مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۲۱، بهمن ۱۴۰۱، ۱۱۱۴-۱۱۰۳

تأثیر تمرین استقامتی به همراه مصرف مکمل نانوکورکومین بر محور p21-p53 و بیان ژن TERF2 در بافت عضلانی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار: یک مطالعه تجربی

جلال پورجعفریان[۱]، یاسر کاظم‌زاده[۲]، سجاد ارشدی[۳]، یحیی محمد نژادپناه کندی[۴]، عبدالعلی بنایی فر[۵]

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۳/۰۷ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۱/۰۳/۲۸ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۱/۱۰/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۰۳

چکیده

زمینه و هدف: آپوپتوز یک برنامه منظم مرگ سلولی است که با تغییرات مورفولوژیک مانند چروکیده شدن سلول، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن DNA مشخص می‌شود. هدف از پژوهش حاضر تأثیر تمرین استقامتی و مصرف مکمل نانوکورکومین بر محور p21-p53 و بیان ژن TERF2 (Telomeric repeat-binding factor 2) در بافت عضلانی موش‌های نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش نر با میانگین وزنی ۲۰±۲۰۰ گرم به صورت تصادفی به ۴ گروه کنترل سالم، تمرین استقامتی، نانوکورکومین، تمرین استقامتی+ نانوکورکومین تقسیم شدند. تمرین استقامتی در ۴ هفته طبق پروتکل اجرا گردید. هم‌زمان موش‌های گروه‌های نانوکورکومین به میزان ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن مکمل مصرف نمودند. شاخص‌ها به‌روش Real-Time PCR و تجزیه و تحلیل داده‌ها با آنالیز واریانس دوطرفه انجام شد.

یافته‌ها: نتایج تفاوت معناداری در TERF2، p53 (Protein 53) و p21 (Protein 21) بین چهار گروه را نشان داد (P<۰/۰۵). در گروه تمرین استقامتی و نانوکورکومین + تمرین استقامتی، میانگین متغیر TERF2 و p53 به طور معناداری بالاتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵). هم‌چنین، تفاوت معناداری بین گروه تمرین استقامتی و گروه نانوکورکومین مشاهده شد که میانگین p53 در گروه تمرین استقامتی به طور معناداری بالاتر از گروه نانوکورکومین بود (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمرین استقامتی به همراه مصرف مکمل نانوکورکومین، بیان ژن TERF2 را افزایش داده و می‌تواند سرعت کوتاه شدن تلومر و پیری را کاهش دهد. هم‌چنین، افزایش پروتئین p53 و p21 در هنگام تمرین استقامتی و مصرف مکمل نانوکورکومین احتمالاً منجر به توقف چرخه سلولی و آپوپتوز شود.

واژه‌های کلیدی: تمرین استقامتی، TERF2، محور p21-p53، نانوکورکومین، موش صحرایی

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، اسلامشهر، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استادیار، دانش آموخته دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
تلفن: ۰۲۱-۵۶۱۲۳۶۰۱، دورنگار: ۰۲۱-۵۶۱۴۳۹۷۱، پست الکترونیکی: yaser.kazemzadeh@yahoo.com
۳- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، اسلامشهر، ایران
۵- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

مقدمه

آپوپتوز (Apoptosis) یا مرگ برنامه‌ریزی شده یک فرآیند ژنتیکی است که بخش تفکیک‌ناپذیر از رشد، توسعه و هومئوستاز موجود زنده بوده که برای حذف سلول‌های زائد با روشی هدفمند به کار می رود [۱]. تحقیقات اخیرآشکار کرده‌اند که p53 (Protein53) علاوه بر داشتن نقش تنظیمی در آپوپتوز، توقف چرخه سلولی، پیری سلول و هم‌چنین از طریق پشتیبانی عمل آنتی اکسیدان‌ها نیز نقش مهار توموری را ایفا می‌کند [۲].

p53 فاکتور رونویسی و سرکوب‌گر تومور است و در فرآیند های سلولی از جمله انتقال پیام‌های سلولی، پاسخ سلولی به آسیب DNA (Deoxyribonucleic acid) ثبات ژنومی نقش دارد [۳]. این ژن موجب ساخته شدن پروتئین p21 (Protein21) شده و به پروتئین CDK2 (Cyclin-dependent kinase 2) متصل و اجازه ورود p21 به مرحله بعدی تقسیم سلولی را نمی‌دهد. ژن p21 به عنوان عامل کلیدی برای تنظیم رشد سلول شناخته شده است [۴]. در پژوهشی نشان داده شد فعالیت‌های ورزشی منجر به افزایش پروتئین p53 گردید و هم‌چنین در محیط آزمایشگاهی پروتئین p21 از طریق مسیر میتوکندریایی منجر به کاهش رشد سلول سرطانی و آپوپتوز می‌گردد [۵].

