مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۹، شماره ۷، مهر ۱۴۰۱ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

تاثیر یک دوره تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین بر پروتئین $FOXO_3$ و بیان ژن ATP Synthase در عضله قلب موش‌های صحرایی تغذیه شده با روغن‌های سرخ شده‌ی عمیق

سوسن آبگینه اسفندیاری: گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقصود پیری: گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (*نویسنده مسئول) m.peeri@iautcb.ac.ir

محمد علی آذربایجانی: گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر یک دوره تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین بر پروتئین $FOXO_3$ و بیان ژن ATP Synthase در عضله قلب موش‌های تغذیه شده با روغن‌های سرخ شده‌ی عمیق بود.

روش کار: ۳۰ موش صحرایی ۸ هفته‌ای نژاد ویستار به ۵ گروه (۶ تایی) تقسیم شدند. در طول دوره پژوهش روغن‌های حرارت دیده عمیق به صورت خوراکی (گاواژ، ۱۰ml/kg) به مدت ۴ هفته، به موش‌های مورد آزمایش خورانده شد. ۸۱ مول بر کیلوگرم اکتاپامین به صورت تزریق درون صفاقی به گروه‌های مکمل تزریق شد. موش‌های گروه تمرینی نیز به تمرین تردمیل با شدت متوسط در هفته‌ی اول ۵۰٪ vo_{2max} و در هفته‌ی آخر ۶۵٪ vo_{2max} پرداختند. تغییرات بیان پروتئینی $FOXO_3$ با روش وسترن بلات و بیان ژنی ATP Synthase با روش QRT-PCR انجام شد.

یافته‌ها: بر اثر مصرف روغن، غلظت پروتئین $FOXO_3$ به طور معناداری افزایش یافت. تمرین و مکمل اکتاپامین غلظت پروتئین FOXO3 را به طور معناداری کاهش داد و کمترین غلظت پروتئین FOXO3 درگروه تمرین و اکتاپامین مشاهده شد. مصرف روغن حرارت دیده عمیق، غلظت ATP synthase را به طور معناداری کاهش داد و تمرین هوازی موجب افزایش بیان ژن ATP synthase شد. همچنین دریافت مکمل اکتاپامین نیز افزایش بیان ژن ATP synthase را به همراه داشت ضمن اینکه اثر تعاملی در هر دو متغیر معنادار نبود.

نتیجه‌گیری: احتمالا تمرین هوازی و اکتاپامین به صورت جداگانه می‌تواند با تعدیل پروتئین $FOXO_3$ و ATP سنتاز اثرات مخرب روغن‌های حرارت دیده عمیق را بر سازوکار سلولی مرتبط با میتوکندری عضله قلب را کاهش دهد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

کلیدواژه‌ها

تمرین هوازی،

اکتاپامین،

روغن سرخ شده عمیق

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۱۰

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۰۷/۰۹

شیوه استناد به این مقاله:

Abgineh Esfandiyari S, Peeri M, Azarbayjani MA. The Effect of 4 Weeks of Aerobic Exercise Training and Octapamine Supplementation on FOXO3 Protein and ATP Synthase Gene Expression in the Cardiac Muscle of Rats Fed with Deep-Fried Oil. Razi J Med Sci. 2022;29(7):125-134.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-05-30]

Razi Journal of Medical Sciences. 2022;29(7):125-134. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

The Effect of 4 Weeks of Aerobic Exercise Training and Octapamine Supplementation on $FOXO_3$ Protein and ATP Synthase Gene Expression in the Cardiac Muscle of Rats Fed with Deep-Fried Oil

Susan Abgineh Esfandiyari: PhD of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Maghsoud Peeri: Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (* Corresponding author) m.peeri@iauctb.ac.ir
Mohammad Ali Azarbayjani: Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: The use of repeatedly heated oils has adverse effects on human health, causing oxidative stress and dysfunction of genes and proteins. Oxidative stress disrupts the regulation of vascular walls and heart cells, mitochondrial damage and cellular apoptosis in heart cells. Myocardial cells, especially mitochondria, become vulnerable to oxidative stress and the ability to their reproduction and regeneration are reduced. The two proteins involved in the process of mitochondrial biogenesis of the cardiac muscle and free radicals in the cell are $FOXO_3$ and ATP Synthase proteins. $FOXO_3$ is like a double-edged sword and on the other hand prevents pathological myocardial hypertrophy, which maintains the size of cardiomyocytes by inhibiting the growth of cardiomyocytes and promoting autophagy. On the other hand, in conditions of ROS accumulation, it promotes cell and mitochondria towards apoptosis. ATP Synthase is associated with octopamine because of its role in relaxing the cardiac muscle. Octopamine (an endogenous biogenic amine) has been introduced as a plant extract with anti-anxiety, sedative, anticonvulsant effects and promotes the growth and growth of nerve stem cells. Octopamine, which is naturally present in many plants such as oranges, has positive effects. In controlling heart diseases such as controlling the nervous system of the heart, reducing tachycardia, and relaxing the cardiac muscle. This study aimed to evaluate the effect of aerobic exercise training and octopamine on $FOXO_3$ protein and ATP Synthase gene expression in the cardiac muscle of rats fed deep-fried oils.
Methods: 30 8-week-old Wistar rats in 5 groups (6) including healthy control, consumption of deep-fried oils, consumption of deep-fried oils + aerobic exercise, consumption of deep-fried oils + supplements Octapamine, consumption of deep-fried oils + aerobic exercise + octopamine supplement were divided, during the study period, deep heated oils were fed orally (gavage, 10ml / kg) to the tested rats for 4 weeks. (Morning). Deep-fried oil was obtained from 8 liters of sunflower oil, which was heated at 190 to 200 ° C for 8 consecutive days. According to sources every 30 minutes. Foods including chicken nuggets, potatoes, and protein products (sausages and sausages) were immersed in oil and at the end of the fourth day, the oil was stored for use in the poisoning intervention. DFO oil was orally gavaged to rats for 4 weeks 5 days a week (10 ml/kg). The supplement used in this study was octopamine. The duration of complementary intervention was 4 weeks and 5 days per week. The dose used according to the articles was 81 µmol / kg by intraperitoneal injection (IP solution with 9% normal saline). The training protocol was performed with moderate intensity training in the range of VO2 max 65-50%, which includes 5 sessions of 30 minutes per week (treadmill) with 5 minutes of warm-up, 20 minutes of activity, and 5 minutes of cooling down. On the first day of

