مجله دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه
دوره ۸. شماره ۱. بهار ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

تاثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر پروتئین HSP70 و Caspase-3 در بافت چربی قهوه ای رت های تغذیه شده با روغن های حرارت دیده عمیق

صادق عبدالهی[۱]، خالید محمد زاده سلامت[۱*]، کمال عزیز بیگی[۱]، ظاهر اعتماد[۱]

۱. گروه تربیت بدنی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

چکیده

زمینه و هدف: روغن‌های حرارت دیده عمیق سمومی تولید می‌کنند که سلامتی افراد را به خطر می‌اندازند. استفاده از مکمل‌های گیاهی در کنار تمرین ورزشی می‌تواند به بهبود سلامتی کمک نماید. از این رو پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر پروتئین HSP70 و کاسپاز۳ در بافت چربی قهوه‌ای رت‌های تغذیه شده با روغن های حرارت دیده عمیق انجام شد.

روش‌ها: در یک کارآزمایی تجربی ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار بعد از چهارهفته تغذیه با روغن حرارت دیده عمیق در پنج گروه ۸ تایی بعنوان نمونه آماری انتخاب و به طور تصادفی به گروه‌های: کنترل- مسمومیت، تمرین- مسمومیت، مکمل- مسمومیت، مکمل- تمرین- مسمومیت و کنترل- سالم تقسیم شدند. برنامه تمرینی، چهار هفته و با شدت ۵۰ تا ۶۵ ٪ VO_2 max به صورت سه جلسه در هفته با مدت زمان ۲۰ دقیقه بود. مکمل اکتاپامین به مدت ۴ هفته و ۵ روز در هفته با استفاده از دوز ۸۱ µmol/kg به صورت تزریق درون صفاقی استفاده شد. برای بررسی پروتئین HSP70 از روش ایمنوهیستوشیمی IHC و کاسپاز۳ از روش وسترن بلات استفاده شد.

نتایج: بر اساس یافته‌ها، تمرین هوازی و دریافت اکتاپامین موجب کاهش معنی دار پروتئین HSP-70 شد، گرچه تعامل آن ها اثر معنی داری بر پروتئین HSP-70 نداشت. تمرین هوازی، دریافت مکمل اکتاپامین و همچنین تعامل آن ها موجب کاهش معنی دار کاسپاز ۳ شد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: تمرین هوازی و اکتاپامین اثرات مخرب روغن‌های حرارت دیده عمیق را کاهش می‌دهند. پیشنهاد می‌گردد برای پخت غذاها از درجه حرارت کمتر از ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد و برای کاهش اثرات سموم تولید شده توسط این روغن‌ها، از تمرینات منظم هوازی و مکمل اکتاپامین استفاده شود.

کلید واژه‌ها:
اکتاپامین، تمرین هوازی، چربی قهوه‌ای، روغن حرارت دیده، مسمومیت

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

مقدمه

با توجه به ماشینی شدن زندگی افراد، نوع و روش مصرف مواد غذایی آن ها نیز دچار تغییراتی شده است. یکی از این تغییرات مهم نحوه طبخ غذاها و آشپزی می‌باشد. امروزه سرخ کردن عمیق یک روش عمومی پخت است که در آن چربی به عنوان محیط انتقال گرما استفاده می‌شود و در طی آن غذاهایی با خصوصیات منحصر به فرد از نظر طعم، بافت و ظاهر تولید می‌شود (۱). در این روش طی فرآیند سرخ‌کردن، همزمان با جابه جایی و انتقال دما، جا به جایی و انتقال مواد نیز رخ می دهد که از جمله آن می‌توان به انتقال روغن به درون محصول و خروج آب از آن اشاره نمود (۲). از این رو دمای سرخ کردن از مهمترین عوامل مؤثر بر مقدار جذب روغن است و به طور مستقیم بر مدت زمان فرآیند، طعم و مزه غذا تأثیر می‌گذارد (۱). روغن های چند بار حرارت دیده در منابع و مطالعات حیوانی سمومی، از جمله آکرولوئین تولید می‌کنند. پروپنال-۲ یا

*آدرس نویسنده مسئول: سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، گروه تربیت بدنی
آدرس پست الکترونیک: Kh.mohamadzadeh@iausdj.ac.ir

آکرولئین یک آلدئیدالکتروفیل غیراشباع متعلق به گروه آلدئیدهای α و β است. این ترکیب ازکربوهیدرات‌ها، چربی‌های حیوانی و گیاهی، آمینواسیدها در طول حرارت‌دهی نیز تشکیل می‌شود. واکنش های شیمیایی درگیر در تشکیل آن شامل دهیدراسیون حرارتی گلیسرول، تجزیه رتروآلدول، کربوهیدرات‌ها، پراکسیداسیون اسیدهای چرب چند غیراشباعی و تجزیه استرکر اسیدهای آمینه مانند متیونین و ترئونین است. همچنین سم دیگری بنام هتروسیکلیک آمین از حرارت دیدن و فرآیند پخت و پز مواد پروتئینی تولید می شود که نتیجه واکنش اسیدهای آمینه و کراتین در دمای پخت بالا است (۳).

به نظر می‌رسد استرس اکسیداتیو ناشی از آکرولئین، تأثیر غیرمستقیم بر سلامت قلبی- عروقی موش‌ها به واسطه آپوپتوز در سلول‌های کاردیومیوسیت دارد. آکرولئین بر روی توانایی میتوکندری به عنوان جز شرکت کننده در تنفس سلولی اثرگذار است (٤). آکرولئین (در غلظت های ۱۰-۱۰۰μm) در سلول های کبدی موش بر روی اجزای سیستم تنفس سلولی مانند کمپلکس I و II، پیرووات دهیدروژناز و α-کتوگلوتارات دهیدروژناز، اثر بازدارندگی دارد (٥).

در حال حاضر بافت چربی به عنوان اندام اندوکرینی فعال در کنترل سوخت و ساز بدن شناخته شده است. این ارگان درون‌ریز پروتئین‌های متعددی تولید و ترشح می‌کند که در هموستاز متابولیسم کربوهیدرات و چربی نقش مهمی ایفا می‌کنند. علت نامگذاری چربی قهوه‌ای به این نام، وجود تعداد زیادی میتوکندری در داخل سلول‌های این بافت می‌باشد. میتوکندری‌ها حاوی آهن بوده و باعث تیره‌تر شدن رنگ این نوع از چربی می‌گردند (٦).