کورکومین (Curcumin) بر عملکرد بسیاری از فاکتورهای رونویسی، فاکتورهای رشد و آپوپتوز تأثیر می‌گذارد [۶]. در بین این ادویه‌ها، زردچوبه به دلیل داشتن ماده فعال کورکومین علاقه تحقیقاتی قابل توجهی دریافت کرده است. کورکومین دارای سمیت کمی است و طیف گسترده‌ای از عملکردهای دارویی از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد-التهابی، ضدمیکروبی و ضدسرطان را انجام می‌دهد [۸-۷].

تلومر (Telomere)، ساختار انتهایی کروموزوم در یوکاریوت‌ها می‌باشد و وظیفه اصلی آن حفاظت و پایداری از انتهای کروموزوم است [۹]. در هر تقسیم سلولی به شکل پیوسته بخشی از درازای تلومر کوتاه می شود، کوتاه شدن مداوم تلومر به توقف چرخه سلولی و مرگ سلولی می‌انجامد [۹]. مکانیزم غالب افزایش طول توالی تلومر در اکثر یوکاریوت‌ها آنزیم تلومراز است. آنزیم تلومراز دارای زیر واحد تجزیه کننده‌ای است که به رونویسی معکوس تلومراز TERT (Telomerase reverse transcriptase) معروف می‌باشد و موجب پایداری DNA می‌شود [۱۰]. سرکوب فعالیت آنزیم تلومراز با پیشبرد آپوپتوزیس و افزایش بیان TERT نیز با کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول همراه است [۱۱]. پروتئین‌های مهمی که در ساختار تلومریک نقش مهمی دارند شامل عوامل اتصالی تکراری تلومر TERF (Telomeric repeat-binding factor) با ایزوفرم TERF1 و TERF2 می باشند [۱۲]. پروتئین TERF2 برای حفظ ساختار انتهایی کروموزوم و طول عمر سلول ضروری است و ممکن است به طور مستقیم و به عنوان تسریع کننده در ایجاد حلقه T شرکت کند. به علاوه، TERF2 هم به صورت فیزیکی و هم به صورت کارکردی با چند عامل ترمیمی DNA ارتباط دارد [۱۲].

در پژوهشی با عنوان اثرات شدید و حاد تمرین استقامتی بر طول تلومر نشان دادند که تمرینات شدید و حاد استقامتی تأثیرات محافظتی بر طول تلومر دارد. هم‌چنین،

نشان دادند که قرار گرفتن در یک مسابقه حاد با مسافت طولانی باعث کوتاه شدن طول تلومر می‌شود و آن هم شاید به دلیل آسیب اکسیداتیو DNA باشد [۱۳].

با توجه به آثار سودمند فعالیت ورزشی بر جلوگیری از پیری سلولی و فرآیند آپوپتوز و هم‌چنین تأثیرات مثبت و آنتی‌اکسیدانی مکمل نانوکورکومین [۷]، این پرسش مطرح می‌شود که آیا ترکیب فعالیت بدنی و مصرف مکمل نانوکورکومین می‌تواند تأثیر بیشتری را نسبت به هرکدام از آن‌ها بر فرآیند آپوپتوز و جلوگیری از پیری سلولی داشته باشد؟ بر طبق جستجوهای انجام شده، مطالعه جامعی که بـه بـررسی این بحث پرداخته باشد، یافت نگردید. لذا هدف از این پژوهش تعیین تأثیر تمرینات استقامتی همراه با مصرف مکمل نانوکورکومین بر محور p21-p53 و بیان ژن TERF2 در بافت عضلانی موش‌های نر صحرایی نژاد ویستار بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی است که در تابستان سال ۱۴۰۰ در مرکز حیوانات علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله انجام شد. این مطالعه دارای کد اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند به شناسه IR.IAU.PIAU.REC.1400.014 می‌باشد. با عنایت به این- که از لحاظ محدودیت‌های مکانی، اخلاقی و زمانی دسترسی به آزمودنی‌های انسان مقدور نبوده است، لذا از آزمودنی‌های حیوان (موش صحرایی نر نژاد ویستار) استفاده شد.

در ابتدا به کسب مجوزهای لازم از کمیته اخلاق دانشگاه اقدام شد و سپس مطابق با دستورالعمل انجمن ایرانیان حمایت از حیوانات آزمایشگاهی، حیوانات مورد مطالعه در قفس‌هایی به صورت جداگانه نگه‌داری شدند. جامعه آماری موش‌های صحرایی‌نر نژاد ویستار و حجم آن شامل ۲۴ سر موش صحرایی بودند.