Keywords
Aerobic exercise training,
Octapamine,
Deep fried oil

Received: 01/08/2022
Published: 01/10/2022

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-05-30]

training, the speed starts from 16 m / s and increases according to the protocol every week, and reaches 26 m / s on the last day after 4 weeks. 48 hours after the last intervention with at least 8 hours of fasting with chloroform solution anesthetized after splitting the chest, a blood sample was taken from the left ventricle of the heart with a 3 cc syringe. The collected blood was placed in a simple 12 ml tubes and the EDTA tube was placed in a refrigerated centrifuge to collect serum and plasma. After blood sampling from the heart, the tissues were quickly isolated and the tissue was washed with saline phosphate buffer solution (PBS) and placed in the microtube. Alterations of $FOXO_3$ protein expression and ATP Synthase gene expression by Western blotting by Primary and secondary antibodies and Real-time-PCR were performed by specific primers. To determine the effect of deep-frying oil intake, healthy control group, and control group - deep-fried oil were compared using an independent t-test. A two-way analysis of variance was used to determine the main effect of exercise, the main effect of octopamine, and the interaction between exercise and octopamine. If there was a significant difference, the Bonferroni post hoc test was used to determine the location of the difference. The expression of the desired gene was calculated by the formula $2\Delta\Delta ct$ and the values of multiplication changes.

Results: Compared to the control group who did not receive supplements and exercise significantly reduced the expression of $FOXO_3$ protein in the exercise group ($P = 0.005$). Octopamine supplementation also significantly reduced $FOXO_3$ protein expression ($P = 0.001$). The combination of exercise and supplements was also significant compared to the control group ($P = 0.001$). Although the lowest expression of $FOXO_3$ protein was observed in the exercise group and octopamine supplementation, the interaction of these two interventions was not statistically significant ($P = 0.159$). (Figure 2 Section A and Table 1). Compared to the control group who did not receive supplements and exercise, exercise significantly increased the expression of the ATP Synthase gene ($P = 0.012$). Octopamine supplementation also significantly increased ATP Synthase gene expression ($P = 0.001$). The combination of exercise and supplements was also significant compared to the control group ($P = 0.0001$). Although the highest expression of ATP Synthase gene belonged to the exercise group and octopamine supplementation, the interaction between exercise and octopamine expression of this gene was not statistically significant. ($P = 0.071$).

Conclusion: It has been reported that moderate-intensity exercise training can reduce myocardial infarction during cell myocardial infarction in rats by modifying FOX family proteins, enhance cardiovascular function, autophagy and Promote the degradation of damaged proteins. Octopamine as a lipolytic agent probably acts on rat fat cells and it is conceivable that octopamine to increase Stem cell proliferation rate is effective and mimics some of the effects of noradrenaline and adrenaline. This response probably indicates a positive and antioxidant effect, anti-inflammatory, weight loss, fat burning, and anti-cancer effects of octopamine, which has been able to act on cells damaged by heated oil poisoning and the damage caused by DFO. According to the results of the present study, it seems that aerobic exercise training and octopamine can reduce the destructive effects of deep heated oils. Octopamine probably plays a very important role in regulating autophagy and mitochondrial function as an antioxidant and aerobic exercise, so exercise can be a key process in cellular and molecular mechanisms.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Abgineh Esfandiyari S, Peeri M, Azarbayjani MA. The Effect of 4 Weeks of Aerobic Exercise Training and Octapamine Supplementation on FOXO3 Protein and ATP Synthase Gene Expression in the Cardiac Muscle of Rats Fed with Deep-Fried Oil. Razi J Med Sci. 2022;29(7):125-134.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-05-30]

مقدمه

مطالعات ارزیابی سلامت قلب و عروق و رژیم غذایی نشان می‌دهد، بیماری‌های قلبی-عروقی تا حدودی به نوع و ترکیب غذاها، نوع روغن استفاده شده، روش سرخ کردن (سرخ شدن عمیق یا تابه) و میزان تخریب روغن مربوط می‌شود (۱). مجموعه‌ای از شواهد نشان می‌دهد که مصرف غذاهای سرخ کردنی و استفاده از روغن‌های چند بار حرارت دیده (Repeatedly heated cooking oil) با بیماری‌های مزمنی از جمله دیابت نوع۲، نارسایی قلبی-عروقی، اختلال عملکرد اندوتلیال، افزایش پراکسیدا سیون لیپید، تصلب شرایین، چاقی، افزایش فشارخون ارتباط دارد (۱، ۲). Jacqueline و همکاران (۲۰۲۰)، در مورد رابطه بین مصرف غذای سرخ شده و بیماری عروق کرونر (Coronary artery disease) (CAD) طی یک پیگیری تقریباً متوسط ۳ ساله نشان دادند مصرف غذای سرخ شده دارای یک رابطه مثبت و وابسته به مقدار مصرف روغن با بیماری قلبی دارد (۱). تحقیقات متعددی که در حیوانات انجام شده است نشان می‌دهد که مصرف روغن‌های چند بار حرارت دیده (RHCO) باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، کاهش فعالیت مهارسازی رادیکال‌های آزاد و در نتیجه استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) می شود (۳). استرس اکسیداتیو موجب اختلال در تنظیم سلول‌های جدار عروق و سلول‌های قلبی، آسیب میتوکندری و آپوپتوز سلولی در سلولهای قلبی می‌شود در واقع سلولهای عضله قلب و بخصوص میتوکندری‌ها در برابر استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر می شوند و توانایی تکثیر و بازسازی آنها کاهش می‌یابد (۴، ۵).

