



## تأثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر بیان ژن LAMP2A، پارکین و غلظت SOD در کبد رت‌های نر تغذیه شده با روغن چند بار حرارت دیده

مهرداد خیراندیش پیش کناری: دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، مازندران، ایران  
پروین فرزنانگی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، مازندران، ایران (\* نویسنده مسئول) parvin.farzanegi@iausari.ac.ir  
لیدا مرادی: استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

تمرین هوازی،  
میتوفاژی،  
استرس اکسیداتیو،  
LAMP2A

**زمینه و هدف:** میتوکندری‌ها جایگاه تولید انرژی و از منابع مهم تولید گونه‌های واکنش اکسیژن هستند. اختلال در عملکرد میتوکندری مرتبط با بیماری‌هایی مانند چاقی، دیابت و سرطان می‌باشد. فعالیت ورزشی در بهبود آسیب میتوکندریایی و استرس اکسیداتیو نقش دارد. لذا، هدف از انجام پژوهش حاضر، تعیین تأثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر بیان ژن LAMP2A، پارکین و غلظت SOD در کبد رت‌های نر تغذیه شده با روغن چند بار حرارت دیده بود.

**روش کار:** در یک مطالعه تجربی، ۲۵ سر رت نر ویستار با میانگین وزن ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم و سن ۸ هفته به‌طور تصادفی به ۵ گروه کنترل سالم، گروه DFO، گروه تمرین هوازی + DFO، گروه اکتاپامین + DFO و گروه تمرین هوازی + اکتاپامین + DFO تقسیم شدند. پروتکل تمرین هوازی شامل ۴ هفته تمرین هوازی، ۵ جلسه در هفته به مدت ۲۰ دقیقه دویدن بر روی تردمیل بود. تزریق درون صفاقی اکتاپامین و گاوژ روغن حرارت دیده، به ترتیب پنج بار در هفته و هر روز انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد، مصرف روغن چند بار حرارت دیده موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن پارکین ( $p < 0.05$ ) و کاهش معنی‌دار بیان ژن LAMP2A و غلظت SOD ( $p < 0.05$ ) در مقایسه با گروه سالم شد. تمرین هوازی باعث افزایش معنی‌دار غلظت SOD ( $p < 0.05$ ) و اختلاف غیر معنی‌دار پارکین و بیان ژن LAMP2A ( $p > 0.05$ ) در مقایسه با گروه DFO شدند. اثر تعامل تمرین هوازی و اکتاپامین باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن SOD ( $p < 0.05$ ) و اختلاف غیر معنی‌دار بیان ژن پارکین و LAMP2A ( $p > 0.05$ ) در مقایسه با گروه DFO شد.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تعامل تمرین هوازی و اکتاپامین می‌تواند باعث بهبود آنتی‌اکسیدان‌ها و میتوفاژی در کبد شود و اختلال ناشی از مصرف روغن چند بار حرارت دیده در میتوکندری را از طریق افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهبود بخشد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت کننده:** حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Kheirandish Pishkenari M, Farzanegi P, Moradi L. Effect of aerobic training and octopamine on the gene expression of LAMP2A, Parkin and concentration OF SOD in liver of male rats fed with repeated heated oil. Razi J Med Sci. 2021;28(2):1-10.

\*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

## Effect of aerobic training and octopamine on the gene expression of LAMP2A, Parkin and concentration OF SOD in liver of male rats fed with repeated heated oil

**Mehrzad Kheirandish Pishkenari:** PhD Candidate, Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University, Sari Branch, Mazandaran, Iran

**Parvin Farzanegi:** Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University, Sari Branch, Mazandaran, Iran (\*Corresponding author) [parvin.farzanegi@iausari.ac.ir](mailto:parvin.farzanegi@iausari.ac.ir)

**Lida Moradi:** Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

### Abstract

**Background and Aims:** Mitochondria are the most important sites for the production of energy and lipids, nucleic acids and amino acid precursors and are one of the most important sources for the production of reactive oxygen species (ROS). Previous studies have shown that mitochondrial dysfunction increases ROS and oxidative stress, which are associated with diseases such as obesity, diabetes and cancer. Today, cooking oil consumption has increased worldwide. During heating, oils are continuously oxidized, releasing lipid hydroperoxides and finally free radicals. Free radicals and oxidative stress in heated oils affect the body's energy production sources such as mitochondria. Therefore, to maintain energy production, mitochondria need to activate factors that can remove damaged parts of the mitochondria to achieve a healthier mitochondrial network by reducing ROS production and mitochondrial biogenesis. This process of selective removal of the affected part of the mitochondria is a form of autophagy called mitophagy. Lysosome-associated membrane protein 2A (LAMP2A) is a lysosome membrane receptor to which damaged proteins attach, enter the lysosome, and break down. LAMP2A acts as an autophagy and its downregulation induces autophagy. Parkin protein is an E3 ubiquitin ligase and acts as a mitophagy in removing damaged mitochondria in various tissues of the body. Exercise has recently been recognized as an effective way to increase mitochondrial function, and the role of exercise in improving mitochondrial damage and oxidative stress in various diseases has been reported. On the other hand, today, researchers are paying attention to sports supplements to reduce the physiological damage caused by exercise such as oxidative stress. One of these supplements is octopamine, which according to studies has antioxidant properties and stimulates fat metabolism. The aim of this study was to determine the effect of aerobic training and octopamine on LAMP2A and parkin gene expression and SOD concentration in the liver tissue of male Wistar rats fed with the repeated heated oil.

