مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v17i4.2801

مقاله پژوهشی

بررسی اثر تمرینات هوازی و مصرف عصاره زنجبیل بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان بر بیان ژن Atrial Natriuretic Peptide (ANP) و خصوصیات هیستوپاتولوژیکی بافت قلب در موش‌های صحرایی مبتلا به سکته قلبی

وحید فلاح‌زاده[۱]، فرزانه تقیان*[۱]، خسرو جلالی‌دهکردی[۱]

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده ی علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۶، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۱۱/۰۹

چکیده

مقدمه: *هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر تمرینات هوازی و مصرف عصاره زنجبیل کپسوله شده در نانوذرات کیتوزان بر بیان ژن atrial natriuretic peptide و تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافـــت قلب در موش‌های صحرایی مدل سکته قلبی می‌باشد.*

مواد و روش‌ها: *۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بـا وزن ۲۲۰ ± ۳۰ گرم به ۵ گروه مختلف تقسیم شدند: (۱) گروه سکته قلبی (بیمار)، (۲) گروه بیمار تیمار شده با نانوذرات کیتوزان، (۳) گروه بیمار تیمار شده با نانوذرات کیتوزان و عصاره زنجبیل، (۴) گروه بیمار تحت تمرینات هوازی و (۵) گروه بیمار تیمار شده با نانوذرات کیتوزان و عصاره زنجبیل و تمرینات هوازی. تمرینات هوازی شامل انجام تردمیل به مدت ۶ هفته و ۵ روز در هر هفته بود. عصاره زنجبیل کپسوله شده در نانوذرات کیتوزان به‌صورت گاواژ با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۶ هفته به موش‌ها خورانده شد. پس از پایان دوره درمان، بیان ژن ANP به روش Real Time PCR و انجام مطالعات هیستوپاتولوژیکی بر روی بافت قلب انجام شد.*

نتایج: *بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی نشان دادند که در گروه‌های بیمار و گروه بیمار تیمار شده با نانوذرات کیتوزان بیشترین میزان رسوب کلاژن در بافت قلب ($P<۰/۰۵$) ایجاد گردید. در سطح مولکولی نیز نتایج حاصل از real-time PCR نشان دادند که تغییرات بیان ژن ANP تنها در گروه‌های تحت درمان ترکیبی با تمرینات هوازی و عصاره زنجبیل معنادار بودند ($P<۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری: *تمرینات هوازی همراه با مکمل‌های دارویی مانند عصاره زنجبیل می‌تواند باعث کاهش فیبروز قلبی و تنظیم بیان ژن ANP گردد.*

واژه‌های کلیدی: تمرین هوازی، عصاره زنجبیل، نانوکیتوزان، سکته قلبی، ANP.

***نویسنده مسئول:** گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده ی علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران، **تلفن:** ۰۹۱۳۳۰۸۰۲۴۱ **نمابر:** ۰۳۱۳۵۰۰۲۳۵۳
Email: ft.taghian@gmail.com

ارجاع: فلاح‌زاده وحید، تقیان فرزانه، جلالی‌دهکردی خسرو. بررسی اثر تمرینات هوازی و مصرف عصاره زنجبیل بارگذاری شده در نانوذرات کیتوزان بر بیان ژن atrial natriuretic peptide (ANP) و خصوصیات هیستوپاتولوژیکی بافت قلب در موش‌های صحرایی مبتلا به سکته قلبی. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۱؛۱۷(۴):۴۳-۳۴.

مقدمه

بیماری عروق کرونری و یا بیماری قلبی–عروقی، نتیجه نهایی تجمع پلاک‌های آترومایی داخل دیواره‌های عروق است که اکسیژن و مواد غذایی را برای میوکاردیوم (عضله قلب) فراهم می‌کنند. این بیماری گاهی CHD نیز نامیده می‌شود، اگرچه CAD معمول‌ترین علت CHD است، اما تنها علت آن نیست CAD. مهمترین علت مرگ در آمریکا و اکثر کشورهای صنعتی است. در حالی که نشانه‌ها و علایم آن در مراحل پیشرفته بیماری مشخص می‌شود (۱). اغلب افراد با بیماری عروق کرونری تا چندین دهه شواهدی از بیماری را نشان نمی‌دهند تا آنجا که بیماری تا اولین علایم پیشرفت می‌کند و در نهایت حمله قلبی ناگهانی رخ می‌دهد. پس از چندین دهه پیشرفت بیماری، پلاک‌های آترومایی تشکیل شده ممکن است جدا شده و جریان خون به عضله قلبی را محدود کنند. طیف علایم بالینی در اختلال عروق کرونر از یک ایسکمی بدون علامت تا آنژین پایدار مزمن، آنژین ناپایدار، انفارکتوس حاد میودکارد، کاردیومیوپاتی ایسکمیک و مرگ ناگهانی قلبی متغیر است. با کشف داروهای جدید و ابداع اعمال جراحی و روش‌های درمانی جدید، میزان مرگ و میر ناشی از اختلال عروق کرونر طی دهه‌های گذشته به تدریج کاهش‌یافته است. با این وجود هر ساله تنها در ایالات متحده ۹۰۰۰۰۰ نفر دچار سکته قلبی می‌شوند. از این تعداد حدود۲۲۵۰۰۰ نفر اغلب به علت آرتیمی و نارسایی قلبی فوت می‌کنند. همچنین بر اساس مطالعات اخیر در ایالات متحده نیمی از مردان سالم ۴۰ ساله و یک سوم زنان ۴۰ ساله در آینده دچار CAD خواهند شد. براساس کتاب رکوردهای گینس، ایرلند شمالی بیشترین وقوعCAD را دارد و در مقابل در ماسای در آفریقا تقریباً بیماری قلبی مشاهده نشده است (۲). استرس اکسیداتیو، منجر به تغییر در ساختار فسفولیپیدها و پروتئین‌های منتهی به پراکسیداسیون لیپیدها و اکسیداسیون گروه تیول می‌شود. این تغییرات علاوه بر ایجاد تغییرات عملکردی پروتئین‌های سلولی مختلف، باعث تغییر در نفوذپذیری و تغییر ساختار غشاها نیز می‌شوند. استرس اکسیداتیو ممکن است منجر به نقص پمپ sarcoplasmic reticulum Ca2+- ATPase (SERCA) شود و در نتیجه تردد کلسیم از سارکوما به سیتوپلاسم کاردیومیوسیت‌ها را مهار می‌کند. در نتیجه آن، عملکرد پمپ Na+-K +-ATPase دچار اختلال شده که آن نیز به نوبه خود منجر به افزایش Ca2-influx می‌شود (۳). نقص در مکانیسم تنظیم‌کننده Ca2 توسط ROS در نهایت منجر به اضافه بار داخل سلولی کلسیم [Ca+2] و مرگ سلولی می‌شود. علاوه بر این، افزایش [Ca2] در حین ایسکمی باعث تبدیل زانتیین دهیدروژناز به زانتان اکسیداز و متعاقباً منجر به افزایش تولید O_2^- می‌شود (۴). در القاء مدل انفارکتوس میوکاردیوم جهت انجام مطالعات گوناگون معمولاً از داروی ایزوپروترونول (ISO) استفاده شد. چندین مکانیسم عملکرد برای ISO وجود دارد که القای آسیب قلبی شامل هیپوکسی میوکاردیوم، یکی از این مکانیسم‌ها محسوب می‌گردد. آسیب‌شناسی تغییرات مورفولوژیکی میوکاردیوم در نتیجه استفاده از ISO در موش صحرایی به اثبات رسیده است. به‌طوری‌که آسیب‌های ایجاد شده قابل مقایسه با آسیب‌هایی است که در اثر وقوع سکته قلبی (MI) رخ می‌دهند. بنابراین مدل انفارکتوس میوکاردیوم القا شده توسط ISO به‌عنوان یک مدل استاندارد شناخته شده و برای مطالعه عملکردهای قلبی و اثرات مفید بسیاری از داروها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). به‌دلیل به هم خوردن تعادل استرس اکسیداتیو و سطح آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن ناشی از القا انفارکتوس میوکاردیوم، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند منجر به بهبود روند درمان در افراد مبتلا شود.