حجم نمونه با نرم‌افزار G*Power بر اساس روش آماری تحلیل واریانس و سطح خطای آلفای ۰/۰۵ و توان ۰/۸۵ برابر با ۲۴ سرموش تعیین شد. موش‌ها با سن تقریبی هشت هفته و با محدوده وزنی ۲۰±۲۰۰ گرم از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی پاستور (تهران، ایران) تهیه و سپس به آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی حیوانات منتقل شدند. همه حیوانات در شرایط یکسان و مطلوب حیوانات آزمایشگاهی (دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵-۵۰ و سیکل روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲) نگه‌داری شدند و به صورت آزادانه به غذای استاندارد آزمایشگاهی و آب دسترسی داشتند. موش‌های صحرایی پس از مدت یک هفته عادت به شرایط محیط به صورت تصادفی (بدون در نظر گرفتن شرایط و ویژگی‌های موش‌های صحرایی) به ۴ گروه شش‌تایی شامل: کنترل سالم، تمرین استقامتی، نانو- کورکومین، تمرین استقامتی + نانوکورکومین تقسیم شدند.

نانو ذرات کیتوزان و نانو ذرات کیتوزان خالی طبق مطالعه Vijayakurup و همکارانش آماده‌سازی شدند [۱۴]. کیتوزان (۵۰۰ میلی‌گرم) در محلول اسیداستیک ۲ درصد v/v حل شد (۵۰ میلی‌لیتر) و با کورکومین در اتانول (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مخلوط شد. ۱۵ میلی‌لیتر ۱ درصد وزن- حجمی از محلول TPP (Sodium tripolyphosphate)، به صورت قطره قطره و تحت هم زدن مغناطیسی ثابت به آن اضافه

شد. سپس محلول به مدت ۱ ساعت بیشتر هم زده شد و در ۱۰،۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل EBA200 شرکت سازنده Hettich ساخت کشور ژاپن) شد. پلت به دست آمده در آب مجدداً معلق شده و بیشتر لیوفیلیزه شد تا نانو ذرات کیتوزان محصور در کورکومین به دست آید. اندازه و مورفولوژی نانو ذرات تشکیل شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM (Scanning Electron Microscope، مدل S-3700N شرکت سازنده Hitachi ساخت کشور ژاپن)، سایز ذرات با دستگاه Zeta sizer (مدل pss0012-22، شرکت Malvern ساخت کشور انگلستان) و پایداری محصول با دستگاه DLS (Dyvamic Light Scattering، مدل SZ10، شرکت Horiba، ساخت کشور ژاپن) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از نانو-کورکومین تجاری ساخته شده توسط شرکت Exir Nano Sina (تهران، ایران) به عنوان نمونه مقایسه‌ای کیفیت محصول استفاده شد. برای هر حیوان در نهایت پس از تهیه محصول ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد [۱۴].

ابتدا به مدت یک هفته آماده‌سازی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار برای دویدن بر روی نوارگردان مخصوص جوندگان (مدل DSI ۵ لاین، شرکت دانش سالار ایرنیان، ساخت ایران) صورت پذیرفت. سپس این پروتکل در مدت ۴ هفته با شدت ۲۰-۱۸ متر در دقیقه، مدت ۳۵-۲۰ دقیقه در روز با تکرار ۵ جلسه در هفته اجرا گردید (تعدیل شده پروتکل هوازی) [۱۵].

در پایان مداخلات تمرین و مکمل‌دهی، موش‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. حیوانات به وسیله تزریق کتامین (۵۰-۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن) و زایلازین (۵-۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن) که به صورت داخل صفاقی به آن‌ها تزریق شد، بی‌هوش شدند. پس از تأیید بیهوشی توسط عدم عقب کشیدن پا، برشی ۵ تا ۶ سانتی‌متر در ناحیه شکمی بدن جوندگان ایجاد و به سرعت بافت عضلانی نعلی جدا و به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و در نیتروژن مایع قرار گرفت. نمونه بافت عضلانی اسکلتی جهت بررسی بیان ژن‌ها گرفته شد. در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک Real Time PCR استفاده گردید. توالی پرایمرهای رفت (Forward) و برگشت (Reverse) ژن های TERF2، p21، p53 و GAPDH با استفاده از نرم‌افزار Olio6 طراحی و سپس با Blast نمودن آن‌ها در NBCI از صحیح بودن آن‌ها اطمینان حاصل شد و نهایتاً توسط شرکت Macrogen سنتز شدند (جدول ۱). سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج و به cDNA تبدیل شدند. cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفتند [۲۲-۲۱].