**Methods:** In an experimental study, 25 adult male Wistar rats weighing an average of 300 to 350 g and aged 8 weeks were purchased. All the rats were kept in polycarbonate cages (5 mice per cage) at 22±2°C, 55% humidity and under the light and dark cycle for 12:12 hours without restriction on water and food. All the rats were randomly divided into five groups, healthy control group (n=5), DFO group (n=5), aerobic training + DFO group (n=5), octopamine + DFO group (n=5) and aerobic training + octopamine + DFO group (n=5). Intraperitoneal injection of octopamine and Gavage of repeated heated oil were done five times a week and every day, respectively. The aerobic training protocol consisted of 4 weeks of aerobic training and 5 sessions per week. The training session included 5 minutes of warm-up at 7 m / min and 5 minutes of cooling at 5 m / min. The intensity of training started in the first week with 50% vo<sub>2</sub>max and a speed of 16 m /

### Keywords

Aerobic training,  
Mitophagy,  
Stress oxidative,  
LAMP2A

Received: 02/01/2021

Published: 24/04/2021

min, and in the last week it reached 65% Vo<sub>2</sub>max and a speed of 26 m / min. 48 hours after the last training session and 8 hours of fasting, all the rats were anesthetized with chloroform and then sacrificed. Blood samples were taken directly from the liver by heparin-soaked syringe and the liver tissue was immediately removed from the body and stored in a nitrogen tank at -80 ° C. Gene expression of LAMP2A and Parkin were measured by Real time-PCR and SOD concentration was measured by ELISA test. One-way ANOVA and Tukey post hoc test were used to analysis the data. The significant level was set at p<0.05.

**Results:** The results showed that consumption of repeated heated oil induced significant increase in gene expression of Parkin (p<0.05) and significant decrease in gene expression of LAMP2A (p<0.05) and concentration of SOD (p<0.05) compared to healthy control group. The aerobic training caused increase in SOD concentration and non-significant difference in gene expression of Parkin (p>0.05) and LAMP2A (p>0.05) compared to DFO group. Interaction effect of aerobic training and octopamine caused the significant increase in gene expression of SOD concentration (p<0.05) and non-significant difference in Parkin and LAMP2A gene expression (p>0.05) in comparison with DFO group.

**Conclusion:** Regarding the incremental effect of aerobic training on SOD concentration, it is likely that due to aerobic training, Nrf2 activity increases, and isolation of the Nrf2-Kaep1 complex, and binding of Nrf2 to the antioxidant responsive element occurs. Subsequently, the transcription of the antioxidant genes, that is SOD, takes place and it is increased. The antioxidant properties of octopamine in interaction with the effect of aerobic training have also been able to significantly increase the concentration of SOD. Regarding the effect of aerobic training and octopamine consumption alone on the expression of the LAMP2A gene, it is likely that they exert their effect by reducing oxidative stress and increasing the inhibition of AKT1, which increases antioxidant activity in the liver tissue cells. The interactive effect of aerobic training and octopamine also showed an insignificant increase in LAMP2A gene expression compared to the DFO group, but this increase is physiologically beneficial. In contrast, Parkin gene expression showed an insignificant decrease due to aerobic training and octopamine consumption alone and simultaneously, indicating an increase in the activity of antioxidants, including SOD, which decreases oxidative stress and consequently reduces mitophagy (decreased expression of Parkin gene) in the liver tissue, by varying the intensity, duration of training, and dose of octopamine, better results may be obtained. In general, it seems that the interaction of aerobic training and octopamine can improve antioxidants and mitophagy in the liver.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Kheirandish Pishkenari M, Farzanegi P, Moradi L. Effect of aerobic training and octopamine on the gene expression of LAMP2A, Parkin and concentration OF SOD in liver of male rats fed with repeated heated oil. Razi J Med Sci. 2021;28(2):1-10.

**\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.**

## مقدمه

میتوکندری‌ها، مهم‌ترین مکان برای تولید انرژی و لیپیدها، اسید نوکلئیک و پیش‌سازهای اسید آمینه هستند و یکی از منابع مهم تولید گونه‌های واکنش اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) می‌باشند (۱). میتوکندری نقش مهمی در تنفس سلولی، استرس اکسیداتیو و هومئوستازی کلسیم بازی می‌کند. مطالعات پیشین بیان کرده‌اند که اختلال میتوکندریایی موجب افزایش ROS و استرس اکسیداتیو می‌گردد که مرتبط با بیماری‌هایی مانند چاقی، دیابت و سرطان می‌باشد (۲).

