



## اثر تعامل تمرین هوازی با شدت متوسط و اوژنول بر بیان ژن *claudin* و *occludin* در بافت قلب رت‌های مسموم شده با کلرپیریفوس

صبا الماسی: دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران  
 محمدعلی آذربایجانی: استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران (\* نویسنده مسئول) [azarbayjani@iauctb.ac.ir](mailto:azarbayjani@iauctb.ac.ir)  
 مقصود پیری: استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

تمرین هوازی با شدت متوسط،  
 استرس اکسیداتیو،

*claudin*  
*occludin*

**زمینه و هدف:** اتصالات محکم، ساختارهای پویایی هستند که عبور یون‌ها و مولکول‌ها را در بافت قلب تنظیم می‌کنند. هدف از مطالعه‌ی حاضر، تعیین تأثیر تعامل تمرین هوازی با شدت متوسط و اوژنول بر بیان ژن *claudin* و *occludin* در بافت قلب رت‌های مسموم شده با کلرپیریفوس بود.

**روش کار:** ۴۰ سر رت نر ویستار با میانگین وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم و سن ۸ هفته به‌طور تصادفی به ۵ گروه ( $n=8$ ) کنترل سالم، کنترل مسموم (کلرپیریفوس)، تمرین هوازی با شدت متوسط + کلرپیریفوس، اوژنول + کلرپیریفوس و تمرین هوازی با شدت متوسط + اوژنول + کلرپیریفوس تقسیم شدند. تزریق درون صفاقی ۳ ml/kg کلرپیریفوس و گاواژ ۲۵۰ mg/kg مکمل اوژنول، به ترتیب به مدت ۶ هفته و ۴ هفته و هر دو پنج بار در هفته انجام شدند. پروتکل تمرین هوازی شامل ۴ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط و ۵ جلسه در هفته بود. در اولین جلسه‌ی تمرین، سرعت از ۱۱ m/s و مدت زمان ۱۰ دقیقه دویدن بر روی تردمیل شروع شد، به تدریج سرعت و مدت تمرین در طول اجرای پروتکل تمرین افزایش یافت و در جلسه‌ی آخر سرعت به ۲۰ m/s و مدت زمان ۲۶ دقیقه رسید. بیان ژن *claudin* و *occludin* توسط RT& PCR اندازه‌گیری شدند. از آزمون‌های تی مستقل، تحلیل واریانس دو سویه و آزمون تعقیبی توکی جهت تحلیل داده‌ها استفاده گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد، تمرین هوازی با شدت متوسط باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *occludin* ( $p=0/001$ ) و *claudin* ( $p=0/001$ ) در مقایسه با گروه کنترل مسموم شد. اوژنول باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *occludin* ( $p=0/001$ ) شد در حالی که اثرش بر بیان ژن *occludin* معنی‌دار نبود ( $p=0/391$ ). تعامل تمرین هوازی با شدت متوسط و اوژنول باعث افزایش غیر معنی‌دار بیان ژن *occludin* ( $p=0/720$ ) و *claudin* ( $p=0/973$ )، در مقایسه با گروه کنترل مسموم شد. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد، تمرین هوازی با شدت متوسط و اوژنول از طریق ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خود می‌توانند بر بیان ژن‌های درگیر در اتصالات محکم بافت قلب موثر باشند.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Almasi S, Azarbayjani MA, Peeri M. Interaction effect of moderate intensity aerobic training and eugenol on gene expression of *claudin* and *occludin* of cardiac tissue of male rats poisoned with chlorpyrifos. Razi J Med Sci. 2021;27(12):142-151.

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



## Original Article

## Interaction effect of moderate intensity aerobic training and eugenol on gene expression of *claudin* and *occludin* of cardiac tissue of male rats poisoned with chlorpyrifos

**Saba Almasi:** PhD candidate, Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University, Central Branch, Tehran, Iran

**Mohammad Ali Azarbayjani:** Professor, Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University, Central Branch, Tehran, Iran (\* Corresponding author) [m\\_azarbayjani@iauctb.ac.ir](mailto:m_azarbayjani@iauctb.ac.ir)

**Maghsoud Peeri:** Professor, Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University, Central Branch, Tehran, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** Insecticides are a very important group of environmental pollutants and their greatest use is in agriculture to protect against diseases and pests, and to improve the quality of crops (1). The use of pesticides and their potential to enter the human diet has raised many concerns for researchers. Organophosphoruses are toxic compounds that people are constantly exposed to in varying concentrations, and its dangers include cancer. Chlorpyrifos is a type of organophosphorus that is widely used as an insecticide in the world. The results of studies have shown that chlorpyrifos has detrimental effects on various organs including the immune system, reproductive system, liver, biochemical and blood parameters. These studies also showed that this toxin increases oxidative stress in various tissues such as liver and kidneys. The role of oxidative stress in cardiovascular disease, Alzheimer's, diabetes, and damage to tight junction has been confirmed. Tight junction proteins, as one of the important structural components, are essential for regulating the passage of ions and molecules in the heart. Claudin and occludin are the first densely integral membrane proteins in the blood barrier and have similar topography and function interactively with each other. The permeability of the junction and the function of the epithelial barrier are primarily caused by the claudins, and the types of claudin isoforms are expressed there and determine the specific properties of the tissue. Occludin and claudin are both reduced by oxidative stress. As mentioned, the use of agricultural pesticides such as chlorpyrifos causes oxidative stress in the body. Therefore, it seems necessary to use a method that can protect against the effects of oxidative stress and the side effects of this toxin. Eugenol or 4-allyl-2-methoxyphenol is an aromatic molecule found in the oils and essential oils of various plants, including clove and cinnamon. Various studies have shown that natural antioxidants with phenolic structure play an important role in protecting body tissues against free radicals. Based on the evidence presented, eugenol has been shown to have an important protective effect against free radical lipid peroxidation (12) and its anti-inflammatory effect has been confirmed. Today, the use of exercise in increasing cardiovascular fitness and physical fitness, improving oxidative stress and vascular tissue has been approved. The aim of this study was to explain the effect of the interaction of moderate-intensity aerobic training and eugenol on the gene expression of occludin and claudin of the cardiac tissue of rats poisoned with chlorpyrifos