جدول ۱- مشخصات توالی پرایمر ژن‌های مورد مطالعه

نام ژن	نوع پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیری
TERF2	Forward Reverse	CCGGGAAAAGAACTTGGCTC CACTGGCTCTGTGTGCTTTT	193 nt
p21	Forward Reverse	AGAAGGGAACGGGTACACAG ACCACCACATACCACACACA	155 nt
p53	Forward Reverse	TCCCCTCCTTTCTTGCCATT CAGAGACCCAGCAACTACCA	150 nt
GAPDH	Forward Reverse	CAAGTTCAAGGGCACAGTCA CCCCATTTGATGTTAGCGGG	102 nt

داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نرمال بودن توزیع فراوانی بیان ژن‌های مورد بررسی در هر یک از گروه‌های مورد مطالعه، با استفاده از آزمون ناپارامتریک Shapiro-Wilk مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون Bartlett نیز به منظور ارزیابی همگنی واریانس بیان ژن‌های مورد بررسی در گروه‌های مورد مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. به منظور ارزیابی اثر تمرین استقامتی و مکمل نانوکورکومین بر بیان ژن‌های مورد بررسی در بعد از مداخله، از آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) استفاده گردید. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج توصیفی بیان ژن‌های TERF2، p21، p53 به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شده است (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار بیان ژن‌های مورد بررسی برحسب گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	گروه کنترل (n=۶) انحراف معیار ± میانگین	گروه تمرین استقامتی (n=۶) انحراف معیار ± میانگین	گروه نانوکورکومین (n=۶) انحراف معیار ± میانگین	گروه نانوکورکومین + تمرین استقامتی (n=۶) انحراف معیار ± میانگین
TERF2	۱/۰۷ ± ۰/۳۹	۴/۸۱ ± ۱/۷۱	۲/۳۶ ± ۰/۴۸	۶/۴۴ ± ۱/۹۹
p53	۱/۱۹ ± ۰/۶۰	۷/۲۷ ± ۲/۴۵	۳/۳۱ ± ۱/۱۱	۵/۶۳ ± ۱/۹۰
p21	۱/۰۲ ± ۰/۲۲	۳/۹۰ ± ۱/۳۵	۳/۰۰ ± ۰/۹۰	۵/۳۲ ± ۲/۱۱

با توجه به نتایج آنالیز واریانس دوطرفه، نظر به آماره F و سطح معنی‌داری به دست آمده، نشان داد بین گروه‌ها از نظر بیان TERF2 تفاوت معنی‌داری وجود دارد که بر اساس این نتایج اثر مکمل بر بیان ژن TERF2 (P<۰/۰۰۱) و اثر تمرین بر بیان ژن TERF2 (P<۰/۰۰۱) از نظر آماری معنی‌دار بود و اثر تعامل تمرین و مکمل بر بیان ژن TERF2 (P=۰/۷۲۸) از نظر آماری معنی‌دار نبود. به عبارتی، اثر مکمل و اثر تمرین منجر به افزایش بیان ژن TERF2 شده است (جدول ۳).

هم‌چنین، برای بیان p53 نیز تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود داشت، به نحوی که اثر تمرین بر بیان ژن p53 (P<۰/۰۰۱) و اثر تعاملی تمرین و مکمل بر بیان ژن p53

(P=۰/۰۰۴) از نظر آماری معنی‌دار بود، اما اثر مکمل بر بیان ژن p53 (P=۰/۶۹۳) از نظر آماری معنی‌دار نبود. به عبارتی، اثر تمرین و اثر تعاملی تمرین و مکمل منجر به افزایش بیان ژن p53 شده است (جدول ۳).

از نظر بیان ژن p21 در بین گروه‌ها با آنالیز واریانس دو-طرفه تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. نتایج نشان داد که اثر مکمل بر بیان ژن p21 (P=۰/۰۰۱) و اثر تمرین بر بیان ژن p21 (P<۰/۰۰۱) از نظر آماری معنی‌دار است، در حالی‌که اثر تعاملی تمرین و مکمل بر بیان ژن p21 (P=۰/۵۵۶) از نظر آماری معنی‌دار نیست. به عبارتی، اثر مکمل و اثر تمرین منجر به افزایش بیان ژن p21 شده است (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج تحلیل واریانس دوطرفه برای تعیین اثر مکمل نانوکورکومین و تمرین استقامتی بر میزان بیان ژن‌های مورد بررسی