امروزه، مصرف روغن در پخت‌وپز در سراسر جهان افزایش یافته است. در طی حرارت دیدن، روغن به‌طور مداوم اکسید شده، هیدروپراکسیدهای لیپیدی و در نهایت رادیکال‌های آزاد تولید می‌شوند (۳). رادیکال‌های آزاد ناشی از روغن‌های حرارت دیده موجب کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها و کاهش توانایی بدن در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو می‌گردد که در نتیجه‌ی آن خطر مقاومت انسولینی و بروز دیابت نوع دو افزایش می‌یابد (۴). همچنین، رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو موجود در روغن‌های حرارت دیده، منابع تولید انرژی در بدن مانند میتوکندری را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بنابراین، میتوکندری برای حفظ تولید انرژی نیاز به فعال شدن عواملی دارد که بتواند بخش‌های آسیب‌دیده میتوکندری یا میتوکندری دچار اختلال را حذف نماید تا شبکه سالم‌تر میتوکندری با کاهش تولید ROS و بی‌وزن میتوکندری حاصل شود (۵). این فرایند حذف انتخابی بخش آسیب‌دیده میتوکندری شکلی از اتوفاژی است که به آن میتوفاژی گویند (۷). اتوفاژی در طی استرس مانند تولید ROS، جهت محافظت از اندامک‌ها فعال می‌شود، دارای نقش حفاظتی در مقابل استرس اکسیداتیو می‌باشد و می‌تواند به نوعی مرگ سلولی برنامه ریزی شده منجر شود که متفاوت از آپوپتوز است (۸). از این رو نیاز به بررسی عوامل و متغیرهایی است که در اتوفاژی و میتوفاژی میتوکندری نقش دارند.

LAMP2A (Lysosome-associated membrane protein 2A) یکی از گیرنده‌های غشاء لیزوزوم می‌باشد که پروتئین‌های آسیب‌دیده به آن متصل شده، به داخل

لیزوزوم وارد شده و تجزیه می‌شوند. LAMP2A به عنوان یک اتوفاژ عمل می‌کند و تنظیم پایینی آن القاکننده‌ی اتوفاژ می‌باشد (۹، ۱۰). پروتئین پارکین (Parkin) یک لیگاز یوبیکویتین E3 (E3 ubiquitin Ligase) است و به عنوان یک میتوفاژ در حذف میتوکندری آسیب‌دیده در بافت‌های مختلف بدن عمل می‌نماید (۱۱).

با توجه به مطالعات پیشین، فعالیت ورزشی اخیراً به عنوان روشی مؤثر در افزایش عملکرد میتوکندریایی شناخته شده است و نقش فعالیت ورزشی در بهبود آسیب میتوکندریایی و استرس اکسیداتیو در بیماری‌های مختلف گزارش شده است (۱۲). بر طبق نتایج بعضی از مطالعات، کلیه تمرینات ورزشی (استقامتی و شدید) با استرس اکسایشی و تولید ROS همراه هستند (۱۳، ۱۴). در مقابل، مطالعه دیگری نشان داده، تمرین استقامتی می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی افراد تمرین نکرده را افزایش دهد (۱۵). آنتی‌اکسیدان‌ها عواملی هستند که موجب کاهش فشارهای اکسایشی می‌شوند (۱۶، ۱۷). ۱۰ هفته دویدن فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase, SOD) و کاتالاز در کبد را تنظیم بالایی نمود و افزایش داد (۱۸). از سوی دیگر، امروزه توجه پژوهشگران به مکمل‌های ورزشی برای کاهش آسیب‌های فیزیولوژیکی ناشی از تمرین ورزشی مانند ROS و استرس اکسیداتیو جلب شده است. یکی از این مکمل‌ها اکتاپامین است که بر اساس مطالعات دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی (۱۹) و محرک زایی متابولیسم چربی می‌باشد (۱۹). اکتاپامین به‌طور طبیعی آمینی است که ساختاری مشابه انتقال‌دهنده‌ی عصبی نورآدرنالین دارد (۱۹) و نقش آن در کبد شامل افزایش کاتابولیسم گلیکوژن، جذب اکسیژن و مهار گلوکونئوز می‌باشد (۲۰). با توجه به افزایش مصرف روغن‌های چند بار حرارت دیده در غذاها و اثر اکسیداتیوی آنها، تأثیر دوگانه تمرینات ورزشی مختلف بر تولید استرس اکسیداتیو، ROS و آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های مختلف بدن، محدودیت مطالعه موجود در رابطه با اثر تمرین هوازی بر بیان ژن‌های مؤثر در مسیر اتوفاژی و میتوفاژی، در مطالعه‌ی حاضر به دنبال پاسخ این سؤال هستیم که آیا تعامل تمرین هوازی و اکتاپامین اثری بر بیان ژن LAMP2A

گروه تمرین هوازی، قبل از شروع برنامه اصلی تمرینی، یک هفته به اجرای دویدن با سرعت 9m/min به مدت 20 دقیقه پرداختند. جلسه‌ی تمرین علاوه بر تمرین هوازی شامل 5 دقیقه گرم کردن با سرعت 7m/min و 5 دقیقه سرد کردن با سرعت 5m/min بود. تمرین هوازی شامل 4 هفته و 5 جلسه در هفته، دویدن بر روی تردمیل به مدت 20 دقیقه بود. شدت تمرین در هفته‌ی اول با  $VO_{2max}$  50٪ و سرعت 16 متر بر دقیقه آغاز و در هفته‌ی آخر به  $VO_{2max}$  65٪ و سرعت به 26 متر بر دقیقه رسید.