پروتئین جعبه‌ی سرچنگالی Forkhead Box (O_3a O_3) که به عنوان $FOXO_3$ یا $FOXO_3a$ شناخته می‌شود، فاکتورهای رونویسی FOXO اعضای FOX هستند که دارای ژن‌هایی با دامنه مشترکی از DNA می‌باشند. $FOXO_3$ بطور گسترده در واکنش با استرس اکسیداتیو مورد مطالعه قرار گرفته است، مطالعات نشان می‌دهد، $FOXO_3$ در تنظیم استرس اکسیداتیو، آپوپتوز () سلولی (مرگ سلولی)، اتوفاژی (Autophagy) در دوره‌ی سلولی و ترمیم DNA آسیب دیده نقش دارد (۵، ۶). $FOXO_3$ مانند یک شمشیر دو لبه است و از طرفی مانع از هایپرتروفی پاتولوژیک میوکارد است که با مهار رشد کاردیومیوسیت‌ها و ترویج اتوفاژی، اندازه‌ی کاردیومیوسیت‌ها را حفظ می‌کند. و از طرف دیگر در شرایط تجمع ROS سلول و میتوکندری را به سمت آپوپتوزیس پیش می‌برد. عملکرد میتوکندری در هومو ستاز انرژی، متابولیسم، سیگنالینگ و آپوپتوز در سلول مهم است(۷). کمپلکس V میتوکندری (ATP Synthase)، یک مجموعه آنزیمی است که به عنوان یک ماشین مولکولی برای تولید و هیدرولیز ATP در سلول ها در آخرین مرحله از روند تنفسی میتوکندری کار می کند. بنابراین، ATP سنتاز نه تنها در حفظ حالت انرژی سلولی ، بلکه در تعیین عملکرد تنفسی میتوکندری نیز نقش محوری دارد. انقباض و بخصوص آرامش قلبی فرآیندهای نیاز به انرژی است که به عملکرد میتوکندری و ATP سنتاز کارآمد بستگی دارد(۸). عدم تنظیم فعالیت ATP سنتاز باید تأثیرات عمده ای بر تنفس میتوکندری و از این رو عملکرد قلبی داشته باشد. اختلالات انرژی میتوکندریایی در توسعه پاتولوژیک قلب نقش دارد. کاهش ATP در عضله قلب از ویژگی های اصلی نارسایی قلبی است. اختلال عملکرد ATP سنتاز می تواند باعث ایجاد و تشدید بیماری های انسانی مانند کاردیومیوپاتی و نارسایی قلبی شود (۹).

تمرینات ورزشی تغییرات آناتومیکی و فیزیولوژیکی مطلوبی را ایجاد می‌کند که خطر بیماری های قلبی و نارسایی را کاهش می‌دهد. هایپرتروفی فیزیولوژیکی قلبی ناشی از ورزش منجر به بهبود عملکرد قلب می‌شود (۱۰). بازسازی قلبی ناشی از ورزش با مکانیسم‌های تنظیم کننده ژن و مسیرهای سیگنالینگ سلولی زمینه سازگاری‌های سلولی، مولکولی و متابولیکی همراه است (۱۱). تمرینات ورزشی همچنین باعث ایجاد بیوژنز میتوکندریایی و ظرفیت اکسیداتیو منجر به کاهش بیماری‌های قلبی عروقی می‌شود(۱۲).

مطالعات متنوعی برای یافتن اهمیت تمرینات ورزشی در بیان ژن‌ها و تغییرات مناسب نشانگرهای بیوژنز میتوکندری و ROS ها پرداخته‌اند. Zeng و همکاران (۲۰۲۰)، مداخلات ورزشی ۱۲ هفته‌ای فسفوریلاسیون Akt، mTOR و $FoxO_3a$ را تنظیم و AMPK فسفریله را تنظیم می‌کند تا وضعیت عملکرد اتوفاژی و کنترل کیفیت میتوکندری را تنظیم کند (۱۳). نتایج مطالعه‌ی Ferreira و همکارانش (۲۰۱۴) که یک دوره طولانی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-05-30]

تمرین هوازی با شدت متوسط را بر روی تغییرات سطوح پروتئینی آنزیم‌ها و فسفوپروتئوم میتوکندری قلب گروهی از موش ها انجام دادند، حاکی از افزایش سطوح ATP سنتاز بر اثر تمرینات بود (۸).

Kavazis و همکاران (۲۰۱۴)، تمرینات ورزشی از میوپاتی نا شی از ماده ضد تومور قوی در قلب (FoxO1 و MuRF-1) و عضلات اسکلتی ($FoxO_3$، MuRF-1 و BNIP3) محافظت می‌کند (۱۴). در تحقیقی Marfe و همکاران (۲۰۱۲)، پس از یک دوره فعالیت بدنی طولانی مدت تا رسیدن به درماندگی در بافت عضله قلب و ا سکلتی موش‌ها، کاهش رونویسی FOXO3a م شاهده شد (۱۵).

اخیرا از برخی گیا هان دارویی به عنوان مکمل های ورزشی استفاده شده است. مطالعاتی نیز اثر آنتی اکسیدانی و ضد التهابی بر متابولیسم بدن را با استفاده علمی از این گیا هان با (۱۶) و بدون مداخله تمرین ورزشی (۱۷) تایید کرده اند. از این میان، اکتاپامین (یک آمین بیوژنیک درون‌زا) بعنوان عصاره گیاهی دارای اثرات ضد اضطراب، آرام بخش، ضد تشنج و موجب تکثیر و رشد سلول‌های بنیادی عصبی معرفی شده است (۱۸).اکتا پامین که به‌طور طبیعی در گیا هان متعدد مانند نارنج موجود است دارای اثرات مثبتی در کنترل بیماری‌های قلبی چون کنترل سیستم عصبی قلب، کاهش تاکی‌کاردی و آرام بخشی عضله قلب است (۲۰).