**Methods:** 40 male Wistar rats were randomly divided into 5 groups (n = 8): healthy

### Keywords

Moderate intensity aerobic training, Stress oxidative, *claudin*, *occludin*

Received: 31/10/2020

Published: 09/03/2021

control, poisoned control (chlorpyrifos), moderate intensity aerobic training + chlorpyrifos, eugenol + chlorpyrifos and moderate intensity aerobic training + eugenol + chlorpyrifos. Intraperitoneal injection of 3 ml / kg chlorpyrifos and gavage of 250 ml / kg eugenol supplement were performed five times a week for 6 weeks and 4 weeks, respectively. In order to adapt, rats in the aerobic training group ran for 20 minutes at 9m/min speed for two weeks before starting the main training protocol. The aerobic training protocol consisted of 4 weeks of moderate-intensity aerobic training, 5 sessions per week running on a treadmill. Each training session consisted of 5 minutes of warm-up, 10-26 minutes of moderate-intensity aerobic training (starting at 11 m / s in the first session and reaching 20 m / s in the last session) and 5 minutes of cooling. Gene expression of claudin and occludin were measured by Real time-PCR. Independent t-test, Two-way ANOVA and Tukey post hoc test were used to analysis the data.

**Results:** The results showed that the moderate-intensity aerobic training and eugenol caused significant increase in gene expression of occludin ( $p=0.001$ ) and claudin ( $p=0.001$ ) compared to Poisoned control group. eugenol caused significant increase in gene expression of occludin ( $p=0.001$ ) whereas its effect was not significant on occludin gene expression ( $p=0.391$ ). Interaction effect of moderate-intensity aerobic training and eugenol caused the non significant increase in claudin ( $p=0.973$ ) and occludin ( $p=0.720$ ) gene expression in comparison with Poisoned control group.

**Conclusion:** Chlorpyrifos toxin increases oxidative stress in various tissues of the body and since oxidative stress affects the expression of claudin and occludin, it significantly reduces the expression of their genes in the blood barrier. However, moderate-intensity aerobic training and eugenol supplementation alone, possibly relying on their antioxidant and anti-inflammatory properties by increasing the activity of antioxidants such as SOD and catalase, reducing lipid peroxidation, activating and increasing ERK1 / 2, and MAPK, decreasing TNF- $\alpha$ , and decreasing beta-amyloid induced the increase the expression of claudin and occludin genes. The results of the present study showed that the interaction of moderate-intensity aerobic training and eugenol did not have a significant effect on the expression of claudin and occludin genes, but what is important is the increase compared to the poisoned control group, and physiologically this change is considered a feat, although the precise mechanism of insignificance cannot be clearly explained. In general, it seems that moderate-intensity aerobic training and eugenol can affect tight junctions.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Almasi S, Azarbayjani MA, Peeri M. Interaction effect of moderate intensity aerobic training and eugenol on gene expression of *claudin* and *occludin* of cardiac tissue of male rats poisoned with chlorpyrifos. Razi J Med Sci. 2021;27(12):142-151.

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

## مقدمه

حشره‌کش‌ها گروه بسیار مهمی از آلاینده‌های محیط زیست هستند و بیشترین کاربردشان در کشاورزی جهت محافظت در برابر بیماری‌ها و آفات و بهبود کیفیت محصولات است (۱). استفاده از آفت‌کش و احتمال وارد شدن آن‌ها به رژیم غذایی انسان‌ها، نگرانی‌های بسیاری را برای پژوهشگران به وجود آورده است. ارگانوفسفرها ترکیبات سمی هستند که به‌طور مداوم افراد در معرض غلظت‌های مختلف از آن هستند و از خطرات آن می‌توان به سرطان اشاره کرد (۲). کلرپیریفوس نوعی از ارگانوفسفرها می‌باشد که به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان حشره‌کش در جهان استفاده می‌شود (۲). نتایج حاصل از مطالعات نشان داده است، کلرپیریفوس اثرات زینباری بر روی ارگان‌های مختلف از جمله سیستم ایمنی (۳)، دستگاه تولید و مثل (۲)، کبد (۴) پارامترهای بیوشیمیایی و خونی دارد. همچنین این مطالعات نشان دادند که این سم باعث افزایش استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف مانند کبد و کلیه می‌گردد (۵). استرس اکسیداتیو با عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌شود. نقش استرس اکسیداتیو در بیماری‌های قلبی و عروقی، آلزایمر، دیابت و سرطان ثابت شده است (۶).