**نمونه‌گیری از بافت:** 48 ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و 8 ساعت ناشتایی، تمامی رت‌ها با ماده‌ی کلروفورم بیهوش و سپس قربانی شدند. بلافاصله بافت کبد از بدن خارج شد، نمونه‌گیری خونی توسط سرنگ آغشته به هیپارین به‌طور مستقیم از کبد گرفته شد و برای استخراج پلازما به مدت 15 دقیقه با سرعت 3000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس بافت کبد توسط بافر فسفات سالیین (pbs) شستشو داده شد، به داخل تانک ازت انتقال پیدا کرد و در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**سنجش غلظت SOD:** میزان غلظت MDA با استفاده از روش الیزا ساخت شرکت CUSABIO و میزان حساسیت 31/25 pg/ml اندازه‌گیری شد

**سنجش بیان ژن LAMP2A و پارکین توسط Real Time PCR:** بیان ژن LAMP2A و پارکین بافت کبد توسط روش Real time PCR انجام شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل طبق پروتکل شرکت سازنده (کیژن، آلمان) از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. جهت سنتز cDNA، 5 میکروگرم از هرکدام از نمونه‌های mRNA، پرایمرهای Oligo-dT (USA, Fermentas) و آنزیم نسخه‌برداری معکوس دستورالعمل کیت سنتز cDNA (USA, Fermentas) استفاده شد. از ژن RGap به

و پارکین و غلظت SOD در بافت کبد رت‌های نر ویستار تغذیه شده با روغن چند بار حرارت دیده دارد؟

## روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود. 25 سر رت نر نژاد ویستار بالغ با میانگین وزن 300 تا 350 گرم و سن 8 هفته خریداری شدند. همه‌ی رت‌ها در قفس‌های پلی کربنات (5 موش در هر قفس) در دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت 55 درصد و تحت چرخه روشنایی و تاریکی 12:12 ساعت بدون محدودیت در آب و غذا نگهداری شدند. سپس رت‌ها به‌طور تصادفی به 5 گروه کنترل سالم (n=5)، گروه کنترل مسموم (DFO, n=5)، گروه تمرین + DFO (n=5)، گروه اکتاپامین + DFO (n=5) تقسیم شدند. مراحل مختلف تمرین، بر اساس رعایت مسائل اخلاقی رفتار با حیوانات انجام شد. مطالعه حاضر با رعایت مسائل اخلاقی رفتار با حیوانات و مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری با کد IR.IAU.SARI.REC.1399.029 انجام شد.

## روغن‌های چند بار حرارت دیده (Deep Frying Oil, DFO)

به منظور تهیه‌ی روغن چند بار حرارت دیده، 8 لیتر روغن آفتاب‌گردان به مدت 4 روز متوالی روزی 8 ساعت با حرارت 190 تا 200 درجه سانتی‌گراد داغ شد و هر 30 دقیقه مواد غذایی: ناگت مرغ، سیب زمینی، مرغ و فرآورده‌های پروتئینی (سوسیس و کالباس) داخل روغن غوطه‌ور شد. روغن روز چهارم به عنوان مداخله‌ی مسمومیتی به صورت خوراکی (گاوژ) به مدت 4 هفته هر روز، به رت‌های همه‌ی گروه‌ها به غیر از گروه سالم خوراند شد (21).

**مکمل اکتاپامین:** 81  $\mu\text{mol/kg}$  اکتاپامین (شرکت سیگما آلدریج) حل شده با نرمال سالین 9٪ به صورت تزریق درون صفاقی به مدت 4 هفته و 5 بار در هفته انجام شد (22).

**پروتکل تمرین هوازی:** به منظور سازگاری رت‌های

جدول 1- مشخصات پرایمرها

Gene	F. primer	R. Primer
rGap	5' AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G 3'	5' CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C 3'
LAMP2A	5'GTGTTGTAAGAAAGCGTGATGTTG3'	5'TTGTGGCGATGATAAGAATGGTG3'
پارکین	5'CACCTAAACCCACCTACCAC3'	5'ATTGTCACCTCTCCACTCATCC3'

**یافته‌ها**

میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد داده‌های LAMP2A، پارکین و SOD در گروه‌های کنترل سالم، گروه DFO، DFO + تمرین، DFO + اکتاپامین و DFO + اکتاپامین + تمرین در جدول ۲ ارائه شده است.

در بررسی داده‌های پارکین با استفاده از آزمون آنوای یک سویه اختلاف معناداری بین پنج گروه مشاهده شد ( $F_{4,14} = 3/76, p < 0/041$ ). با مراجعه به آزمون تعقیبی توکی مشخص شد تنها گروه کنترل سالم با گروه DFO ( $p = 0/046$ ) اختلاف معناداری دارد؛ اما دیگر گروه‌های تحقیق دو به دو اختلاف معناداری نشان ندادند ( $p > 0/05$ ) (شکل ۱).