با توجه به اینکه تاثیر همزمان و جداگانه مکمل اکتاپامین و تمرین ورزشی هوازی بر پروتئین و ژن‌های دخیل در بیوژنز و مرگ میتوکندری عضله قلب و آنزیم‌های دخیل در روند آرامش عضله قلب بررسی نشده است؛ لذا این مطالعه در پی یافتن پاسخ به این سوال است که مداخله جداگانه و همزمان دو عامل تمرین ورزشی هوازی و مکمل اکتاپامین پس از خوراندن روغن‌های سرخ شده چندبار حرارت دیده به موش‌های صحرایی، بر تنظیم بیان پروتئین FOXO3 و ژن ATP Synthase چه تاثیری دارد؟

روش کار

در این مطالعه تجربی، ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با ۸ هفته سن و با وزن تقریبی بین ۲۰۰-۲۵۰ گرم از انستیتوی پاستور (تهران) تهیه شد. نگهداری آنها در دمای ۳ ±۲۲ درجه‌ی سانتیگراد، رطوبت مورد استفاده برای قفس‌ها حدود ۶۰ درصد ، چرخه روشنایی-تاریکی، ۱۲ ساعت خاموش و ۱۲ ساعت روشن بود. تمام مراحل مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینگی انجام شد. حیوانات به ۵ گروه (۶ تایی) شامل: کنترل سالم، م صرف روغن‌های سرخ شده عمیق، مصرف روغن‌های سرخ شده عمیق + تمرین هوازی، مصرف روغن‌های سرخ شده عمیق + مکمل اکتاپامین، مصرف روغن‌های سرخ شده عمیق + تمرین هوازی + مکمل اکتاپامین تقسیم شدند

تهیه روغن سرخ شده عمیق: روغن سرخ شده عمیق از ۸ لیتر روغن آفتاب گردان که به مدت ۴ روز متوالی روزی ۸ ساعت با حرارت ۱۹۰ تا ۲۰۰ درجه سانتی گراد داغ شده بود بدست آمد. طبق منابع هر ۳۰ دقیقه (با دماسنج پخت غذا اندازه گیری شد). مواد غذایی شامل ناگت مرغ، سیب زمینی و فراورده‌های پروتئینی (سوسیس و کالباس) داخل روغن غوطه‌ور شدند و در انتهای روز چهارم، از روغن به منظور استفاده مداخله مسمومیتی نگه‌داری شد. روغن DFO (Deep frying oil) به صورت خوراکی به مدت ۴ هفته ۵ روز در هفته، (۱۰ میلی لیتر برکیلوگرم) به رت‌ها گاواژ شد.

برنامه‌ی تمرین ورزشی: پس از یک هفته آشنایی با راه رفتن بر روی تردمیل مخصوص حیوانات، جوندگان به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۹ متر در دقیقه بر روی تردمیل قرار گرفتند. پروتکل تمرین به صورت تمرین با شدت متوسط در محدوده VO_2 max ۵۰-۶۵٪ که شامل ۵ جلسه تمرین ۳۰ دقیقه‌ای در هفته (تردمیل) با ۵ دقیقه گرم‌کردن و ۲۰ دقیقه فعالیت و ۵ دقیقه سرد کردن انجام شده است. در اولین روز شروع تمرین، سرعت از ۱۶ m/s شروع و طبق پروتکل هر هفته افزایش یافته و تا در روز آخر بعد از ۴ هفته به ۲۶m/s رسید.

برنامه‌ی مکمل: مکمل مورد ا ستفاده در این تحقیق اکتاپامین بود. مدت زمان مداخله در این طرح ۴ هفته و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-05-30]

۵ روز در هفته بود. دوز مورد استفاده بر اساس مقالات ۸۱µmol/kg به صورت تزریق درون صفاقی (IP محلول با نرمال سالین ٪۹) بود. مکمل از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شد.

ارزیابی‌های بافتی: ۴۸ ساعت پس از آخرین مداخله با حداقل ۸ ساعت نا شتایی با محلول کلروفورم بیهوش و پس از شکافتن قفسه سینه از بطن چپ قلب با سرنگ ۳ سی سی خونگیری انجام شد. خون جمع آوری شده داخل لوله ۱۰۰×۱۲ ساده و لوله EDTA به منظور برداشت سرم و پلاسما داخل سانتریفیوژ یخچال دار قرار داده شد. پس از خونگیری از قلب به سرعت بافت‌ها جدا شده و با محلول بافر فسفات سالین (PBS) شستشوی بافت انجام شد و داخل میکروتیوب قرار گرفت. سپس داخل تانک ازت بافت فریز شده و تا زمان آنالیز داخل فریزر ۸۰- نگهداری شد. بافت به ظرف فیکساتیو ثانویه (فرمالین ۱۰٪) انتقال پیدا می کند . بعد از گذشت ۳ تا ۵ روز بافت جهت آبگیری و قالب گیری پارافینه به دستگاه (Tissue process) انتقال پیدا کرد.

qRT-PCR استخراج RNA و پروتئین و پروتئین با استفاده از معرف TRizol از بافت قلب استخراج شد، طبق دستورالعمل سازنده کیفیت RNA و پروتئین استخراج شد (Invitrogen USA). با توجه به نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ ، اندازه گیری شده توسط طیف سنج NanoDrop Waltham ،MA ،USA Thermo Scientific تعیین شد. سنتز cDNA و تجزیه و تحلیل کمی از روش RT-PCR و (به عنوان ژن خانه‌داری) با استفاده از نرم افزار premier 5 طراحی شدند (Premier Bio-Soft International USA). سنتز cDNA برای foxo3, ATP synthase, cythorome c با استفاده از یک کیت سنتز cDNA Exiqon ، دانمارک (طبق دستورالعمل های سازنده) انجام شد. با استفاده از پروتکل‌های استاندارد با سیستم Rotor-Gene 6000 در سه نسخه (Corbett Life Science Mortlake) به طور خلاصه، در حجم کل ۱۰ میکرولیتر ، ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر cDNA به یک ترکیب اصلی اضافه شد شامل ۱۰ µl / pmol از هر پرایمر و ۵ میلی لیتر premix ExTag SYBR از کیت (Kusatsu, TaKaRa II) استان شیگا، ژاپن استفاده شد. برنامه برای اجرا به شرح زیر تنظیم شد: ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۱۵ دقیقه و ۴۰ چرخه ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه واکنش PCR بررسی شد.