زنجبیل [Zingiber officinale Roscoe (Zingiberaceae)] یکی از معروف ترین ادویه‌های جهان است و در طول تاریخ به دلیل مزایای سلامتی آن به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. زنجبیل غنی از ترکیبات فعالی مانند ترکیبات فنلی و ترپن‌ها است (۶) و به‌دلیل خواص دارویی متعدد آن مانند ضدالتهاب، ضددرد، ضدتب و خاصیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷–۹). بنابراین زنجبیل برای محافظت در برابر استرس اکسیداتیو مؤثر است. مکانیسم‌های اساسی عمل آنتی‌اکسیدان در مدل‌های سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. عصاره زنجبیل می‌تواند تولید ROS را در سلول‌های فیبروسارکوم انسانی دچار شده به استرس اکسیداتیو ناشی از H2O2 کاهش دهد (۹). همچنین، عصاره زنجبیل می‌تواند باعث کاهش شاخص‌های اکسیداتیوی نظیر مالون دی آلدئید (MDA) تولید شده در اثر پراکسیداسیون لیپیدها گردد (۷). در سال‌های اخیر استفاده از نانوپلیمرهای زیستی مختلف به‌عنوان حامل‌های دارویی جهت انتقال دارو یا عصاره‌های گیاهی به بدن موجود زنده بسیار مورد توجه قرار گرفته است که باعث افزایش پایداری و نیمه عمر ترکیب دارویی و همچنین انتقال هدفمند دارو به اندام یا بافتی خاص گردیده است. کیتوزان و مشتقات بیولوژیکی آن، از جمله پلیمرهایی هستند که به علت دارا بودن خواصی نظیر غیر سمی بودن، زیست تخریب‌پذیری، زیست سازگاری و ایمنی، فعالیت ضدتوموری، ضدباکتریایی و ضدمیکروبی به‌طور گسترده به‌عنوان حامل‌های دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۰).

از طرف دیگر مطالعات نشان دادند که تمرینات بدنی (PT) یک روش درمانی مؤثر برای کاهش آسیب‌های قلبی–عروقی ناشی از انفارکتوس میوکاردیوم در انسان و مدل‌های حیوانی می‌باشد. تمرینات هوازی در بیماران قلبی–عروقی موجب افزایش فعالیت سوپر اکسید دسموتاز به‌عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیداتیو و در نتیجه کاهش استرس اکسیداتیو و آپوپتوز می‌شود.

لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر توام نانوذره زنجبیل پوشش‌دار شده با کیتوزان و تمرین استقاوتی بر روی بهبود وضعیت قلبی موش‌های مدل انفراکتوس قلبی می‌باشد. در این مطالعه، اثر این دو عامل به تنهایی و

همراه با هم بر تغییرات هیستوپاتولوژیکی قلب شامل میزان رسوب کلاژن و تغییرات دیواره بافت قلب و همچنین تغییرات بیان ژن ANP در کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرایی مدل انفاراکتوس قلبی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۲۵ سر موش صحرایی نژاد ویستار با وزن ۳۰ ±۲۲۰ گرم و در محدوده سنی ۲/۵-۲ ماه، از انستیتو پاستور کرج خریداری شدند. موش‌های صحرایی در حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، تحت دما (۲۲۰ ± C2) و رطوبت کنترل شده (۳۰-۷۰٪) و با چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲ساعته در قفسه‌های پلاستیکی نگهداری شدند. به مدت یک هفته پیش از آغاز آزمایش، غذای مخصوص (به‌صورت پلت) و همچنین آب موردنیاز حیوانات به‌صورت آزاد در دسترس حیوانات قرار داده شد. کلیه مطالعات حیوانی، مطابق با قوانین اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه آزاد واحد اصفهان (خوراسکان) و پس از دریافت کد اخلاق IR.IAU.KHUISF.REC 1399.041. انجام شد .

پس از سازگاری حیوانات مورد آزمایش با محیط، به‌منظور القای انفارکتوس میوکاردیوم در موش‌های صحرایی، براساس مطالعات انجام گرفته توسط شارما و همکاران (۱۱)، ایزوپروترونول با دوز ۸۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به‌صورت محلول در نرمال سالین (۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به مدت دو روز پیاپی به فاصله ۲۴ ساعت به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. سپس القای انفارکتوس میوکاردیوم و تغییر در شاخص‌های بیوشیمیایی طبق پروتکل‌های استاندارد تعیین شد. به این منظور، به‌صورت تصادفی تعدادی از موش‌ها دو روز بعد از انفارکتوس بیهوش شدند و نمونه‌های بافت قلب از بطن چپ آنها با استفاده از تکنیک‌های هیستوشیمیایی رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین مورد بررسی قرار گرفت و ظهور مناطق سفیدرنگ نشان‌دهنده آسیب نکروزی ناشی از انفارکتوس در بافت قلب تأیید شد. سپس تعداد ۲۵ سر موش صحرایی به ۵ گروه مختلف تقسیم شدند (۵ سر در هر گروه)، شامل: (۱ گروه سکته قلبی(ISOP) ، ۲) گروه سکته قلبی تیمار شده با نانوذرات کیتوزان و حلال(ISOP+CNPs) ، ۳) گروه سکته قلبی تیمار شده با نانوذرات کیتوزان و زنجبیل (ISOP+GE+CNPs)، ۴) گروه سکته قلبی تحت تمرین مداوم با شدت متوسط (ISOP+AE) و ۵) گروه سکته قلبی تیمار شده با نانوذرات کیتوزان و زنجبیل و تحت تمرین مداوم با شدت متوسط (ISOP+GE+CNPs+AE)