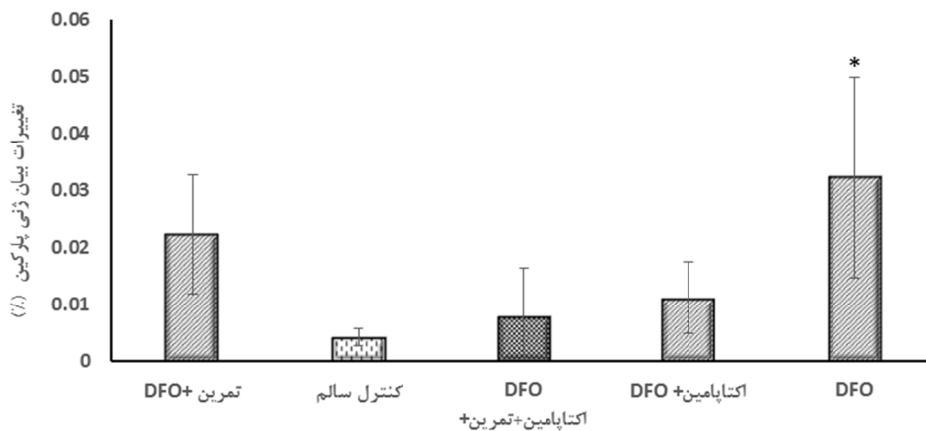
در بررسی داده‌های LAMP2A با استفاده از آزمون آنوای یک سویه اختلاف معناداری بین پنج گروه مشاهده شد ( $F_{4,14} = 11/41, P < 0/001$ ). با مراجعه به آزمون تعقیبی توکی مشخص شد که گروه کنترل سالم

عنوان ژن رفرنس استفاده شد و اعداد حاصل از نمودار تکثیر برای ژن هدف در هر نمونه نسبت به ژن رفرنس نرمالیز گردید. در این مطالعه نتایج با استفاده از فرمول فافل و به صورت  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد. مشخصات مربوط به پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است.

**روش آماری:** از آزمون شاپیرو ویلک برای بررسی توزیع نرمال داده‌ها استفاده گردید. جهت بررسی تفاوت میانگین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک سویه (One Way ANOVA) و جهت تعیین محل تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. سطح معنی داری برای تمام محاسبات  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ اجرا شد و نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel نسخه ۱۶ رسم شد.

**جدول ۲- میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد بیان ژن پارکین و LAMP2A و غلظت SOD در گروه‌های مختلف**

متغیر	گروه	پارکین	LAMP2A	SOD
		میانگین $\pm$ SD	میانگین $\pm$ SD	میانگین $\pm$ SD
تمرین + DFO	۰/۰۲۲۲	۰/۰۱۰۰	۰/۰۰۲۱	۲۳۳۳/۳۳۳
کنترل سالم	۰/۰۰۴۲	-۰/۰۰۲	۴/۴۱۴۶	۷۸/۹۱۲۴۸
اکتاپامین + تمرین + DFO	۰/۰۰۷۹	-۰/۰۰۹	۲/۴۷۲۶	۲۷۰۰
اکتاپامین + DFO	۰/۰۱۱۱	-۰/۰۰۶	۰/۰۰۴۵	۱۲۲۰/۲۳۸
DFO	۰/۰۳۳۳	-۰/۰۱۸	۰/۰۰۰۹	۲۳۳۳/۳۳۳



**شکل ۱- میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد تغییرات بیان ژن پارکین در پنج گروه. \* نشانگر تفاوت معنادار گروه DFO با گروه کنترل سالم می‌باشد.**



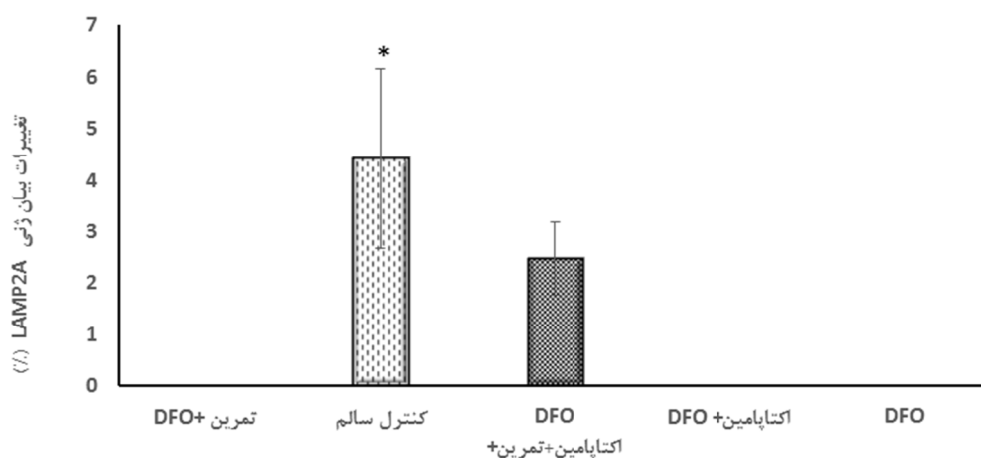
با گروه‌های DFO+تمرین (P=0/001) و اکتاپامین+تمرین (P=0/005) اختلاف معناداری دارد؛ اما دیگر گروه‌های تحقیق دو به دو اختلاف معناداری نشان ندادند (P>0/05) (شکل ۳).