روش و سترن بلات: سلول‌ها در بافر لیز کننده قرار گرفته و لیز شدند (با مهار کننده‌های پروتئاز PMSF) مقادیر مساوی پروتئین جدا شد توسط SDS-PAGE با ۵٪- ۱۲٪ ژل تریس-گلیسین (Invitrogen) و تحت آزمایش استاندارد و سترن قرار گرفت تحلیل و بررسی وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی های پروتئین و ژنی انجام شد (۱: ۱۰۰۰ رقت) (Can Ag، سوئد)، آنزیم ضد HRP رقت ۱: ۲۰۰۰ ؛ Can Ag، سوئد) در زمانی که با آنتی بادی های ثانویه متصل به (HRP واکنش رقت ۱: ۳۰۰۰؛ آبکم، ایالات متحده) واکنش نشان داد. سرانجام، رنگ امیزی‌ها با استفاده از سیستم ECL Western Blotting (Amersham Life Detection Arlington Heights) ساخته شدند. پروتئین GAPDH به عنوان یک کنترل داخلی استفاده شد.

تجزیه وتحلیل آماری: جهت تعیین اثر در یافت روغن سرخ شده عمیق، گروه کنترل سالم و گروه کنترل-روغن سرخ شده عمیق با استفاده از آزمون t مستقل مورد مقایسه قرار گرفتند. جهت تعیین اثر اصلی تمرین، اثر اصلی اکتاپامین و تعامل تمرین و اکتاپامین ازتحلیل دو راهه واریانس استفاده شد در صورت وجود تفاوت معنادار، جهت تعیین محل تفاوت از آزمون تعقیبی بن فرونی استفاده شد. کمی سازی بیان ژن مورد نظر توسط فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ و مقادیر تغییرات چند برابری محاسبه شد. اطلاعات در جداول و اشکال بر اساس میانگین و انحراف استاندار گزارش شد. سطح معنا داری $P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام گردید.

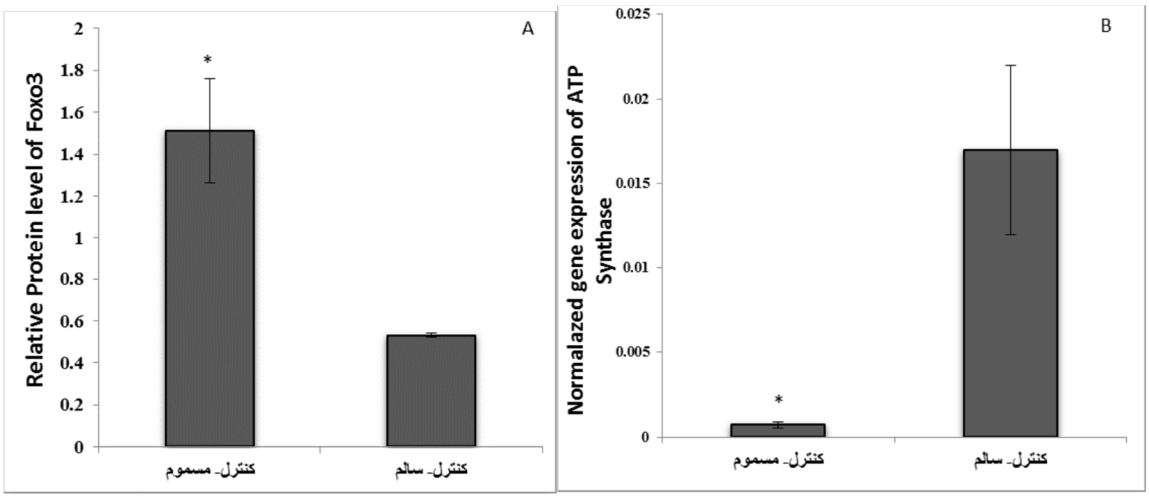
یافته‌ها

جهت تعیین اثر دریافت روغن سرخ شده عمیق،

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-05-30]

گروه کنترل سالم و گروه کنترل+روغن سرخ شده عمیق (کنترل مسموم) از آزمون t مستقل استفاده شد. نتایج نشـــان داد مقادیر $FOXO_3$ در گروه دریافت روغن به صـورت معناداری نسـبت به گروه کنترل سـالم افزایش دا شته ا ست (P=۰/۰۰۱). مقادیر ATP سنتاز در گروه کنترل مســموم نســبت به گروه کنترل ســالم کاهش معناداری داشت (P=۰/۰۰۱) (شکل۱ بخشA و B).