بافت چربی تعداد زیادی هورمون ترشح می‌کند که بسیاری از آن ها با ایمنی و پاسخ‌های التهابی در ارتباط می‌باشند (۷). در این میان عواملی چون پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat Shock proteins (HSP)) از عملکرد و بقای سلول حفاظت می‌کنند (۸). پروتئین‌های شوک حرارتی نه تنها به استرس گرمایی بلکه به تغییرات سایر استرس‌های سلولی از جمله اسیدوز، هیپوکسی، ایسکمی، رده‌های فعال اکسیژن، تخریب پروتئین‌ها و عفونت‌های ویروسی پاسخ می‌دهند. حساس‌ترین گروه پروتئین‌های شوک حرارتی خانوادهٔ پروتئین شوک حرارتی 70 (HSP70) هستند (۹). بیان پروتئین شوک حرارتی ۷۰ به علت افزایش رادیکال های آزاد در طی چاقی و تغذیه نامناسب افزایش می‌یابد (۸).

استرس اکسیداتیو می‌تواند از طریق پراکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و نیز فعال کردن مسیرهایی که به آپوپتوزیس ختم می‌گردند، باعث آسیب بافتی شود (۱). دو مسیر آپوپتوز، مسیرداخلی و دیگری مسیر خارجی نام دارد که در نهایت کاسپازها را فعال می‌کنند. کاسپازها جزء خانواده سیستئین پروتئاز هستند که نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می‌نمایند که متعاقب فعال شدن این آنزیم ها روی سوبستراهای خاصی عمل می‌کنند و تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیک در سلول آپوپتوزی را ایجاد می‌کنند (۱۰).

شواهدی وجود دارد که فعال شدن پی درپی کاسپازها در روند آپوپتوز، منجر به ارائه مسیر واکنش آبشاری برای کاسپازها می‌گردد. این واکنش آبشاری با فعال شدن کاسپازهای آغازگر شروع شده و پیام را از طریق فعال کردن کاسپازهای اجرایی منتقل می‌نماید (۱۱). در این راستا پروکاسپازهای آغازگر و همچنین کاسپازهای التهابی (۱) عموما درآپوپتوز دخالت ندارند، ولی کاسپازهای اجرایی که مهمترین آن ها کاسپاز ۳ می‌باشد، برنامه آپوپتوزی را برای تجزیه چندین پروتئین حیاتی اجراء می‌کند (۱۲). در این زمینه، برخی از محققان عنوان کرده اند که انجام تمرینات ورزشی با شدت متوسط و مداوم احتمالاً موجب کاهش آپوپتوز در بافت‌های مختلف می‌شود (۱۱).

Kim و همکاران گزارش کردند که تمرین هوازی میزان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl2 را افزایش و فعالیت کاسپاز۳ را در عضلات موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد (۱۳). اخیرا برای کاهش اثرات آپوپتوز نقش تمرینات ورزشی در تعامل با مکمل دهی مورد بررسی قرار گرفته است. امروزه مکمل‌های گیاهی به عنوان یکی از موثرترین مکمل‌های موجود به شمار می‌روند. از

این بین می‌توان بـه مکمـل اکتاپـامین بـا اثـرات آنتـی اکسـیدانی اشاره کرد (۱٤). عصاره میوه مرکبات از جملـه نـارنج بـه‌طـور سنتی به عنوان محصولات کاهش وزن و سرکوب کننـده اشـتها و گاهی به عنوان یک ماده غذایی مورد استفاده قـرار مـی‌گیـرد، اما بیشتر به عنوان یک مکمل دارویی یا رژیم غذایی مصرف می شود (۱٥).

یکی از اجزای این عصاره‌ها اکتاپامین است که با تقلیـد عملکـرد سـمپاتیک یـک مـاده آدرنرژیـک محسـوب مـی‌گـردد. از اثـرات اکتاپامین می‌توان به اثرات آنتی اکسیدانی، اثـرات ضـد التهـابی، کاهش وزن و چربی سوزی و ضـد سـرطان اشـاره کـرد (۱٦). یکی از عواملی که باعث اخـتلاف در اثـرات فارمـاکولوژیکی در مقایسه اکتاپامین و دیگر آمین‌های بیوژنیـک بـه عنـوان نـوراپی نفرین و افدرین می‌شود، تفاوت در گیرنده آدنرژیک اسـت (۱۷). با توجـه بـه کمبـود منـابع تحقیقـاتی در زمینـه اثـرات مصـرف اکتاپامین بر القای مسمومیت ناشی از روغن‌های حـرارت دیـده به عنوان یک عصاره گیاهی و استفاده روز افـزون روغـن‌هـای حرارت دیده در فرآورده‌های غذایی، این تحقیق با هدف بررسی تاثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر پروتئین HSP70 و کاسپاز۳ در بافت چربی قهوه‌ای رت‌های تغذیه شده با روغن‌های حرارت دیده عمیق انجام شد.

روش‌ها

در این مطالعه تجربی از رت‌های نر سالم نـژاد ویسـتار بعنـوان جامعه آماری استفاده شد. ٤۰ سر رت بعنوان نمونه آمـاری بـا سن ۲۰ هفته و میـانگین وزنـی۳۰۰ - ۳٥۰ گـرم بعـد از تهیـه از انسـتیتو پاسـتور ایـران در قالـب پـنج گـروه ۸ تـایی بـه طـور تصادفی به گروه های کنتـرل-مسـمومیت، تمـرین-مسـمومیت، مکمل- مسمومیت، مکمـل- تمـرین- مسـمومیت و کنتـرل سـالم تقسیم شدند. حیوانـات در شـرایط اسـتاندارد آزمایشـگاهی بـا درجه دمای تقریبی ۲٥ درجه سانتیگراد، رطوبت نسـبی ٤٥٪ در چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته تا زمان کامل آزمایشـات و دوره تمرینـات ورزشـی نگهـداری شـدند. تمـامی حیوانـات دسترسی آزاد بـه آب و غـذای اسـتاندارد مخصـوص حیوانـات آزمایشگاهی داشتند. نر بودن موش‌ها، بازه وزنـی ۳۰۰ تـا ۳٥۰ گرم و سـلامت کامـل مـوش‌هـا از جملـه معیـار هـای ورود بـه مطالعـه بـود. معیارهـای خـروج از مطالعـه شـامل اسـتفاده از داروهای ضد درد و ضد مسمومیت، ابتلاء به هرگونه بیماری یا التهاب و عدم تناسب وزنی موش با مطالعه حاضر بود.

به منظور تهیه روغـن بـا حـرارت عمیـق ۸ لیتـر روغـن آفتـاب گردان به مدت ٤ روز متوالی روزی ۸ ساعت با حرارت ۱۹۰ تـا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد داغ شد (۱۳) و سپس هر ۳۰ دقیقـه مـواد غذایی شامل ناگـت مـرغ، سـیب زمینـی، مـرغ و فـرآورده هـای پروتئینی (سوسیس و کالباس) داخل روغن غوطه ور شده و در انتها روغن روز چهارم بـه منظـور اسـتفاده بـه عنـوان مداخلـه مسمومیتی تا زمان اجرا نگهداری و به صورت خوراکی (گاواژ) به مدت ٤ هفته به رت‌ها خورانده شد.