موش‌های گروه تمرین به مدت یک هفته با نحوه فعالیت روی نوارگردان و نیز اجرای پروتکل تمرینی آشنا شدند. برنامه آشنایی شامل ۳ جلسه راه رفتن و دویدن بر روی نوارگردان با سرعت ۵ تا ۸ متر بر دقیقه با شیب صفر درصد و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه بود. میزان شدت تمرین ورزشی موش‌ها، با استفاده از سرعت دویدن آنها بر روی نوارگردان کنترل گردید (۱۲). به‌طوری‌که، دویدن با سرعت ۱۸ متر بر دقیقه با شیب ۵ درصد، به مدت ۳۰ دقیقه یک بار در روز بر روی نوارگردان (هشت کاناله مخصوص رت (مدل دانش یاخته ساخت کشور ایران) و ۵ روز در هفته به مدت ۶ هفته به‌عنوان یک فعالیت ورزشی با شدت متوسط در نظر گرفته شد (۱۳). جهت رعایت اصل افزایش بار تدریجی، شدت و مدت تمرین ورزشی، در هفته اول، سرعت ۸ متر بر دقیقه و مدت ۵ دقیقه، در هفته دوم، سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و مدت ۱۰ دقیقه، در هفته سوم، سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و مدت ۱۴ دقیقه، در هفته چهارم سرعت ۱۴ متر بر دقیقه و مدت ۱۸ دقیقه، در هفته پنجم سرعت ۱۴ متر بر دقیقه و مدت ۲۲ دقیقه، در هفته ششم سرعت ۱۷ متر بر دقیقه و مدت ۲۶ دقیقه خواهد بود، در دو هفته آخر مطالعه، تمامی متغیرهای تمرینی ثابت نگه داشته خواهند شد (سرعت ۲۰ متر بر دقیقه و مدت ۳۰ دقیقه) تا سازگاری‌های ایجاد شده در زمان تشریح به حالت یکنواخت خود برسند. برای هر جلسه تمرین ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۵ متر بر دقیقه و به همان اندازه سرد کردن در نظر گرفته خواهد شد. موش‌های گروه کنترل نیز در طول دوره ۶ هفته‌ای هیچگونه فعالیتی انجام نخواهند داد (جدول ۱). به‌منظور کنترل وزن، وزن‌کشی موش‌ها در ابتدا، وسط و انتهای تمرینات، توسط ترازوی دیجیتالی (مدل Metler ساخت کشور آلمان) با دقت ۴ صفر انجام شد.

جدول ۱- برنامه تمرین استقامتی برای موش‌های گروه‌های موردنظر

هفته‌ها	سرعت/ متر بر دقیقه	مدت تمرین/ دقیقه
اول	۸	۵
دوم	۱۰	۱۰
سوم	۱۰	۱۴
چهارم	۱۴	۱۸
پنجم	۱۴	۲۲
ششم	۱۷	۲۶
هفتم	۲۰	۳۰
هشتم	۲۰	۳۰

به‌منظور تهیه عصاره زنجبیل، مقدار موردنیاز از ریشه زنجبیل تازه تهیه و بعد از شستشو، مقدار مشخصی از آن پوست گرفته شد. سپس برش‌های نازک از ریشه‌ها آماده و به‌منظور خشک شدن به مدت یک روز در آون قرار داده شد. نمونه‌های خشک شده پودر و سپس محلول هیدروالکلی (۵۰٪ اتانول و ۵۰٪ آب) از آن تهیه شد. پس از آن سوکسله به مدت ۶ ساعت انجام شد. بعد از قرارگرفتن در روتاری با دور۵۰ در زمان ۵۰-۴۵ دقیقه و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در نهایت عصاره عسلی و تیره رنگ زنجبیل به‌دست آمد که به یک ظرف با پوشش آلومینیومی منتقل شده و سپس جهت حذف رطوبت باقی مانده در عصاره، به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه دسیکاتور تحت خلاء قرار گرفت و محصول غلیظ نهایی حاصله جهت جلوگیری از آلودگی و برای ادامه آزمایش در دمای۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این مطالعه، زنجبیل با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم به

ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت کپسوله (پوشش‌دهی با کیتوزان) جهت تیمار موش‌های مدل سکته قلبی مورد استفاده قرار گرفت.

نانوذرات کیتوزان براساس روش تغییر یافته ژل یونوتروپیک تهیه شد(۱۴). به‌طور خلاصه، کیتوزان در اسید استیک (۱٪ حجمی/حجمی) حل شد و سپس بر روی استیرر به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد pH .با استفاده از سود 01/0(NaOH) طبیعی بر روی ۵/۵ تنظیم شد. تولید نانو ذرات به‌صورت کپسوله کردن و پوشش‌دهی عصاره زنجبیل با استفاده از پلیمرهای طبیعی کیتوزان انجام شد. به‌منظور حفظ و پایدارسازی نانو ذرات کیتوزان و دیواره پلیمری آنها، از کراس لینکرهای مختلفی نظیر سدیم تری پلی فسفات (TPP) استفاده گردید. نانوذرات در نهایت با استفاده از سانتریفیوژ جداسازی و به‌منظور حذف بیوپلیمر و مواد شیمیایی اضافی، با استفاده از آب دیونیزه، نانوذرات حاصل چند بار شستشو داده شدند. سپس حجم مشخصی از آب دیونیزه به نانوذرات اضافه و سونیکیت شدند. کلوئید نهایی تا زمان مصرف در فریزر نگهداری شد.