نســبت به گروه کنترل که مکمل و تمرین دریافت نکرده بودنـد، تمرین موجـب کـاهش معنـا دار بیـان پروتئین $FOXO_3$ در گروه تمرین شـــد (P=۰/۰۰۵). در یا فت مک مل اک تا پامین نیز کاهش مع نادار ب یان پروتئین $FOXO_3$ را به همراه داشـــت (P=۰/۰۰۱). ترکیب تمرین و مکمل نیز نسـبت به گروه کنترل معنی دار بود (P=۰/۰۰۱). با وجود آنکه کمترین بیان پروتئین $FOXO_3$ در گروه تمرین و و مکمل اکتاپامین مشـــاهده شد، اما تعامل این دو مداخله از نظر آماری معنادار نبود (P=۰/۱۵۹). (شـکل۲ بخش A و جدول ۱). نسـبت به گروه کنترل که مکمل و تمرین در یافت نکرده بودند، تمرین موجب افزایش معنادار بیان ژن ATP Synthase شد (P=۰/۰۱۲). دریافت مکمل اکتاپامین نیز افزایش معنادار بیان ژن ATP Synthase را به همراه داشـــت (P=۰/۰۰۱). ترکیب تمرین و مکمل نیز نسبت به گروه کنترل معنی دار بود (P=۰/۰۰۱). با وجوداینکه بیشترین میزان بیان ژن ATP Synthase مربوط به گروه تمرین و مکمل اکتاپامین بود، ولی تعامل تمرین و اکتاپامین بربیان این ژن از نظر آماری معنا دار نبود (P=۰/۰۷۱). (شکل ۲ بخش B و جدول ۱).

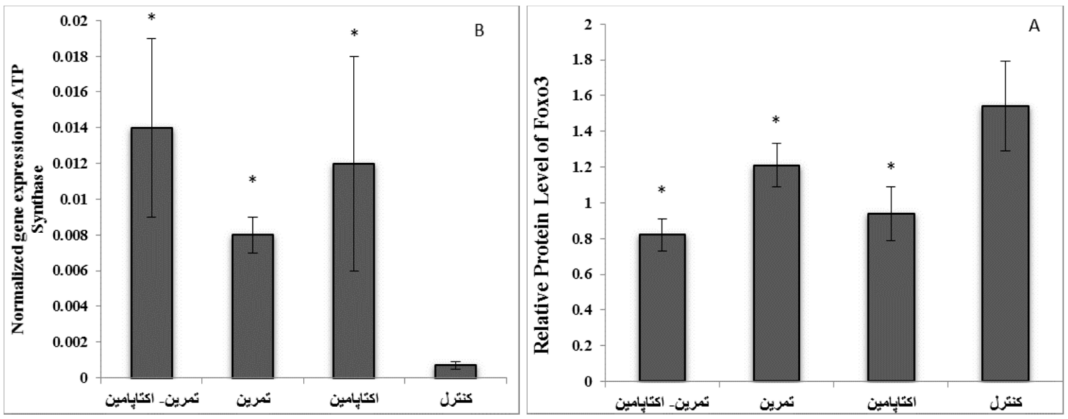


شکل ۱- مقایسه بیان پروتئین FOXO3 (بخش A) و بیان ژن ATP Synthase (بخش B) بین گروه کنترل سالم و کنترل مسموم.
*نشانه تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل- سالم. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استانداردگزارش شده است.

جدول ۱- اثر متقابل دو عامل تمرین و مکمل در پروتئین $FOXO_3$ و ATP Synthase آمده است.

آماره	منبع تغییر	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	اندازه اثر	سطح معنی‌داری
$FOXO_3$	اثر مکمل	۰/۳۰	۱	۰/۳۰	۵۰/۵۹۲	۰/۷۱۷	۰/۰۰۱
	اثر تمرین	۱/۴۸	۱	۱/۴۸	۱۰/۲۲۷	۰/۳۳۸	۰/۰۰۵
	اثر متقابل مکمل*تمرین	۰/۰۶	۱	۰/۰۶	۲/۱۳۵	۰/۰۹۶	۰/۱۵۹
ATP Synthase	اثر مکمل	۰/۰۰۱	۱	۰/۰۰۱	۲۷/۷۰۷	۰/۵۸۱	۰/۰۰۱
	اثر تمرین	۰/۰۰۱	۱	۰/۰۰۱	۷/۶۰۹	۰/۲۷۶	۰/۰۱۲
	اثر متقابل مکمل*تمرین	۶/۲۶	۱	۶/۲۶	۳/۶۳۵	۰/۱۵۴	۰/۰۷۱

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-05-30]



شکل ۲- بیان پروتئین $FOXO_3$ (بخش A) و بیان ژن ATP Synthase (بخش B) در گروه‌های مورد مطالعه.
*نشانه تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استانداردگزارش شده است.

بحث

هدف از این پژوهش بررسی تاثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر پروتئین $FOXO_3$ و بیان ژن ATP Synthase در عضلات قلب موش‌های تغذیه شده با روغن‌های سرخ شده عمیق بود. یافته‌های آماری نشان داد در اثر مسمومیت رت‌ها با روغن حرارت دیده عمیق غلظت پروتئین $FOXO_3$ به طور معناداری افزایش یافت. تمرین و مکمل اکتاپامین به صورت جداگانه موجب کاهش معنادار پروتئین $FOXO_3$ شدند. با وجود آنکه کمترین غلظت پروتئین $FOXO_3$ درگروه تمرین و اکتاپامین مشاهده شد، اما اثر تعاملی این دو متغیر معنادار نبود که بدین معناست که در ترکیب این دو عامل بر هم هیچ یک از عوامل بر معنادار شدن عامل دیگر موثر نیست. همچنین تمرین و مکمل اکتاپامین به صورت جداگانه موجب افزایش معنادار مقادیر ژنی ATP Synthase شدند؛ اما اثر تعاملی عامل تمرین و مکمل در تغییرات ژنی ATP Synthase معنادار نبود. همسو با نتایج این تحقیق Zeng و همکاران (۲۰۲۰)، در پژوهشی تأثیر تمرینات استقامتی بر غلظت پروتئین $FOXO_3$ نشان دادند که فعالیت ورزشی استقامتی با شدت متوسط سبب کاهش میزان این پروتئین و در نتیجه، کاهش میزان حجم سلول‌ها می‌شود (۱۳). صدری و همکاران (۲۰۲۰)، در پژوهش خود نشان دادند، تمرین تداومی می‌تواند آسیب ناشی از فاکتورهای رونویسی $FOXO_3$ را کنترل کند و در اتوفاژی و آتروفی عضلانی نقش موثر ایفا کند (۱۹). به صورت خاص مطالعه‌ی Ferreira و همکارانش (۲۰۱۴) که یک دوره طولانی تمرین هوازی با شدت متوسط را بر روی تغییرات سطوح پروتئینی آنزیم ها و فسفوپروتئوم میتوکندری قلب گروهی از موش‌ها انجام دادند، حاکی از افزایش سطوح ATP سنتاز بر اثر تمرینات بود که با نتایج مطالعه‌ی حاضر همسو می‌باشد(۸).

