Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Comparison of the effect of exercise with *Kelussia Odaratissma Mozaff* on *FoxO$_1$* Expression level in cardiac tissue of obese rats

Farzad Zandian[1], Hosein Sazegar[2]*

ABSTRACT

Background and Aim: The *FoxO$_1$* gene is a substantial regulator of cellular metabolism in heart tissue. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of Kelussia extract and exercise on *FoxO$_1$* expression in cardiac tissue.

Materials and Methods: In the present study, A total of 30 adult male Wistar rats weighing 180 to 200 g were selected and divided into five groups of control, negative control, a group of obese rats with exercise (rats became obese in 6 weeks and were trained 5 days a week for one hour and the extract was given to them for 6 weeks) and two treatment groups with doses of 400 and 800 mg/Kg of Kelussia extract. Molecular tests were performed on the hearts of 30 rats using Real-Time RT PCR. Finally, Statistical analysis of results was performed by SPSS software and ANOVA TEST with a significance level of $P<0.05$.

Results: Kelussia extract at doses of 400 and 800 mg/kg can significantly reduce *FoxO$_1$* expression level (0.61 ± 0.14) and (0.70 ± 0.25), respectively, compared to the obese group ($P<0.05$). Also, in the group of rats with exercise, gene expression was significantly reduced compared to that of the obese group (0.54 ± 0.13). Furthermore, the results of biochemical tests confirmed the reduction of cholesterol, sugar, LDL, and triglyceride in the hearts of obese rats treated with 400 and 800 mg/kg of Kelussia.

Conclusion: Exercise as well as Kelussia extract can reduce *FoxO$_1$* expression level and, could be used as a therapeutic target in heart disease if confirmed in further studies.

Keywords: *FoxO$_1$* gene, Heart tissue, *Kelussia Odaratissma Mozaff*, Obesity

Citation: Zandian F, Sazegar H. [Comparison of the effect of exercise with Kelussia Odaratissma Mozaff on *FoxO1* Expression level in cardiac tissue of obese rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2021; 28(3): 279-288. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.106

Received: December 10, 2020 **Accepted:** September 15, 2021

[1] Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

[2] Biotechnology Research center, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

***Corresponding author:** Biotechnology Research center, Department of Biology, Science Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Tel: +989177121993 Fax: +98383361000 E-mail: hoseinsazgar@yahoo.com

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.106]

مقاله اصیل پژوهشی

مقایسه اثر تمرینات ورزشی با کرفس کوهی بر بیان ژن $FoxO_1$ در بافت قلب موش‌های صحرایی چاق

فرزاد زندیان[۱]، حسین سازگار[۲]*

چکیده

زمینه و هدف: ژن *FoxO1* تنظیم‌کننده مهم متابولیسم سلولی در بافت قلب به شمار می‌آید. لذا هدف از این تحقیق بررسی اثر عصاره گیاه کرفس کوهی و ورزش بر بیان ژن *FoxO1* در بافت عروقی می‌باشد.

روش تحقیق: در تحقیق حاضر ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم از نژاد ویستار انتخاب شدند و به پنج گروه کنترل، کنترل منفی، یک گروه موش‌های چاق همراه با تمرینات ورزشی (که در ۶ هفته چاق شدند و ۵ روز در هفته و به مدت یک ساعت تمرین داده شدند و به مدت ۶ هفته عصاره داده شد) و دو گروه تیمار با دوز ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره کرفس تقسیم شدند. تست‌های مولکولی بر روی بافت قلب ۳۰ سر موش با کمک تکنیک Real Time RT PCR انجام شد. در نهایت از نرم‌افزار SPSS و آزمون ANOVA برای مقایسه داده‌ها انجام شد. سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: عصاره کرفس کوهی با دوز ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم باعث کاهش چشمگیر بیان ژن *FoxO1* به ترتیب (۰/۱۴ ± ۰/۶۱) و (۰/۲۵ ± ۰/۷۰) نسبت به گروه چاق شد (P<۰/۰۵). همچنین در گروه تمرینات ورزشی نیز بیان ژن *FoxO1* کاهش معنی‌داری نسبت به گروه چاق داشت (۰/۱۳ ± ۰/۵۴). از سوی دیگر نتایج تست‌های بیوشیمیایی، کاهش فاکتورهای کلسترول، قند، LDL و تری‌گلیسرید را در بافت قلب موش‌های چاق در رت‌های تیمار شده با دوز ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کرفس را نشان داد (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: تمرینات ورزشی و همچنین عصاره کرفس می‌توانند باعث کاهش بیان ژن *FoxO1* شود و در صورت تأیید در مطالعات بیشتر می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در بیماری قلبی مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: ژن *FoxO1*، بافت قلب، کرفس کوهی، چاقی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۰؛ ۲۸(۳): ۲۷۹-۲۸۸.

دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۰ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۴

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهرکرد، ایران

آدرس: شهرکرد- رحمتیه- دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

تلفن: ۰۹۱۷۷۱۲۱۹۹۳ نمابر: ۰۳۸۳۳۶۱۰۰۰ پست الکترونیکی: hoseinsazgar@yahoo.com

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.106]

مقدمه

بیماری‌های قلبی و عروقی به عنوان مهم‌ترین عامل مرگ و میر در دنیا محسوب می‌شود؛ به طوری‌که ۶۰ درصد از موارد مرگ و میر در سال ۲۰۰۰ در جهان را به خود اختصاص داده است و پیش‌بینی می‌شود تا سال۲۰۲۰ به ۷۳ درصد برسد (۲, ۱). علّت اصلی عوارض و مرگ‌ومیر در بیماران مبتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی، پارگی پلاک آترواسکلروتیک و به دنبال آن انفارکتوس میوکارد یا سکته مغزی است. آترواسکلروز نوعی بیماری التهابی مزمن در اثر تجمع چربی است که در نهایت منجر به بروز حاد بیماری قلبی‌و عروقی می‌شود (۴, ۳). تقریباً تمام حملات قلبی ناشی از آترواسکلروز عروق کرونری است. آترواسکلروزیس ناشی از رسوب کلسترول LDL و کلسیم در دیواره رگ‌های تغذیه کننده قلب است. بسته به میزان کاهش جریان خون متناسب با نیاز عضله قلبی، آسیب، حمله و یا سکته قلبی رخ می‌دهد (۶, ۵). در برخی افراد که استعداد ژنتیکی به آترواسکلروز دارند یا در افرادی که بیش از اندازه کلسترول و چربی‌های دیگر را مصرف می‌کنند، به تدریج مقادیر زیادی کلسترول در زیر اندوتلیوم شریانی بسیاری از مناطق بدن رسوب می‌کنند. به تدریج، بافت فیبری به این نواحی رسوب کلسترول حمله می‌کند و غالباً نواحی مزبور کلسیفیه می‌گردند (۸, ۷). شواهد تأیید می‌کنند که فرآیندهای اپی ژنتیکی مانند متیلاسیون DNA، اصلاح هیستون و RNA های غیر کد کننده نقش مهمی در پیشرفت و آسیب پذیری پلاک بازی می‌کنند که با فعال کردن یا حذف این عوامل می‌توان بیان ژن را تنظیم کرد. شناخت مکانیسم‌های مولکولی که منجر به تصلب شرایین و بی ثباتی پلاک می‌شود، برای توسعه راهکارهای درمانی جدید ضروری است. در ابتدا از پاسخ لایه اندوتلیال به آسیب بافتی شروع می‌شود و به دنبال آن لیپیدها در دیواره رگ تجمع می‌یابند، در نتیجه التهاب مزمن ایجاد می‌شود که می‌تواند منجر به پارگی پلاک چربی و ایجاد ترومبوز شود. اخیراً نقش اپی‌ژنتیک در تصلب شرایین به طور فزاینده‌ای شناخته شده است (۱۰, ۹). *FoxO1* (The O subfamily of forkhead) تنظیم کننده مهم متابولیسم سلولی در چندین بافت از جمله قلب وجود دارد که در آن در تنظیمات قلبی مسیرهای متابولیک گلوکز و لیپیدها و اندوتلیوم نقش ایفا می‌کند. همچنین نقش مهمی در انرژی هومئوستاز، پاسخ به استرس و اتوفاژی دارد و در دیابت و ایسکمی تنظیم بیان آن دچار اختلال می‌شود. فعالیت *FoxO1* توسط فرآیندهای پس از ترجمه، مانند فسفوریلاسیون، متیلاسیون، گلیکوزیلاسیون، استیله شدن و یوبیکوینیزه شدن تنظیم می‌شود و قادر هستند بر ویژگی‌های عملکردی *FoxO1* تاثیر بگذارند. شناسایی مارکرهای دخیل در تنظیم بیان *FoxO1* می‌تواند منجر به شناسایی فرآیندهای مربوط به پیشرفت بیماری‌های قلبی و عروقی و روند فعال شدن پلاک مانند مسیر التهاب و تخریب بافت شود. شکل دِاستیله شده *FoxO1*، در پلاک‌های آترواسکلروتیک انسانی، با کاهش نشانگرهای التهاب و فعال سازی سلولی همراه است (۱۲, ۱۱). پس از ایجاد پزشکی نوین و استفاده گسترده از داروهای شیمیایی گرایش مردم به داروهای گیاهی کاهش یافت؛ امّا بعد از مدتی به علّت شناخت عوارض جانبی داروها و بروز مقاومت دارویی در افراد، داروهای گیاهی به عنوان منبع سالم‌تر و بدون عوارض جانبی مورد توجه قرار گرفتند. پس از آن گیاهان همیشه یکی از منابع عمومی داروها بوده‌اند که به صورت سنتی یا به شکل فرآورده‌های شیمیایی مورد بهره برداری قرار می‌گیرند (۱۳). گیاه کرفس کوهی با نام علمی *Kelussia odoratissima Mozoffarian* از جنس *Kelussiae* و خانواده چتریان است. این گیاه دو ساله بوده و حداکثر طول آن ۱۵۵ سانتی متر است. کرفس از جمله گیاهانی است که به علت وجود فلاونویید در آن خاصیت آنتی اکسیدانی دارد و با این خاصیت از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند. فلاونویدهای موجود در کرفس به فرم اگلیکون هستند و به دلیل شکل فضایی خاص خود جذب روده‌ای سریع و قابل توجهی دارند. مطالعات قبلی نشان داده است که این فلاونویید موجب مهار متابولیسم آراشیدونیک اسید می‌شود. همچنین وجود گروه ۵-هیدروکسی در ساختار فلاونویید باعث می‌شود که حلقه بتای فلاونویید چرخش آزاد داشته باشد و از این طریق مهار آنزیم ۵-لیپو اکسیژناز را تشدید می‌کند و التهاب را کاهش می‌دهد. کافئیک اسید موجود در این گیاه با داشتن گروه‌های O کینول خواص آنتی اکسیدانی دارد و افزایش خواص آنتی

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.106]

اکسیدانی در گروه‌های تحت رژیم کرفس کوهی دیده شده است (۱۴-۱۶).