برنامه تمرین هوازی به مدت چهار هفته و با شدت متوسـط بـه صورت یک روز در میان انجام شد. شدت تمـرین در هفتـه اول ٥۰ ٪ حـداکثر اکسـیژن مصـرفی و در هفتـه ی آخـر بـه ٦٥٪ حداکثر اکسیژن مصرفی رسید. به منظور سازگاری رت‌ها قبـل از شروع برنامه اصلی تمرینـی یـک هفتـه تمـرین سـازگاری بـا سرعت ۹m/min و زمـان ۲۰ دقیقـه انجـام گردیـد. مـدت زمـان تمرین ۲۰ دقیقه ثابت بوده و شدت تمرین از روز اول ۱٦m/min و در روز آخر به ۲٦m/min رسید. برای شروع تمـرین ٥ دقیقـه با سرعت ۷m/min گرم و پس از تمرین اصلی ٥ دقیقه با سرعت ٥m/min سرد کردنـد. همچنـین اکتاپـامین (سـیگما آلـدریچ) بـه عنوان مکمل به مدت ٤ هفته و ٥ روز در هفته با استفاده از دوز ۸۱μmol/kg بـه صـورت تزریـق درون صـفاقی (IP محلـول بـا نرمال سالین ۹٪) بود.

به منظـور نمونـه‌گیـری خـون و بافـت بـرداری از حیوانـات ٤۸ ساعت پـس از آخـرین مداخلـه تمـامی رت هـا بـه مـدت ۸ -۱۰ ساعت ناشتا شـده و قبـل از شـروع بافـت بـرداری وزن کشـی انجام شد. بعد از وزن کشی بیهوشی به شـکل استنشـاقی و بـا ماده کلروفورم انجام شد، پس از بیهوشی کامـل و تسـت درد و اطمینان از عدم هوشـیاری خـونگیری از بطـن چـپ قلـب انجـام

گردید. سپس به سرعت بافت روده‌باریک از بدن خارج شده و با شستشو بافر فسفات سالین مخاط ، خون و مواد اضافی تمیز شد و بافت داخل میکروتویوب ۲ میلی‌لیتری کدگذاری شده قرار گرفت. میکروتیوب به داخل تانک ازت انتقال داده شد، سپس تا زمان آنالیزهای سلولی داخل فریزر ۸۰- نگه داری شدند.

در روش بافتی، پس از خونگیری، سرم حاوی نرمال سالین وارد بطن چپ شده و گوشک دهلیز راست با یک قیچی نازک قطع می‌شد که خون به قلب باز نگردد. پس از صرف زمانی حدود ۲۰ دقیقه (با توجه به وزن رت) و سفید شدن کامل چشم و خون بازگشته از اندام ها سرم فیکساتیو (پارافرم آلدئید ٤٪) جایگزین نرمال سالین شد و بعد از مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه با فیکس شدن کامل اندام‌ها سرم از قلب جدا شده و بافت چربی قهوه ای از بدن خارج شد. پس از آن بافت به ظرف فیکساتیو ثانویه (فرمالین۱۰٪) انتقال پیدا کرد و بعد از گذشت ۳ تا ۵ روز بافت جهت آبگیری و قالب گیری پارافینه به دستگاه Tissue process انتقال پیدا کرد. به منظور بررسی پروتئین HSP70 از روش ایمنوهیستوشیمی IHC و کاسپاز ۳ از روش وسترن بلات استفاده شد.

در روش ایمونوهیستوشیمی IHC ، مقدار ۲۰ گرم پارا فرمالدهید (Merck, Germany) به ۵۰۰ سی سی آب مقطر اضافه شد و روی Hot Plate قرار گرفت تا دمای آن به ٦۰ درجه سانتی گراد برسد. بعد از آن به محلول مورد نظر، سود (NaoH) اضافه گردید تا PH محلول به ۷/۲ تا ۷/٤ برسد. در مرحله آخر یک قرص PBS درون محلول قرار داده شد. مقدار ۲ سی سی اسید کلریدریک ۳۷/۵ ٪ به ۱۱ سی سی آب مقطر اضافه گردید. مقدار ۱۰۰ لاندا سرم بز به ۹۰۰ لاندا PBS اضافه شد و سرم بز ۱۰ ٪ بدست آمد. همچنین مقدار ۳ لاندا تریتون ۱۰۰x به ۹۹۷ لاندا PBS اضافه شد و تریتون (Triton) ۰/۳ درصد بدست آمد. نمونه با PBS در ٤ مرحله و به فاصله ۵ دقیقه شسته شدند. به منظور بازیابی آنتی ژنی بر روی نمونه ها اسیدکلریدریک ۲ نرمال به مدت ۳۰ دقیقه ریخته شد. بافر بورات به منظور خنثی سازی اسید به مدت ۵ دقیقه اضافه گردید و سلول‌ها با PBS شسته شدند. تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور نفوذ پذیر کردن غشاء سلول‌ها استفاده گردید و با PBS شستشو داده شدند. سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه به منظور بلوک کردن واکنش آنتی بادی ثانویه به صورت رنگ اضافی زمینه اضافه شد. آنتی بادی اولیه رقیق شده (۱ به ۱۰۰) با PBS به نمونه اضافه گردید و بعد از ایجاد یک محیط مرطوب برای جلوگیری از خشک شدن بافت به مدت یک شب درون یخچال با دمای ۲ تا ۸ درجه قرار داده شد. روز بعد ظرف حاوی بافت از یخچال خارج شد و سپس ٤ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شدند. به نمونه آنتی بادی ثانویه با رقت ۱ به ۱۵۰ اضافه گردید و سپس در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. بعد از آن نمونه از انکوباتور به اتاق تاریک منتقل گردید و بعد از ٤ بار شستشو، به آن‌ها DAPI اضافه شد و بلافاصله برداشته شد و روی نمونه PBS ریخته شد. در مرحله آخر نمونه توسط میکروسکوپ فلوروسنت مدل Olympus و با لنز ٤۰۰ برای تایید مارکرها مشاهده شدند.