پس از پایان دوره آزمایش، موش‌های صحرایی بیهوش شدند و قلب آنها خارج و در فرمالین ۱۰٪ فیکس شدند تا برای مطالعات هیستوپاتولوژی قابل استفاده باشند. برای تهیه لام بافتی، ابتدا نمونه‌های بافت قلب به‌ترتیب در الکل‌های ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد هر کدام به مدت ۵۰ دقیقه قرار گرفتند تا فرآیند آبگیری انجام شود. سپس نمونه‌ها با قرار گرفتن در زایلول شفاف شده و توسط پارافین قالب‌گیری شدند. برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر توسط دستگاه میکروتوم از بافت‌ها تهیه شد. سپس به‌منظور خارج کردن پارافین نمونه‌ها به مدت ۵۰ دقیقه در زایلول قرار گرفتند و جهت آبدهی، نمونه‌های بافتی به‌ترتیب به مدت یک دقیقه در محلول‌های الکل ۱۰۰ درصد تا ۷۰ درصد و در نهایت در آب جاری قرار گرفتند.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین_ائوزین به‌منظور تعیین میزان آسیب‌های بافتی بر روی برش‌های تهیه شده از بافت قلب انجام شد. برش‌های بافتی به مدت ۱۰ دقیقه در هماتوکسیلین و پس از شستشو با آب جاری، به مدت ۱ ثانیه در اسید الکل قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از شستشوی مجدد با آب، به مدت ۱۰ ثانیه در ائوزین قرار داده شدند. پس از آن به‌منظور آبگیری، بافت‌ها به مدت ۱ دقیقه در الکل‌های ۵۰ تا ۱۰۰ درصد قرار گرفتند. در انتها، نمونه‌ها در حضور گزیلول (۵ دقیقه) شفاف شدند.

در این مطالعه، برای تشخیص افزایش کلاژن و تعیین شدت فیبروز در بافت قلب رنگ‌آمیزی تری کروماسون انجام شد. در این روش از سه رنگ Blue Aniline ، Scarlet Biebrich و Hematoxylin Iron ، به ترتیب برای رنگ‌آمیزی کلاژن، سیتوپلاسم و هسته سلول استفاده شد. در این روش کلاژن به رنگ آبی، سیتوپلاسم قرمز و هسته‌ها مشکی می‌شوند.

بررسی میزان بیان ژن ANP استخراج RNA کل از بافت قلب مورد مطالعه طبق دستورالعمل کیت کیازول (شرکت کیاژن) صورت گرفت. غلظت و خلوص RNA استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتر نانودراپ بررسی شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و غلظت آن براساس ضریب رقت برحسبng/µl به‌دست آمد. سپس غلظت ۱ نانوگرم بر میکرولیتر از RNA تهیه و برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور، به ۱۰ میکرولیتر از RNA، میزان ۱۰ میکرولیتر از کیت سنتز cDNA اضافه شد و سپس به مدت۵ دقیقه در دمای C25° و به دنبال آن ۶۰ دقیقه در C 60° درون ترموسایکلر قرار داده شد. در انتها، cDNA به‌منظور انجام qPCR ، در دمای C 20°– نگهداری شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای بررسی میزان تکثیر ژن مورد مطالعه انجام شد. در این مطالعه از ژن بتااکتین به‌عنوان ژن کنترل استفاده شد. برای تکثیر ژن ANP و بتا–اکتین، برنامه دمایی شامل، دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه، دناتوراسیون ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، سنتز اولیه ۵۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، ۴۰ سیکل تکرار مراحل ۲–۴ و سنتز نهایی ۵۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۸ دقیقه بود. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از دستگاه step 1 ABI system استفاده شد. در انتها، نمودارهای به‌دست آمده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و با استفاده از تجزیه و تحلیل ΔΔCT–۲ (تجزیه و تحلیلی که براساس اختلاف CT بین گروه‌های مداخله می‌باشد) تغییرات بیان ژن‌ها محاسبه شد. توالی پرایمر مورد استفاده جهت سنجش بیان ژن ANP به‌صورت پرایمر رفت AATAGCCGCACGAGTCAG و پرایمر برگشت AACGCCACCAACACCGAT بود.

نتایج

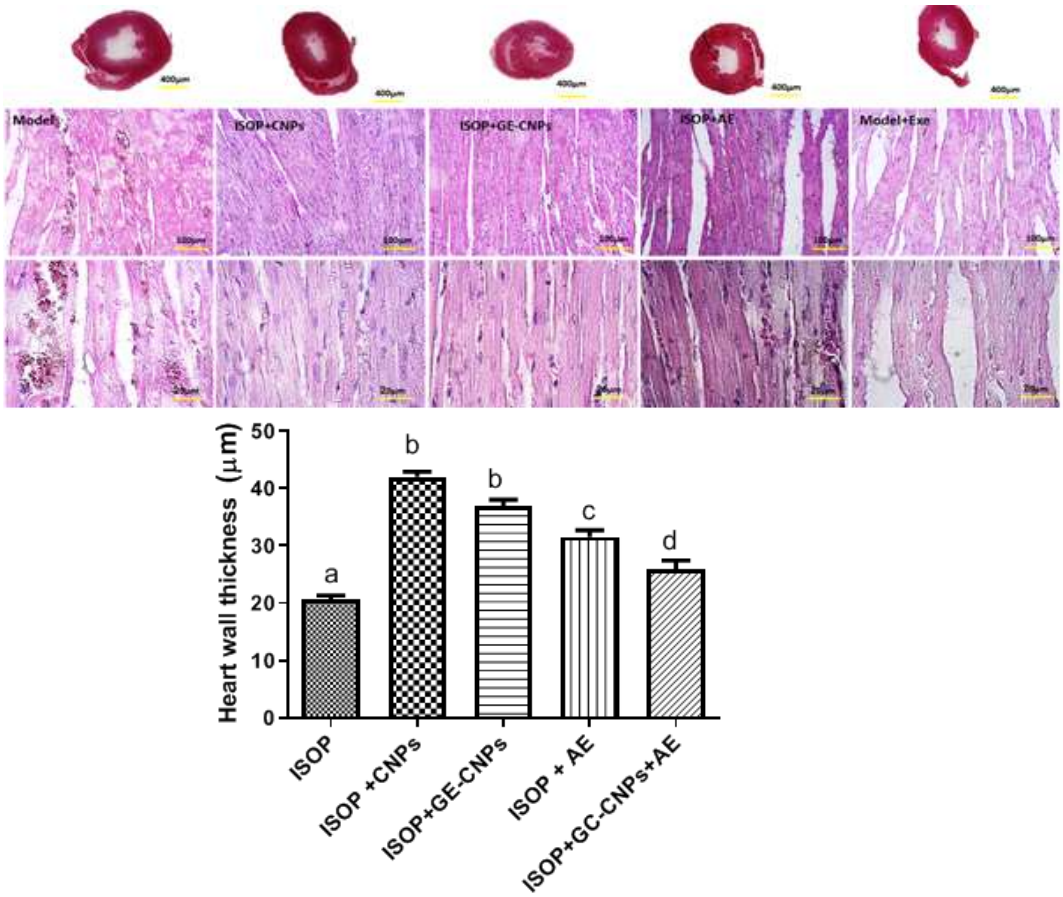
همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، در موش‌های مدل سکته قلبی انسجام بافت ماهیچه‌ای کاهش‌یافته است. همچنین عروق خونی به‌صورت خونریزی داخل بافت و نفوذ سلول‌های التهابی به داخل بافت افزایش قابل توجه نشان داد. گروه دریافت‌کننده نانوذره کیتوزان تفاوت معنی‌داری به گروه مدل سکته قلبی نشان داده است. در گروه تمرین میزان انسجام بافت ماهیچه کاهش نشان داد. از طرفی تعداد سلول التهابی کمتری در بافت مشاهده شد. گروه تیمار شده با عصاره کپسوله شده، بافت قلبی در مقایسه با کنترل در گروه تیمار شده با عصاره کپسوله در نانوذرات کیتوزان به تنهایی یا به همراه تمرین مداوم، رشته‌های عضلانی بافت قلبی به‌صورت کاملاً منسجم در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. همچنین میزان خونریزی و سلول‌های التهابی در این گروه کاهش قابل توجه داشته‌اند. همچنین در گروه‌های تحت تیمار با عصاره زنجبیل به تنهایی یا به همراه