متغیر	منبع تغییر	مجذور مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار P
بیان ژن TERF2	اثر مکمل	۱۷/۱۷۱	۱	۱۷/۱۷۱	۱۹/۵۱۳	<۰/۰۰۱
	اثر تمرین	۱۲۲/۱۶۸	۱	۱۲۲/۱۶۸	۱۳۸/۸۲۷	< ۰/۰۰۱
	اثر متقابل مکمل و تمرین	۰/۲۲۶	۱	۰/۲۲۶	۰/۲۵۷	۰/۷۲۸
	خطا	۱۷/۶۰۵	۲۰	۰/۸۸۰	-	-
بیان ژن p53	اثر مکمل	۰/۴۴۹	۱	۰/۴۴۹	۰/۱۵۹	۰/۶۹۳
	اثر تمرین	۱۴۱/۰۷۱	۱	۱۴۱/۰۷۱	۵۰/۱۲۴	< ۰/۰۰۱
	اثر متقابل مکمل و تمرین	۲۸/۱۸۸	۱	۲۸/۱۸۸	۱۰/۰۱۶	۰/۰۰۴
	خطا	۷۸/۸۰۴	۲۰	۳/۹۴۰	-	-
بیان ژن p21	اثر مکمل	۲۳/۱۹۱	۱	۲۳/۱۹۱	۱۲/۹۷۶	۰/۰۰۱
	اثر تمرین	۵۴/۳۰۴	۱	۵۴/۳۰۴	۳۰/۳۸۵	< ۰/۰۰۱
	اثر متقابل مکمل و تمرین	۰/۶۳۶	۱	۰/۶۳۶	۰/۳۵۶	۰/۵۵۶
	خطا	۵۰/۰۴۱	۲۰	۲/۵۰۲	-	-

P<۰/۰۵ اثر معنی‌دار

بحث

با توجه به نتایج داده‌ها تغییر معناداری بین TERF2، p53 و p21 بین چهار گروه مشاهده شد. در گروه تمرین استقامتی و گروه نانوکورکومین + تمرین استقامتی میزان متغیر TERF2 به طور معناداری بالاتر از گروه کنترل بود.

هم‌سو با نتایج تحقیق حاضر، بعضی پژوهش‌ها به بررسی اثر تمرین تناوبی شدید و تداومی استقامتی بر بیان ژن‌های TERF2 و TERT بافت قلب موش‌های صحرایی نر پیر پرداختند. نتایج نشان داد بیان ژن TERF2 گروه‌های تناوبی شدید و تداومی در مقایسه با گروه کنترل افزایش آماری معنی‌داری نشان داد. آن‌ها نتیجه گرفتند شش هفته تمرین تناوبی شدید و تداومی استقامتی بتواند رشد و طول عمر سلول‌های قلبی را به وسیله حفظ طول تلومراز از طریق افزایش ژن TERF2 تنظیم کند. TERF2 و TERT رشد و طول عمر سلول‌ها را تنظیم می‌کنند [۱].

در مطالعات موجود، مکانیسم مشخصی برای اثر فعالیت ورزشی بر بیولوژی و طول تلومر وجود ندارد، اما چندین مکانیسم را در این ارتباط می‌توان مورد ارزیابی قرار داد که مهم‌ترین آن ها آنزیم تلومراز و استرس اکسیداتیو هستند. میانگین طول تلومرها یک نشانگر ارزشمند سالمندی زیستی است. هنگامی که طول تلومر در اثر پیری به صورت تدریجی کاهش پیدا می کند، آنزیم تلومراز یک الگوی دوفازی را از ساختار خود جایگزین می‌کند. در یک مطالعه مشاهده شد که هم طول تلومر و هم فعالیت آنزیم تلومراز از ۴ تا ۳۹ سالگی به صورت تدریجی کاهش پیدا می‌کند. هم‌چنین، افراد بالای ۴۰ ساله که طول تلومر آن‌ها به صورت تدریجی درحال کوتاه شدن است، ۶۵ درصد دارای فعالیت آنزیم تلومراز ثابت اما کم بودند و ۳۵ درصد افراد فعالیت آنزیم تلومراز نداشتند [۴]. فعالیت ورزشی می‌تواند تأثیر مثبتی بر ثبات و جلوگیری از کوتاه شدن طول تلومر و کاهش آنزیم تلومراز در نتیجه افزایش سن داشته باشد. پاره‌ای تحقیقات گزارش کرده‌اند که فعالیت بدنی منظم منجر به فعال سازی آنزیم تلومراز و تثبیت طول تلومر می‌شود [۵]. از طرف دیگر نشان داده شده کاهش توانایی بدن در حفظ طول تلومر ارتباط مستقیم با افزایش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی دارد [۱۶]. ورزش و فعالیت بدنی با شدت‌های متفاوت می-تواند به عنوان یک شیوه مؤثر برای بسیاری از بیماری‌ها و کیفیت بهتر زندگی در دوران سالمندی کمک کند [۲۴]. هم‌چنین، ورزش باعث افزایش محتوای آنتی‌اکسیدان و کاهش فشار اکسایشی نیز می‌شود. نتایج پژوهش Baghaiee و همکاران نشان داد ورزش به کاهش فشار اکسایشی در موش میانسال منجر شده و عوامل مؤثر در پیری سلول را تعدیل می‌کند [۲۳]. Liu و همکاران افزایش فعالیت تلومراز در عضلات اسکلتی و عدم تغییر فعالیت تلومراز در بافت قلب و کبد موش‌ها را به دنبال یک دوره تمرینات استقامتی طولانی مدت گزارش کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که ورزش و فعالیت بدنی می تواند سرعت کاهش طول تلومر را در بافت قلب و کبد در گذر عمر تقلیل دهند؛ اما در عضلات اسکلتی ورزش موجب کوتاهی هر چه بیشتر طول تلومر می‌شود [۱۷].