### بحث

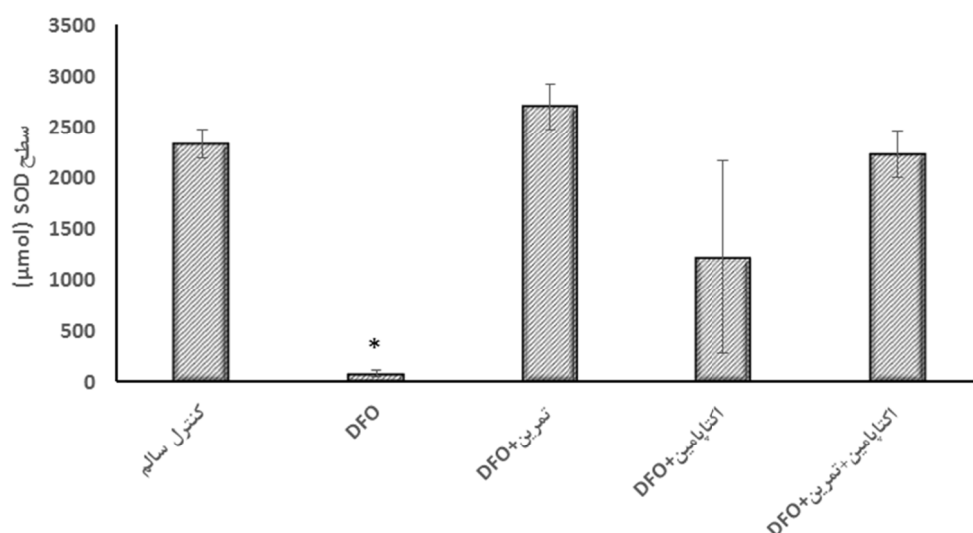
در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار به تعیین تأثیر هم‌زمان اجرای تمرین هوازی و مصرف اکتاپامین بر بیان ژن LAMP2A و پارکین و غلظت SOD در کبد

با گروه‌های DFO+تمرین (P=0/003)، اکتاپامین (P=0/003) و DFO (P=0/003) اختلاف معناداری دارد؛ اما دیگر گروه‌های تحقیق دو به دو اختلاف معناداری نشان ندادند (P>0/05) (شکل ۲).

در رابطه با بررسی داده‌های SOD با استفاده از آزمون آنوای یک سویه اختلاف معناداری بین پنج گروه مشاهده شد (F<sub>4,14</sub>=11/14, P=0/001). با مراجعه به آزمون تعقیبی توکی مشخص شد که گروه DFO با گروه‌های کنترل سالم (P=0/004)، گروه DFO تمرین



شکل ۲- میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد تغییرات بیان ژن LAMP2A در پنج گروه. \* نشانگر تفاوت معنادار گروه کنترل سالم با گروه‌های DFO+تمرین، DFO+اکتاپامین و DFO می‌باشد.



شکل ۳- میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد تغییرات بیان ژن SOD در پنج گروه. \* نشانگر تفاوت معنادار گروه DFO با گروه‌های کنترل سالم، گروه DFO+تمرین و گروه DFO+اکتاپامین+تمرین باشد.

جداسازی کمپلکس Nrf2-Kaep1 و اتصال Nrf2 به پاسخ عنصر آنتی‌اکسیدان (Antioxidant responsive element ARE) رخ داده باشد (۲۸) و متعاقب آن رونویسی ژن‌های آنتی‌اکسیدانی که در اینجا SOD می‌باشد، صورت گرفته و افزایش غلظت SOD در مقایسه با گروه DFO را نشان داده است. طبق مطالعه ای شدت کم تمرین مرتبط با فعالیت زیاد SOD است. در شروع هر فعالیتی که با شدت کم شروع می‌شود و مقدار رادیکال‌ها خیلی کم است، دفاع آنتی‌اکسیدانی اولیه، SOD است که باعث تبدیل سوپراکسید به  $H_2O_2$  می‌شود (۲۹). در مطالعه‌ی حاضر نیز، تمرین هوازی بیشترین افزایش را نسبت به دو گروه مداخله ای دیگر در مقایسه با گروه DFO نشان داده است. در رابطه با اکتاپامین نیز، درست است تغییرات معنی‌داری را گروهی که اکتاپامین مصرف کرده بودند در مقایسه با گروه DFO نشان نداده است اما از نظر فیزیولوژیکی همین اثر کاهشی غیر معنی‌دار آن نیز مفید می‌باشد و احتمالاً با تغییر در دوز مصرفی آن، نتایج بهتری حاصل شود اما ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن در تعامل با اثر تمرین هوازی توانسته است باعث افزایش معنی‌دار SOD شود. شاید اکتاپامین با ویژگی‌ای مشابه با اپی نفرین باعث فعال شدن لیپولیز و کاهش چربی در بافت کبد (کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از تجمع چربی) (۱۹) موجب افزایش غلظت SOD شده باشد. در رابطه با اثر تمرین ورزشی با اکتاپامین بر بیان ژن LAMP2A تاکنون هیچ مطالعه ای صورت نگرفته است؛ اما کاهش معنی‌دار بیان ژن در گروه DFO، DFO + تمرین و DFO + اکتاپامین، نشان دهنده‌ی افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از روغن چند بار حرارت دیده در سلول می‌باشد که باعث کاهش بیان این گیرنده‌ها و کم‌تر بودن آنها بر روی لیزوزوم شده است و همچنین کاهش بیان چاپرون‌هایی شده است که باعث بیان و وارد شدن LAMP2A به لیزوزوم می‌شوند. از سوی دیگر مصرف روغن چند بار حرارت دیده موجب افزایش بیان ژن پارکین شده است. افزایش پارکین نشان از سیستم دفاعی سلول برای از بین بردن نواحی آسیب‌دیده میتوکندریایی است (۳۰) و نشان دهنده‌ی افزایش استرس اکسیداتیو و اختلال و آسیب در میتوکندری می‌باشد که به جهت انجام میتوفاژی و ایجاد شبکه میتوکندریایی سالم است (۳۱).