با توجه به شیوه زندگی امروزه و نوع رژیم غذایی که در جوامع صنعتی به سمت مصرف مواد چرب و فست فودها رفته است و با شناخت اهمیت بیماری تصلب شرایین که در نتیجه این سبک زندگی شیوع قابل توجهی پیدا کرده است و همچنین عوارض جانبی کمتری که داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی دارند، در این مطالعه به بررسی اثر عصاره گیاه کرفس کوهی و ورزش بر بیان ژن *FoxO1* در بافت عروقی می‌پردازیم.

روش تحقیق

نوع مطالعه، گروه‌بندی، چاق کردن و ورزش رت‌ها

در این تحقیق روش گردآوری اطلاعات به صورت آزمایشگاهی– مشاهده‌ای بود و ۳۰ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم از لانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد خریداری شد. حیوانات آزمایشگاهی در شرایط استاندارد ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با آب و غذای کافی و استاندارد درون قفس‌های مخصوص دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد نگهداری شدند. در ادامه رت‌ها (به استثناء تعداد شش موش به عنوان گروه کنترل) به مدت ۶ هفته با چربی بالا که شامل ۵۸٪ چربی، ۲۵٪ پروتئین و ۱۷٪ کربوهیدرات در هر گرم بود چاق شدند. لازم به ذکر است که ابتدا ۳۶۵ گرم خوراک پودر شده موش را با ۱۰ گرم کلسترول و ۲۵۰ گرم کازئین و ۶۰ گرم ویتامین–مینرال میکس شده و سپس ۰/۳ گرم DL متیونین، ۰/۱ مخمر و ۰/۱ سدیم کلرید اضافه نموده و در نهایت چربی آب شده با آن میکس شد. سپس به‌وسیله دستگاه پلت زن به صورت خوراک پلت و پرس شده در می‌آوریم و سپس به مدت سه روز در جای خشک و خنک نگهداری شد و آماده مصرف رت‌ها شد (۱۷). همچنین برای تمرینات ورزشی از تردمیل مخصوص (با شیب ثابت) موش استفاده شد که موش‌ها ۵ روز در هفته و به مدت یک ساعت در هر روز بر روی دستگاه قرار گرفتند. گروه‌بندی حیوانات به ترتیب زیر انجام شد:

- ✓ گروه اول را گروه کنترل تشکیل می‌دهد که شامل ۶ رت با وزن طبیعی (بدون رژیم غذایی پرچرب و فاقد تیمار و تمرینات ورزشی) می‌باشد.
- ✓ گروه دوم کنترل منفی (موش‌های چاق بدون تیمار و تمرینات ورزشی) است که شامل ۶ رت می باشد.
- ✓ گروه سوم را موش‌های چاق دریافت کننده دوز ۴۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم عصاره کلوس تشکیل می‌دهد.
- ✓ گروه چهارم شامل شش موش چاق دریافت کننده دوز ۸۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره کلوس می‌باشد.
- ✓ گروه پنجم شامل موش‌های چاق همراه با تمرینات ورزشی و فاقد تیمار عصاره کلوس می‌باشد.

پس از گروه‌بندی و طی شدن دوره‌ی تطبیق حیوانات با حرارت و رطوبت محل نگهداری، آزمایشات با اعمال رژیم غذایی پرچرب به گروه های مورد مطالعه شروع شد و پس از شش هفته تیمار حیوانات با غذای پرچرب و اطمینان از افزایش وزن موش‌ها، تیمار عصاره کلوس و تمرینات ورزشی به مدت شش هفته و بر اساس گروه‌بندی انجام شده اعمال گردید. لازم به ذکر است که رژیم غذایی پرچرب تا پایان آزمایش برای حیوانات مورد مطالعه در نظر گرفته شد. اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در تمام مراحل لحاظ گردید.

تهیه عصاره کرفس

گیاه کرفس زیر نظر متخصصین گیاه‌پزشکی دانشگاه آزاد شهرکرد تأیید شده (با عدد هرباریومی ۱۹۴) و سپس خشک شد. قسمت‌های خشک‌شده توسط آسیاب برقی پودر شد و سپس ۵۰ گرم از این پودر با الکل اتانول ۷۰ درصد صنعتی مخلوط کرده، به‌اندازه‌ای که پودر کامل با الکل پوشیده شود و الکل تا روی گیاه بیاید و بعد از ۵ ساعت از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس عصاره‌ای که پس از عبور از کاغذ صافی به دست می‌آید با دستگاه Rotary که روی دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته و خود دستگاه شرایط ایده‌آل را ایجاد می‌کند، تغلیظ گردید و در نهایت مقدار انتخابی عصاره‌ها با حل کردن آن‌ها در یک حلال مناسب به دست آمد و به صورت گاواژ به رت‌ها داده شد (۱۸).

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.106]

بیهوشی و نمونه‌گیری و استخراج

پس از سی روز نگهداری و انجام گاواژ ، رت‌ها با استفاده از کلروفرم بیهوش شدند و نمونه‌گیری انجام شد.