گزارش شده است تمرین ورزشی در شدت‌های متوسط می‌تواند از طریق تعدیل پروتئین‌های خانواده FOX انفارکتوس میوکارد را در حین آسیب سلولی میوکارد در موش‌ها کاهش دهد، عملکرد قلب و عروق را تقویت کند، اتوفاژی و ترویج تخریب پروتئین‌های آسیب دیده را بهبود دهد (۷، ۱۴، ۲۰) از آنجایی که مصرف روغن‌های چندبار حرارت دیده به مدت ۵ هفته موجب افزایش التهاب در بافت قلبی می‌گردد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف اکتاپامین به عنوان یک عامل لیپولیتیک احتمالا بر روی سلول‌های چربی موش عمل می‌کند و قابل تصور است که اکتاپامین برای افزایش سرعت تکثیر و رشد سلولهای بنیادی موثر است و برخی اثرات نورآدر نالین و آدر نالین را تقلید کند (۲۱). در تحقیق حاضر نیز مصرف اکتاپامین موجب کاهش غلظت پروتئین $FOXO_3$ شد، این پاسخ احتمالاً به تاثیرگذاری مثبت و آنتی اکسیدانی، اثرات ضدالتهابی، کاهش وزن، چربی‌سوزی و ضد سرطان اکتاپامین اشاره می‌کند که توانسته است در سلول‌های آسیب دیده بر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-05-30]

اثر مسمومیت با روغن حرارت دیده عمل کند و تخریبات ناشی از DFO را کنترل نماید. نتایج پژوهش حاضر نشان داد در اثر مسمومیت با روغن حرارت دیده عمیق غلظت ATP synthase به طور معناداری کاهش یافت و تمرین هوازی موجب افزایش بیان ژن ATP synthase شد. Chung و همکاران (۲۰۱۷)، Mi-Hyun و همکاران (۲۰۲۰)، Holwerda و همکاران (۲۰۲۰)، بیان کردند تمرینات منظم ورزشی از اختلال عملکرد میتوکندری و آپوپتوز ناشی از میتوکندری در عضلات قلب جلوگیری می‌کند (۱۲، ۲۲، ۲۳). اخیرا پژوهش کاظمی و همکاران (۱۳۹۹)، که نتایجی همسو با مطالعه‌ی حاضر داشتند نشان داد مصرف اکتاپامین همراه با تمرین ورزشی به مدت ۴ هفته قادر به کنترل اینفلامازوم و کاهش آپوپتوز و بهبود ظرفیت احیای سلول‌های قلبی در مدل اختلالات تغذیه‌ای ناشی از DFO است (۱۶). Holwerda و همکاران (۲۰۲۰)، نیز نشان دادند، تمرین و فعالیت‌های بدنی میزان سنتز پروتئین میتوکندریایی عضله را افزایش می‌دهد (۲۳).

در اثر مسمومیت DFO بیان ژن‌های مرتبط با بیوژنز میتوکندریایی بطور معناداری کاهش می‌یابد و روغن‌های سوخته منجر به آپوپتوز از طریق مسیرهای گیرنده میتوکندری می‌شود (۲، ۳، ۱۶). Doria و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش کردند که در طول ایسکمی و خونرسانی مجدد، میتوکندری بازیگران اصلی در مرگ سلول، بلکه در بقای سلول هستند و تمرینات ورزشی می‌توانند عملکرد میتوکندری را تحت تأثیر قرار دهند (۲۴). قلب از کار افتاده ناشی از کمبود انرژی قلب است و از آنجا که میتوکندری اندام اصلی تولید انرژی در بافت عضلانی است، اختلال در عملکرد میتوکندریایی با مرگ سلولی و در نتیجه کاهش طول عمر ارتباط نزدیکی دارد، احتمالاً در ایجاد و توسعه سارکوپنی (کاهش شدید توده عضلانی) از طریق کاهش ذخایر انرژی و آپوپتوز با واسطه میتوکندریایی نقش دارد (۱۳، ۲۳، ۲۵).

نتیجه‌گیری

اگر با اقداماتی مانند تمرینات ورزشی بتوان بیان ژن ژن‌های مرتبط در بهبود تامین انرژی و موثر در عملکرد قلبی را افزایش داد و میزان تولید ROS را کاهش داد، در نتیجه می‌توان با ترمیم کاردیومیوسیت‌ها و بهبود سیستم دفاع ضد اکسایشی نیز به افزایش ATP synthase رسید.

از محدودیت‌های مطالعه‌ی حاضر می‌توان به عدم دسترسی به نمونه های انسانی و نیز عدم سنجش سنتز پروتئین از سایر فاکتورهای مرتبط با آبشار بیوژنز میتوکندریایی میوکارد به دلیل کمبود بودجه پژوهش اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی به بررسی اثر مکمل و ورزش و نیز هر دو آن در طولانی مدت مورد ارزیابی قرار گیرد و روش‌های تمرینی دیگر نیز ارزیابی شود. همچنین پیشنهاد می‌شود به بررسی سایر پروتئین‌های مرتبط با بیوژنز میتوکندریایی و سیستم دفاع ضداکسایشی پرداخته شود. با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد تمرین هوازی و اکتاپامین می‌تواند اثرات مخرب روغن های حرارت دیده عمیق را کاهش دهد. احتمالا اکتاپامین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان و تمرین هوازی نقش بسیار مهمی در تنظیم اتوفاژی و عملکرد میتوکندری ایفا می‌کند پس ورزش می‌تواند فرآیندی کلیدی در سازوکارهای سلولی و مولکولی باشد.

