممانعت از اگومری شدن Bax-Bax، با فعالیت پیش آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت می‌کند. (۲۲). هم‌چنین، پروتئین Bcl-2 با ورود به غشای خارجی میتوکندری، یکپارچگی غشا را با خارج ساختن یون‌های H+ از طریق کانال‌های یونی حفظ کرده و با اتصال به Apaf-1 فعال‌سازی کاسپازی را مهار می‌کند. این احتمال وجود دارد که در پاسخ به فشار اکسایشی، جابه‌جایی و استقرار پروتئین Bax در غشای بیرونی میتوکندری افزایش یابد (۲۲–۲۵). این موضوع تا اندازه‌ای می‌تواند ناشی از فعال شدن JNK سیتوزلی باشد، به‌طوری‌که JNK در حضور محرک‌های اترس سلولی فسفریله شده و موجب مهار پروتئین Bcl-2 می‌شود، لذا پروتئین Bax اجازه جابه‌جایی به سمت میتوکندری را می‌یابد. پروتئین JNK[4] در داخل میتوکندری، در باز شدن mPTP[5] دخالت کرده و موجب رهایش عوامل پیش آپوپتوزی مانند سیتوکروم c به داخل سیتوزول می‌شود. به‌محض رهایش و ورود عوامل پیش آپوپتوزی به سیتوزول، سیتوکروم C می‌تواند از طریق آبشار کاسپازی شامل کاسپاز ۹ و درنهایت کاسپاز ۳ باعث تشدید آپوپتوزیس شود (۲۶). همچنین، کاسپازها به‌ویژه کاسپاز ۹ و ۳ نقش مهمی در تغییر حالت بافت عضلانی بازی می‌کنند و برای تمایز سلولی این بار ضروری می‌باشد؛ 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 سلول‌های ماهواره‌ای مورد نیاز باشد (۲۷). لذا، احتمالاً سطوح پایینی از کاسپازها برای تحریک برخی فعالیت‌های سلولی و ترمیم یا رشد بافت متعاقب تمرین ورزشی مناسب باشد. اثبات چنین آثاری نیاز به تحقیق در مورد اثرات هم‌زمان تمرینات ورزشی بر عضله نعلی همراه با عصاره‌ی مرزن‌جوش را ضروری می‌سازد، در این راستا با بررسی مقدار نسبی کاسپاز ۹ موجود در عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی تمرین داده و عصاره‌ی مرزن‌جوش تغذیه شده، نتایج نشان می‌دهد که کاسپاز ۹ موجود عضله‌ی نعلی در گروه‌های تمرین با کنترل شش ماهه، کنترل شش ماهه با عصاره‌ی مرزن‌جوش، کنترل شش ماهه با تمرین عصاره‌ی مرزن‌جوش توأم و عصاره با تمرین عصاره‌ی مرزن‌جوش توأم متفاوت بوده و تمرین با عصاره اثرات خود را به‌عنوان مکانیزم اثر بر مرگ سلولی گذاشته‌اند. تفاوت موجود بین گروه کنترل با گروه‌های تمرین، عصاره و توأم به ترتیب ۶۸٪، ۴۷٪ و ۱۰۰٪ (گروه کنترل نسبت به دیگر