قطعه‌های کوچک به ابعاد ۰/۵ در ۰/۵ سانتیمتر از قلب جدا شد و درون اپندرف ۱/۵ حاوی یک میلی‌لیتر RNA later قرار داده‌شد. همچنین نمونه خون نیز گرفته شد. در مرحله بعد RNA با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما (ساخت ایران) استخراج شد و در نهایت بررسی کمی و کیفی آن با استفاده از دستگاه نانودارپ و ژل آگارز یک درصد انجام گردید. سپس با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما cDNA (YT4500) ساخته شد و برای بررسی ژن مورد مطالعه، پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش توسط شرکت سیناژن بر اساس توالی ژن که توسط نرم افزار Primer 3D طراحی شد، سنتز گردید. توالی مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

ژن	توالی	دما	سایز
FoxO1-F	5'-GTCCCTACACAGCAAGTTTATTCG-3	۶۴°C	۱۹۳ bp
FoxO1-R	5'- TTGCCCGGACTGGAGAGATG -3'		
GAPDH-F	5'- TGATTCTACCCACGGCAAGTTC-3'	۵۶°C	۲۰۰ bp
GAPDH-R	5' -CGCTCCTGGAAGATGGTGATG-3'		

تکنیک RT-PCR

جهت بررسی صحت سنتز cDNA از تکنیک PCR استفاده شد. برای انجام تکنیک PCR، ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix (یکتاتجهیز آزما)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت (۵pmol/ µL)، ۱ میکرولیتر نمونه cDNA (ng/ µL ۲۵)، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر (با آب مقطر استریل) تهیه و مخلوط شد. در ادامه با برنامه دمایی: فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، برای اتصال آغازگرها در دمای مناسب (بهترین دما برای انجام PCR برای ژن GAPDH ۵۸ درجه سانتی‌گراد بود) به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر انجام شد و در نهایت روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز انجام گردید.

تکنیک Real Time – RTqPCR

در این تحقیق از تکنیک Real Time –RT qPCR (دستگاه Corbett rotor gene 6000) به منظور سنجش کمی سطح بیان ژن‌های مورد نظر استفاده شد. برای انجام این تکنیک از SYBR Green (یکتاتجهیز آزما) استفاده شد. لازم به ذکر است که واکنش Real Time –RT qPCR برای ژن‌های مورد نظر و ژن خانه داری به صورت دو تکرار و به همراه یک واکنش کنترل منفی برای هر ژن صورت گرفت. پس از محاسبه $\Delta\Delta CT$ نسبت بیان ژن هدف نسبت به نمونه کنترل با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید (۲۱-۱۹).

تست‌های بیوشیمیایی

تست‌های بیوشیمیایی این پژوهش شامل تست کلسترول، قند، HDL و LDL بود که در ادامه به توضیح آن‌ها پرداخته شده است. این آزمایشات با روش اتوآنالیزر و توسط دستگاه اتوآنالیزر (Auto Analyser BT 3000plus، ساخت کشور ایتالیا) انجام شد.

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.106]

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

آنالیز آماری داده‌های این تحقیق با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. از آن‌جا که داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند، با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و با آزمون تعقیبیLSD post test ارزیابی شدند. تفاوت بین گروه‌های مختلف با P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد.

ملاحظات اخلاقی

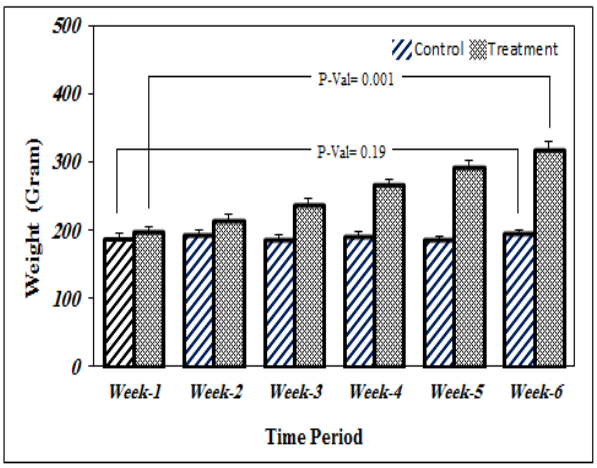
این تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد شهرکرد با کد IR.IAU.SHK.REC.1399.052 به تصویب رسیده است.

یافته‌ها

در جدول ۲ وزن موش‌ها در ۶ هفته ابتدایی مطالعه آورده شده است که نشان دهنده افزایش وزن آن‌ها قبل از شروع تیمار عصاره کلوس و تمرینات ورزشی می باشد. همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود در گروه کنترل به دلیل عدم استفاده از رژیم پرچرب تغییرات وزنی در طول دوره مورد بررسی ناچیز بوده (P=۰/۱۹) درحالی که در موش‌های دارای رژیم غذایی پرچرب افزایش قابل توجهی در میانگین وزنی موش‌ها پس از ۶ هفته ایجاد شده است (P=۰/۰۰۱)؛ بنابراین با توجه به نتایج حاصل از بررسی وزن موش‌ها در طول یک دوره ۶ هفته‌ای پیش از انجام آزمایشات می‌توان از افزایش وزن موش‌ها و ابتلای آن‌ها به چاقی اطمینان حاصل نمود.

جدول ۲- وزن موش‌ها در ۶ هفته

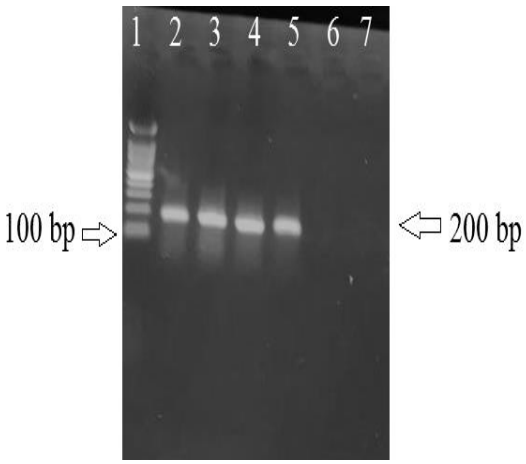
میانگین وزن	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم
موش‌های کنترل فاقد رژیم پرچرب	۱۸۸ ± ۶/۹	۱۹۲ ± ۷/۲	۱۸۶ ± ۶/۱	۱۹۰ ± ۷/۷	۱۸۵ ± ۶/۳	۱۹۴ ± ۶/۷
موش های دارای رژیم پرچرب	۱۹۸ ± ۷/۶	۲۱۴ ± ۸/۷	۲۳۷ ± ۱۰/۲	۲۶۶ ± ۹/۵	۲۹۲ ± ۱۰/۳	۳۱۸ ± ۱۲/۷



نمودار ۱-بررسی تغییرات وزن موش‌های موردد مطالعه در یک دوره ۶ هفته‌ای

نتایج کمی و کیفی مربوط به RNA و صحت سنتز cDNA

در این تحقیق در بررسی کیفی RNAهای استخراج شده مشاهده باندهای ۲۸ s rRNA، ۱۸ s rRNA و ۵/۸ s rRNA نشان دهنده کیفیت مناسب RNA بود. همچنین نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه‌ها پس از RT-PCR با استفاده از پرایمرهای ژن خانه‌داری، که به منظور بررسی صحت سنتز cDNA انجام شد، در تصویر ۱ مشاهده می‌شود. همان‌طور که انتظار می‌رفت وجود باند ۲۰۰ bp نشان دهنده صحت سنتز cDNA از نمونه‌های RNA می‌باشد.

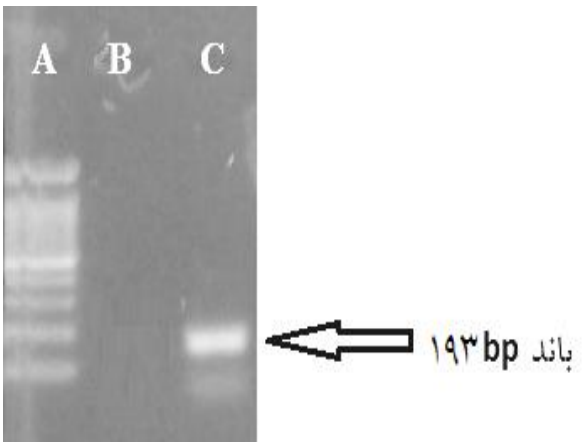


تصویر ۱- تایید صحت سنتز cDNA

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.106]

بررسی سنتز ژن *FoxO1*

به منظور تأیید صحت سنتز *FoxO1* با پرایمرهای اختصاصی ژن *FoxO1*، واکنش RT-PCR انجام شد. پس از پایان کار الکتروفورز محصولات روی ژل آگارز بررسی شد که باند ۱۹۳ جفت بازی مربوط به *FoxO1* دیده شد که در تصویر۲ باند ژن نشان داده شده است.



تصویر ۲- تأیید صحت سنتز ژن *FoxO1*. چاهک A مارکر، چاهک B کنترل منفی و چاهک C باند ۱۹۳ جفت بازی ژن *FoxO1*

نتایج آنالیز بیان ژنی

در پژوهش حاضر برای برررسی اثر تمرینات ورزشی و کرفس کوهی بر بیان ژن *FoxO1* در بافت قلب موش‌های صحرایی چاق داده‌های حاصل از بیان ژن به روش real time RT-PCR با استفاده از آزمون آماری T-test independent و سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ انجام شد.

بررسی نتایج نشان داد که عصاره کرفس کوهی با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم می‌تواند باعث کاهش چشمگیر بیان ژن *FoxO1* (۰/۶۱ ± ۰/۱۴b) نسبت به دوز ۸۰۰ در رت‌های چاق (۰/۷۰ ± ۰/۲۵ab) نسبت به گروه چاق شود که این کاهش بیان از نظر آماری معنادار بود (P<۰/۰۵). همچنین در گروه موش‌ها با تمرینات ورزشی کاهش بیان ژن را نسبت به گروه چاق داشتیم (۰/۵۴ ± ۰/۱۳b) که در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- مقایسه میزان تغییرات بیان ژن *FoxO1* در گروه‌های مختلف

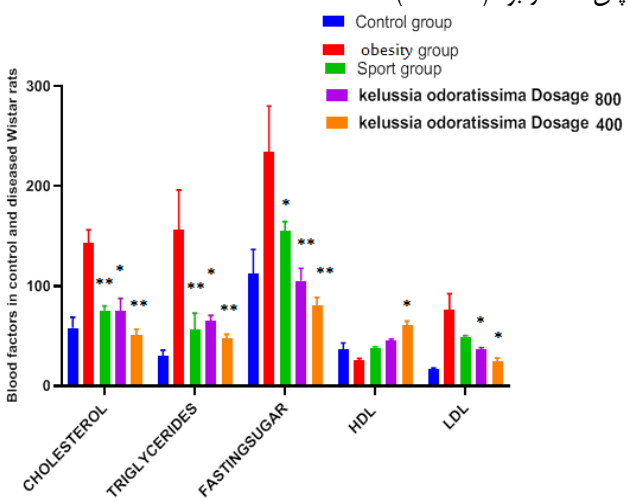
گروه	چاق	سالم	عصاره ۴۰۰	عصاره ۸۰۰	ورزشی
بیان ژن	۱/۱۴±۰/۵۳^{a}	۰/۳۹ ± ۰/۰۹^{b}	۰/۶۱ ± ۰/۱۴^{b}	۰/۷۰ ± ۰/۲۵^{ab}	۰/۵۴ ± ۰/۱۳^{b}

a,b: میانگین‌ها با حروف لاتین متفاوت، اختلاف آماری معنی‌دار دارند (P<0.05).

نتایج تست‌های بیوشیمیایی

تست‌های بیوشیمیایی تحقیق حاضر شامل تست کلسترول، قند، HDL و LDL و تری‌گلیسرید بود که در ادامه نتایج آن‌ها آورده شده است. از سوی دیگر نتایج تست‌های بیوشیمیایی کاهش فاکتورها را قلب موش‌های چاق در رت‌های تیمار شده با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کرفس را تأیید کرد.

همان‌طور که مشاهده می‌شود در نمودار ۲ تمام فاکتورها در گروه چاق افزایش داشته و در گروه ورزشی و تیمار با دوز ۴۰۰ و ۸۰۰ فاکتورهای کلسترول، قند، LDL و تری‌گلیسرید کاهش یافته است. همچنین عصاره کرفس کوهی با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم می‌تواند باعث کاهش بیشتر بیان ژن FoxO1 نسبت به دوز ۸۰۰ در رت‌های چاق شود و این کاهش بیان از نظر آماری نسبت به گروه چاق معنادار بود (P<۰/۰۵)



نمودار ۲- نتایج تست‌های بیوشیمیایی کلسترول، قند، HDL و LDL و تری‌گلیسرید در گروه‌های تیمار با کرفس، ورزشی، چاق و کنترل. * و ** اختلاف آماری معنی‌دار (P<0.05) دارند.

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.106]

بحث

با توجه به شیوه زندگی امروزه و نوع رژیم غذایی که در جوامع صنعتی به سمت مصرف مواد چرب و فست فودها رفته است و با شناخت اهمیت بیماری تصلب شرایین که در نتیجه این سبک زندگی شیوع قابل توجهی پیدا کرده است و همچنین عوارض جانبی کمتری که داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی دارند، در این مطالعه بررسی نتایج نشان داد که عصاره کرفس کوهی با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم می‌تواند باعث کاهش چشمگیر بیان ژن *FoxO1* نسبت به دوز ۸۰۰ در رت‌های چاق نسبت به گروه چاق شود که این کاهش بیان از نظر آماری معنادار بود همچنین در گروه موش‌ها با تمرینات ورزشی کاهش بیان ژن را نسبت به گروه چاق داشتیم. از سوی دیگر نتایج تست‌های بیوشیمیایی کاهش فاکتورهای مورد نظر را در رت‌های تیمار شده با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کرفس تأیید کرد. در ادامه به بررسی مهم‌ترین تحقیقاتی که در این مورد انجام شده است، پرداخته شده است. در سال ۲۰۰۹ رمضانی و همکاران به بررسی اثر ضد التهابی گیاه کرفس پرداختند. جهت ارزیابی التهاب از روش ایجاد تورم در گوش موش توسط گزیلن استفاده شد. موش‌های نر نژاد NMRI به سه گروه کنترل مثبت دگزا متازون، کنترل منفی و تجربی تقسیم شدند. به موش‌های گروه تجربی دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره کرفس به صورت درون صفاقی تجویز شد. نتایج نشان داد که اثر ضد التهابی تمامی دوزهای ۱۰۰mg/kg تا ۴۰۰ عصاره آبی و هگزانی نسبت به کنترل معنی‌دار است و نسبت به دگزا متازون اختلاف معنی‌داری ندارد و عصاره کرفس وابسته به دوز نیست که این نتایج با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر همسو بود چرا که در این تحقیق نیز دوز بالاتر اثر معناداری بر روی بیان ژن نداشت. عصاره کرفس دارای اثرهای قوی ضد التهابی حتی در دوزهای پایین است که احتمالاً به دلیل وجود فلاونوئید، فتالید و کومارین در دانه کرفس است (۲۲). مینایار و همکاران نشان دادند که کرفس کوهی با اثر گذاشتن بر التهاب روده بزرگ دارای خواص ضد التهابی است (۱۶). Garelnabi و همکارانش نشان دادند که ورزش هوازی و مصرف فلاونوییدها در ترکیب با ورزش توانست سطح تعدیل کننده‌های چربی را مانند mRNA PCSK9 تنظیم کنند (۲۳). Wang و همکارانش نشان دادند که مصرف رژیم غذایی پرچرب در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نژاد Sprague–Dawley آترواسکلروز ایجاد نمود و عصاره گیاه Polygonum capitatum که ماده مؤثر آن از خانواده فلاونوییدهاست توانست پروفایل لیپیدی را در گروه‌های بیمار کاهش دهد و بیان فاکتورهای التهابی در بافت کبد را کاهش دهند (۲۴). Burke و همکارانش نشان دادند که ترکیبات دارای فلاونویید می‌تواند تأثیر درمانی زیادی در زمینه چاقی، اختلال عملکرد متابولیک و بیماری‌های قلبی عروقی داشته باشد (۲۵) که نتایج این تحقیق با نتایج ما همسو است چراکه عصاره کرفس باعث کاهش بیان ژن و به دنبال آن کاهش چاقی خواهد شد. Slopack و همکاران یک جلسه تمرین هوازی بیان ژن *FoxO1* را بلافاصله و ۲ ساعت ریکاوری را در موش‌های صحرایی آزمایشگاهی به میزان معنی‌داری افزایش دادند. سطح پروتئین *FoxO1* هم تنها ۲ ساعت پس از آزمون به میزان معنی‌داری افزایش یافت. این اطلاعات اشاره می‌کند که بیان ژن *FoxO1* در جلسات اولیه یک مداخله تمرینی افزایش می‌یابد؛ امّا تمرینات استقامتی طولانی مدت به کاهش سطح پروتئین *FoxO1* از جلسات دهم به بعد می‌شود. این مفاهیم به کاهش بیان آن در پاسخ به تمرینات استقامتی طولانی مدت اشاره می‌کند. از این رو حتی اگر بیان ژن *FoxO1* اندازه‌گیری نشود این یافته‌ها تأکید دارند که تمرینات طولانی مدت به کاهش نقش عملکردی پروتئین *FoxO1* منجر می‌شود (۲۶). Sanchez و همکاران اظهار داشتند که یک جلسه تمرین استقامتی به افزایش معنی‌دار پروتئین و بیان *FoxO1* در عضله اسکلتی موش‌ها منجر می‌شود ؛در حالی که تمرینات استقامتی طولانی مدت به کاهش معنادار بیان *FoxO1* منجر خواهد شد. همان‌طور که در تحقیق حاضر نیز پس از یک دوره ورزش در موش‌ها کاهش بیان ژن را داشتیم. آن‌ها همچنین اظهار داشتند که مهار فعالیت *FoxO1* به افزایش ظرفیت اکسایشی عضلات در پاسخ به تمرینات استقامتی منجر می‌شود (۲۷). Fouad و همکاران به بررسی بیان *FOX* و STIP-1 در کارسینومای پاپیلار تیروئید و ارتباط آنها با پیش آگهی