با توجه به نتایج تحقیق در گروه تمرین استقامتی و گروه نانوکورکومین + تمرین استقامتی میزان متغیر p53 به طور معناداری بالاتر از گروه کنترل بود. هم‌چنین، تفاوت معناداری بین گروه تمرین استقامتی و گروه نانوکورکومین مشاهده شد که میزان p53 در گروه تمرین استقامتی به طور معناداری بالاتر از گروه نانوکورکومین بود. در همه گروه‌ها میزان متغیر p21 به‌طور معناداری بالاتر از گروه کنترل بود. عملکرد سرکوب کننده تومور p53 عمدتاً بر توانایی آن در جلوگیری از تکثیر سلولی در پاسخ به محرک‌های استرس که در طی پیشرفت تومورها مواجه می شوند، بستگی دارد. فعال‌سازی p53 منجر به توقف چرخه سلولی و آپوپتوز می‌شود و می‌تواند نقش مهمی در ایجاد تمایز و پیری سلولی داشته باشد [۱۸]. در یک مقاله مروری که به بررسی p53، متابولیسم هوازی و سرطان پرداخته شد، بیان شد که مکانیسم‌هایی که توسط p53 تنظیم می‌شود تنفس میتوکندریایی را تنظیم و نیز به حفظ ثبات ژنومی کمک می کند. پروتئین p53 پس از آسیب ژن‌های دیگر به DNA

متصل شده و باعث تحریک ژن WAF1 (Wildtype activating factor 1) می‌گردد. این ژن موجب ساخته شدن پروتئین p21 شده و به پروتئین CDK2 می‌چسبد و اجازه ورود p21 به مرحله بعدی تقسیم سلولی را نمی‌دهد [۱۹].

نشان داده شده است که p53 مانع آنژیوژنز در تومورها، با فعال یا سرکوب کردن ژن‌هایی که سلول جدید را تشکیل می‌دهند، می‌گردد [۱۵]. p53 هم‌چنین می‌تواند نقش مستقیمی در بهبود آسیب DNA هم از طریق ترمیم مجدد نوکلئوتید و هم‌برداشت پایه ایفاء کند [۱۴]. یک سلول تحت توقف چرخه سلولی یا آپوپتوز به واکنش p53 به چندین عامل بستگی دارد. بعضی از این‌ها ممکن است مستقل از p53 باشند. از قبیل وجود عوامل بیرونی خارج‌سلولی، وجود سایر تغییرات ابتلاء به اکوژنیک و در دسترس بودن شاخص‌های رونویسی اضافی با کوفکتورها باشد. با این‌حال، فعالیت p53 هم‌چنین می‌تواند به انتخاب پاسخ کمک کند. نوع و شدت استرس سلولی ممکن است با فعالیت روی سطح با فعالیت پروتئین p53 که باعث القاء آن است، کنترل عملکرد p53 را کنترل کنند. این امر نشان می‌دهد که پروتئین‌هایی که بیان ژن‌های آپوپتوتیک را تنظیم می‌کنند پیوند p53 را با وابستگی پایین‌تر نسبت به هدف‌های توقف سیکل سلولی مرتبط می‌کنند [۲۰].

در راستای تحقیق حاضر در پژوهشی که به بررسی تأثیر شش هفته تمرینات تناوبی شدید بر تغییرات سری p53 پرداختند، منتج به آن شد که تمرینات تناوبی شدید می‌تواند سطوح پروتئین p53 را در سرم خونی افزایش دهد. کورکومین بر عملکرد بسیاری از فاکتورهای رونویسی فاکتورهای رشد و گیرنده‌های آن‌ها، سیتوکین‌ها، آنزیم‌ها و ژن‌های تنظیم کننده تکثیر سلولی و آپوپتوز تأثیر می‌گذارد. کورکومین باعث مهار تکثیر و بقاء اکثر سلول‌های توموری می‌شود. در این راستا کورکومین از طریق فعال‌سازی مسیرهای مرگ سلولی و مهارکردن مسیرهای رشد و تکثیر سلولی باعث القاء مرگ در سلول‌های سرطانی می‌شود. کورکومین در مسیر آپوپتوز با فعال کردن کاسپاز ۸ منجر به شکستن Bid شده که در نتیجه این امر سیتوکروم C میتوکندریایی آزاد شده و کاسپاز ۹ و ۳ فعال می‌شود که این مسأله منجر به فعال شدن PARP (Poly ADP-Ribose Polymerase) و ایجاد آپوپتوز در سلول‌های توموری می‌شود که در این راستا با توجه به مطالعات انجام شده، کورکومین باعث القاء این مرگ به طور انتخابی تنها در سلول‌های سرطانی شده و تغییری در عملکرد سلول‌های نرمال ایجاد نمی‌کند [۲۰].