گروه‌ها) بیشتر بوده است که نشان‌دهنده وجود میزان کم ژن کاسپاز ۹ در عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی است که تمرین کرده و عصاره‌ی مرزن‌جوش به غذای آن‌ها اضافه شده است، البته وجود مقدار کم کاسپاز ۹ در گروه تمرین، استفاده عصاره‌ی مرزن‌جوش و هر دو با هم نسبت به گروه کنترل روند آپوپتوز را کند کرده است. در این خصوص، وینشتین[6] و همکاران (۲۰۱۱) اشاره داشتند که آپوپتوز میتوکندریایی اغلب با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن همراه است (۲۶) و از طرفی، ژین[7] و همکاران (۲۰۰۹) عنوان داشتند که تمرینات هوازی و استقامتی طولانی‌مدت می‌تواند با افزایش استرس اکسایشی موجب تشدید آپوپتوز شوند (۲۸) که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر همسو است. همچنین نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های سیو[8] 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[9] و همکاران (2012) نیز گزارش دادند که شش هفته تمرین استقامتی تأثیر معنی‌داری بر فعالیت پروتئازی آنزیم کاسپاز ۳ و ۹ و قطعه‌قطعه شدن DNA در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی جوان (سه ماهه) و سالم ندارد (۲۷) ناهمسو است. به نظر می‌رسد دلیل اصلی تناقض مطالعه حاضر با نتایج سیو و همکاران (۲۰۰۶) و مک میلان و همکاران (۲۰۱۲) سن موش‌های صحرایی و پروتکل تمرینی و زمان نمونه‌گیری باشد به‌طوری‌که موش‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر در حدود سه ماهه بودند که به‌عنوان موش‌های بالغ جوان محسوب می‌شوند، ولی سیو از موش‌های صحرایی 24 ماهه استفاده کرده بودند که به‌عنوان موش‌های صحرایی سالخورده و پیر محسوب می‌شوند .در این راستا، استرس اکسایشی، سایتوکین‌های التهابی و اختلال در محافظت از استرس سلول سازوکارهای احتمالی هستند که در افزایش آپوپتوز بافت‌های پیر مشارکت می‌کنند (۱۸)، افزایش سن و پیری با افزایش قابل‌توجه آپوپتوز همراه است؛ که در این صورت احتمال تأثیر تمرینات ورزشی بر شاخص‌های آپوپتوزی مانند بیان ژن یا پروتئین کاسپاز ۳ و ۹ و قطعه‌قطعه شدن DNA بیشتر و بارزتر می‌شود (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 موش‌های صحرایی بالغ جوان استفاده شده است .به نظر می‌رسد آنچه موجب تناقض نتایج مطالعه حاضر

