



تأثیر 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 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،
پویایی میتوکندری،
استرس اکسیداتیو

زمینه و هدف: میتوکندری به عنوان منبع تولید انرژی و استرس اکسیداتیو می تواند تحت تأثیر تمرین هوازی قرار بگیرد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر 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 ($n=3$)، گروه DFO ($n=3$)، گروه تمرین هوازی + DFO ($n=3$)، گروه اکتاپامین + DFO ($n=3$) و گروه تمرین هوازی + اکتاپامین + DFO ($n=3$) 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 تردمیل 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 $p < 0.05$ بود.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، مصرف روغن حرارت دیده موجب کاهش معنی دار Drp-1 ($p=0.001$) و Mfn-1 ($p=0.001$) و عدم تغییر معنی دار MDA ($p=0.071$) در مقایسه با گروه سالم شد. اثر تعامل تمرین هوازی و اکتاپامین باعث افزایش معنی دار بیان ژن Drp-1 ($p=0.001$) در مقایسه با همه‌ی گروه‌ها بجز گروه کنترل سالم و اختلاف غیر معنی دار بیان ژن Mfn-1 و غلظت MDA ($p=0.008$) 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.

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 3.0 CC BY-NC-SA صورت گرفته است.



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

Mehrzaad 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@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, hydroperoxides 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 $22 \pm 2^\circ \text{C}$, 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% $\text{VO}_{2\text{max}}$ and a speed of 16 m / min, and in the last week it reached 65% $\text{VO}_{2\text{max}}$ 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

Keywords

Aerobic Training,
Mitochondrial Dynamics,
Stress Oxidative

Received: 02/10/2021

Published: 20/02/2022

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 β_3 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 β_3 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.**

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، هیدروپراکسیدها و آلدهیدها هستند. این محصولات جهش‌زا و سرطان‌زا هستند (۲) و اثرات مضر 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)، 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) 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 میتوکندریایی 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 ((Reactive oxygen species-(ROS بیشتری تولید می‌کنند که باعث استرس اکسیداتیو می‌گردند (۱۰). حذف پروتئین‌های ادغام مانند ((Optic - (Opa1 یا ((atrophin 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

کربنات (۵ موش در هر قفس) در دمای 22 ± 2 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 ($n=6$)، گروه کنترل مسموم (DFO, $n=6$)، گروه تمرین + DFO ($n=6$)، گروه اکتاپامین + DFO ($n=6$)، گروه تمرین + اکتاپامین + DFO ($n=6$) 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 خوراندن شد (۳). $81 \mu\text{mol/kg}$ اکتاپامین (شرکت سیگما آلدریج) 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 تردمیل به مدت ۲۰ دقیقه بود. شدت تمرین در هفته‌ی اول با $50\% \text{ VO}_{2\text{max}}$ و سرعت ۱۶ متر بر دقیقه آغاز و در هفته‌ی آخر به $65\% \text{ VO}_{2\text{max}}$ 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

تقسیم میتوکندری کاهش می‌دهد (۱۶). به ویژه، بیان (Mitofusins 2-(Mfn-2)) و (Optic atrophy -(Opa1)) 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 تأثیر قرار می‌دهد و قابلیت فعال کردن آدرنرژیک‌های $\beta 3$ 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، تأثیر 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 Drp-1، Mfn-1 و غلظت MDA در کبد رت‌های نر تغذیه شده با روغن چند بار حرارت دیده تأثیر 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

جدول ۱- مشخصات آغازگرها

Gene	آغازگر روبه جلو	آغازگر معکوس
rGap	5' AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G	5' CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C
	3'	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'

استفاده از نرم افزار Microsoft Excel نسخه ۱۶ رسم شد.

یافته‌ها

میانگین $\pm$ انحراف استاندارد داده‌های ژن‌های Drp-1، Mfn-1 و MDA در گروه‌های کنترل سالم، گروه 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 ($F_{4,29}=17/74$, $P<0/001$). با مراجعه با آزمون تعقیبی توکی مشخص شد که گروه کنترل سالم با DFO + تمرین ($P=0/001$)، DFO + اکتاپامین ($P=0/003$) و DFO ($P<0/001$) و نیز گروه DFO + اکتاپامین + تمرین با گروه DFO + اکتاپامین ($P=0/010$) و DFO ($P=0/046$) و DFO + اکتاپامین ($P=0/003$) اختلاف معنی داری دارند؛ اما دیگر گروه‌های تحقیق اختلاف معنی داری نشان ندادند ($P>0/05$) (شکل ۱).