لازم به‌ذکر می باشد که میزان دقیق غذای روزانه هر موش صحرایی و هم‌چنین میزان تحرک آن‌ها در شرایط غیرتمرینی در داخل قفس‌ها از جمله محدودیت‌های پژوهش حاضر بود که ممکن است تأثیرات هر چند ناچیزی بر نتایج پژوهش اعمال کرده باشد. جهت بیان دقیق‌تر نتایج چنین پژوهش‌هایی پیشنهاد می شود، در پژوهش‌های آتی از تعداد جلسات تمرینی بیشتر با تغییر در پروتکل تمرینی از نظر نوع و شدت تمرین همراه با تغییر در دوز مصرفی مکمل نانوکورکومین استفاده گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمرین استقامتی به همراه مصرف مکمل نانوکورکومین، بیان ژن TERF2 را افزایش داده و می‌تواند سرعت کوتاه شدن تلومر و پیری را کاهش دهد. هم‌چنین، نتایج تحقیق نشان داد افزایش پروتئین سرکوب‌گر p53 و p21 در هنگام تمرین استقامتی و مصرف مکمل نانوکورکومین احتمالاً منجر به توقف چرخه سلولی و آپوپتوز شود و می‌تواند نقش مهمی در ایجاد تمایز و پیری سلولی داشته باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئول مرکز حیوانات علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله به جهت در اختیار گذاشتن حیوانات و ایجاد محیط لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

[1] 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.

[2] Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35: 495-516.

[3] Hasima N, Aggarwal BB. Cancer-linked targets modulated by curcumin. *Int J Biochem Mol Biol* 2012: 3; 328-51.

[4] Pasz-Walczak G, Kordek R, Faflik M. P21 (WAF1) expression in colorectal cancer: correlation with p53 and cyclin D1 expression, clinicopathological parameters and prognosis. *Pathol Res Pract* 2001; 197: 683-9.

[5] Barnard RJ, Leung PS, Aronson WJ, Cohen P, Golding LA. A mechanism to explain how regular exercise might reduce the risk for clinical prostate cancer. *Eur J Cancer Prev* 2007; 16: 415-21.

[6] Reuter S. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(11): 1340-51.

[7] Mousavi SM, Milajerdi AR, Kord Varkaneh H, Gorjipour MM, Esmaillzadeh A. The effects of curcumin supplementation on body weight, body mass index and waist circumference: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *Critial Reviews in Food Science and Nutritin* 2020; 60(1): 171-80. [Farsi]

[8] Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipat J, Srimal RC. Multile biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences* 2006; 78(18): 2081-7.

[9] Pejenaute Á, Cortés A, Marqués J, Montero L, Beloqui Ó, Fortuño A, et al. NADPH oxidase overactivity underlies telomere shortening in human atherosclerosis. *IJMS* 2020; 21(4): 1434.

[10] Heidenreich B, Kumar R. TERT promoter mutatins in telomere biology. *Mutatin Research* 2017; 771: 15-31.

[11] Slattry ML, Herrick JS, Pellat AJ, Wolf RK, Mullany LE. Telomere length, TERT, and miRNA expression. *PLoS One* 2016; 11(9): e0162077.

[12] Monaghan P, Eisenberg DT, Harrington L, Nussey D. Understanding diversity in telomere dynamics. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. *Series B, Biological Sciences* 2018; 373(1741): 20160435.

[13] Andrea Borghini, Guido Giardini, Alessandro Tonacci, Francesca Mastorci, Antonella Mercuri, Simona Mrakic Sposta, et al. Chronic and acute effects of endurance training on telomere length. *Mutagenesis* 2015; 30: 711–6. (PMID: 26001753)

[14] Vijayakurup V, Carmela S, Carmelo D, Corrado T, Srinivas P, Gopala S. Phenethyl caffeate benzo[kl]xanthene lignan with DNA interacting properties induces DNA damage and apoptosis in colon cancer cells. *Life sciences* 2012: 91; 56-64.

[15] Al-Jarrah M, Ahmad MB, Maayah M, Al-Khatib A. Effect of Exercise Training on the Expression of p53 and iNOS in the Cardiac Muscle of Type I Diabetic Rats. *Journal of Endocrinology and Metabolism* 2012; 2(4-5): 176-80.

[16] Yuehong W, Zhao J, Yang W, Bi Y, Chi J, Tian J, et al. High-dose alcohol induces reactive oxygen species-mediated apoptosis via PKC-β/p66Shc in mouse primary cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research* 2015; 456(2): 656-61.

[17] Liu J, Zhang C, Feng Z. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2014; 46(3): 170-9.