در روش وسترن بلات، برای بررسی پروتئین کاسپاز۳ از روش وسترن بلات استفاده شد. پس از لیز شدن، پروتئین توسط روش SDS-PAGE با استفاده از ژل ۱۲٪ Tris-Glycine (Invitrogen) از هم جدا شد و با دستگاه وسترن بلات ساخت شرکت BioRad کشور انگلستان پروتئین بررسی گردید. وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی Caspase-3 ab9669; USA (Abcam) (رقت ۱: ۱۰۰۰) انجام شد. سپس با آنتی بادی های کونژوگه شده HRP ثانویه مربوطه واکنش نشان داد (رقت ۱: ۲۰۰۰، Abcam, USA). سرانجام ، بلات با استفاده از سیستم تشخیصی ECL (Arlington ،Amersham Life Science Inc) تشخیص داده شد. تصاویر به دست آمده از باندهای مورد بررسی از پروتئین کاسپاز۳ با استفاده از نرم افزار ImageJ تجزیه و تحلیل شد. برای اطمینان از مقادیر مساوی پروتئین در زمان اندازه گیری، قبل از انجام تست میزان پروتئین با روش

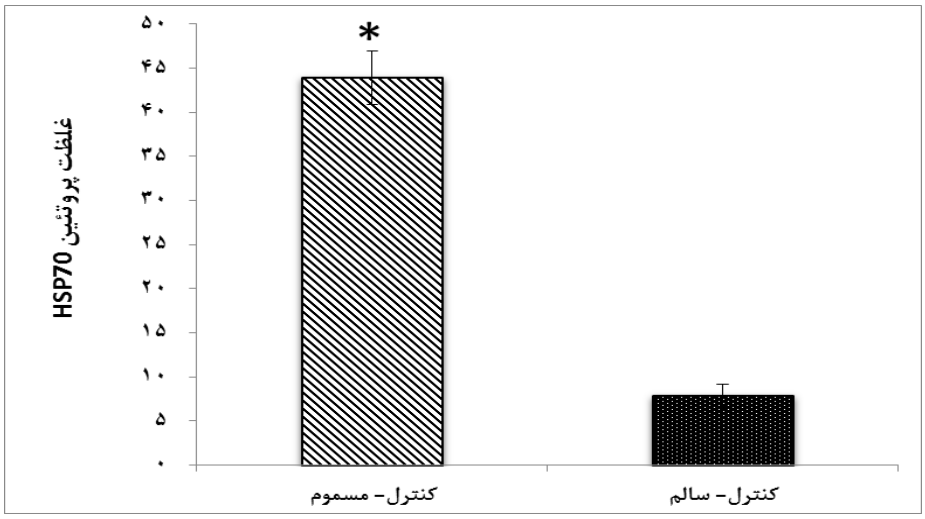
لوری تعیین غلظت شد. پروتئین GAPDH به عنوان کنترل داخلی در این مطالعه استفاده شد.

به منظور تحلیل، تمامی داده‌ها بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شدند. برای تعیین اثر مسمومیت با روغن حرارت دیده، با استفاده از آزمون t برای گروه‌های مستقل گروه کنترل سالم و کنترل مسموم مورد مقایسه قرار گرفتند. جهت تعیین اثر اصلی تمرین، اثر اکتاپامین و اثر همزمان تمرین * اکتاپامین از تحلیل دوراهه واریانس استفاده شد. در صورت مشاهده تفاوت معنی دار از آزمون پیگیری بن فرونی استفاده شد. سطح معنی داری P=۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ اجرا شد.

نتایج

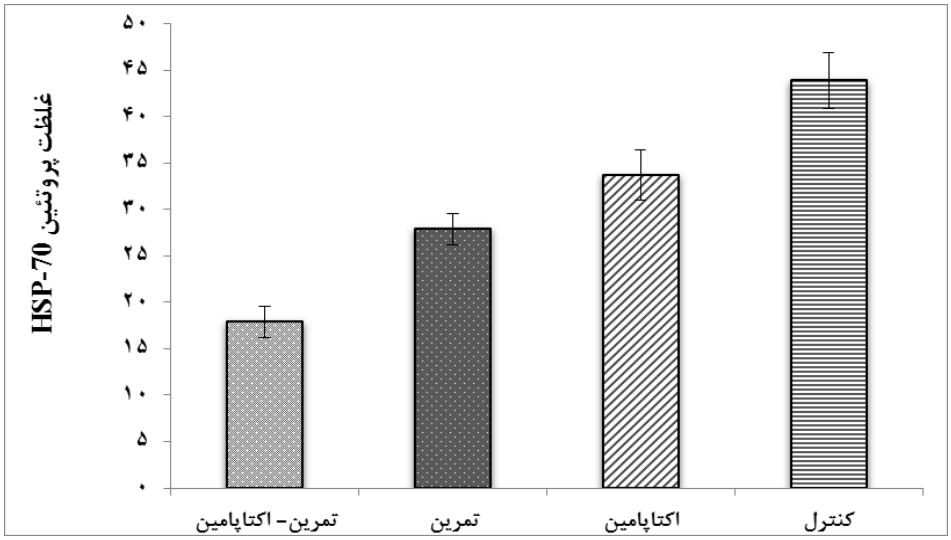
در اثر مسمومیت با روغن حرارت دیده عمیق غلظت پروتئین HSP-70 به طور معنی داری افزایش یافت. تفاوت معنی داری در غلظت پروتئین HSP-70 بین گروه کنترل سالم و مسموم شده با روغن حرارت دیده عمیق وجود داشت (P=۰/۰۰۱). تمرین اثر کاهشی معنی‌داری بر پروتئین HSP-70 (P=۰/۰۰۱) داشت. دریافت مکمل اکتاپامین اثر کاهشی معنی داری بر غلظت پروتئین HSP-70 (P=۰/۰۰۱) داشت، اما تعامل تمرین و مکمل اکتاپامین اثر معنی داری برغلظت پروتئین HSP-70 (P=۰/۰۰۱) نداشت. نتایج آزمون بن فرونی نشان داد با وجود آنکه کمترین غلظت پروتئین HSP-70 درگروه دریافت کننده اکتاپامین و تمرین مشاهده شد، با این وجود اثر تعاملی بین تمرین و مکمل اکتاپامین بر غلظت پروتئین HSP-70 از نظر آماری معنی دار نبود (شکل۲).