رت‌های نر تغذیه شده با روغن چند بار حرارت دیده پرداخته شد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد مصرف روغن چند بار حرارت دیده موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن LAMP2A و غلظت SOD و افزایش معنی‌دار بیان ژن پارکین در مقایسه با گروه کنترل سالم شد. تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین نیز به تنهایی باعث کاهش غیر معنی‌دار بیان ژن LAMP2A در مقایسه با گروه کنترل سالم و کاهش غیر معنی‌دار بیان ژن پارکین در مقایسه با گروه DFO شدند. تمرین هوازی به تنهایی و هم‌زمان با مکمل اکتاپامین نیز موجب افزایش معنی‌دار غلظت SOD شدند. اکتاپامین نیز باعث کاهش غلظت SOD شد اما از نظر آماری معنی‌دار نبود. گروه DFO + اکتاپامین + تمرین هوازی نیز کاهش غیر معنی‌دار بیان ژن پارکین و افزایش غیر معنی‌دار بیان ژن LAMP2A را در مقایسه با گروه DFO نشان دادند.

در طی فرایند حرارت دادن روغن، گونه‌های واکنش اکسیژن مانند هیدروپراکسیدازها، تولید می‌شوند و موجب ایجاد سیتوتوکسیته ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شوند (۲۳) و در ادامه، اختلال DNA هسته‌ای و میتوکندریایی موجب کاهش سنتز میتوکندری جدید و شبکه میتوکندریایی می‌شود و از آن جایی که این کاهش موجب کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی خواهد شد، نتیجه‌ی آن ایجاد فشار اکسایشی در سلول است (۲۴). (۲۵). در مطالعه‌ی حاضر، کاهش معنی‌دار غلظت SOD در گروهی که روغن حرارت دیده (DFO) مصرف نموده بودند در مقایسه با گروه سالم، تایید کننده‌ی افزایش فشار اکسیداتیو و کاهش غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها در بافت کبد می‌باشد. SOD یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مهم می‌باشد که ROS را حذف می‌کند و فعالیت SOD سلول می‌تواند بازتاب توانایی بدن در حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن را نشان دهد (۲۶). با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر اجرای ۴ هفته تمرین هوازی قادر به افزایش معنی‌دار SOD در مقایسه با گروه DFO بودند. بر اساس مکانیسمی، احتمالاً ROS ناشی از تمرین ورزشی می‌تواند بر بیان ژن فاکتور رونویسی هسته‌ای اریتروئید ۲ مرتبط با فاکتور ۲ (Nuclear factor erythroid 2 [NF-E2]-related factor 2) (Nrf2) و آنتی‌اکسیدان‌ها مؤثر باشد (۲۷)، به واسطه‌ی تمرین هوازی فعالیت Nrf2 افزایش یافته،



زحمات اساتید بزرگوار و دوستان عزیز که در اجرای پژوهش همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## References

1. Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem.* 2010;35(9):505-13.
2. Yoo SZ, No MH, Heo JW, Park DH, Kang JH, Kim JH, et al. Effects of acute exercise on mitochondrial function, dynamics, and mitophagy in rat cardiac and skeletal muscles. *Int. Neurourol J.* 2019;23(Suppl 1):S22.
3. El-Bohi K, Moustafa G, El sharkawi NI, Sabik LME. 2011. Genotoxic effects of acrylamide in adult male albino rats liver. *Am J Sci.* 7(1):1097-108.
4. Ng CY, Leong XF, Masbah N, Adam SK, Kamisah Y, Jaarin K. Heated vegetable oils and cardiovascular disease risk factors. *Vasc Pharmacol.* 2014;61(1):1-9.
5. Youle RJ, Van Der Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 2012;337(6098):1062-5.
6. Devoto VMP, Falzone TL. Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: a role for  $\alpha$ -synuclein? *Dis Model Mech.* 2017;10(9):1075-87.
7. Oliver D, Reddy PH. Dynamics of Dynamin-Related Protein 1 in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *Cells.* 2019;8(9):961.
8. Moreno ML, Villar VM, Mérida S, Bosch Morell F, Miranda M. Autophagy dysfunction and oxidative stress, two related mechanisms implicated in retinitis pigmentosa. *Front Physiol.* 2018;9:1008.
9. Majeski AE, Dice JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(12):2435-44.
10. Saha T. LAMP2A overexpression in breast tumors promotes cancer cell survival via chaperone-mediated autophagy. *Autophagy.* 2012;8(11):1643-56.
11. Koyano F, Yamano K, Kosako H, Tanaka K, Matsuda N. Parkin recruitment to impaired mitochondria for nonselective ubiquitylation is facilitated by MITOL. *J Biol Chem.* 2019; jbc. RA118. 006302.
12. Koo JH, Kang EB. Effects of treadmill exercise on the regulatory mechanisms of mitochondrial dynamics and oxidative stress in the brains of high-fat diet fed rats. *J Nutr Biochem.* 2019;23(1):28.
13. Park SY, Kwak YS. Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. *J Exerc Rehabil.* 2016;12(2):113.
14. Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko

در رابطه با اثر تمرین هوازی و اکتاپامین به تنهایی بر بیان ژن LAMP2A، احتمالاً اثر خود را با کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش مهار AKT1 که باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۱۰، ۳۲) در سلول‌های بافت کبد می‌شد، اعمال کرده باشند. اثر تعاملی تمرین هوازی و اکتاپامین نیز افزایش غیر معنی‌دار بیان ژن LAMP2A را در مقایسه با گروه DFO نشان داده است اما این افزایش از نظر فیزیولوژیکی مفید می‌باشد. در مقابل، بیان ژن پارکین کاهش غیر معنی‌داری را بر اثر تمرین هوازی و مصرف اکتاپامین به تنهایی و هم‌زمان با هم نشان داده است که گویای افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله SOD است که موجب کاهش استرس اکسیداتیو و متعاقب آن کاهش میتوفاژی (کاهش بیان ژن پارکین) در بافت کبد شده است که با تغییر در شدت، مدت تمرین و دوز مصرف اکتاپامین، شاید نتایج بهتری بتوان از آن گرفت.

محدودیت مطالعه حاضر عدم اندازه‌گیری ROS و عدم تصویربرداری از بافت کبد بود که می‌توانستند در تحلیل نتایج بدست آمده از این مطالعه مؤثر باشند در نهایت با توجه به توسعه استفاده از غذا‌های سرخ کردنی و استفاده از روغن‌های چند بار حرارت دیده در غذا و بررسی کامل‌تر، بررسی اثر اجرای تمرین هوازی و اکتاپامین (با دوزهای مختلف) بر فعالیت ROS، بیان ژن Nrf2 و PINK1 در یافت کبد رت‌های تغذیه شده با روغن چند بار حرارت دیده پیشنهاد می‌گردد. با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، عدم مصرف غذا‌های سرخ کردنی و فست فود و همچنین اجرای تمرین هوازی زیر نظر متخصص تربیت بدنی پیشنهاد می‌گردد.

## نتیجه‌گیری

مصرف روغن چند بار حرارت دیده، به ترتیب موجب فعالیت اتوفاژی و میتوفاژی از طریق کاهش بیان ژن LAMP2A و پارکین می‌شود. تمرین هوازی و تعامل تمرین هوازی و اکتاپامین نیز باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند.

## تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر برگرفته از بخشی از رساله دکتری با گرایش فیزیولوژی ورزشی می‌باشد و بدین وسیله از

- T, Tahara S, Goto S, et al. The effects of moderate-, strenuous-and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem Int.* 2005;46(8):635-40.
15. Quadros L, Brandao I, Longhi R. Ascorbic Acid and Performance: A Review. *Vitam Miner.* 2016;5(136):2376-1318.1000136.
16. Gomez-Cabrera M-C, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(2):126-31.
17. McKay BR, Paterson DH, Kowalchuk JM. Effect of short-term high-intensity interval training vs. continuous training on O<sub>2</sub> uptake kinetics, muscle deoxygenation, and exercise performance. *J Appl Physiol.* 2009;107(1):128-38.
18. Botezelli JD, Cambri LT, Ghezzi AC, Dalia RA, Scariot PP, Ribeiro C, et al. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. *Diabetol Metab Syndr.* 2011;3(1):35.
19. Beaumont RE, Cordery P, James LJ, Watson P. Supplementation with a low-dose of octopamine does not influence endurance cycling performance in recreationally active men. *J Sci Med Sport.* 2017;20(10):952-6.
20. de Oliveira A, de Paula M, Comar J, Vilela V, Peralta R, Bracht A. Adrenergic metabolic and hemodynamic effects of octopamine in the liver. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):21858-72.
21. Wang Z, Liao T, Zhou Z, Wang Y, Diao Y, Strappe P, et al. Construction of local gene network for revealing different liver function of rats fed deep-fried oil with or without resistant starch. *Toxicol Lett.* 2016;258:168-74.
22. Bour S, Visentin V, Prévot D, Carpené C. Moderate weight-lowering effect of octopamine treatment in obese Zucker rats. *Physiol Biochem.* 2003;59(3):175-82.
23. Adam SK, Soelaiman IN, Umar NA, Mokhtar N, Mohamed N, Jaarin K. Effects of repeatedly heated palm oil on serum lipid profile, lipid peroxidation and homocysteine levels in a post-menopausal rat model. *MJM.* 2008;11(2):145.
24. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002;7(9):405-10.
25. Youn JY, Zhang J, Zhang Y, Chen H, Liu D, Ping P, et al. Oxidative stress in atrial fibrillation: an emerging role of NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;62:72-9.
26. Yu J, Wang Y, Li Z, Dong S, Wang D, Gong L, et al. Effect of heme oxygenase-1 on mitofusin-1 protein in LPS-induced ALI/ARDS in rats. *Sci Rep.* 2016;6:36530.
27. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt LA. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res.* 2005;19(2):276-85.
28. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(9):1304-9.
29. Covas MI, Elosua R, Fito M, Alcantara M, Coca L, Marrugat J. Relationship between physical activity and oxidative stress biomarkers in women. *Med Sci Sports Exerc.* 2002;34(5):814-9.
30. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 803.795:(5)183;2008.
31. Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(1):30-8.
32. Van Den Berg MC, Burgering BM. Integrating opposing signals toward Forkhead box O. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(4):607-21.