[18] Sohrabi M-R, Karimi HR, Malih N, Keramatinia AA. Mental Health Status of Medical Students in Tehran: A Cross Sectional Study. *Social Determinants of Health* 2015; 1(2): 81-8. [Farsi]

[19] Zlotogorski A, Dayan A, Dayan D, Chaushu G, Salo T, Vered M. Nutraceuticals as new treatment approaches

for oral cancer-I: Curcumin. *Oral Oncol* 2013; 49(3): 187-91.

[20] Escandarei A, Fashi M, Dakhili AB. Effect of high interval and continuous endurance training on TRF2 and TERT gene expression in heart tissue of aging male rats. *J Gorgan Univ Med Sci* 2016; 21: 89-95. [Farsi]

[21] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 2009; 55(4): 611-22.

[22] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 2002; 3(7): 34-57.

[23] Baghaiee B, Karimi P, Siahkouhian M, Pescatello LS. Moderate aerobic exercise training decreases middle-aged induced pathologic cardiac hypertrophy by improving Klotho expression, MAPK signaling pathway and oxidatie stress status in Wistar rats. *Iran J Basic Med Sci* 2018; 21(9): 911-9.

[24] Feizolahi F, Azarbayjani MA. Comparison the Effect of Short-term Swimming Training and Curcumin Supplementation on Damaged Spatial Memory after Binge Ethanol Drinking in Male Rats: Preliminary Report. *Journal of Medicinal* Plants 2016; 16(10): 174-84. [Farsi]

The Effect of Endurance Training with Nano-Curcumin Supplementation on p53-p21 Axis and TERF2 Gene Expression in Muscle Tissue of Male Wistar Rats: An Experimental Study

Jalal Pourjafarian[1], Yaser Kazemzadeh[2], Sajjad Arshadi[3], Yahya Mohammadnejadpanah Kandi[4], Abdolali Banaifar[5]

Received: 28/05/22 Sent for Revision: 18/06/22 Received Revised Manuscript: 18/01/23 Accepted: 23/01/23

Background and Objectives: Apoptosis is a regular program of cell death. This active form of cell death is characterized by morphological changes such as cell wrinkling, chromatin condensation, and DNA fragmentation. The purpose of this study was to determine the effect of endurance training along with nano-curcumin supplementation on p53 (Protein53)-p21 (Protein53) axis and TERF2 (Telomeric repeat-binding factor 2) gene expression in the muscle tissue of male Wistar rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 24 male rats with a mean weight of 200±20 gr were randomly divided into 4 groups including healthy control, endurance training, nano-curcumin, and endurance training+nano-curcumin. Endurance training protocol was performed for 4 weeks. At the same time, rats in the nano-curcumin group received a supplement of 80 mg/kg of body weight. Indices were measured by Real-Time PCR. Data were analyzed using two-way analysis of variance.

Results: According to the results, a significant difference was observed between the mean of TERF2, p53, and p21 across the four groups ($p<0.05$). In the endurance training group and the nano-curcumin+endurance training group, the mean of TERF2 and p53 variables were significantly higher than the control group ($p<0.05$). Also, a significant difference was observed between the endurance training group and the nano-curcumin group ($p<0.05$). The mean of p53 in the endurance training group was significantly higher than the nano-curcumin group ($p<0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that endurance training combined with nano-curcumin supplementation increases TERF2 gene expression and can reduce telomere shortening rate and aging. The results also showed that increasing the suppressor protein p53 and p21 during endurance training and nano-curcumin supplementation may lead to cell cycle arrest and apoptosis.

Key words: Endurance training, TERF2, p53-p21 axis, Nano-curcumin, Rat

Funding: This study did not have any funds.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Islamic Azad University of Parand approved the study (IR.IAU.PIAU.REC.1400.014).

How to cite this article: Pourjafarian Jalal, Kazemzadeh Yaser, Arshadi Sajjad, Mohammadnejadpanah Kandi Yahya, Banaifar Abdolali. The Effect of Endurance Training with Nano-Curcumin Supplementation on p53-p21 Axis and TERF2 Gene Expression in Muscle Tissue of Male Wistar Rats: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2023; 21 (11): 1103-14. [Farsi]

1- PhD Student, Dept.of Sports Physiology, Faculty of Physical Education, Islamic Azad University, Islamshahr Branch, Islamshahr, Iran
2- Assistant Prof., Graduated from Kharazmi University, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0001-5635-9352
(Corresponding Author) Tel: (021) 56123601, Fax: (021) 56143971, E-mail: yaser.kazemzadeh@yahoo.com
3- Assistant Prof., Dept. of Sports Physiology, Faculty of Physical Education, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran
4- Assistant Prof., Dept. of Sports Physiology, Faculty of Physical Education, Islamic Azad University, Islamshahr Branch, Islamshahr, Iran
5- Associate Prof., Dept.of Sports Physiology, Faculty of Physical Education, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran