مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۸، شماره ۱۲، اسفند ۱۴۰۰ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

تاثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر بیان ژن Drp-1، Mfn-1 و غلظت MDA در کبد رت‌های نر تغذیه شده با روغن چند بار حرارت دیده

مهرزاد خیراندیش پیش کناری: دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، مازندران، ایران

پروین فرزانگی: 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

زمینه و هدف: میتوکندری به عنوان منبع تولید انرژی و استرس اکسیداتیو می تواند تحت تاثیر تمرین هوازی قرار بگیرد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی تاثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر بیان ژن Drp-1 و Mfn-1 و غلظت MDA در کبد رت‌های نر تغذیه شده با روغن چند بار حرارت دیده بود.

روش کار: در یک مطالعه تجربی، ۱۵ سر رت نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ۵ گروه کنترل سالم (n=۳)، گروه DFO (n=۳)، گروه تمرین هوازی + DFO (n=۳)، گروه اکتاپامین + DFO (n=۳) و گروه تمرین هوازی + اکتاپامین + DFO (n=۳) تقسیم شدند. تزریق درون صفاقی اکتاپامین و گاواژ روغن حرارت دیده، به ترتیب پنج بار در هفته و هر روز انجام شد. پروتکل تمرین هوازی شامل ۴ هفته تمرین هوازی، ۵ جلسه در هفته به مدت ۲۰ دقیقه دویدن بر روی تریدمیل بود. بیان ژن Drp-1 و Mfn-1 توسط Real time PCR و غلظت MDA توسط الایزا اندازه‌گیری شدند. از تحلیل واریانس یک سویه و آزمون تعقیبی توکی جهت تحلیل داده‌ها استفاده گردید. سطح معنی داری p<۰/۰۵ بود.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، مصرف روغن حرارت دیده موجب کاهش معنی دار DRP-1 (p=۰/۰۰۱) و Mfn-1 (p=۰/۰۰۱) و عدم تغییر معنی‌دار MDA (p=۰/۰۷۱) در مقایسه با گروه سالم شد. اثر تعامل تمرین هوازی و اکتاپامین باعث افزایش معنی دار بیان ژن DRP-1 (p=۰/۰۰۱) در مقایسه با همه‌ی گروه‌ها بجز گروه کنترل سالم و اختلاف غیر معنی دار بیان ژن Mfn-1 و غلظت MDA (p =۰/۰۰۸) در مقایسه با گروه DFO شد.

نتیجه‌گیری: مصرف روغن حرارت دیده، پویایی میتوکندری در کبد را مختل می‌کند. به نظر می‌رسد تعامل تمرین هوازی و اکتاپامین می‌تواند باعث بهبود پویایی میتوکندری و استرس اکسیداتیو در کبد شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

کلیدواژه‌ها

تمرین هوازی،

پویایی میتوکندری،

استرس اکسیداتیو

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۰

تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱

شیوه استناد به این مقاله:

Kheirandish Pishkenari M, Farzanegi P, Moradi L. Effect of Aerobic Training and Octopamine on the Gene Expression of Drp-1 and Mfn-1 and MDA Concentration in Liver of Male Rats Fed with Repeated Heated Oil. Razi J Med Sci. 2022;28(12):346-355.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-11]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.31.7]

Razi Journal of Medical Sciences. 2022;28(12):346-355. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Effect of Aerobic Training and Octopamine on the Gene Expression of Drp-1 and Mfn-1 and MDA Concentration in Liver of Male Rats Fed with Repeated Heated Oil

Mehrzad Kheirandish Pishkenari: PhD Condidate, 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@gmail.com
Lida Moradi: Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: Now days, frying and heating the oils are used to prepare the food in all over the world. During the heating, the oil decomposes continuously at high temperatures in the presence of air and moisture, and oxidation, isomerization, polymerization, and hydrolysis occur. Oxidized and heated oils contain oxidized monomers, dimers, polymers, free radicals, hydroperoxidases and aldehydes. These products have detrimental effects on human health and can cause harmful changes in body organs. Free radicals and oxidative stress in heated oils influence the body's energy sources such as mitochondria and genes involved in mitochondrial dynamics. Mitochondrial dynamics factors include Opa1 protein (optic atrophy 1) and mitofusin 1 and 2 (Mfn-1 and 2), dynamin-related protein (Drp-1) and fusion protein 1 (Fis1). Deviation towards fusion optimizes mitochondrial function and is useful in maintaining long-term bioenergy capacity. Conversely, deviation toward division leads to the removal of the damaged part of the mitochondria. 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 aerobic training and octopamine on the gene expression of Drp-1 and Mfn-1 and MDA concentration in liver of male rats fed with 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% VO2max and a speed of 16 m / min, and in the last week it reached 65% Vo2max 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

Keywords
Aerobic Training,
Mitochondrial Dynamics,
Stress Pxidative

Received: 02/10/2021
Published: 20/02/2022

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-11]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.31.7]

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 Drp-1 and Mfn-1 were measured by Real time-PCR and MDA 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 decrease in gene expression of Drp-1 (P =0.001) and Mfn-1 (P =0.001) and non-significant change in MDA (P =0.071) compared to healthy control group. Interaction effect of aerobic training and octopamine caused the significant increase in gene expression of Drp-1 (P =0.001) compared to all the groups except that healthy control group and non-significant difference in Mfn-1 gene expression and MDA concentration (P =0.008) in comparison with DFO group.

Conclusion: During the oil heating process, mitochondrial oxygen species reduce the synthesis of new mitochondria and the mitochondrial network, and since this reduction reduces antioxidant defense, it results in oxidative stress in the cell. MDA is one of the final products of lipid peroxidation, which is considered as an indicator of oxidative damage. At the end of 4 weeks of training protocol, the groups were not significantly different from each other, but physiologically, a nonsignificant increase in MDA indicates an increase in oxidative stress. And a significant decrease in Mfn-1 gene expression indicates a decrease in cell strength to maintain mitochondria and the integration process, which can act as a complementary defense process in the cell. In this study, mitochondrial fusion proteins tended to increase statistically insignificantly, possibly due to the increase in oxidative stress caused by consuming oil heated several times in liver tissue. However, direct comparisons between the effects of reheated oil consumption and mitochondrial dysfunction and the effect of aerobic exercise and octopamine on the expression of variables in the present study in the liver are difficult due to the lack of access to similar studies. Studies have shown that octopamine, with properties similar to epinephrine, can selectively and strongly bind to β3 adrenoceptors and increase lipolysis and fat metabolism in general. Fat loss is associated with a decrease in oxidative stress and subsequent increase in Mfn-1 gene expression. Aerobic exercise can also increase Mfn1 gene expression by stimulating epinephrine, increasing β3 adrenoceptor gene expression, increasing fat catabolism, and reducing fat-induced oxidative stress, all of which interact physiologically to increase Mfn1 gene expression. Therefore, the use of aerobic exercise and octopamine as a stimulant to reduce fat and subsequently reduce ROS and maintain mitochondrial activity and homeostasis. In addition, since the transcriptional regulation of mitochondrial dynamics correlates with exercise intensity, there is likely to happen a positive interaction between consumption of repeated heated oil and effects of exercise intensity and even exercise duration that significantly increase Drp-1 gene expression compared to the DFO group. However, it seems that more studies are needed.

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 Drp-1 and Mfn-1 and MDA Concentration in Liver of Male Rats Fed with Repeated Heated Oil. Razi J Med Sci. 2022;28(12):346-355.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-11]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.31.7]

مقدمه

امروزه در سراسر جهان از سرخ کردن و حرارت دادن روغن‌ها جهت آماده‌سازی غذا استفاده می‌نمایند. در طی حرارت دیدن، روغن به‌طور مداوم و پیوسته در دمای بالا در حضور هوا و رطوبت تجزیه می‌شود و اکسیداسیون، ایزومراسیون، پلیمریزاسیون و هیدرولیز رخ می‌دهد. (۱). روغن‌های اکسید شده و حرارت دیده حاوی مونومرهای اکسید شده، دایمرها، پلیمرها، رادیکال‌های آزاد، هیدروپراکسیدازها و آلدهیدها هستند. این محصولات جهش‌زا و سرطان‌زا هستند (۲) و اثرات مضری بر سلامتی افراد دارند و می‌توانند موجب تغییرات مضر در کبد و کلیه‌ها شوند (۳). رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو موجود در روغن‌های حرارت دیده، منابع تولید انرژی در بدن مانند میتوکندری را تحت تاثیر قرار می‌دهند. میتوکندری‌ها اندامک‌های حیاتی کوچک در بیشتر سلول‌های یوکاریوتی هستند و مسئول متابولیسم انرژی، تولید رادیکال‌های آزاد، هومئوستازی کلسیم و مرگ سلولی می‌باشند. بیشتر انرژی سلولی از طریق فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری تولید می‌شود و منبع تولید گونه‌های واکنش اکسیژن (Reactive oxygen species-(ROS)) و استرس اکسیداتیو نیز میتوکندری‌ها هستند (۴). بر طبق مطالعات پیشین، استرس اکسیداتیو با وضعیت‌های پاتولوژیکی مانند کهن‌سالی، سرطان و اختلالات متابولیکی مرتبط با سن مرتبط می‌باشد (۵، ۶). پویایی میتوکندری (Mitochondrial dynamics) بر اساس تعادل در پروتئین‌های مسئول ادغام (fusion) و تقسیم (fission) تعریف شده است (۷). ادغام میتوکندریایی شامل پروتئین (Optic -(Opa1) atrophy 1) و میتوفیوژن ۱ و ۲ (Mitofusins 1 and 2-(Mfn-1 and 2) است که GTP آز هایی هستند که مسئول ادغام غشاء خارجی میتوکندری هستند (۸) درحالی‌که پروتئین مرتبط با داینامین (Mitochondrial fission proteins dynamin-related protein 1-(Drp-1)) و پروتئین تقسیم ۱ (Fission protein 1(Fis1)) در تقسیم شرکت دارند. پدیده تقسیم، سبب تسهیل نابودی میتوکندری‌های آسیب‌دیده می‌گردد. انحراف به سمت ادغام، عملکرد میتوکندری را بهینه می‌نماید و در حفظ ظرفیت انرژی زیستی بلند مدت مفید است. برعکس، انحراف به سمت تقسیم به شکستگی‌های متعدد میتوکندری مانند اتوفاژی میتوکندریای آسیب‌دیده منجر می‌شود (۹). (Reactive oxygen species-(ROS)) موجب فعال شدن تقسیم میتوکندری از طریق (Mitochondrial fission proteins dynamin-related protein 1(Drp-1) و (Fission protein 1(Fis1)) می‌شود و منجر به جدا شدن میتوکندری می‌گردد. این میتوکندری‌ها پتانسیل غشایی کمتری دارند و ATP کمتر و (Reactiveoxygen species-(ROS)) بیشتری تولید می‌کنند که باعث استرس اکسیداتیو می‌گردند (۱۰). حذف پروتئین‌های ادغام مانند (Optic - (Opa1) atrophy 1) یا (Mitofusins 1-(Mfn-1)) یا (Mitofusins 2-(Mfn-2)) موجب افزایش سطوح (Reactive oxygen species-(ROS)) و شکست میتوکندری می‌شود. اگرچه، حذف پروتئین‌های تقسیم مانند (Fission protein 1(Fis1)) و (Mitochondrial fission proteins dynamin-related protein 1(Drp-1 نشان داده است که تأثیری بر تولید (Reactive oxygen species-(ROS)) ندارد (۱۱). آنتی‌اکسیدان‌های آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک، آسیب اکسیداتیو سلول را ترمیم می‌نمایند. افزایش مدت و دمای حرارت دادن روغن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی روغن را تغییر می‌دهد (۱۲) و پراکسیداسیون لیپیدی رخ می‌دهد. مالون دی آلدهید (Malondialdehyde – (MDA)) یکی از محصولات پایانی پراکسیداسیون لیپیدی است که به عنوان شاخص آسیب سلولی بررسی شده است (۱۳). از عوارض استفاده از روغن‌های حرارت دیده، چاقی می‌باشد. چاقی، پویایی میتوکندری را مختل می‌کند و تعادل بین تقسیم و ادغام میتوکندری را تغییر می‌دهد، از این رو، تعداد میتوکندری‌ها کاهش یافته و سبب اختلال در میتوکندری اندام‌هایی مانند کبد می‌شود (۱۴). فعالیت ورزشی اخیراً به عنوان روشی مؤثر در افزایش عملکرد میتوکندریایی شناخته شده است و نقش فعالیت ورزشی در بهبود آسیب میتوکندریایی در بیماری‌های مختلف گزارش شده است (۱۵). بر طبق نتایج یک مطالعه، تمرین ورزشی عدم تعادل پویایی میتوکندری را از طریق افزایش پروتئین‌های ادغامی و کاهش یا حفظ سطوح پروتئین

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-11]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.31.7]

تقسیم میتوکندری کاهش می‌دهد (۱۶). به ویژه، بیان (Mitofusins 2-(Mfn-2)) و (Optic atrophy -(Opa1) 1) در گروهی که فعالیت بدنی انجام داده بودند افزایش یافته بود (افزایش به سمت ادغام) در حالیکه بیان سطوح پروتئین‌های تقسیم در گروه فعالیت ورزشی، تغییری نکرده بود و این بیان‌کننده‌ی تغییر به سمت ادغام میتوکندری بود (۱۶). از طرف دیگر نتایج متضادی نیز در رابطه با جایی که تمرین ورزشی اجازه‌ی افزایش یا کاهش بیان پروتئین‌های مرتبط با تقسیم یا ادغام میتوکندریایی را می‌دهد وجود دارد (۱۷, ۱۸). این وضع احتمالاً مربوط به تغییراتی است که دلیلش شدت تمرین، پاتولوژی بیماری، نوع بافت و وضعیت‌های مختلف آزمون است. با توجه به نتایج مختلف درباره‌ی اثر تمرین ورزشی بر استرس اکسیداتیو و اثر افزایشی استرس اکسیداتیو ناشی از روغن چند بار حرارت دیده در بدن و مکمل اکتاپامین را با توجه به نقش محرک زایی‌اش در متابولیسم چربی، مورد بررسی قرار داده است. اکتاپامین به‌طور طبیعی آمینی است که ساختاری مشابه انتقال‌دهنده‌ی عصبی نورآدرنالین دارد و بر روی رسپتورهای آدرنرژیک و دوپامینرژیک تأثیرگذار است. اکتاپامین عملکرد انسان‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد و قابلیت فعال کردن آدرنورسپتورهای β3 در بافت چربی و تحریک لیپولیز و متابولیسم چربی را دارا می‌باشد (۱۹). نقش اکتاپامین در کبد شامل افزایش کاتابولیسم گلیکوژن، جذب اکسیژن و مهار گلوکونئوژنز می‌باشد (۲۰). امروزه، با افزایش مصرف روغن‌های چند بار حرارت دیده و فست فودها، تاثیر مختلف تمرین هوازی بر تولید استرس اکسیداتیو و محدودیت مطالعه در رابطه با اثر تمرینات ورزشی و اکتاپامین بر بیان ژن‌های مرتبط با پویایی میتوکندریایی، در پی پاسخ به این سوال هستیم که آیا تمرین هوازی و اکتاپامین بر بیان ژن Mfn-1، Drp-1 و غلظت MDA در کبد رت‌های نر تغذیه شده با روغن چند بار حرارت دیده تاثیر دارد یا خیر؟

روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی است. ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار بالغ با میانگین وزن ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم و سن ۲۰ هفته خریداری شدند. همه‌ی رت‌ها در قفس‌های پلی کربنات (۵ موش در هر قفس) در دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و تحت چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت بدون محدودیت در آب و غذا نگهداری شدند. سپس رت‌ها به‌طور تصادفی به ۵ گروه کنترل سالم (n=۶)، گروه کنترل مسموم (DFO, n=۶)، گروه تمرین + DFO (n=۶)، گروه اکتاپامین + DFO (n=۶)، گروه تمرین + اکتاپامین + DFO (n=۶) 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.

به منظور تهیه‌ی روغن چند بار حرارت دیده، ۸ لیتر روغن آفتاب گردان به مدت ۴ روز متوالی روزی ۸ ساعت با حرارت ۱۹۰ تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد داغ شد و هر ۳۰ دقیقه مواد غذایی: ناگت مرغ، سیب زمینی، مرغ و فرآورده‌های پروتئینی (سوسیس و کالباس) داخل روغن غوطه‌ور شد. در انتها روغن روز چهارم به منظور استفاده به عنوان مداخله‌ی مسمومیتی به صورت خوراکی (گاواژ) به مدت ۴ هفته هر روز، به رت‌های همه‌ی گروه‌ها به غیر از گروه سالم خورانده شد (۳). ۸۱μmol/kg اکتاپامین (شرکت سیگما آلدریچ) حل شده با نرمال سالین ٪۹ به صورت تزریق درون صفاقی به مدت ۴ هفته و ۵ بار در هفته انجام شد (۱۹).

پروتکل تمرین هوازی: به منظور سازگاری رت‌های گروه تمرین هوازی، قبل از شروع برنامه اصلی تمرینی، یک هفته به اجرای دویدن با سرعت ۹m/min به مدت ۲۰ دقیقه پرداختند. جلسه‌ی تمرین علاوه بر تمرین هوازی شامل ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۷m/min و ۵ دقیقه سرد کردن با سرعت ۵m/min بود. تمرین هوازی شامل ۴ هفته و ۵ جلسه در هفته، دویدن بر روی تریدمیل به مدت ۲۰ دقیقه بود. شدت تمرین در هفته‌ی اول با ٪۵۰ VO_{2max} و سرعت ۱۶ متر بر دقیقه آغاز و در هفته‌ی آخر به ٪۶۵ VO_{2max} و سرعت به ۲۶ متر بر دقیقه رسید (۱۴).

نمونه‌گیری از بافت: ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و ۸ ساعت ناشتایی، تمامی رت‌ها با ماده‌ی کلروفورم بیهوش و سپس قربانی شدند. بلافاصله بافت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-11]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.31.7]

جدول ۱- مشخصات آغازگرها

Gene	آغازگر روبه جلو	آغازگرمعکوس
rGap	5' AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G 3'	5' CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C 3'
Mfn1	5' CTC CTG TAA TCT TGC CTG 3'	5' ATC GGA TCT TTT TTG TTT CAG C 3'
DRP-1	5' TGGATGTATTGATGGGAAGGGT3'	5' TTTCTGTTGGGCAGAGATGGGT 3'

کبد از بدن خارج شد، نمونه‌گیری خونی توسط سرنگ آغشته به هپارین به‌طور مستقیم از کبد گرفته شد و برای استخراج پلاسما به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس بافت کبد توسط بافر فسفات سالین (PBS) شستشو داده شد، به داخل تانک ازت انتقال پیدا کرد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه داری شد.

سنجش غلظت MDA و بیان ژن Drp-1 و Mfn-1: میزان غلظت MDA با استفاده از روش الایزا اندازه گیری شد. بیان ژن Drp-1 و Mfn-1 بافت کبد توسط روش Real time&PCR انجام شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن، آلمان) از بافت ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. جهت سنتز cDNA،۵ میکرو گرم از هر کدام از نمونه های mRNA، پرایمرهای Oligo-dT (Fermentas, USA) و آنزیم نسخه برداری معکوس دستورالعمل کیت سنتز cDNA (Fermentas, USA) استفاده شد. از ژن RGap به 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 داده ها 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 ۰/۰۵ > p در نظر گرفته شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ اجرا شد و نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel نسخه ۱۶ رسم شد.

یافته‌ها

میانگین ± انحراف استاندارد داده‌های ژن‌های Drp-1، Mfn-1 و MDA در گروه‌های کنترل سالم، گروه DFO. DFO+ تمرین، DFO +اکتاپامین و DFO +اکتاپامین+تمرین در جدول ۲ ارائه شده است.

در بررسی داده‌های Drp-1 با استفاده از آزمون آنوای یک سویه اختلاف معنی داری بین پنج گروه مشاهده شد ($F_{۴,۲۹}$=۱۷/۷۴, P<۰/۰۰۱). با مراجعه با آزمون تعقیبی توکی مشخص شد که گروه کنترل سالم با DFO+تمرین (P=۰/۰۰۱)، DFO+اکتاپامین (P=۰/۰۰۳) و DFO (P<۰/۰۰۱) و نیز گروه DFO+اکتاپامین+تمرین با گروه DFO+تمرین (P=۰/۰۱۰) و DFO+اکتاپامین (P=۰/۰۴۶) و DFO (P=۰/۰۰۳) اختلاف معنی داری دارند؛ اما دیگر گروه‌های تحقیق اختلاف معنی داری نشان ندادند (P>۰/۰۵) (شکل ۱).

در بررسی داده ها با استفاده از آزمون آنوای یک سویه اختلاف معنی داری در بیان ژن Mfn-1 بین پنج گروه مشاهده شد ($F_{۴,۲۹}$=۶/۳۴, P<۰/۰۰۸). با مراجعه با آزمون تعقیبی توکی مشخص شد که گروه کنترل سالم با گروه‌های DFO+تمرین (P=۰/۰۳۴)، DFO +اکتاپامین (P=۰/۰۱۴) و DFO (P=۰/۰۱۰) اختلاف معنی داری دارد؛ اما دیگر گروه‌های تحقیق دو به دو اختلاف معنی داری نشان ندادند (P>۰/۰۵) (شکل ۲).

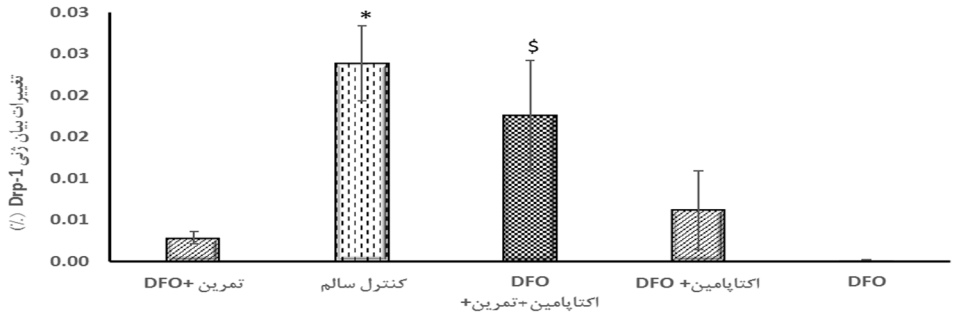
در رابطه با MDA، آزمون آنوای یک سویه اختلاف معنی داری بین پنج گروه نشان نداد (P=۰/۰۷۲، $F_{۴,۱۴}$=۲/۹۹) (شکل ۳).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-11]

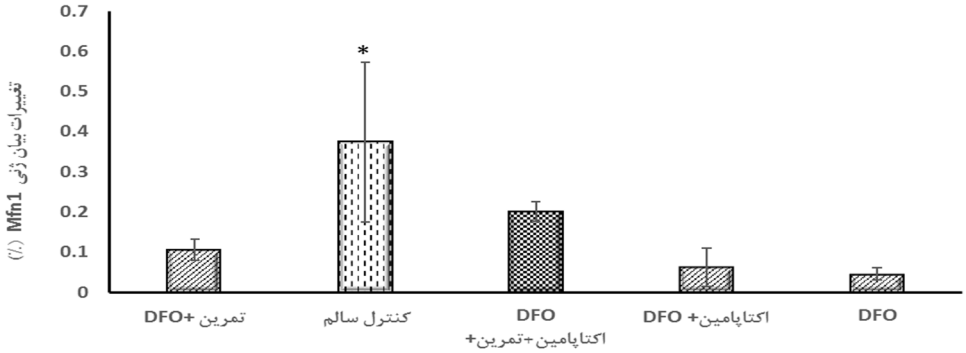
[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.31.7]

جدول ۲- میانگین ± انحراف استاندارد بیان ژن Drp-1 و Mfn-1 و غلظت MDA در گروه‌های مختلف

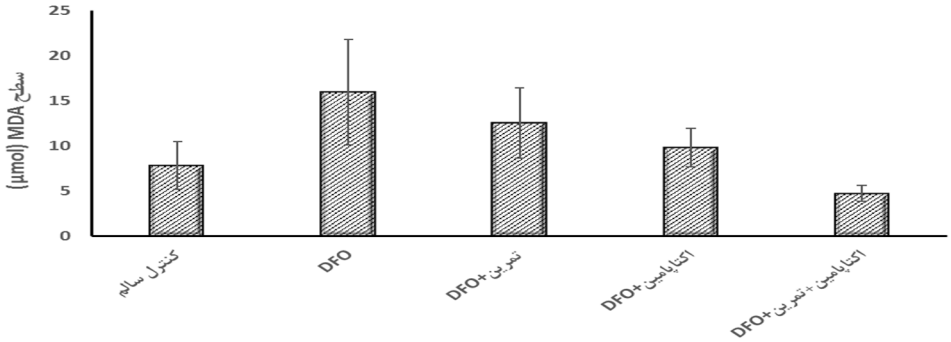
گروه / متغیر	Drp-1		Mfn1		MDA	
	میانگین±SD		میانگین±SD		میانگین±SD	
DFO+ تمرین	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۰۸	۰/۱۰۵۹	۰/۰۲۶.	۷/۸۲۴۶۹۱	۲/۶۶۱۴۰۳
کنترل سالم	۰/۰۲۳۸	۰/۰۰۴۵	۰/۳۷۳۶	۰/۱۹۸	۱۵/۹۴۸۱۵	۵/۸۵۵۴۴۵
DFO + اکتاپامین+تمرین	۰/۰۱۷۶	۰/۰۰۶۶	۰/۲۰۰۸	۰/۰۲۴	۱۲/۵۴۰۷۴	۳/۹۰۱۳۹۱
DFO+اکتاپامین	۰/۰۰۶۲	۰/۰۰۴۷	۰/۰۶۲۴	۰/۰۴۸	۹/۸	۲/۱۳۹۱۸۹
DFO	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۴۵۱	۰/۰۱۵	۴/۷۳۸۲۷۲	۰/۸۸۱۳۱۲



شکل ۱- میانگین ± انحراف استاندار تغییرات بیان ژن Drp-1 در پنج گروه. * نشانگر تفاوت معنی دار گروه کنترل سالم با DFO+تمرین، DFO+اکتاپامین و DFO می باشد. $ نشان دهنده تفاوت معنادار گروه DFO+اکتاپامین+تمرین با گروه DFO+تمرین و DFO+اکتاپامین و DFO می باشد.



شکل ۲- میانگین±انحراف استاندار تغییرات بیان ژن Mfn-1 در پنج گروه. * نشانگر تفاوت معنادار گروه کنترل سالم با گروه های DFO+تمرین، DFO +اکتاپامین و DFO می باشد.



شکل ۳- میانگین±انحراف استاندار تغییرات بیان ژن MDA در پنج گروه

بحث

در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار به بررسی تاثیر همزمان اجرای تمرین هوازی و مصرف اکتاپامین بر بیان ژن Drp-1 و Mfn-1 و غلظت MDA در کبد

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-11]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.31.7]

رت‌های نر تغذیه شده با روغن‌های چند بار حرارت دیده پرداخته شد. نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد مصرف روغن چند بار حرارت دیده موجب کاهش معنی دار بیان ژن Drp-1 و Mfn-1 و افزایش غیر معنی دار MDA در مقایسه با گروه کنترل سالم شد. تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین نیز به تنهایی باعث افزایش غیر معنی دار بیان ژن Drp-1 و Mfn-1 و کاهش غیر معنی دار MDA در مقایسه با گروه DFO شدند. گروه DFO + اکتاپامین + تمرین هوازی نیز افزایش معنی داری در بیان ژن Drp-1 در مقایسه با همه‌ی گروه‌ها بجز گروه کنترل سالم و افزایش غیر معنی دار بیان ژن Mfn-1 و کاهش غیر معنی دار MDA در مقایسه با گروه DFO را نشان دادند. پویایی میتوکندری، نقش مهمی در عمل سلولی و میتوکندریایی نرمال بازی می‌کند (۲۱). ادغام فیزیکی بین غشاهای میتوکندری‌ها می‌توانند تبادل مولکول های میتوکندریایی (پروتئین ها و متابولیت ها) را تسهیل کند در صورتی که تقسیم میتوکندریایی می تواند میتوکندری‌های جدا شده و میتوکندری‌های غیر ضروری و دچار اختلال را حذف کند (۲۲). در طی فرایند حرارت دادن روغن، گونه‌های واکنش اکسیژن مانند هیدروپراکسیدازها، تولید می شوند و موجب سیتوتوکسیتی ناشی از استرس اکسیداتیو می شوند (۲۳) و در ادامه، اختلال DNA هسته ای و میتوکندریایی موجب کاهش سنتز میتوکندری جدید و شبکه میتوکندریایی می‌شود و از آن جایی که این کاهش موجب کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی خواهد شد، نتیجه ی آن ایجاد فشار اکسایشی در سلول است (۲۴، ۲۵). MDA، یکی از محصولات پایانی پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد که به عنوان شاخص آسیب اکسیداتیو بررسی می‌شود (۲۶) در پایان ۴ هفته اجرای پروتکل، گروه‌ها تفاوت معناداری با یکدیگر نداشتند اما از نظر فیزیولوژیکی، افزایش غیر معنی دار MDA نشان دهنده ی افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش معنی دار بیان ژن Mfn-1 نشان دهنده کاهش قدرت سلول برای حفظ میتوکندری و فرایند ادغام است که می تواند به عنوان یک فرایند مکمل دفاعی در سلول عمل کند (۲۷). مطالعه قبادی و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که ۶ هفته مصرف روغن حرارت دیده موجب افزایش MDA در مقایسه با گروه کنترل شد (۲۸).

در مطالعه ی حاضر، ما فرض کردیم که بیان ژن ادغام میتوکندری، Mfn-1، توسط تقاضای انرژی ناشی از تمرین هوازی تحریک می‌شود. با وجود این، در این مطالعه پروتئین ادغام میتوکندری تمایل به افزایش بدون معنی داری آماری داشتند که شاید دلیل آن افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف روغن چند بار حرارت دیده در بافت کبد بوده است. بر طبق مطالعه ای، مدت کوتاه تمرین و عدم ریکاوری می‌توانند در عدم معنی داری پروتئین‌های ادغام نقش داشته باشند(۲۱) . مطالعه ای در انسان‌ها نشان داد، سطوح پروتئین Mfn-1 و Mfn-2 بعد از یک جلسه تمرین تغییری نکرد (۲۹). تنظیم رونویسی پویایی میتوکندری با شدت تمرین همبستگی دارد (۲۱). در رابطه با مکمل اکتاپامین نیز مصرف آن به تنهایی و همزمان با انجام تمرین هوازی، افزایش معنی داری را در بیان ژن Mfn-1 نسبت به گروه DFO نشان ندادند اما با بررسی میانگین آنها، تعامل تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین، افزایش بیشتری را در بیان این ژن نشان داده است. به هر حال مقایسه ی مستقیم بین اثرات مصرف روغن چند بار حرارت دیده و اختلال میتوکندریایی و تاثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر بیان متغیرهای مطالعه ی حاضر در کبد، به دلیل عدم دسترسی به مطالعات مشابه مشکل است. مطالعات نشان داده اند اکتاپامین با ویژگی ای مشابه با اپی نفرین می تواند به‌طور انتخابی و قوی به آدرنورسپتورهای β3 متصل شود و لیپولیز و به‌طور کل متابولیسم چربی را افزایش می‌دهد (۱۹). کاهش چربی با کاهش استرس اکسیداتیو و متعاقب آن افزایش بیان ژن Mfn-1 همراه می‌باشد. تمرین هوازی نیز می تواند با تحریک اپی نفرین ، افزایش بیان ژن آدرنورسپتورهای β3 ، افزایش کاتابولیسم چربی و کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از کاهش چربی، باعث افزایش بیان ژن Mfn-1 شده باشد، که تعامل آنها باعث افزایش فیزیولوژیکی بیشتری در بیان ژن Mfn-1 شده است. از این رو استفاده از تمرین هوازی و اکتاپامین به عنوان محرکی برای کاهش چربی و متعاقب آن کاهش ROS و حفظ فعالیت و هومئوستازی میتوکندری ضروری به نظر می رسد. اکسلرود و همکاران گزارش کرده اند که تمرین می تواند تقسیم و ادغام میتوکندری

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-11]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.31.7]

در عضله انسان را کنترل نماید (۳۰). کنوپکا و همکاران بیان کرده اند کـه ۱۲ هفتـه تمـرین هـوازی منجـر بـه افزایش مشـابه در بیـان Mfn-1 و Mfn-2 در آزمـودنی های جوان و کهنسال شد (۳۱). در رابطه با کاهش بیان ژن Drp-1 در گروه DFO احتمالاً روغن چند بار حرارت دیـده موجـب افـزایش فسفوریلاسـیون Ser637 در میتوکندری شـده و بـه مهـار فعالیـت Drp-1 GTPase منجرشده است (۲۲) و محتوی تام آن که موجب فعـال شدن و افزایش فرایند تقسـیم میتوکنـدریایی می‌شـود، تغییری نیافته است (۳۲) و یا شاید مکانیسم دیگری بـا خنثی کردن عوارض ناشـی از روغـن چنـد بـار حـرارت دیده باعث کاهش بیان ژن DRP-1 شده است. در رابطه با اثر کاهشی اکتاپامین و تمرین بـر بیـان ژن DRP-1 ، از آنجایی که مطالعه ای مشابه با مطالعه ی حاضر یافت نشد که تغییرات ژن‌های درگیر در هومئوستاز و پویـایی میتوکندری بر اثر مصرف روغن چند بار حرارت دیـده را مورد بررسی قرار داده باشد، مکانیسم این تغییر بخـوبی قابل درک نمی‌باشد. امـا از آنجـا کـه تنظـیم رونویسـی پویایی میتوکنـدری بـا شـدت تمـرین همبسـتگی دارد (۲۱)، این احتمال نیز وجود دارد که تعامل مثبتی بـین مصرف روغن چند بـار حـرارت دیـده و اثـرات ناشـی از شدت تمرین حاضر و حتـی مـدت تمـرین پـیش آمـده باشد که سـبب افـزایش معنـی دار بیـان ژن Drp-1 در مقایسه با گروه DFO شده است.

در نهایت با توجه به توسعه ی اسـتفاده از غـذا هـای سرخ کردنی و اسـتفاده از روغن‌هـای حـرارت دیـده در غذا، بررسی اثر اجـرای تمـرین هـوازی و اکتاپـامین بـر ROS، PGC-1α، OPA1، FIS1 و PINK در بافت کبـد رت‌های تغذیه شده بـا روغـن چنـد بـار حـرارت دیـده پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

اجرای تمرین هوازی همراه با اکتاپامین باعث کاهش معنی دار بیان ژن Drp-1 و افزایش غیر معنی دار بیـان ژن Mfn-1 و غلظت MDA شد.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر برگرفته از بخشی از رسـاله دکتـری بـا گرایش بیوشیمی و متابولیسم ورزشی می‌باشـد و بـدین وسیله از زحمات اساتید بزرگوار و دوسـتان عزیـزی کـه در اجرای پژوهش همکاری داشـتند، تشـکر و قـدردانی می‌گردد.

References

1. Romero A, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. Cyclic fatty acids in sunflower oils during frying of frozen foods with oil replenishment. Eur J Lipid Sci. Technol. 2007;109(2):165-73.
2. El-Bohi K, Moustafa G. El sharkawi NI, Sabik LME.Genotoxic effects of acrylamide in adult male albino rats liver. J Am Sci. 2011;7(1):1097-108.
3. Farag RS, Abdel-Latif M, Basuny A, Hakeem B. Effect of non-fried and fried oils of varied fatty acid composition on rat organs. Agric Biol J N Am. 2010;1(4):501-9.
4. Krishnamurthy P, Wadhwani A. Antioxidant enzymes and human health. Antioxidant enzyme: InTech; 2012.
5. Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, et al. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. Int J Mol Sci. 2015;16(1):193-217.
6. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies .Biochim. Biophys. Acta - Mol Basis Dis. 2017;1863(5):1066-77.
7. Haroon S, Vermulst M. Linking mitochondrial dynamics to mitochondrial protein quality control. Curr Opin Genet Dev. 2016;38:68-74.
8. Van der Bliek AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. Cold Spring Harb. Perspect Biol. 2013;5(6):a011072.
9. Mollica MP, Raso GM, Cavaliere G, Trinchese G, De Filippo C, Aceto S, et al. Butyrate regulates liver mitochondrial function, efficiency, and dynamics in insulin-resistant obese mice. Diabetes. 2017;66(5):1405-18.
10. Szabo A, Sumegi K, Fekete K, Hocsak E, Debreceni B, Setalo Jr G, et al. Activation of mitochondrial fusion provides a new treatment for mitochondria-related diseases. Biochem Pharmacol. 2018;150:86-96.
11. Hara H, Araya J, Ito S, Kobayashi K, Takasaka N, Yoshii Y, et al. Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke-induced bronchial epithelial cell senescence. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2013;305(10):L737-L46.
12. Choe E, Min D. Chemistry of deep-fat frying oils. J Food Sci. 2007;72(5):R77-R86.
13. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-11]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.31.7]

nonenal. Oxid Med Cell Longev. 2014;2014.
14. Heo JW, No MH, Park DH, Kang JH, Seo DY, Han J, et al. Effects of exercise on obesity-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. Korean J Physiol Pharmacol. 2017;21(6):567-77.
15. 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.
16. Greene NP, Lee DE, Brown JL, Rosa ME, Brown LA, Perry RA, et al. Mitochondrial quality control, promoted by PGC-1α, is dysregulated by Western diet-induced obesity and partially restored by moderate physical activity in mice. Physiol Rep. 2015;3(7):e12470.
17. Gusdon AM, Callio J, Distefano G, O'Doherty RM, Goodpaster BH, Coen PM, et al. Exercise increases mitochondrial complex I activity and DRP-1 expression in the brains of aged mice. Exp Gerontol. 2017;90:1-13.
18. Moore TM, Zhou Z, Cohn W, Norheim F, Lin AJ, Kalajian N, et al. The impact of exercise on mitochondrial dynamics and the role of Drp-1 in exercise performance and training adaptations in skeletal muscle. Mol Metab. 2019;21:51-67.
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. Picard M, Gentil BJ, McManus MJ, White K, St. Louis K, Gartside SE, et al. Acute exercise remodels mitochondrial membrane interactions in mouse skeletal muscle. J Appl Physiol. 2013;115(10):1562-71.
22. Iqbal S, Hood DA. Oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and movement in skeletal muscle myoblasts. Am. J Physiol Cell Physiol. 2014;306(12):C1176-C83.
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. Mcgill J Med. 2008;11(2):145.
24. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Int J 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. Oboh G, Falade A, Ademiluyi A. Effect of thermal oxidation on the physico-chemical properties, malondialdehyde and carotenoid contents of palm oil. Riv Ital Sostanze Grasse. 2014;91(1):59-65.
27. Ono T, Isobe K, Nakada K, Hayashi J-I. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. Nat Genet. 2001;28(3):272.
28. Ghobadi S, Akhlaghi M, Mokhtari M, Mohammadian F. The Effects of Heated Oils Used in Fast Food Restaurants on Metabolic, Inflammatory and Oxidative Stress Markers, Blood Pressure, and Liver Histology in Sprague-Dawley Rats. Iran Red Crescent Med J. 2018;20(2).
29. Perry CG, Lally J, Holloway GP, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. J Physiol. 2010;588(23):4795-810.
30. Axelrod CL, Fealy CE, Mulya A, Kirwan JP. Exercise training remodels human skeletal muscle mitochondrial fission and fusion machinery towards a pro-elongation phenotype. Acta Physiol. 2019;225(4):e13216.
31. Konopka AR, Suer MK, Wolff CA, Harber MP. Markers of human skeletal muscle mitochondrial biogenesis and quality control: effects of age and aerobic exercise training. J Gerontol A Biol Sci. 2013;69(4):371-8.
32. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. J Cell Biol. 2008;183(5):795-803.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-09-11]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1400.28.12.31.7]