تمرین مداوم مشاهده شد که ضخامت دیواره قلب نسبت‌به گروه بیمار افزایش‌یافته است (نمودار ۱).

میزان فیبروز بافتی بافت قلب رنگ‌آمیزی شده به روش تری کروماسون در گروه‌های مورد مطالعه

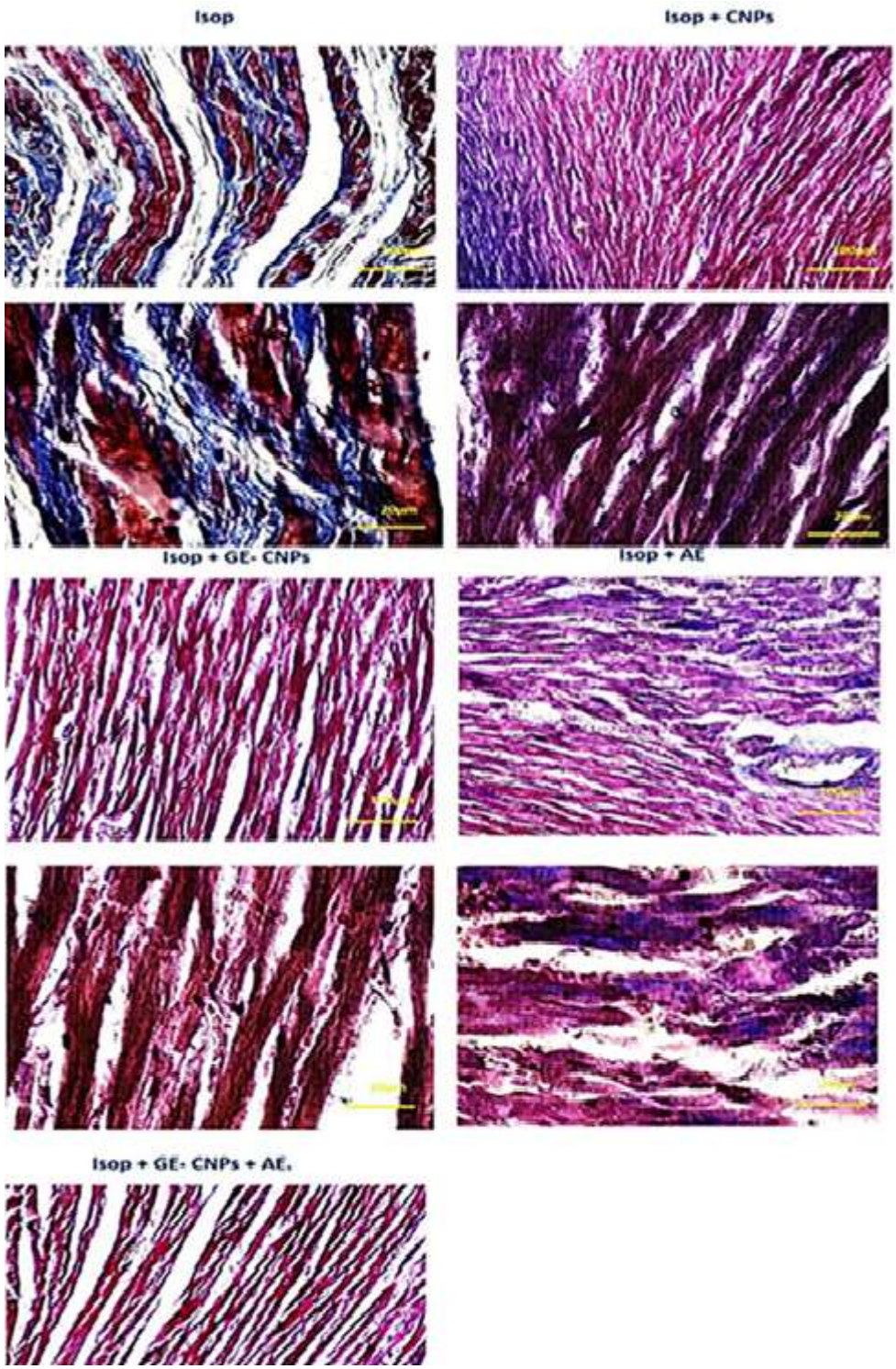
نمودار ۲ مربوطبه رنگ‌آمیزی تری کروماسون نشان داد که اختلاف میزان فیبروز بافتی در گروه بیمار (ISOP) در مقایسه با گروه بیمار تیمار شده با نانو ذرات کیتوزان (ISOP+ CNPs) بی‌معنی است. اما در گروه‌های بیمار تیمار شده با نانو ذرات کیتوزان و عصاره زنجبیل (ISOP+GE+CNPs)، بیمار تمرین دیده (ISOP+ AE) و بیمار تمرین دیده و تیمار شده با با نانو ذرات کیتوزان و عصاره زنجبیل (ISOP+GE+CNPs+AE) میزان فیبروز بافتی ناشی از رسوب کلاژن به میزان معنی‌داری کاهش یافته بود (P<۰/۰۵) در مقابل بیان کلاژن در گروه ISOP+GE+CNPs در مقایسه با گروه ISOP+GE+CNPs+AE تفاوت معنی‌دار را نشان نداد نمی‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در شکل ۲، بیان کلاژن در گروه سکته مغزی در کنار ورزش (ISOP+AE) بالاتر از سایر گروه‌های تحت درمان می‌باشد. در مقابل بیان کلاژن در گروه سکته مغزی همراه با نانوذرات کیتوزان به همراه زنجبیل با آزمون ورزش بسیار کمتر از بقیه نمونه‌های مورد بررسی نشان داده شده است. به این ترتیب در گروه مدل بیمار بیشترین میزان فیبروز بافتی ناشی از تجمع کلاژن مشاهده می‌شود. در گروه درمان ترکیبی کمترین میزان فیبروز بافتی مشاهده می‌شود.

شکل ۱- خصوصیات ظاهری بافت قلب رنگ‌آمیزی شده به روش هماتوکسیلین- ائوزین



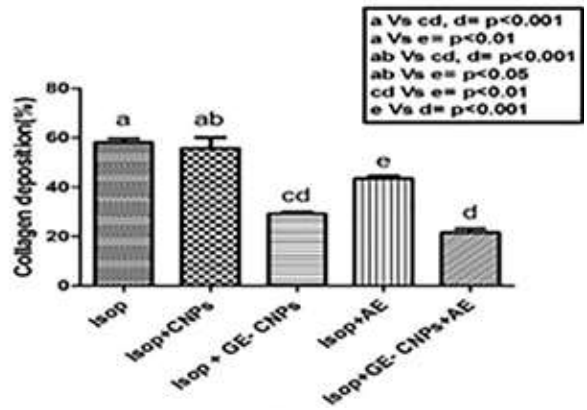
نمودار ۱- ارزیابی ضخامت دیواره قلب در پنج گروه مورد بررسی (P<۰/۰۵).

همه داده‌ها به‌صورت میانگین SD ± نشان داده شدند. علایم یکسان تفاوت معنی‌دار ندارند. علایم غیر همنام از نظر آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) هستند ISOP: سکته قلبی، CNP: نانوذرات کیتوزان،AE: تمرین هوازی، GE: زنجبیل.



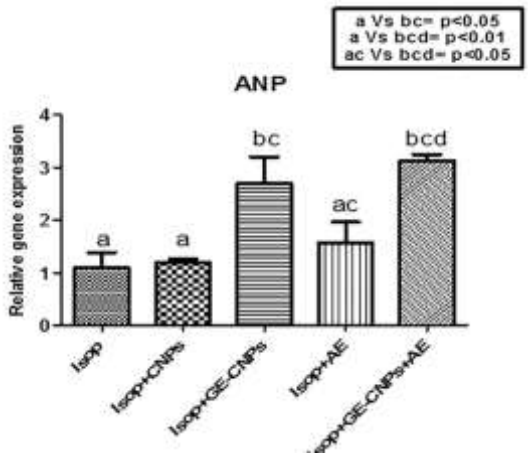
شکل ۲- رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون مربوطبه میزان فیبروز بافتی و رسوب کلاژن در فضای بینابینی کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرایی گروه‌های مورد آزمایش

بر این اساس، رنگ آبی نشان‌دهنده میزان فیبروز بیشتر و کلاژن بافتی را نشان می‌دهد و رنگ قرمز، بافت عضلانی و رشته‌های کاردیومیوسیت‌ها را نشان می‌دهد. به این ترتیب در گروه مدل بیشترین میزان کلاژن مشاهده می‌شود. در گروه درمان ترکیبی کمترین میزان فیبروز بافتی مشاهده می‌شود.



نمودار ۲- میزان فیبروز بافتی و رسوب کلاژن در فضای بینابینی کاردیومیوسیت‌های موش‌های گروه‌های مورد آزمایش

همه داده‌ها به‌صورت میانگین ± SD نشان داده شدند. علایم یکسان تفاوت معنی‌دار ندارند. علایم غیر همنام از نظر آماری تفاوت معنی‌دار (P≤۰/۰۵) دارند. ISOP: سکته قلبی، CNP: نانوذرات کیتوزان، AE: تمرین هوازی، GE: زنجبیل.



نمودار ۳- اثرات تمرینات هوازی و تیمار با نانوذرات کیتوزان حامل عصاره زنجبیل در بیان ژن ANF در گروه‌های مختلف مطالعه

همه داده‌ها به‌صورت میانگین ± SD نشان داده شدند. علایم یکسان تفاوت معنی‌دار ندارند. علایم غیر همنام از نظر آماری تفاوت معنی‌دار (P≤۰/۰۵) دارند. ISOP: سکته قلبی، CNP: نانوذرات کیتوزان، AE: ورزش هوازی، GE: زنجبیل.

تغییرات بیان ژن ANP در بافت قلب گروه‌های مورد مطالعه در نمودار ۳ تفاوت معنی‌داری در بیان ژن ANP بین گروه‌های ISOP در مقایسه با ISOP+CNPs مشاهده نمی‌شود (P>۰/۰۵) در حالی که درمان ترکیبی با تمرین هوازی و تیمار با نانو ذرات کیتوزان و عصاره زنجبیل موجب یک افزایش معنی‌داری در بیان ژن ANP در مقایسه با گروه‌های ISOP، ISOP+AE و ISOP+GE+CNPs گردید (P<۰/۰۵). میزان بیان ژن ANP در دو گروه ISOP+GE+CNPs+AE و ISOP+GE+CNPs تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین، بیان ژن ANPدر گروه بیمار تمرین دیده (ISOP+AE) نسبت‌به گروه بیمار (ISOP) و گروه بیمار تیمار شده با نانوذرات کیتوزان (ISOP+CNPs) اختلاف معنی‌دار را نشان نداد.

بحث

در این مطالعه اثر همزمان تمرین هوازی و عصاره زنجبیل پوشش داده شده با نانوذره کیتوزان در تنظیم بیان ژن ANP و تغییرات هیستوپاتولوژیکی در سیستم عصبی- عضلانی عضله قلبی موش‌های صحرایی بعد از انفاراکتوس قلبی میوکاردی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این هدف، موش‌های صحرایی نژاد ویستار در گروه‌های دریافت‌کننده تمرین هوازی، تحت برنامه تمرینی هشت هفته تمرین بر روی نوار گردان به‌صورت ۵ روز تمرین در هفته قرار گرفتند. عصاره زنجبیل با پوشش نانوکیتوزان به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت ۵ روز در هفته به مدت دو ماه به‌صورت خوراکی دریافت کردند. بیماری‌های قلبی عروقی (CVDs) علت اصلی بروز مرگ ناشی از این بیماری در سطح جهان هستند. در سال ۲۰۰۸، CVDs مرگ و میر بیش از ۱۷ میلیون نفر در سراسر جهان را به خود اختصاص داده است (۱ و ۲). علل CVD شامل آترواسکلروز، فشار خون بالا، نارسایی احتقانی قلب، کاردیومیوپاتی، بیماری عروق کرونر قلب، هیپرتروفی، آریتمی، فیبریلاسیون بطنی، تاکی کاردی بطنی می‌باشند. میوکارد انفارکتوس (MI) و سکته مغزی (stroke) شرایطی است که وقفه در خونرسانی عروق کرونر برای برآوردن خون مورد نیاز میوکارد رخ می‌دهد و منجر به محرومیت اکسیژن و مواد مغذی قلب شده و سرانجام بافت‌های قلبی را از بین می‌برد (۱۵). گیاهان دارویی از زمان‌های بسیار قدیم توسط همه تمدن‌ها به‌عنوان منبع داروهای مورد استفاده قرار گرفته اند. به‌دلیل منشأ طبیعی، مقرون به صرفه بودن و عوارض جانبی کمتر علاقه به بهره‌برداری از ترکیبات بیولوژیکی گیاهان دارویی مختلف وجود داشته است. بسیاری از این گیاهان دارویی همواره به‌عنوان منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها مورد توجه بوده‌اند. گیاه زنجبیل با نام علمی Zingiber officinale Roscoe یکی از گیاهان دارویی بسیار قوی با خواصی نظیر ضدالتهاب، ضدمیکروب و آنتی‌اکسیدانی است که دارای اثرات محافظتی بر روی بافت‌هایی نظیر قلب، اعصاب و کبد و کاهش درد در روماتیسم می‌باشد (۱۶ و ۱۷).

از سوی دیگر تمرینات بدنی (PT) یک روش شناخته شده درمانی است که در انسان و مدل‌های حیوانی برای غلبه بر آسیب‌های قلب و عروقی پس از انفارکتوس میوکاردیوم (MI) مورد استفاده قرار می گیرد. در انسان، تمرین بدنی بعد از انفارکتوس قلبی تأثیرات مطلوبی در ترمیم مجدد بطن چپ، بهبود ظرفیت عملکردی LV، کسر تخلیه و پر کردن دیاستولیک LV اولیه داشته است. همچنین اثر تمرینات هوازی با شدت‌های بر افزایش

متوسط استرس اکسیداتیو بر روی دیواره‌های شریانی به تسهیل در سنتز، آزادسازی و مدت عملکرد اکسید نیتریک که مسئول گشاد شدن عروق و نیز مهار فرآیندهای چندگانه درگیر در آتروسکلروز و آنفارکتوس و ترومبوز و آپوپتوزیس می‌گردد، مشاهده شده است (۱۸ و ۱۹).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که استفاده همزمان از هر دو روش درمانی شامل تمرینات هوازی و مصرف عصاره زنجبیل به‌صورت کپسوله شده در نانوذرات کیتوزان تأثیر قابل توجهی در کاهش آسیب‌های بافتی مشاهده شده پس از القای انفارکتوس میوکاردیم شامل شامل تجمع کلاژن و فیبروز بافتی و کاهش ضخامت دیواره قلبی داشته است به‌طوری‌که در گروه‌های تحت درمان به‌طور قابل توجهی از میزان فیبروز بافتی کاسته شده و ضخامت دیواره قلب افزایش‌یافته بود. در همین راستا، کریمی و همکاران نیز در مطالعه خود نشان دادند که مکمل زنجبیل و تمرینات هوازی بر پایه آب منجر به کاهش hs-CRP، IL-10، انسولین، گلوکز، مقاومت به انسولین، LDL-C، TG شده است. نتایج آنها نیز نشان داد که انجام تمرینات هوازی بر پایه آب و مصرف مکمل زنجبیل به‌طور همزمان در مقایسه با هر یک به تنهایی تأثیرات مثبت بیشتری را دارا می‌باشند (۲۰). در این مطالعه همچنین تغییرات سطح بیان ژن ANP در بافت قلب گروه‌های مورد مطالعه ارزیابی شد. این ژن کدکننده پپتیدی به نام پپتید ناتریورتیک دهلیزی است که یک هورمون قلبی محسوب می‌شود و مهمترین عملکرد آن کاهش فشارخون و تنظیم هومئوستازی الکترولیت‌ها در قلب می‌باشد (۲۱). در انسان، ANP هدف مهمی برای تشخیص و درمان نارسایی قلبی است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که مصرف عصاره زنجبیل به تنهایی و یا توأم با انجام تمرینات هوازی باعث افزایش سطح بیان ژن ANP و تنظیم آن می‌گردد. با توجه به اثرات ضدالتهابی زنجبیل، نتایج این مطالعه نیز پیشنهاد می‌کنند که عصاره زنجبیل و انجام تمرینات هوازی با تنظیم بیان ژن ANP باعث کاهش التهاب می‌گردند. همچنین انجام تمرینات هوازی به همراه مصرف عصاره زنجبیل با افزایش بیان ANP می‌تواند مسیرهای ژنی مربوطبه بخش الکتریکی قلب را کنترل کند و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی قلب به‌دلیل مصرف زنجبیل و افزایش قدرت انقباض بافت قلب به‌دلیل انجام تمرینات هوازی را در پی داشته باشد.

مطابق با نتایج به‌دست آمده، تمرینات هوازی به همراه مصرف عصاره زنجبیل کپسوله شده در نانوذرات کیتوزان قادر بود باعث کاهش آسیب‌های بافتی ناشی از انفارکتوس میکوکاردیوم شامل فیبروز بافتی و کاهش ضخامت دیواره قلب گردد. همچنین نتایج حاصل نشان دادند که درمان ترکیبی موردنظر با تنظیم بیان ژن ANP قادر به تنظیم و بهبود عملکرد بافت قلب در مدل‌های بیمار می‌گردد. از این رو، این درمان ترکیبی می‌تواند به‌عنوان روشی مؤثر برای مطالعات بالینی بر روی سکته قلبی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از شرکت فناوران بافت و ژن پاسارگاد تهران بابت انجام امور آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. Plos med 2006;3:e442. doi: 10.1371/journal.pmed.0030442
2. Mendis S, Puska P, Norrving B, Organization WH. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control: World Health Organization; 2011. doi: 10.1023/a:1012220908636
3. Dixon I, Hata T, Dhalla NS. Sarcolemmal Na (+)-K (+)-ATPase activity in congestive heart failure due to myocardial infarction. American Journal of Physiology-Cell Physiology 1992;262:C664-C71. doi: 10.1152/ajpcell.1992.262.3.C664
4. González-Montero J, Brito R, Gajardo AI, Rodrigo R. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: Therapeutic opportunities. World Journal of Cardiology 2018;10:74. doi: 10.4330/wjc.v10.i9.74
5. Wexler BC, Greenberg BP. Protective effects of clofibrate on isoproterenol-induced myocardial infarction in arteriosclerotic and non-arteriosclerotic rats. Atherosclerosis 1978;29:373-95. doi: 10.1016/0021-9150(73)90114-7
6. Li J, Cai C, Li J, Li J, Li J, Sun T, et al. Chitosan-based nanomaterials for drug delivery. Molecules 2018;23:2661. doi: 10.3390/molecules23102661
7. Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol,[8]-gingerol,[10]-gingerol and [6]-shogaol. Journal of Ethnopharmacology 2010;127:515-20. doi: 10.1016/j.jep.2009.10.004
8. Ippoushi K, Azuma K, Ito H, Horie H, Higashio H. [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774. 1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. Life Sciences 2003;73:3427-37. doi: 10.1016/j.lfs.2003.06.022
9. Kundu JK, Surh Y-J. Molecular basis of chemoprevention with dietary phytochemicals: redox-regulated transcription factors as relevant targets. Phytochemistry Reviews 2009;8:333-47. doi: 10.1007/s11101-009-9132-x
10. Sharma N, Singh D, Rani R, Sharma D, Pandey H, Agarwal V. Chapter 13 - Chitosan and Its Nanocarriers: Applications and Opportunities. In: Tripathi DK, Ahmad P, Sharma S, Chauhan DK, Dubey NK, editors. Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms: Academic Press;2019.p.267-86. doi: 10.3390/catal11080902
11. Sharma M, Kishore K, Gupta SK, Joshi S, Arya DS. Cardioprotective potential of Ocimum sanctum in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. Molecular and Cellular Biochemistry 2001;225:75-83. doi: 10.1023/a:1012220908636
12. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen o. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation 2007;14:753-60. doi: 10.1097/HJR.0b013e3281eacef1
13. Somboonwong J, Traisaeng S, Saguanrungsirikul S. Moderate-intensity exercise training elevates serum and pancreatic zinc levels and pancreatic ZnT8 expression in streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sciences 2015;139:46-51. doi: 10.1016/j.lfs.2015.08.008
14. Sabry S. Effect of chitosan nanoparticles on haloperidol drug-induced hepatotoxicity in albino rats: Light and Electron Microscopic study. Journal of Bioscience and Applied Research 2016;2:771-8. doi: 10.21608/JBAAR.2016.109754

15. Amran AZ, Jantan I, Dianita R, Buang F. Protective effects of the standardized extract of Zingiber officinale on myocardium against isoproterenol-induced biochemical and histopathological alterations in rats. Pharmaceutical Biology 2015;53:1795-802. doi: 10.3109/13880209.2015.1008147

16. Choi JG, Kim SY, Jeong M, Oh MS. Pharmacotherapeutic potential of ginger and its compounds in age-related neurological disorders. Pharmacology & Therapeutics 2018;182:56-69. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.08.010

17. Eleiwa NZH. Protective effect of Zingiber officinale (ginger) on doxorubicin induced oxidative cardiotoxicity in rats. Marsland press/Zhengzhou University 2013;2:2924-34. doi: 10.1002/ptr.2412

18. Giannuzzi P, Temporelli PL, Corrà U, Tavazzi L. Antiremodeling effect of long-term exercise training in patients with stable chronic heart failure: results of the Exercise in Left Ventricular Dysfunction and Chronic Heart Failure (ELVD-CHF) Trial. Circulation 2003;108:554-9. doi: 10.1161/01.CIR.0000081780.38477.FA

19. Hambrecht R, Gielen S, Linke A, Fiehn E, Yu J, Walther C, et al. Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: a randomized trial. JAMA 2000;283:3095-101. doi: 10.1001/jama.283.23.3095

20. Karimi N, Roshan VD, Bayatiyani ZF. Individually and combined water-based exercise with ginger supplement, on systemic inflammation and metabolic syndrome indices, among the obese women with breast neoplasms. Iranian Journal of Cancer Prevention 2015;8. doi: 10.17795/ijcp-3856

21. Evrard A, Hober C, Racadot A, Lefebvre J, Vantyghem MC. [Atrial natriuretic hormone and endocrine functions]. Annales de Biologie Clinique 1999;57:149-55. doi: 10.3389/fphys.2021.691407

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2023; Vol 17, No 4

DOI: 10.22100/jkh.v17i4.2801

Orginal Article

The Effects of Aerobic Exercise and Ginger Extract Loaded into Chitosan Nanoparticles on Atrial Natriuretic Peptide (ANP) Gene and Cardiac Histopathology in Rat Models of Myocardial Infarction

Vahid Fallahzadeh (Ph.D. Student)[1], Farzaneh Taghian (Ph.D.)[2*], Khosro Jalali Dehkordi (Ph.D.)[3]

1- Dept. of Physical Education and Sport Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Received: 17 November 2021**, Accepted:** 29 Junuary 2022

Abstract:

Introduction: *In this study, the effects of aerobic exercises and encapsulated ginger extract (GE) into chitosan nanoparticles (CNPs) were investigated on atrial natriuretic peptide (ANP) gene expression and cardiac histopathology in rat models of myocardial infarction.*

Methods: *The 25 male rats were divided into five groups: Isop (85 mg/kg), Isop + CNPs, Isop + GE-CNPs, Isop + AE, and Isop + GE- CNPs + AE. The rats performed AE on a rodent treadmill five days per week for six weeks. GE- CNPs were gavaged to rats at a dose of 500 mg/kg for six weeks. After the end of the treatment period, the expression of ANP genes was carried out by Real-Time PCR.*

Results: *Based on our findings, the highest amount of collagen deposition was in the heart tissue of patient groups and the patient group treated with chitosan nanoparticles ($P<0.05$). Besides, the results of real-time PCR showed that the changes in ANP gene expression were significant only in the groups treated with aerobic exercise and ginger extract ($P<0.05$).*

Conclusion: *Regular aerobic exercises with nano-drug supplements such as ginger extract encapsulated into CNPs can reduce cardiac fibrosis and regulate ANP gene expression.*

Keywords: Aerobic exercise, Ginger extract, Myocardial infarction, Chitosan nanoparticles, ANP.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** F. Taghian, **Email**: ft.taghian@gmail.com*

Citation: Fallahzadeh V, Taghian F, Jalali Dehkordi K. The effects of aerobic exercise and ginger extract loaded into chitosan nanoparticles on atrial natriuretic peptide (ANP) gene and cardiac histopathology in rat models of myocardial infarction. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;17(4):34-43.