در بررسی داده‌ها با استفاده از آزمون آنوای یک سویه اختلاف معنی داری در بیان ژن Mfn-1 بین پنج گروه مشاهده شد ($F_{4,29}=6/34$, $P<0/008$). با مراجعه با آزمون تعقیبی توکی مشخص شد که گروه کنترل سالم با گروه‌های DFO + تمرین ($P=0/034$)، DFO + اکتاپامین ($P=0/014$) و DFO ($P=0/010$) اختلاف معنی داری دارد؛ اما دیگر گروه‌های تحقیق دو به دو اختلاف معنی داری نشان ندادند ($P>0/05$) (شکل ۲). در رابطه با MDA، آزمون آنوای یک سویه اختلاف معنی داری بین پنج گروه نشان نداد ($P=0/072$)، ($F_{4,14}=2/99$) (شکل ۳).

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

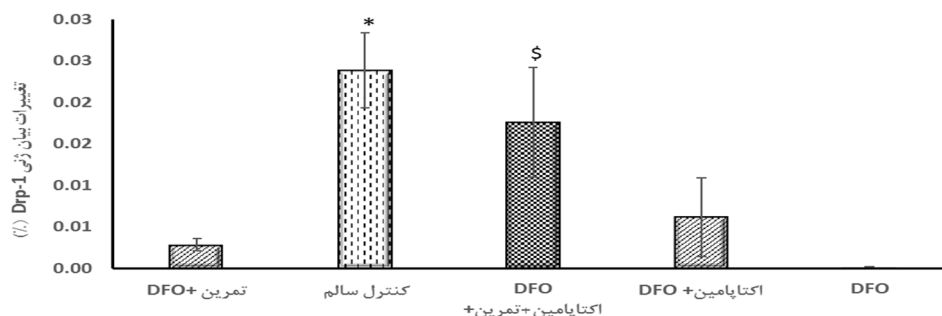
۱. میزان غلظت MDA با استفاده از روش الایزا اندازه گیری شد. بیان ژن Drp-1 و Mfn-1 بافت کبد توسط روش Real time & PCR انجام شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل طبق پروتکل شرکت سازنده (کیان، آلمان) از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. جهت سنتز cDNA، ۵ میکرو گرم از هر کدام از نمونه‌های mRNA، پرایمرهای mRNAs، 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:

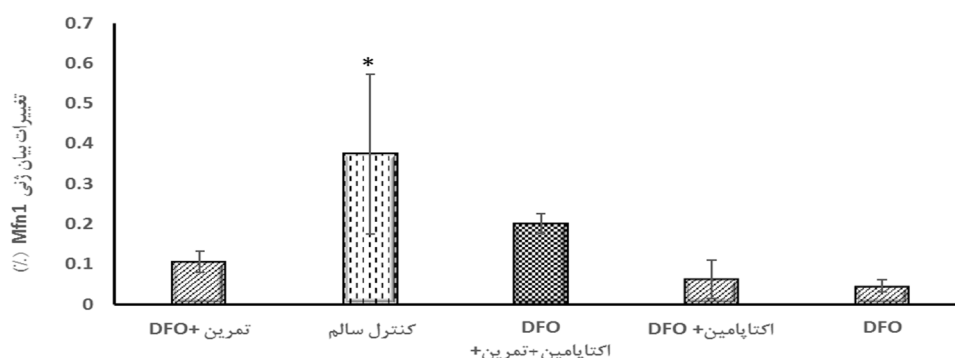
از آزمون شاپیرو ویلک برای بررسی توزیع نرمال داده‌ها استفاده گردید. جهت بررسی تفاوت میانگین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک سویه (One Way ANOVA) و جهت تعیین محل تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. سطح معنی داری برای تمام محاسبات $0/05 < p$ در نظر گرفته شد. تمامی محاسبات با استفاده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

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

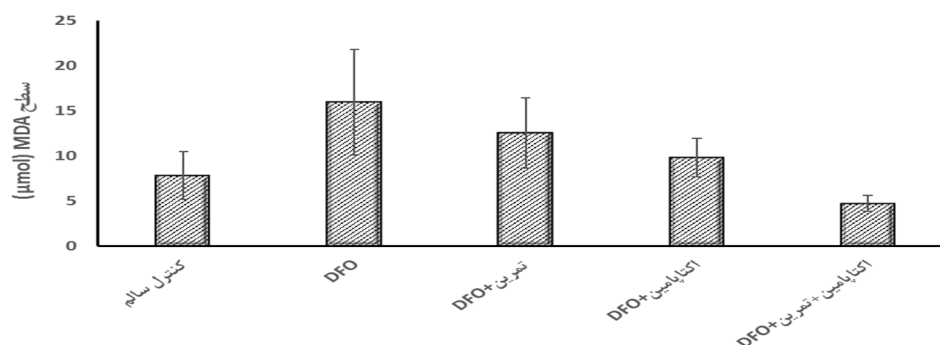
متغیر	گروه	Drp-1 میانگین $\pm$ SD	Mfn1 میانگین $\pm$ SD	MDA میانگین $\pm$ SD
DFO + تمرین	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۰۸	۰/۰۲۶	۷/۸۳۴۶۹۱
کنترل سالم	۰/۰۲۳۸	۰/۰۰۴۵	۰/۱۰۵۹	۵/۸۵۵۴۴۵
DFO + اکتاپامین + تمرین	۰/۰۱۷۶	۰/۰۰۶۶	۰/۰۲۴	۱۲/۵۴۰۷۴
DFO + اکتاپامین	۰/۰۰۶۲	۰/۰۰۴۷	۰/۰۴۸	۹/۸
DFO	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۴۵۱	۴/۳۸۲۷۲



شکل ۱- میانگین $\pm$ انحراف استاندارد 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+اکتاپامین و DFO می باشد.