1. Song
2. Ho
3. Koçtürk
4. c-Jun-N-Terminal Kinase
5. Mitochondrial Permeability Transition Pore
6. Vainshtein
7. Xin
8. Siu
9. McMillan

با مطالعه مک میلان و همکاران (۲۰۱۲) شده است، تفاوت در نوع بافت مورد مطالعه و زمان برداشت بافت باشد، به‌طوری‌که 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 30متر/دقیقه و شیب3%) باشد، به‌طوری‌که 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، ویلوگبی[1] و همکاران (۲۰۰۳) اشاره داشتند که بیان ژن کاسپاز ۳ در عضله پهن جانبی 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.

به‌طورکلی نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های دوستار و همکاران (۲۰۰۸)، کوچتورک و همکاران (۲۰۰۸)، لی[2] و همکاران (۲۰۱۳)، پترسون[3] و همکاران (۲۰۰۸)، رادگری و همکاران (۱۳۹۲)، سانگ و همکاران (۲۰۰۶)، هو و همکاران (۲۰۱۲)، ژین و همکاران (۲۰۰۹)، وینشتین و همکاران (۲۰۱۱)، کیم[4] و همکاران (۲۰۱۰) همسو است (۳۲، 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 عدم‌تغییر معنادار سیتوکروم c دست یافتند. همچنین نتایج این پژوهش با یافته‌های کوادریلاترو[5] و همکاران (۲۰۱۰)، کوچتورک و همکاران (۲۰۰۸)، ارسلان و همکاران (۲۰۰۲)، پترسون و همکاران (۲۰۰۸)، سیو و همکاران (۲۰۰۴)، مک میلان و همکاران (۲۰۱۲)، ویلوگبی و همکاران (۲۰۰۳)، وینشتین و همکاران (۲۰۱۱)، ناهمسو است (۳۵، ۱۰، ۳۶، ۲۲، ۲۹، ۲۷، ۳۱، ۲۶). برخی از این پژوهشگران در بخشی از نتایج خود به افزایش یا عدم‌تغییر معنادار بیان پروتئین کاسپاز ۹ و یا تغییر معنادار سیتوکروم c دست یافتند که ممکن است دلیل این ناهمسویی 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 عصاره‌ی 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، عصاره‌ی 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 زایی عصاره گیاه دارویی مرزنجوش بر جنین‌های موش سوری پرداختند همسو است. آن‌ها دریافتند گروه دریافت کننده دوز بالای عصاره گیاه مرزنجوش در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنادار 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 عصاره‌ی مرزن‌جوش باعث تغییر در وزن بدن موش‌های صحرایی نسبت به گروه کنترل می‌شود و موجب افزایش معنادار وزن عضله‌ی نعلی نسبت به گروه کنترل شده (۱۰۱٪) و از همه مهم‌تر اثر مثبت و معنادار 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 عصاره‌ی 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[6] 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 عصاره‌ی مرزن‌جوش تااندازه‌ای 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 عصاره‌ی مرزن‌جوش و تمرین بهتر از مصرف عصاره به‌تنهایی به نظر می‌رسد. بااین‌حال، با توجه به محدودیت‌های پژوهش حاضر مانند محدودیت‌های قابل‌کنترل ازجمله: 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 غیرقابل‌کنترل 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

1. Willoughby
2. Lee
3. Peterson
4. Kim
5. Quadrilatero
6. Araujo

از طرفی بـا توجـه به این محدودیت‌های امکان ارزیابی شـــاخص‌های التهابی مانند TNF-α و IL-6، عـدم انـدازه‌گیری تغییرات مورفولوژیکی، ارزیـابی بیـان ســـایر پروتئین‌های درگیر در مســیر میتوکندریایی آپوپتوز، بررســی بیان پروتئین‌های درگیر در مســیر خـارجی آپوپتوز و انـدازه‌گیری محتوای پروتئین‌هـای مورد نظر، اظهارنظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری وزن و شـاخص‌های مربوط به آپوپتوز مانند کاسپاز ۹ و سـیتوکروم 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 بیشـتر در این زمینه می‌باشد. از طرفی، با توجه به نتایج به‌دسـت‌آمده از تفاوت معنی‌دار شـاخص‌های آپوپتوزی بین گروه تمرین هوازی، مصـرف عصـاره مرزنجوش و توأم با گروه کنترل احتمالاً اسـتفاده از تمرینات ورزشی هوازی به‌جای سـایر تمرینات و مصـرف عصـاره مرزنجوش، تغییراتی را در آپوپتوز عضـله اسکلتی ایجاد خواهد کرد. اگرچه امکان بروز آپوپتوز شدید در این مرحله زندگی (جوانی) به‌ندرت وجود دارد، ولی ازآنجایی‌که اثر فزاینده تمرین هوازی بر بیان ژن ضـد آپوپتوزی Bcl -2 و نسـبت بیان ژن Bax به Bcl-2 عضله‌ی نعلی قابل توجه بود، لذا به نظر می‌رسـد که می‌توان از تمرینات هوازی به‌عنوان یک عامل پیشـگیرانه و مداخله کاربردی غیربالینی برای محافظت از سـلول‌های عضـله اسـکلتی بهره برد. در این راسـتا، با توجه به نتایج حاصـل، امکان حصـول شـرایط و محیط مطلوب‌تر برای بقای سـلول‌های 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. Kalemba 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 Antimicobial 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, Kornbluth 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 solues muscle fibers in rats. European journal of applied physiology, 102(5): 515-524.
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 ApplPhysiol 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 ApplPhysiol 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

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. Quadrilatero, 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 embryofoetotoxicity of alphaterpinene in the rat. Food Chem Toxicol 1996;34(5):477-82.