تقدیر و تشکر

از کمیته اخلاق دانشگاه ازاد اسلامی واحد کرج جهت بررسی استانداردهای اخلاقی این تحقیق، تشکر می گردد.

References

1. Honerlaw JP, Ho YL, Nguyen XMT, Cho K, Vassy JL, Gagnon DR, et al. Fried food consumption and risk of coronary artery disease: The Million Veteran Program. Clin Nutr. 2020;39(4):1203-8.
2. Dobarganes C, Márquez-Ruiz G. Possible adverse effects of frying with vegetable oils. Br J Nutr. 2015;113(S2):S49-S57.
3. Venkata RP, Subramanyam R. Evaluation of the deleterious health effects of consumption of repeatedly heated vegetable oil. Toxicol Rep. 2016;3:636-43.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-05-30]

4. Sirangelo I, Sapio L, Ragone A, Naviglio S, Iannuzzi C, Barone D, et al. Vanillin prevents doxorubicin-induced apoptosis and oxidative stress in rat H9c2 cardiomyocytes. Nutrients. 2020;12(8):2317.
5. Angelova PR, Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. FEBS Lett. 2018;592(5):692-702.
6. Li L, Kang H, Zhang Q, D'Agati VD, Al-Awqati Q, Lin F. FoxO3 activation in hypoxic tubules prevents chronic kidney disease. J Clin Invest. 2019;129(6):2374-89.
7. Jokar M, Sherafati Moghadam M, Daryanoosh F. The Effect of an 8-Week Endurance Training Program on the Content of FOXO3a and Beclin-1 Proteins in Heart Muscle of Rats with Type 2 Diabetes. J Qazvin Univ Med Sci. 2020;23(6):484-93.
8. Ferreira R, Vitorino R, Padrão AI, Espadas G, Mancuso FM, Moreira-Gonçalves D, et al. Lifelong exercise training modulates cardiac mitochondrial phosphoproteome in rats. J Proteome Res. 2014;13(4):2045-55.
9. Long Q, Yang K, Yang Q. Regulation of mitochondrial ATP synthase in cardiac pathophysiology. Am J Cardiovasc Dis. 2015;5(1):19.
10. Taub PR, Ramirez-Sanchez I, Ciaraldi TP, Gonzalez-Basurto S, Coral-Vazquez R, Perkins G, et al. Perturbations in skeletal muscle sarcomere structure in patients with heart failure and Type 2 diabetes: Restorative effects of (−)-epicatechinrich cocoa. Clin Sci. 2013;125(8):383-9.
11. Koh JH, Hancock CR, Han D-H, Holloszy JO, Nair KS, Dasari S. AMPK and PPARβ positive feedback loop regulates endurance exercise training-mediated GLUT4 expression in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019;316(5):E931-E9.
12. No MH, Heo JW, Yoo SZ, Kim CJ, Park DH, Kang J-H, et al. Effects of aging and exercise training on mitochondrial function and apoptosis in the rat heart. Pflügers Archiv-European J Physiol. 2020;472(2):179-93.
13. Zeng Z, Liang J, Wu L, Zhang H, Lv J, Chen N. Exercise-Induced Autophagy Suppresses Sarcopenia Through Akt/mTOR and Akt/FoxO3a Signal Pathways and AMPK-Mediated Mitochondrial Quality Control. Front Physiol. 2020;11.
14. Kavazis AN, Smuder AJ, Powers SK. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. J Appl Physiol. 2014;117(3):223-30.
15. Marfe G, Manzi V, Tafani M, Pucci B, Gambacurta A, Russo M, et al. The modulation of sirtuins and apoptotic proteins in rats after exhaustive exercise. Open J Mol Integr Physiol. 2012.
16. Peeri M, Azarbayjani MA. The effect of endurance exercise training and octopamine supplementation on nlrp1 inflammasome, pi3k, apoptosis, and histopathological changes in heart tissue of rats poisoned with deep-fried oil. Stud Med Sci. 2020;31(9):667-79.
17. Qu Y, Yang J, Chen S. Synthesis of octopamine derivatives and investigation of their antioxidation activities. Chin J Mar Drugs. 2012;3:006.
18. Farooqui T. Octopamine-mediated neuromodulation of insect senses. Neurochem Res. 2007;32(9):1511-29.
19. Sadri S, Sharifi G, Dehkordi KJ. Effects of high intensity interval training (up & downward running) with BCAA/nano chitosan on Foxo3 and SMAD soleus muscles of aging rat. Life Sci. 2020;252:117641.
20. Khalesi M, Mirdar S, Samadi A. Effect of a period of swimming exercise on sirt1 and foxo3a genes expression in lung tissue of wistar rats. J Sabzevar Univ Med Sci. 2018.
21. De Oliveira AL, De Paula MN, Comar JF, Vilela VR, Peralta RM, Bracht A. Adrenergic metabolic and hemodynamic effects of octopamine in the liver. iNT J MOL SCI. 2013;14(11):21858-72.
22. Holwerda AM, Bouwman FG, Nabben M, Wang P, Van Kranenburg J, Gijsen AP, et al. Endurance-type exercise increases bulk and individual mitochondrial protein synthesis rates in rats. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2020;30(2):153-64.
23. Chung N, Park J, Lim K. The effects of exercise and cold exposure on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle and white adipose tissue. J Exerc Nutr Biochem. 2017;21(2):39.
24. Boulghobra D, Coste F, Geny B, Reboul C. Exercise training protects the heart against ischemia-reperfusion injury: A central role for mitochondria? Free Rad Biol Med. 2020.
25. Zorov DB, Filburn CR, Klotz L-O, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (Ros-Induced) Ros release: A new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. J Experim Med. 2000;192(7):1001-14.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-05-30]