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.106]

بیماران پرداختند. آن‌ها اظهار داشتند سطوح بالای بیان FOXE-1 و STIP-1 در PTC با اندازه بزرگتر تومور، گسترش اضافی تیروئید، حمله قلبی، وجود متاستازهای دوردست و مراحل بالاتر سرطان در ارتباط است (۲۸).

نتیجه‌گیری

شناسایی مارکرهای دخیل در تنظیم بیان *FoxO1* می‌تواند منجر به شناسایی فرآیندهای مربوط به پیشرفت بیماری‌های قلبی و عروقی و روند فعال شدن پلاک مانند مسیر التهاب و تخریب بافت شود. از طرفی بررسی‌ها بر روی کرفس کوهی نشان می‌دهد که این گیاه باعث کاهش وزن و همچنین کاهش اختلالات قلبی می‌شود و نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره کرفس کوهی باعث کاهش بیان ژن *FoxO1* در موش‌های چاق می‌شود و این کاهش بیان از نظر آماری معنادار بود. از سوی دیگر نتایج بر روی موش‌های چاق نشان داد که عصاره کرفس کوهی می‌تواند به دلیل داشتن فلانوئیدها باعث پیشگیری از بیماری قلبی و لاغری در رت‌های چاق شود و کرفس به دلیل داشتن فلانوئیدها باعث کاهش بیان ژن *FoxO1* می‌شود و در صورت تأیید در مطالعات بعدی می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در بیماری قلبی و چاقی مطرح باشد.

تقدیر و تشکّر

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد است و بدین وسیله از تمام افرادی که در انجام این پژوهش یاری رساندند صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. GOLD executive summary. Am J Respir Crit Care Med. 2017; 195(5): 557-82. DOI: 10.1164/rccm.201701-0218PP

2- Santilli F, D'Ardes D, Davi G. Oxidative stress in chronic vascular disease: from prediction to prevention. Vascul Pharmacol. 2015; 74: 23-37. DOI: 10.1016/j.vph.2015.09.003

3- Dighe S, Zhao J, Steffen L, Mares J, Meuer SM, Klein BE, et al. Diet patterns and the incidence of age-related macular degeneration in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Br J Ophthalmol. 2020; 104(8): 1070-1076. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2019-314813

4- Fava C, Montagnana M. Atherosclerosis is an inflammatory disease which lacks a common anti-inflammatory therapy: how human genetics can help to this issue. A narrative review. Front. Pharmacol. 2018; 9: 55. DOI: 10.3389/fphar.2018.00055

5- Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. Circ Res. 2017; 120(4): 713-35. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326

6- Ahotupa M. Oxidized lipoprotein lipids and atherosclerosis. Free Radic Res. 2017; 51(4): 439-47. DOI: 10.1080/10715762.2017.1319944

7- Laclaustra M, Casasnovas JA, Fernández-Ortiz A, Fuster V, León-Latre M, Jiménez-Borreguero LJ, et al. Femoral and carotid subclinical atherosclerosis association with risk factors and coronary calcium: the AWHS study. J Am Coll Cardiol. 2016; 67(11): 1263-74. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.12.056

8- Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book: Elsevier Health Sciences; 2010; 1(5): 5-8. Link

9- Xu S, Pelisek J, Jin ZG. Atherosclerosis is an epigenetic disease. Trends Endocrinol Metab. 2018; 29(11): 739-42. DOI: 10.1016/j.tem.2018.04.007

10- Dron JS, Hegele RA. Genetics of triglycerides and the risk of atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep. 2017; 19(7): 31. DOI: 10.1007/s11883-017-0667-9

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.106]

11- Kappel BA, Stöhr R, De Angelis L, Mavilio M, Menghini R, Federici M. Posttranslational modulation of FoxO1 contributes to cardiac remodeling in post-ischemic heart failure. Atherosclerosis. 2016; 249: 148-56. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.04.001

12- Menghini R, Casagrande V, Iuliani G, Rizza S, Mavilio M, Cardellini M, et al. Metabolic aspects of cardiovascular diseases: Is FoxO1 a player or a target?Int J Biochem Cell Biol. 2020; 118: 105659. DOI: 10.1016/j.biocel.2019.105659

13- Jafarzadeh L, Habibian R, Rafieian Kopaei M, Mohammadzade Z. Effect of hydroalcoholic extract of kelussia odoratissima mozaffarian on uterus contractions of mature rats. Horizon Med Sci. 2015; 21(3): 169-74. [Persian] DOI: 10.18869/acadpub.hms.21.3.169

14- Miraj S, Jivad N, Kiani S. A review of chemical components and pharmacological effects of Kelussia odoratissima Mozaff. Der Pharmacia Lettre. 2016; 8(1): 140-7. Link

15- Sedighi M, Rafieian-Kopaei M, Noori-Ahmadabadi M. Kelussia odoratissima Mozaffarian inhibits ileum contractions through voltage dependent and beta adrenergic receptors. Life Sci J. 2012; 9(4): 1033-8. Link

16- Minaiyan M, Sajadi S, Naderi N, Taheri D. Anti-Inflammatory Effect of Kelussia odoratissima Mozaff. hydroalcoholic extract on acetic acid-induced acute colitis in rats. J Rep Pharm Sci. 2014; 3(1): 28-35. Link

17- Kurhe Y, Radhakrishnan M, Gupta D. Ondansetron attenuates depression co-morbid with obesity in obese mice subjected to chronic unpredictable mild stress; an approach using behavioral battery tests. Metab Brain Dis. 2014; 29(3): 701-10. DOI: 10.1007/s11011-014-9574-8

18- Sazegar H, Balali E, Sadeghi Samani F. Effects of Kelussia odoratissima Mozaff Hydroalcoholic Extract on Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Mice. J Ilam Univ Med Sci. 2019; 26(5): 30-41. [Persian] DOI: 10.29252/sjimu.26.5.30

19- Vester D, Lagoda A, Hoffmann D, Seitz C, Heldt S, Bettenbrock K, et al. Real-time RT-qPCR assay for the analysis of human influenza A virus transcription and replication dynamics. J Virol Methods. 2010; 168(1-2): 63-71. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.04.017

20- Ferns R, Nastouli E, Garson J. Quantitation of hepatitis delta virus using a single-step internally controlled real-time RT-qPCR and a full-length genomic RNA calibration standard. J Virol Methods. 2012; 179(1): 189-94. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.11.001

21- Ling D, Salvaterra PM. Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis. PloS one. 2011; 6(3): e17762. DOI: 10.1371/journal.pone.0017762

22- Ramezani M, Nasri S, Yassa N. Study of anti-inflammatory effect of aqueous and hexane extract of Apium graveolens L. in mice. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 2009; 24(4): 437-43. [Persian] Link

23- Garelnabi M, Mahini H. Role of polyphenolic flavonoid and exercise in atherosclerosis. Free Radic Biol Med. 2018; 128 (1): S26. DOI:10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.10.017

24- Wang Z, Jiang X. Flavonoid-rich extract of Polygonum capitatum attenuates high-fat diet–induced atherosclerosis development and inflammatory and oxidative stress in hyperlipidemia rats. Eur J Inflamm. 2018; 16(1): 205-219. DOI: 10.1177/2058739218772710

25- Burke AC, Sutherland BG, Telford DE, Morrow MR, Sawyez CG, Edwards JY, et al. Intervention with citrus flavonoids reverses obesity and improves metabolic syndrome and atherosclerosis in obese Ldlr−/− mice. J Lipid Res. 2018; 59(9): 1714-28. DOI: 10.1194/jlr.M087387

26- Slopack D, Roudier E, Liu ST, Nwadozi E, Birot O, Haas TL. Forkhead BoxO transcription factors restrain exercise- induced angiogenesis. J Physiol. 2014; 592(18): 4069-82. DOI: 10.1113/jphysiol.2014.275867

27- Sanchez AM. FoxO transcription factors and endurance training: a role for FoxO1 and FoxO3 in exercise-induced angiogenesis. J Physiol. 2015; 593(Pt 2): 363-4. DOI: 10.1113/jphysiol.2014.285999

28- Fouad EM, Harb OA, Amin SR. The Expression of FOXE-1 and STIP-1 in Papillary Thyroid Carcinoma and Their Relationship with Patient Prognosis. Iran J Pathol. 2018; 13(2): 256-271. Link

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.3.106]