در اثر مسمومیت با روغن حرارت دیده عمیق غلظت کاسپاز۳ به طور معنی داری افزایش یافت. تفاوت معنی داری در غلظت کاسپاز۳ بین گروه کنترل سالم و مسموم شده با روغن حرارت دیده عمیق مشاهده شد (P=۰/۰۰۱). تمرین اثر معنی داری بر غلظت کاسپاز۳ (P=۰/۰۰۱) داشت. دریافت مکمل اکتاپامین نیز اثر معنی داری بر غلظت کاسپاز۳ (P=۰/۰۰۱) داشت. تعامل تمرین و مکمل اکتاپامین نیز اثر معنی داری بر غلظت کاسپاز۳ (P=۰/۰۱۶) داشت. طبق نتایج آزمون بن فرونی با توجه به میزان غلظت کاسپاز۳ در گروه تمرین و گروه مکمل انتظار می رفت در گروه تمرین و مکمل غلظت کاسپاز۳ از هریک از مداخلات کمتر باشد، نتایج نیز این نکته را تایید نمود و غلظت کاسپاز۳ از تک تک مداخلات کوچک‌تر بود. بطوریکه همزمانی این دو مداخله نسبت به جمع اثر تک تک هر یک، اثر کاهنده بر غلظت کاسپاز۳ داشت (شکل ۵).



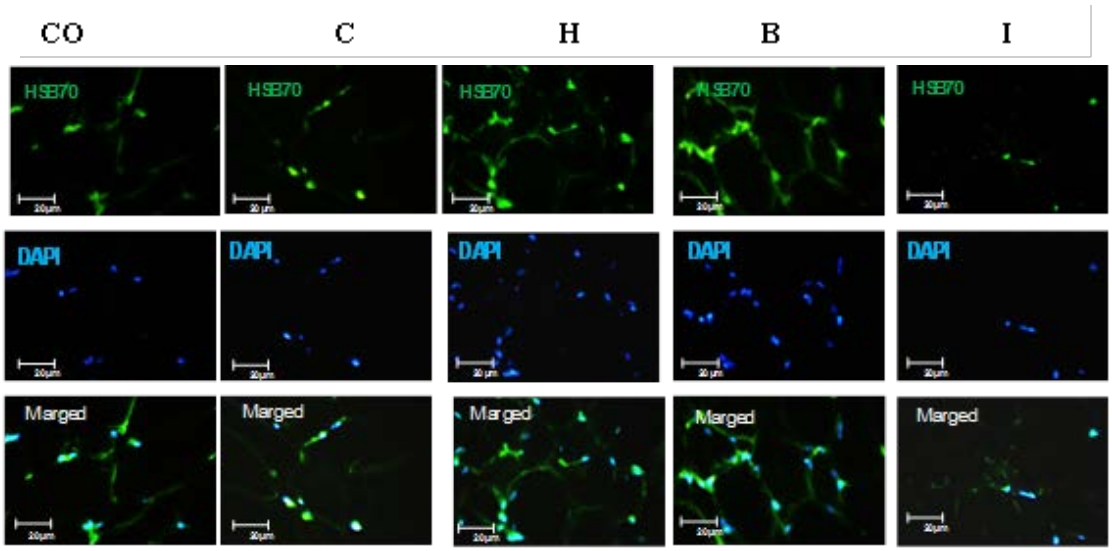
شکل ۱. مقایسه غلظت پروتئین HSP-70 درگروه کنترل سالم و کنترل مسموم شده با روغن حرارت دیده عمیق.

***نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل سالم** N=16 و(P=0.001)



شکل ۲. غلظت پروتئین HSP-70 در گروه‌های مورد مطالعه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

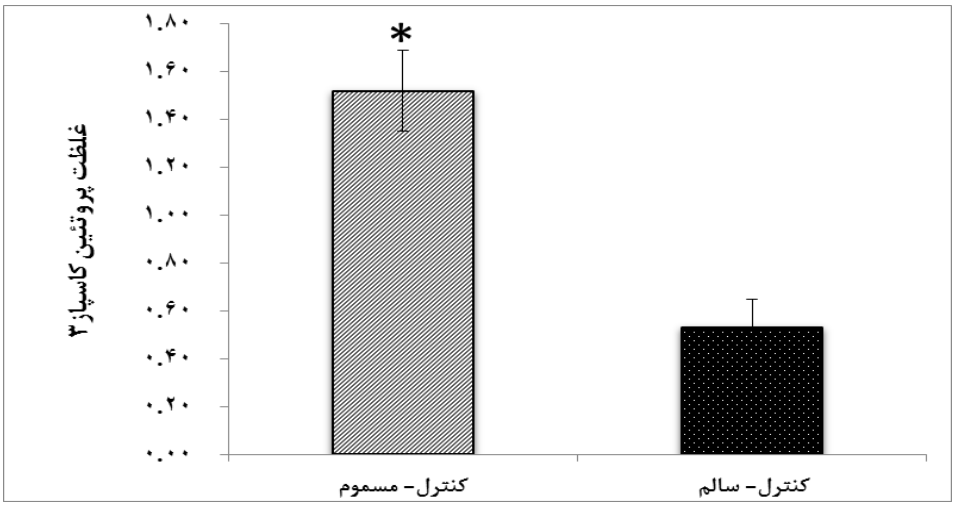
N=32 و (P=0.001)



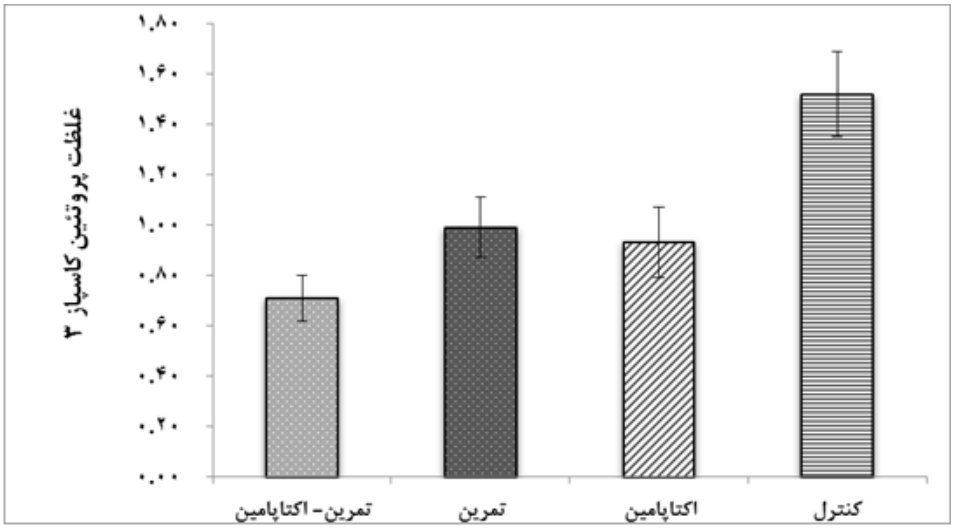
شکل ۳. تصاویر ایمونوهیستوشیمی IHC پروتئین HSP70 در گروه های مورد مطالعه، I: کنترل مسموم، H: تمرین-مسمومیت، B: اکتاپامین-مسمومیت، C: تمرین-اکتاپامین- مسمومیت، CO: کنترل سالم

بحث

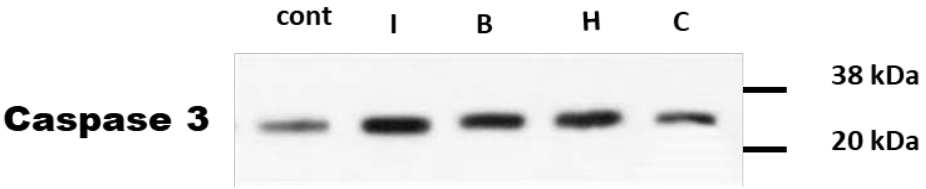
هدف از این تحقیق بررسی تاثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر غلظت پروتئین HSP70 و کاسپاز۳ در بافت چربی قهوه ای رت‌های تغذیه شده با روغن های حرارت دیده عمیق بود. یافته‌های آماری نشان داد در اثر مسمومیت رت‌ها با روغن حرارت دیده عمیق غلظت پروتئینHSP-70 به طور معنی داری افزایش یافت. تمرین موجب کاهش معنی داری پروتئین HSP-70 شد. دریافت مکمل اکتاپامین نیز غلظت پروتئینHSP-70 را به طور معنی داری کاهش داد. با وجود آنکه کمترین غلظت پروتئین HSP-70 درگروه تمرین و اکتاپامین مشاهده شد، اما تعامل این دو برغلظت پروتئینHSP-70 از نظر آماری معنی دار نبود. همسو با نتایج این تحقیق علی نژاد و همکاران در پژوهشی با عنوان تأثیر تمرینات استقامتی بر غلظت پروتئین HSP70 نشان دادند که فعالیت ورزشی استقامتی با شدت



شکل ۴. مقایسه غلظت پروتئین کاسپاز۳ درگروه کنترل سالم و کنترل مسموم شده با روغن حرارت دیده عمیق.*نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل سالم، N=16 و(P=0.001)



شکل ۵. غلظت پروتئین کاسپاز۳ در گروه های مورد مطالعه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است، N=32 و (P=0.001)



شکل ۶. نتایج آنالیز پروتئین کاسپاز۳ به روش وسترن بلات

متوسط سبب کاهش میزان این پروتئین و در نتیجه، کاهش میزان حجم سلول های توموری می‌شود (۱۸).

پروتئین HSP70 نقش بسیار مهمی در وضعیت آپوپتوزیس ایفا می‌کند. این پروتئین از یک سو با مسدود کردن یا کاهش مسیر کاسپازها که از فاکتورهای مهم در آپوپتوزیس می باشند از مرگ سلول ها جلوگیری می‌کند و از سوی دیگر به بازسازی سلول‌های آسیب دیده می‌پردازند (۱۹). Locke و همکاران در تحقیق خود به منظور بررسی پاسخ پروتئین شوک گرمایی ۷۰

به فعالیت های ورزشی استقامتی درازمدت با شدت متوسط به این نتیجه رسیدند که این گونه تمرینات سطوح این پروتئین را در مقایسه با سایر اعضای خانواده پروتئین های شوک حرارتی بیشتر افزایش می‌دهد (۲۰). از طرف دیگر، Hamilton و همکاران در تحقیقی بر روی میزان بیان پروتئین های شوک حرارتی در محیط های مختلف به این نتیجه رسیدند که انجام فعالیت ورزشی کوتاه مدت سبب افزایش بیان پروتئین های شوک حرارتی نمی شود (۲۱).

به نظر می‌رسد، بین سطوح در گردش پروتیئنHsp70 و سایتوکین های التهابی نیز ارتباط وجود دارد. همچنین اخیراً درتحقیقات مشاهده شده است که اکتاپامین به عنوان یک عامل لیپولیتیک بر روی سلول های چربی موش عمل میکند و قابل تصور است که اکتاپامین می تواند برخی از اثرات نورآدرنالین وآدرنالین را تقلید کند (١٤). در تحقیق حاضر نیز مصرف اکتاپامین موجب کاهش غلظت پروتئین Hsp70 شد، این پاسخ احتمالا تاثیر گذاری مثبت و آنتی اکسیدانی اکتاپامین را نشان می‌دهد که توانسته در سلول های آسیب دیده بر اثر مسمویت با روغن حرارت دیده عمل کند و سطوح HSP70 را در بافت چربی قهوه ای کاهش معنی دار دهد. پروتئین Hsp70 از طریق گیرنده های ۲ –TLR و ٤–TLR روی مونوسیت ها موجب فعالسازی مسیر NFKB و ترشح سایتوکین های التهابی می‌شود. در واقع عملکرد دوگانهٔ پروتئین Hsp70 در سطح درون سلولی و برون سلولی میتواند سازگاری مناسبی در دفاع میزبان علیه ویروس‌ها و بیماری های مرتبط با آن باشد (۲). همچنین افزایش سطح برون سلولی Hsp70 میتواند سبب فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی و دفاع در برابر عفونت های باکتریایی شود. به دنبال این یافته ها Campisi و همکاران به این نتایج دست یافتند که انجام فعالیت های ورزشی با شدت و مدت متفاوت بر روی میزان بیان پروتئین های شوک حرارتی در نقاط مختلف بدن از جمله هیپوتالاموس، هیپوکامپ، بافت چربی، قلب و عضلهٔ اسکلتی تأثیر متفاوتی دارد و اذعان داشتند هرچه شدت فعالیت کمتر شود، میزان بیان این پروتئین ها نیز کمتر می‌شود (۲۲). بنابراین یکی از دلایل کاهش پروتئین Hsp70 در گروه تمرین هوازی این است که احتمالا تمرین هوازی با شدت متوسط سازگاری خوبی بر این پروتئین ایجاد نموده و باعث تغییرات عوامل بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی تأثیرگذار شده، که حاصل آن پایداری پروتئینHSP70 است.

یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد در اثر مسمومیت با روغن حرارت دیده عمیق غلظت کاسپاز۳ به طور معنی داری افزایش یافت. تمرین هوازی موجب کاهش معنی دار غلظت کاسپاز۳ شد. همچنین دریافت مکمل اکتاپامین نیز کاهش معنی دار غلظت کاسپاز۳ را به همراه داشت و تعامل تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین نیز بر میزان آن اثر کاهشی داشت. در تحقیق Kwak و همکاران که بر روی موش های نر انجام شد و گروه تمرین هوازی بر روی تردمیل موتوری با سرعت پانزده متر در دقیقه به مدت دوازده هفته دویدند، کاهش غلظت کاسپاز-۳ نشان داده شد (۲۳). کنترل کاسپاز ۳ فرآیند پیچیده ای است و چندین مسیر پیام رسانی آپوپتوز را درگیر میکند. نشان داده شده است که کاسپاز۳ به وسیله ی فعال شدن کاسپاز۱۲ از طریق مسیر آزادسازی کلسیم یا به وسیله ی فعال شدن کاسپاز-۹ در مسیر داخلی و یا افزایش TNF-α سرم در مسیر خارجی فعال میشود (٢٤). در تحقیق حاضر اثر تعاملی تمرین هوازی و اکتاپامین توانست بصورت معنی داری اثرات آپوپتوزی و التهابی را با کاهش معنی دار کاسپاز۳ نشان دهد. در این راستا محمودی و همکاران در تحقیق خود تاثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر مونسیت ها و ماکروفاژ های بافت چربی سفید رت های مسموم شده با روغن حرارت دیده را بررسی نمودند. آن ها به این نتیجه رسیدند که مصرف اکتاپامین و تمرین هوازی موجب می شود نفوذپذیری ماکروفاژها در بافت چربی پس از مسمومیت با روغن های حرارت دیده کاهش معنی داری داشته باشد (۲۵).

نوع و شدت تمرینات ورزشی نیز، می‌تواند مسیر مرگ میتوکندری را تغییر دهد و اگر شدت و مدت این فعالیت از حد آستانه فراتر رود، تشدید خواهد شد. Kim و همکاران گزارش

کردند که بین گروه های تمرین هوازی و کنترل در بیان کاسپاز-۳ پس از ۸ هفته تمرین روی نوارگردان تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (۱۳). این نتایج با یافته های تحقیق حاضر متناقض است. احتمالا عمده ترین دلیل به شدت پروتکل تمرین هوازی استفاده شده بستگی دارد. یکی دیگر ازدلایل تفاوت نتایج کیم و همکاران با یافته های تحقیق حاضر احتمالا استفاده از اکتاپامین حین تمرینات باشد. چرا که استفاده از اکتاپامین همراه با تمرین در میزان کاهش کاسپاز۳ در تحقیق حاضر موثر بود. از دیگر مطالعات نا همسو با مطالعه حاضر میتوان به مطالعه Colombo و همکاران اشاره کرد. آن ها نشان دادند که ۵ هفته تمرینات هوازی با شدت ۶۰٪ اکسیژن مصرفی بیشینه موجب افزایش غیرمعنی دار کاسپاز-۳، pAkt و کاهش غیرمعنادار Bax/Bcl-۲ میشود. به نظر میرسد دلیل این تفاوت ناشی از سازو کارهای احتمالی در خصوص افزایش سطوح XIAP) مهار کننده قوی کاسپاز ۳) در مطالعه Colombo باشد (۲۶). بطور کلی، به نظر می‌رسد مصرف اکتاپامین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی تا حدکافی می‌تواند به سلامتی بافت چربی قهوه ای کمک کند و در نتیجه باعث کاهش عوامل التهابی گردد. همچنین تمرین هوازی با شدت متوسط نیز تا حدودی از طریق کاهش و پیشگیری از رها سازی سیتوکروم C درون میتوکندریایی در کنترل فاکتورهای مرتبط با آپوپتوز سلول های بافت چربی قهوه ای مفید باشد. پژوهش حاضر اولین مطالعه ای است که تاثیر ورزش بر اثرات مخرب روغن های حرارت دیده عمیق را مورد بررسی قرار داد. از این رو کمبود منابع تحقیقاتی از محدودیت های اصلی این پژوهش بود. با توجه به عدم وجود مستندات کافی در خصوص بافت چربی قهوه ای، پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی اثر گذاری سایر مکمل های گیاهی که دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند، بر روی این بافت مورد ارزیابی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته های تحقیق حاضر به نظر می رسد تمرین هوازی و اکتاپامین می تواند اثرات مخرب روغن های حرارت دیده عمیق را کاهش دهد. اکتاپامین به عنوان یک آنتی اکسیدان و تمرین هوازی بعنوان یک عامل مهم در جهت کنترل فاکتورهای مرتبط با آپوپتوز سلول های بافت چربی قهوه ای موجب حفظ ساختار و عملکرد این بافت می‌شود. از این رو می‌توان پیشنهاد نمود که حدالامکان برای پخت غذاها از درجه حرارت کمتر از ۱۸۰ استفاده شود و برای کاهش اثرات سموم تولید شده توسط این روغن ها، از تمرینات منظم هوازی و در کنار آن مصرف مکمل اکتاپامین استفاده شود

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی است. بدینوسیله از تمامی افرادی که محققان را در این پژوهش همراهی نمودند، به ویژه از زحمات بی دریغ پروفسور محمد علی آذربایجانی تشکر و قدردانی بعمل می‌آید. لازم به ذکر است کلیه اصول اخلاقی تحقیق حاضر مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کردستان رعایت گردید و کلیه مراحل آن توسط کمیته اخلاق آن دانشگاه با کد اخلاق IR.MUK.REC.1398/5006 تایید گردید.

ملاحظات اخلاقی

تحقیق حاضر در آزمایشگاه تحقیقاتی هیستوژنتیک تهران و با نظارت اساتید فیزیولوژی ورزشی و پزشکان متخصص آزمایشگاهی و با رعایت کلیه اصول اخلاقی انجام شد.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه یا جمع آوری داده ها ، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها: کمال عزیزبیگی، ظاهر اعتماد.

(۲) تهیه پیش نویس مقاله: صادق عبدالهی

(۳) تایید دست نوشته پیش از ارسال به مجله : خالید محمد زاده سلامت

References

1. Ascensão A, Ferreira R, Magalhães J. Exercise-induced cardioprotection—biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. International journal of cardiology. 2007;117(1):16-30.

2. Asea A. Mechanisms of HSP72 release. Journal of biosciences. 2007;32(3):579-84.

3. Ekiz E, Oz F. The effects of different frying oils on the formation of heterocyclic aromatic amines in meatballs and the changes in fatty acid compositions of meatballs and frying oils. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2019;99(4):1509-18.

4. Wang L, Sun Y, Asahi M, Otsu K. Acrolein, an environmental toxin, induces cardiomyocyte apoptosis via elevated intracellular calcium and free radicals. Cell biochemistry and biophysics. 2011;61(1):1.31-6

5. Sun Y, Ito S, Nishio N, Tanaka Y, Chen N, Isobe K-i. Acrolein induced both pulmonary inflammation and the death of lung epithelial cells. Toxicology letters. 2014;229(2):384-92.

6. Norheim F, Langleite TM, Hjorth M, Holen T, Kielland A, Stadheim HK, et al. The effects of acute and chronic exercise on PGC-1α, irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. The FEBS journal. 2014;281(3):739-49.

7. Wang B, Wood IS, Trayhurn P. Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology. 2007;455(3):479-92.

8. Steinacker JM, Lormes W, Reissnecker S, Liu Y. New aspects of the hormone and cytokine response to training. European journal of applied physiology. 2004;91(4):382-91.

9. Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. Pharmacology & therapeutics. 1998;80(2):183-201.

10. Morn F, Volker C. Cellular and Molecular of Spot Physiology. Translate by Tattiban B, et al Uromia, Jahad Daneshgahi. 2012.

11. Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases-detection and therapeutic applications. Medical Science Monitor. 2005;11(11):RA337-RA45.

12. Quindry J ,French J, Hamilton K, Lee Y, Mehta JL, Powers S. Exercise training provides cardioprotection against ischemia–reperfusion induced apoptosis in young and old animals. Experimental gerontology. 2005;40(5):416-25.

13. Kim K-B, Kim Y-A, Park J-J. Effects of-۸ week Exercise on Bcl-2, Bax, Caspase-8, Caspase-3 and HSP70 in Mouse Gastrocnemius Muscle. Journal of Life Science. 2010;20(9):1409-14.

14. Carpéné C, Galitzky J, Fontana E, Atgié C, Lafontan M, Berlan M. Selective activation of β3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 1999;359(4):310-21.

15. Thevis M, Koch A, Sigmund G, Thomas A, Schänzer W. Analysis of octopamine in human doping control samples. Biomedical Chromatography. 2012;26(5):610-5.

16. De Oliveira AL, De Paula MN, Comar JF, Vilela VR, Peralta RM, Bracht A. Adrenergic metabolic and hemodynamic effects of octopamine in the liver. International journal of molecular sciences. 2013;14(11):21858-72.

17. Xin-Fang L, Jumat S, Rais MM, Kamsiah J. Effect of Repeatedly Heated Palm Olein on Blood Pressure—Regulating Enzymes Activity and Lipid Peroxidation in Rats. The Malaysian journal of medical sciences: MJMS. 2012;19(1):20.

18. Agha Ali Nejad H, Towfighi A, Zuhair M, Mahdavi M, Shahrokhi S . The effect of continuous endurance training on HSP70 levels and longevity of mice with breast cancer. Journal of Olympic. 2008;16(2):75-86.

19. Thompson HJ. Effect of exercise intensity and duration on the induction of mammary carcinogenesis. Cancer research. 1994;54(7 Supplement):1960s-3s.

20. Locke M, Noble EG, Atkinson BG. Exercising mammals synthesize stress proteins.

American Journal of Physiology-Cell Physiology. 1990;258(4):C723-C9.

21. Hamilton KL, Powers SK, Sugiura T, Kim S, Lennon S, Tumer N, et al. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2001;281(3):H1346-H52.

22. Campisi J, Leem TH, Greenwood BN, Hansen MK, Moraska A, Higgins K, et al. Habitual physical activity facilitates stress-induced HSP72 induction in brain, peripheral, and immune tissues. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2003;284(2):R520-R30.

23. Kwak H-B, Kim J-h, Joshi K, Yeh A, Martinez DA, Lawler JM. Exercise training reduces fibrosis and matrix metalloproteinase dysregulation in the aging rat heart. The FASEB Journal. 2011;25(3):1106-17.

24. Kalyani RR, Corriere M, Ferrucci L. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. The lancet Diabetes & endocrinology. 2014;2(10):819-29.

25. Mahmudi R, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi P. Effects of Training and Octopamine Supplementation on Expression of M1 and M2 Monocyte/Macrophage Surface Markers in White Adipose Tissue of Rats Poisoned with Deep-Fried Oil. Gene, Cell and Tissue.7(1).

26. Colombo R, Siqueira R, Conzatti A, Fernandes TRG, Tavares AMV, da Rosa Araújo AS, et al. Aerobic exercise promotes a decrease in right ventricle apoptotic proteins in experimental Cor pulmonale. Journal of cardiovascular pharmacology. 2015;66(3):246-53.

Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences
2020, Volume 8, No. 1: 48-59.

Original article

The Effect of aerobic training and octopamine on HSP70 and Caspase-3 protein expression in brown adipose tissue in rats received deeply heated oil treatment

Sadegh Abdollahi[1], Khalid Mohamadzadeh Salamat[1*], Kamal Azizbeigi [1], Zaher Etemad[1]

1. Department of Physical Education, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

Corresponding author: Kh.mohamadzadeh@iausdj.ac.ir

Keywords:
Actapamine,
Aerobic exercise,
Brown fat,
Heated oil,
Poisoning

Abstract

Background & Aim: Deep heated oils produce toxins that endanger people's health. The use of herbal supplements along with exercise can improve general health. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of aerobic and octapamine training on HSP70 and Caspase 3 protein in brown adipose tissue of rats received w deep heated oils.

***Methods*:** 40 male wistar rats after four weeks of feeding with heated oil were randomly assigned into control-intoxication (CI; n=8), exercise training-intoxication (ETI; n=8), supplement-intoxication (SI; n=8), supplement-exercise-intoxication (SEI; n=8), and healthy-control (HC; n=8). The exercise-training was done for four weeks at intensity of 50-65% vo2max for 20 minutes per session. Octopamine was used as a supplement for 4 weeks and it was also used in the form of intraperitoneal injection with a dose of 81 µmol/kg for five days per week in the CI, SI, and SEI. To test the HSP70 protein by immunohistochemistry And Caspaz 3 used Western blot.

***Results*:** The results showed that aerobic exercise significantly reduces HSP-70 protein (P = 0.001). Octopamine intake significantly reduced HSP-70 protein (P = 0.001). However, the interaction between aerobic exercise and octopamine did not have a significant effect on HSP-70 protein concentration. Aerobic exercise significantly reduced Caspase 3 (P = 0.001). Taking octapamine supplementation significantly reduced caspase 3 (P = 0.001). Also, the interaction of aerobic exercise and octopamine significantly reduced Caspase 3 (P = 0.016).

***Conclusion*:** Aerobic exercise and octopamine reduce the detrimental effects of deeply heated oils. It is recommended to use food at a temperature below 180 ^{0}C and in order to reduce the effects of toxins produced by these oils, regular aerobic exercise and octapamine supplementation would be useful.

How to Cite this Article: Abdollahi S, Mohamadzadeh Salamat K, Azizbeigi K, Etemad Z. The Effect of aerobic training and octopamine on HSP70 and Caspase-3 protein expression in brown adipose tissue in rats received deeply heated oil treatment. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2020;8(1):48-59.

Copyright © 2020 Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.