در پژوهش‌های صورت گرفته، یکی از دلایل بیماری‌های قلبی، اختلال در اتصالات محکم (Tight junction) بافت قلبی می‌باشد (۷) که استرس اکسیداتیو نیز در به وجود آمدن این اختلال نقش دارد (۸، ۹). اتصالات محکم، عبور یون‌ها و مولکول‌ها را از طریق مسیر سلول‌ها در سلول‌های اپیتلیال و اندوتلیال تنظیم می‌کنند و در واقع به‌عنوان یک مانع اولیه برای انتشار املاح از طریق فضای داخل سلولی عمل می‌کنند. اتصالات محکم، ساختارهای پویایی هستند که درجه‌بندی نفوذپذیری‌شان بر اساس شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی متفاوت می‌باشند (۱۰). اتصالات محکم بیشتر در سلول‌های پوششی در اولین اتصال غشای سلولی از رأس سلول وجود دارد. در این نوع پیوستگی، فضای بین سلولی مسدود است، بنابراین غشاهای دو سلول مجاور به هم می‌چسبند و به‌طور تقریبی هیچ فضای بین سلولی باقی نمی‌ماند (۱۱). وجود پروتئین‌های اتصالات محکم به‌عنوان یکی از اجزا

ساختاری مهم در بافت قلب ضروری می‌باشد. مهم‌ترین پروتئین‌های اتصالات محکم claudin و occludin می‌باشد. claudin و occludin اولین پروتئین‌های غشای متراکم پیوسته هستند و توپوگرافی و عملکردی مشابه با هم دارند و در تعامل با یکدیگر عمل می‌کنند (۱۱). نفوذپذیری محل اتصال و عملکرد سد اپیتلیال در درجه اول توسط claudin ها ایجاد می‌شود و انواع ایزوفرم های claudin در آنجا بیان می‌شوند و ویژگی‌های خاص بافت را برای نفوذپذیری نسبت به یون‌ها و مولکول‌های دیگر تعیین می‌کنند (۱۲). occludin نیز یک پروتئین غشایی پیوسته می‌باشد که در محل اتصالات محکم واقع شده است (۱۳). occludin و claudin هر دو بر اثر استرس اکسیداتیو کاهش می‌یابند (۸). همچنین اختلال در پروتئین‌های اتصالات محکم می‌تواند با وقوع و پیشرفت سرطان نقش داشته باشد. در سرطان چسبندگی سلول و اتصالات سلولی از بین می‌روند و سلول‌های اپی تلیال به سلول‌های مزانشیال که دارای قدرت تحرک زیاد می‌باشند، تبدیل می‌شوند. بر اساس نتایج مطالعه‌ای، خاموشی ژن claudin در موش‌ها، باعث اختلال در یکپارچگی اتصالات محکم سد اپیتلیالی و سرانجام مرگ سلول‌های زاید شد (۱۴). همه‌ی این گزارش‌ها، گویای اهمیت اتصالات محکم در بافت‌های بدن و نقش آن‌ها در بیماری‌های مختلف می‌باشد.

همان‌طور که بیان شد، استفاده از سموم کشاورزی از جمله کلرپیریفوس موجب استرس اکسیداتیو و التهاب در بدن می‌شود (۱۵). بنابراین بکار بردن روشی که بتواند از اثرات اکسیداتیوی و التهابی عوارض این سم محافظت کند، ضروری به نظر می‌رسد. اوژنول یا 4-allyl-2-methoxyphenol مولکولی آروماتیک است که در روغن‌ها و اسانس گیاهان مختلف از جمله میخک و دارچین یافت می‌شود. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی دارای ساختار فنولی نقش مهمی در حفاظت بافت‌های بدن بر علیه رادیکال‌های آزاد دارند. بر اساس مدارک ارائه شده اوژنول اثر محافظت‌کنندگی مهمی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از رادیکال‌های آزاد دارد (۱۶) و اثر ضد التهابی آن نیز تایید شده است. در همین ارتباط ناگابابو و همکاران (۲۰۱۰)، گزارش کرده‌اند که اثرات

شدت متوسط، قبل از شروع برنامه اصلی تمرینی، دو هفته به اجرای دویدن با سرعت 9m/min به مدت 20 دقیقه پرداختند. تمرین هوازی با شدت متوسط، شامل 4 هفته، 5 جلسه در هفته و هر جلسه تمرین شامل 5 دقیقه گرم کردن، 20 دقیقه تمرین هوازی با شدت متوسط و 5 دقیقه سرد کردن بود. در اولین جلسه تمرین، سرعت از 11 m/s و مدت زمان 10 دقیقه شروع شد، به تدریج سرعت و مدت تمرین در طول اجرای پروتکل تمرین افزایش یافت و در روز آخر سرعت به 20 m/s و مدت زمان 26 دقیقه رسید (15). رت‌ها 48 ساعت پس از آخرین مداخله با حداقل 8 ساعت ناشتایی با محلول کلروفورم بیهوش شدند و سپس قربانی شدند. بافت قلب به سرعت از بدن خارج شد و پس از شستشو با محلول بافر فسفات سالین داخل تانک ازت قرار داده شده و در دمای 80- درجه نگهداری شد.

برای بررسی بیان ژن claudin و occludin در هر گروه بررسی بافت‌ها از تکنیک Real Time & PCR استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس cDNA از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت.

**روش آماری:** از آزمون شاپیرو ویلک برای بررسی توزیع نرمال داده‌ها استفاده گردید. جهت بررسی تفاوت میانگین گروه‌ها از آزمون تی مستقل و تحلیل واریانس دو سویه (Two Way ANOVA) و جهت تعیین محل تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. سطح معنی داری برای تمام محاسبات  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

نتایج آزمون تی مستقل، تفاوت معنی داری در بیان ژن occludin بین گروه کنترل سالم و مسموم شده با سم کلرپیریفوس نشان داد ( $P=0.001$ ). در اثر مسمومیت با سم کلرپیریفوس، بیان ژن occludin به طور معنی داری کاهش یافت. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس دوره مشخص شد، تمرین هوازی اثر معنی داری بر بیان ژن occludin

آنتی‌اکسیدانی اوژنول 5 برابر قوی‌تر از ویتامین E بوده و استفاده از آن موجب مهار پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (17). امروزه استفاده از تمرینات ورزشی در افزایش آمادگی قلبی-عروقی و آمادگی جسمانی، بهبود استرس اکسیداتیو و فعالیت عصبی تایید شده است (18). با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با تأثیر تمرین ورزشی و تعامل آن با مکمل اوژنول بر بیان ژن متغیرهای occludin و claudin بافت قلب انجام نشده و همچنین افزایش استفاده از سموم کشاورزی در تولید محصولات غذایی، این سؤال پیش می‌آید که آیا تعامل تمرین هوازی با شدت متوسط و اوژنول تأثیری بر بیان ژن occludin و claudin در بافت قلب رت‌های مسموم شده با کلرپیریفوس دارد؟

### روش کار

در یک مطالعه تجربی-آزمایشگاهی، 40 سر رت نر نژاد ویستار بالغ با میانگین وزن 180 تا 220 گرم و سن 8 هفته خریداری شدند. همه رت‌ها در دمای 3 ± 23 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 10% ± 55 درصد و تحت چرخه روشنایی و تاریکی 12:12 ساعت بدون محدودیت در آب و غذا، در قفس‌های پلی‌کربنات (3 رت در هر قفس) نگهداری شدند. سپس رت‌ها به‌طور تصادفی به 5 گروه کنترل سالم (n=8)، گروه کنترل مسموم (n=8)، گروه تمرین + کلرپیریفوس (n=8)، گروه اوژنول + کلرپیریفوس (n=8)، گروه تمرین + اوژنول + کلرپیریفوس (n=8) تقسیم شدند. مطالعه با رعایت مسائل اخلاقی رفتار با حیوانات و تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی انجام شد. مطالعه حاضر با رعایت مسائل اخلاقی رفتار با حیوانات و مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد گچساران با کد IR.IAU.IAUG.REC.1399.006 انجام شد.

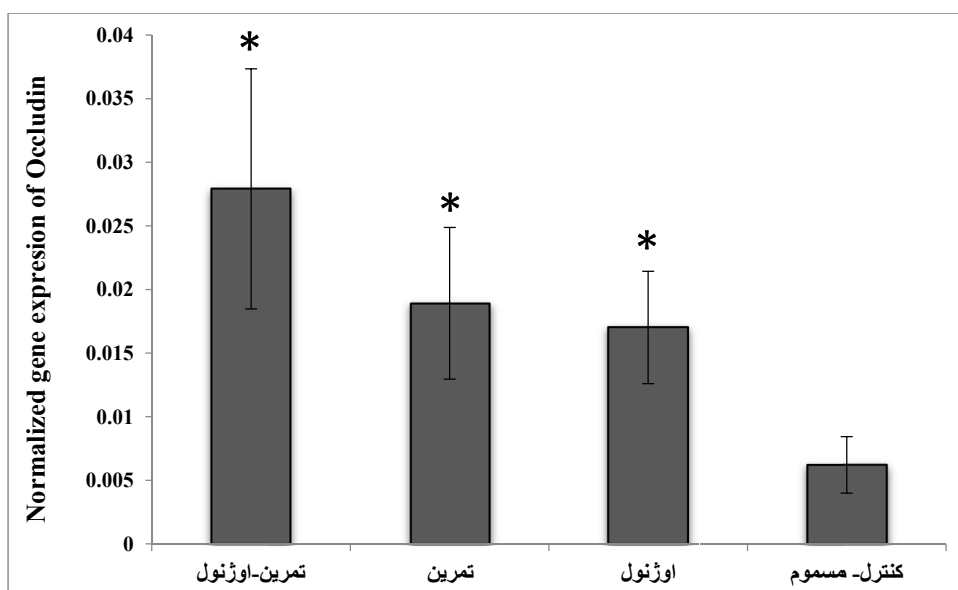
مسمومیت با سم کلرپیریفوس تهیه شده از شرکت سیگما آلدریج آمریکا و در دوز 3 mg/kg القاء شد. تزریق بصورت درون صفاقی، به مدت 6 هفته و 5 روز در هفته انجام شد (15).

مقدار 250 mg/kg اوژنول ساخت شرکت مرک آلمان نیز به روش گاواژ به رت‌های گروه مکمل به مدت 4 هفته و 5 روز در هفته خوراند (19). به منظور سازگاری رت‌های گروه تمرین هوازی با

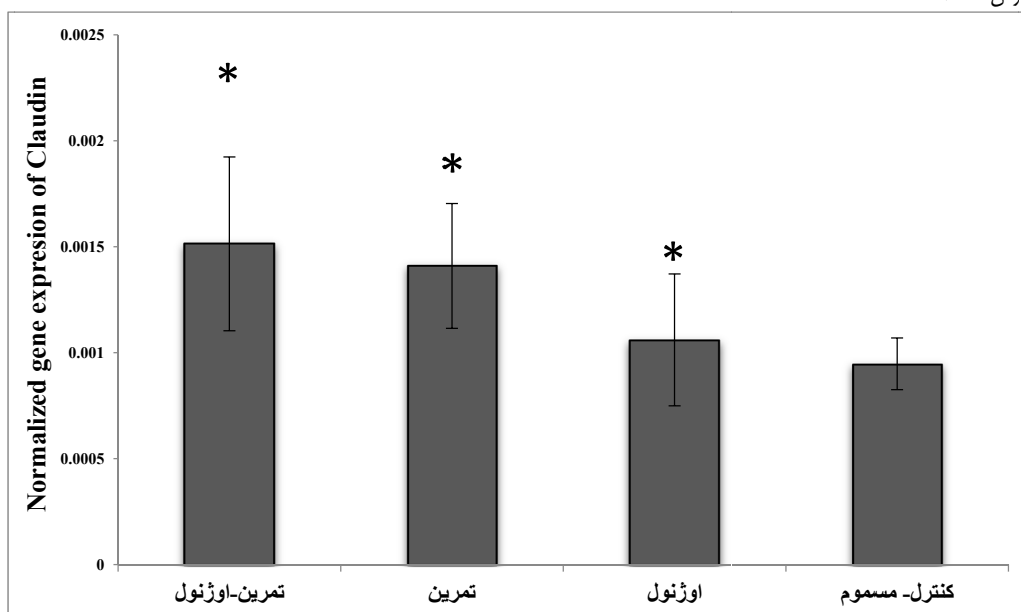
سم کلرپیریفوس نشان داد ( $P=0.001$ ). در اثر مسمومیت با سم کلرپیریفوس، بیان ژن claudin به طور معنی داری کاهش یافت. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون تحلیل واریانس دوراهه مشخص شد، تمرین هوازی اثر معنی داری بر بیان ژن claudin داشت ( $F=13.69, P=0.001, \eta=0.406$ )؛ اما اثر مکمل اوژنول ( $F=0.769, P=0.391, \eta=0.037$ ) و تعامل تمرین هوازی و مکمل اوژنول بر بیان ژن claudin معنی دار

داشت ( $F=22.43, P=0.001, \eta=0.529$ ). دریافت مکمل اوژنول نیز اثر معنی داری بر بیان ژن occludin داشت ( $F=15.79, P=0.001, \eta=0.441$ )؛ اما تعامل تمرین هوازی و مکمل اوژنول اثر معنی داری بر بیان ژن occludin نداشت ( $F=0.13, P=0.720, \eta=0.007$ ) (شکل ۱).

نتایج آزمون تی مستقل، تفاوت معنی داری در بیان ژن claudin بین گروه کنترل سالم و مسموم شده با



شکل ۱- بیان ژن occludin در گروه های مورد مطالعه. \* نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل مسموم. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.



شکل ۲- بیان ژن claudin در گروه های مورد مطالعه. \* نشانه افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل مسموم. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

نمود (F=0.001, P=0.973, η=0.001) (شکل ۲).

### بحث

مطالعه‌ی حاضر به تعیین اثر تعامل تمرین هوازی و اوژنول بر بیان ژن claudin و occludin در بافت قلب رت‌های مسموم شده با کلرپیریفوس پرداخت. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد مصرف کلرپیریفوس موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن claudin و occludin در مقایسه با گروه کنترل سالم شد. اجرای تمرین هوازی و مصرف اوژنول نیز به تنهایی موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن occludin در مقایسه با گروه کنترل مسموم شد. همچنین تمرین هوازی و مصرف اوژنول به ترتیب باعث افزایش معنی‌دار و عدم افزایش معنی‌دار بیان ژن claudin در مقایسه با گروه کنترل مسموم شد. اثر تعامل تمرین هوازی و اوژنول نیز بر بیان ژن claudin و occludin در مقایسه با گروه کنترل مسموم معنی‌دار نبود. تاکنون مطالعه‌ای به بررسی اثر تعامل تمرین هوازی و اوژنول بر روی بیان ژن claudin و occludin انجام نشده است و شایان ذکر است که پژوهشگران مطالعه‌ی حاضر نتوانستند مطالعه‌ای در راستای اثر تمرین هوازی با شدت متوسط و تعامل تمرین هوازی و اوژنول بر بیان ژن claudin و occludin برای مقایسه بیابند.

همان‌گونه که ذکر شد، اتصالات محکم، اتصالات بین سلولی سختی هستند که یک ساختار مولکولی پیچیده‌ای را نشان می‌دهند که شامل پروتئین آدابتور (مانند ZO، Zonula) و پروتئین‌های پیوند دهنده‌ی غشای پیوسته مانند occludin و claudin می‌باشد. محل این اتصالات در سمت داخل غشای پلاسمایی سلول می‌باشد و وجود آن‌ها در بافت‌های بدن ضروری و حیاتی می‌باشد (۲۰). با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، مصرف کلرپیریفوس موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن claudin و occludin در مقایسه با گروه کنترل سالم و تمرین هوازی باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن claudin و occludin در مقایسه با گروه مسموم شد.

سم کلرپیریفوس باعث افزایش استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف بدن می‌گردد (۵) که در ادامه به مکانیسم و انواع متغیرهای استرس اکسیداتیو موثر بر کاهش بیان ژن claudin و occludin اتصالات محکم

اشاره می‌شود. متغیرهای استرس اکسیداتیوی مانند O<sub>2</sub><sup>-</sup> و H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> بیشترین اهمیت را در سیگنالینگ وابسته به occludin و claudin دارند. واکنش پذیری نسبتاً کم O<sub>2</sub> و حذف اثر بخشی اش توسط سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اغلب از اثرش جلوگیری می‌کند. همچنین اختلال در SOD مرتبط با ALS (amyotrophic lateral sclerosis) است که اتصالات محکم در سد خونی مثلاً در مغز را مختل می‌کند (۲۱). سطح بیان ژن occludin و claudin در بافت اتصالات محکم کاهش می‌یابد در نتیجه اتصالات محکم نفوذپذیری اش افزایش می‌یابد و یا تخریب می‌شود (۲۲). occludin و claudin هر دو بر اثر استرس اکسیداتیو کاهش می‌یابند. به‌طور کلی، پراکسیداسیون لیپیدی موجب نقص در اتصالات محکم و به ویژه کاهش بیان claudin و occludin می‌شود (۲۳، ۲۴).

مطالعات کاراز و همکاران (۲۰۰۳) و گولتکین و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد که سم کلرپیریفوس باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در ریه، کلیه و کبد می‌شود (۲۵، ۲۶). در مطالعه احمد و همکاران (۲۰۰۹)، کلرپیریفوس به مدت دو هفته موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو در کبد، مغز و کلیه شد (۲۷). در مقابل افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها مانند SOD و کاتالاز باعث کاهش استرس اکسیداتیو و مهار آن و افزایش فسفوریلاسیون claudin و occludin می‌شود. در مطالعه‌ای به بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی اوژنول پرداختند، نتایج کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی، فعالیت گلوکاتایون پر اکسیدازها و افزایش SOD، CAT و گلوکاتایون را بعد از ۱۵ روز مصرف اوژنول را نشان داد (۲۸). مطالعه غفران و همکاران (۲۰۱۹) نیز کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و همچنین کاهش پاسخ درد را پس از مصرف اوژنول نشان داد (۲۹). یکی دیگر از عوامل اثر استرس اکسیداتیو بر کاهش claudin و occludin، کاهش یا مهار فعالیت ERK1/2 و MAPK می‌باشد (۸). اما مطالعات نشان داده‌اند که تمرین هوازی توانایی فعال کردن و افزایش ERK1/2 و MAPK را دارا می‌باشد (۳۰، ۳۱). عامل ایجاد کننده‌ی استرس اکسیداتیو دیگر، NO می‌باشد، مطالعات نشان داده‌اند مقدار NO به‌طور غیر مستقیم بر اتصالات

افزایشی است که نسبت به گروه کنترل مسموم داشته است و از نظر فیزیولوژیکی این تغییر موفقیت محسوب می‌شود اگر چه مکانیسم دقیق عدم معنی داری را نمی‌توان به وضوح توضیح داد اما این احتمال وجود دارد که با تغییر در شدت و مدت تمرین و مقدار دوز اوژنول، این تعامل از نظر آماری معنی دار گردد.

محدودیت مطالعه حاضر عدم بررسی اختلالات یونی و عدم تصویربرداری از بافت اتصالات محکم بافت قلب بود که می‌توانستند در تحلیل نتایج بدست آمده از این مطالعه موثر باشند. با توجه به افزایش استفاده از سموم کشاورزی در زراعت جهت درک بهتر تغییرات اتصالات محکم در بافت قلب، بررسی اثر اجرای تمرین هوازی و اوژنول بر ROS، MDA و آنتی‌اکسیدان‌های SOD و CAT در قلب رت‌های مسموم شده با کلرپیریفوس پیشنهاد می‌گردد. همچنین استفاده از تمرین هوازی به دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی‌شان، زیر نظر متخصص تربیت بدنی پیشنهاد می‌گردد اما در رابطه با اوژنول نیاز به پژوهش‌های بیشتر می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

اجرای تمرین هوازی باعث افزایش معنی دار بیان ژن *occludin* و *claudin* شد. مصرف اوژنول باعث افزایش معنی دار *occludin* و عدم افزایش معنی دار *claudin* شد. همچنین اثر تعامل تمرین هوازی و اوژنول بر بیان ژن *occludin* و *claudin* معنی دار نبود. اگر چه به نظر می‌رسد تمرین هوازی در استحکام و نفوذپذیری اتصالات محکم در بافت قلب اثر مثبت داشته باشند.

### تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر برگرفته از بخشی از رساله دکتری با گرایش فیزیولوژی ورزشی می‌باشد و بدین وسیله از زحمات اساتید بزرگوار و دوستان عزیز که در اجرای پژوهش همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

### References

- Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critic Rev Toxicol*. 2008;38(sup2):1-125.
- Joshi SC, Mathur R, Gulati N. Testicular toxicity

محکم موثر هستند. فعال سازی VEGFR-2 ممکن است منجر به آزاد شدن NO توسط NO سنتتاز نیتروسیلی (eNOS) شود که به نوبه ی خود مسیر های سیگنالینگ مانند Rho-Rac فعال می‌کند (۳۲). رهایی از این مسیر، موجب اثر منفی بر تخریب پروتئین‌های اتصالات محکم مانند *occludin* و *claudin* و همچنین کاهش بیان آن‌ها می‌شود. رهایی NO از مسیر یاد شده در هنگام افزایش استرس اکسیداتیو و در بیماری‌هایی مانند دیابت نوع دو رخ می‌دهد (۳۳، ۳۴). نتایج مطالعات مختلف نشان داده‌اند که مسیر PI3K/AKT یک مسیر سیگنالینگ غیر پاتولوژیکی می‌باشد که موجب افزایش NO شده و اثر سوئی بر بیان *occludin* و *claudin* ندارد و احتمالاً تمرین هوازی از این مسیر باعث افزایش بیان ژن *occludin* و *claudin* شده است (۳۵). افزایش سایتوکاین های التهابی نیز با افزایش استرس اکسیداتیو در بافت قلب در ارتباط هستند. بر طبق مطالعات افزایش فاکتور نکروز دهنده ی تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) نیز با کاهش کلونین و *occludin* در ارتباط است (۳۶، ۳۷). همسو با مطالعه ی حاضر، مطالعه بختیاری و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد ۴ هفته تمرین هوازی موجب کاهش معنی دار بیان ژن TNF- $\alpha$  در بافت قلب رت‌های دیابتی نوع دو می‌گردد (۳۸). احتمالاً اوژنول نیز از طریق ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خود باعث افزایش بیان ژن *claudin* و *occludin* شده است. همسو با مطالعه ی حاضر، هرا و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند اوژنول بیان ژن TNF- $\alpha$  و مسیر سیگنالینگ NF  $\kappa$ B را در استخوانی که در مجاورت پراکسیداسیون لیپیدی قرار گرفته را مهار می‌کند (۳۹). همچنین افزایش استرس اکسیداتیو با افزایش بتا آمیلوئید مرتبط می‌باشد و بر طبق مطالعه‌ای افزایش بتا آمیلوئید با کاهش *occludin* و *claudin* همراه بوده است (۴۰، ۴۱). شاهد و همکاران (۲۰۱۸) بیان نمودند که اجرای تمرین ورزشی موجب کاهش بتا آمیلوئید می‌شود (۴۲). با توجه به ارتباط مستقیم بین استرس اکسیداتیو و بتا آمیلوئید، احتمالاً ویژگی آنتی‌اکسیدانی اوژنول موجب افزایش بیان ژن *claudin* و *occludin* شده است. نتایج مطالعه ی حاضر نشان داد تعامل تمرین هوازی و اوژنول اثر معنی داری بر بیان ژن *occludin* و *claudin* ندارد اما آنچه مهم می‌باشد،



- of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. *Toxicol Indust Health*. 2007;23(7):439-44.
3. Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Chlorpyrifos induces apoptosis in human T cells. *Toxicology*. 2009;255(1-2):53-7.
  4. Tripathi S, Srivastav AK. Liver profile of rats after long-term ingestion of different doses of chlorpyrifos. *Pesticide Biochem Physiol*. 2010;97(1):60-5.
  5. Zama D, Meraihi Z, Tebibel S, Benayssa W, Benayache F, Benayache S, et al. Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: The protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L. *Indian J Pharmacol*. 2007;39(3):145.
  6. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep*. 2016;4(5):519-22.
  7. Zhang LZ, Lei S. Changes of junctions of endothelial cells in coronary sclerosis: a review. *Chron Dis Transl Med*. 2016;2(1):22-6.
  8. Gonzalez JE, DiGeronimo RJ, D'Ann EA, King JM. Remodeling of the tight junction during recovery from exposure to hydrogen peroxide in kidney epithelial cells. *Free Rad Biol Med*. 2009;47(11):1561-9.
  9. Rao R. Oxidative stress-induced disruption of epithelial and endothelial tight junctions. *Front Biosci*. 2008;13:7210.
  10. Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes*. 2008;1778(3):729-56.
  11. Morrow CM, Mruk D, Cheng CY, Hess RA. Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium. *Philosophic Trans Royal Soc B: Biol Sci*. 2010;365(1546):1679-96.
  12. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes*. 2008;1778(3):631-45.
  13. Van Itallie CM, Anderson JM. Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J Cell Sci*. 1997;110(9):1113-21.
  14. Zhang J, Li Z, Qie M, Zheng R, Shetty J, Wang J. Sodium fluoride and sulfur dioxide affected male reproduction by disturbing blood-testis barrier in mice. *Food Chem Toxicol*. 2016;94(10):103-11.
  15. Nikbin S, Derakhshideh A, Karimi Jafari S, Mirzahamedani A, Moslehi A, Ourzamani S, et al. Investigating the protective effect of aerobic exercise on oxidative stress and histological damages of testicular tissue associated with chlorpyrifos in male rats. *Andrologia*. 2020;52(2):e13468.
  16. Lopez-Velez M, Martinez-Martinez F, Valle-Ribes CD. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. 2003.
  17. Nagababu E, Rifkind JM, Boindala S, Nakka L. Assessment of antioxidant activity of eugenol in vitro and in vivo. *Free Rad Antioxid Protocols*: Springer; 2010. p. 165-80.
  18. Cheon SH. The effect of a skilled reaching task on hippocampal plasticity after intracerebral hemorrhage in adult rats. *J Physic Ther Sci*. 2015;27(1):131-3.
  19. Rempelberg C, Verhagen H, Van Bladeren P. Effects of the naturally occurring alkenylbenzenes eugenol and trans-anethole on drug-metabolizing enzymes in the rat liver. *Food Chem Toxicol*. 1993;31(9):637-45.
  20. Denker BM, Nigam SK. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol Ren Physiol*. 1998;274(1):F1-F9.
  21. Zhong Z, Deane R, Ali Z, Parisi M, Shapovalov Y, O'Banion MK, et al. ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nature Neurosci*. 2008;11(4):420-2.
  22. Nicaise C, Mitrecic D, Demetter P, De Decker R, Authélet M, Boom A, et al. Impaired blood-brain and blood-spinal cord barriers in mutant SOD1-linked ALS rat. *Brain Res*. 2009;1301:152-62.
  23. Blasig I, Mertsch K, Haseloff R. Nitronyl nitroxides, a novel group of protective agents against oxidative stress in endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Neuropharmacology*. 2002;43(6):1006-14.
  24. Roche H, Terres A, Black I, Gibney M, Kelleher D. Fatty acids and epithelial permeability: effect of conjugated linoleic acid in Caco-2 cells. *Gut*. 2001;48(6):797-802.
  25. Karaoz E, Gultekin F, Akdogan M, Oncu M, Gokcimen A. Protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on lung toxicity induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Experim Toxicol Pathol*. 2002;54(2):97-108.
  26. Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. *Arch Toxicol*. 2001;75(2):88-96.
  27. Ahmed MM, Zaki NI. Assessment the ameliorative effect of pomegranate and rutin on chlorpyrifos-ethyl-induced oxidative stress in rats. *Nature Sci*. 2009;7(10):49-61.
  28. Vidhya N, Devaraj SN. Antioxidant effect of eugenol in rat intestine. *Indian J Exp Biol*. 1999.
  29. Ghofran O, Safari T, Shahraki MR. Effects of eugenol on pain response to the formalin test and plasma antioxidant activity in high fructose drinking water in male rats. *Int J Prev Med*. 2019;10.
  30. Cao S, Li B, Yi X, Chang B, Zhu B, Lian Z, et al. Effects of exercise on AMPK signaling and downstream components to PI3K in rat with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2012;7(12):e51709.
  31. Nemati J, Samadi M, Hadidi V, Ghodrati L. The

effect of 8 weeks of resistance training on total and phosphorylated extracellular signal regulated kinases (ERK) in flexor hallucis longus muscle of rats. *J Pract Stud Biosci Sport*. 2019;6(12):117-126.

32. Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc Res*. 2010;87(2):262-71.

33. Beauchesne É, Desjardins P, Hazell AS, Butterworth RF. eNOS gene deletion restores blood-brain barrier integrity and attenuates neurodegeneration in the thiamine-deficient mouse brain. *J Neurochem*. 2009;111(2):452-9.

34. Cuzzocrea S, Mazzon E, De Sarro A, Caputi AP. Role of free radicals and poly (ADP-ribose) synthetase in intestinal tight junction permeability. *Mol Med*. 2000;6(9):766-78.

35. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103(2):137-49.

36. Bruewer M, Utech M, Ivanov AI, Hopkins AM, Parkos CA, Nusrat A. Interferon- $\gamma$  induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J*. 2005;19(8):923-33.

37. Castello G, Scala S, Palmieri G, Curley SA, Izzo F. HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *Clin Immunol*. 2010;134(3):237-50.

38. Bakhtiari F, Homae HM, Ghazalian F. The Effect of Aerobic Training on Tumor Necrosis Factor alpha, Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha & Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Cardiac Tissue of Diabetic Rats. *Iran J Diabetes Obes*. 2020;12(2):90-7.

39. Martínez-Herrera A, Pozos-Guillén A, Ruiz-Rodríguez S, Garrocho-Rangel A, Vértiz-Hernández A, Escobar-García DM. Effect of 4-allyl-1-hydroxy-2-methoxybenzene (eugenol) on inflammatory and apoptosis processes in dental pulp fibroblasts. *Mediat Inflamm*. 2016;2016.

40. Marco S, Skaper SD. Amyloid  $\beta$ -peptide1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells. *Neuroscience letters*. 2006;401(3):219-24.

41. Blasig IE, Bellmann C, Cording J, Vecchio Gd, Zwanziger D, Huber O, et al. Occludin protein family: oxidative stress and reducing conditions. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(5):1195-219.

42. Shahed A, Ravasi AA, Choubineh S, Khodadadi D. Effect of Four Weeks Exercise Prior Preparation before Alzheimer's Induction on the Levels of Nerve Growth Factor and Beta Amyloid in the Hippocampus of Wistar Male Rats. *J Arak Univ Med Sci*. 2018;20(11):56-66.