شکل ۲- میانگین $\pm$ انحراف استاندارد 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 $\pm$ انحراف استاندارد تغییرات بیان ژن MDA در پنج گروه

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

رتهای نر تغذیه شده با روغن‌های چند بار حرارت دیده پرداخته شد. نتایج مطالعه‌ی 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 مولکول‌های میتوکندریایی (پروتئین‌ها و متابولیت‌ها) را تسهیل کند در صورتی که تقسیم میتوکندریایی می‌تواند 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 می‌شوند و موجب سیتوتوکسیته ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شوند (۲۳) و در ادامه، اختلال DNA هسته‌ای و میتوکندریایی موجب کاهش سنتر 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). 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 دهنده‌ی افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش معنی دار بیان ژن Mfn-1 نشان دهنده کاهش قدرت سلول برای حفظ میتوکندری و فرایند ادغام است که می‌تواند 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 مطالعه‌ی 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 مطالعه‌ی، مدت کوتاه تمرین و عدم ریکاوری می‌تواند در عدم معنی داری پروتئین‌های ادغام نقش داشته باشند (۲۱). مطالعه‌ی 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 مقایسه‌ی مستقیم بین اثرات مصرف روغن چند بار حرارت دیده و اختلال میتوکندریایی و تاثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر بیان متغیرهای مطالعه‌ی حاضر در کبد، به دلیل عدم دسترسی به مطالعات مشابه مشکل است. مطالعات نشان داده اند اکتاپامین با ویژگی‌ای مشابه با اپی نفرین می‌تواند به‌طور انتخابی و قوی به آدرنورسپتورهای β_3 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 می‌تواند با تحریک اپی نفرین، افزایش بیان ژن آدرنورسپتورهای β_3 ، 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 هموستازی میتوکندری ضروری به نظر می‌رسد. اکسلرود و همکاران گزارش کرده اند که تمرین می‌تواند تقسیم و ادغام میتوکندری

وسیله از زحمات اساتید بزرگوار و دوستان عزیز که در اجرای پژوهش همکاری داشتند، تشکر و قدردانی 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, Wadhvani 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 Blik 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, Debrececi 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-

در عضله انسان را کنترل نماید (۳۰). کنوپکا و همکاران بیان کرده اند که ۱۲ هفته تمرین هوازی منجر به افزایش مشابه در بیان Mfn-1 و Mfn-2 در آزمودنی های جوان و کهنسال شد (۳۱). در رابطه با کاهش بیان ژن Drp-1 در گروه DFO احتمالاً روغن چند بار حرارت دیده موجب افزایش فسفوریلاسیون Ser637 در میتوکندری شده و به مهار فعالیت GTPase Drp-1 منجر شده است (۲۲) و محتوی تام آن که موجب فعال شدن و افزایش فرایند تقسیم میتوکندریایی می‌شود، تغییری نیافته است (۳۲) و یا شاید مکانیسم دیگری با خنثی کردن عوارض ناشی از روغن چند بار حرارت دیده باعث کاهش بیان ژن Drp-1 شده است. در رابطه با اثر کاهشی اکتاپامین و تمرین بر بیان ژن Drp-1، از آنجایی که مطالعه ای مشابه با مطالعه ی حاضر یافت نشد که تغییرات ژن های درگیر در هومئوستاز و پویایی میتوکندری بر اثر مصرف روغن چند بار حرارت دیده را مورد بررسی قرار داده باشد، مکانیسم این تغییر بخوبی قابل درک نمی‌باشد. اما از آنجا که تنظیم رونویسی پویایی میتوکندری با شدت تمرین همبستگی دارد (۲۱)، این احتمال نیز وجود دارد که تعامل مثبتی بین مصرف روغن چند بار حرارت دیده و اثرات ناشی از شدت تمرین حاضر و حتی مدت تمرین پیش آمده باشد که سبب افزایش معنی دار بیان ژن Drp-1 در مقایسه با گروه DFO شده است.

در نهایت با توجه به توسعه ی استفاده از غذا های سرخ کردنی و استفاده از روغن های حرارت دیده در غذا، بررسی اثر اجرای تمرین هوازی و اکتاپامین بر ROS، PGC-1 α ، OPA1، FIS1 و PINK در بافت کبد رت های تغذیه شده با روغن چند بار حرارت دیده پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه گیری

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

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر برگرفته از بخشی از رساله دکتری با گرایش بیوشیمی و متابولیسم ورزشی می‌باشد و بدین

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-1 α , 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.