

## تأثیر یک دوره فعالیت بدنی هوازی و مکمل یاری اکتاپامین بر بیان اینفلامازوم NLRP1، PI3k، آپوپتوزیس و هیستوپاتولوژیک بافت قلب موش‌های صحرایی نر مسموم شده با روغن حرارت دیده عمیق

محبوبه کاظمی دره‌بیدی<sup>۱</sup>، مقصود پیری<sup>۲</sup>، محمدعلی آذربایجانی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۴/۰۴ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۷/۲۴

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** اشتباهات رایج تغذیه‌ای باعث التهاب و تخریب هومئوستاز سلول‌های قلبی می‌شود. از جمله مسیرهایی که سبب القای التهاب و تخریب بازسازی پروتئین‌های قلبی می‌شود کمپلکس اینفلامازوم می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی تغییرات اینفلامازوم NLRP1، PI3k، آپوپتوزیس و هیستوپاتولوژیک بافت قلب به دنبال فعالیت بدنی هوازی و مکمل یاری اکتاپامین در موش‌های صحرایی نر مسموم شده با روغن چند بار حرارت دیده عمیق (DFO) بود.

**مواد و روش کار:** ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم) به‌طور تصادفی به ۵ گروه (n=6): کنترل، روغن حرارت دیده عمیق، روغن حرارت دیده عمیق + تمرین هوازی، روغن حرارت دیده عمیق + مکمل اکتاپامین (Sup) و روغن حرارت دیده عمیق + تمرین هوازی + مکمل اکتاپامین تقسیم شدند. در طول دوره پژوهش DFO به‌صورت خوراکی (گاواژ، ۱۰ ml/kg) مدت ۴ هفته به موش‌های صحرایی مربوط خوراندند (صبح). دوز مورد استفاده اکتاپامین 81 mol/kg به‌صورت تزریق درون صفاقی IP و حل‌شده با نرمال سالین ۹ درصد بود که ۲ ساعت بعد از انجام تمرین ورزشی به گروه‌های مکمل تزریق می‌شد. موش‌های صحرایی گروه تمرینی نیز به تمرین تردمیل با شدت متوسط در هفته‌ی اول ۵۰٪ vo2max و در هفته‌ی آخر به ۶۵٪ vo2max پرداختند. تغییرات بیان ژنی NLRP1 و بیان پروتئینی PI3k با روش RT Pcr و IHC انجام شد. همچنین برای بررسی آپوپتوز از روش تانل استفاده شد.

**یافته‌ها:** مصرف DFO افزایش معنی‌داری در تخریبات بافتی (P=0.001) و رسوب کلاژن (p=0.001) به بافت قلب ایجاد کرد. همچنین گاواژ DFO به مدت ۴ هفته در نمونه موش صحرایی، باعث افزایش معنی‌داری در تخریبات بافتی، افزایش mRNA اینفلامازوم NLRP1 و سلول‌های آپوپتوزی (p=0.001) و همچنین کاهش معنی‌دار در بیان پروتئین PI3K می‌شود (p=0.001). در بررسی تغییرات بافتی نیز مشخص شد که گروه‌های روغن حرارت دیده عمیق + مکمل اکتاپامین و روغن حرارت دیده عمیق + تمرین هوازی + مکمل اکتاپامین کاهش معنی‌دار در رسوب کلاژن نشان دادند (p<0.05). همچنین مداخلات درمانی مقادیر mRNA NLRP1 و سلول‌های درمانی را کاهش و بیان پروتئین PI3K را افزایش دادند که بیشترین این تغییرات مربوط به گروه روغن حرارت دیده عمیق + تمرین هوازی + مکمل اکتاپامین بود (p<0.05).

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف اکتاپامین همراه با تمرین ورزشی هوازی به مدت ۴ هفته قادر به کنترل کمپلکس اینفلامازوم (کاهش mRNA NLRP1) و به دنبال آن کاهش آپوپتوز و بهبود ظرفیت احیای سلول‌های قلبی (بیان پروتئین PI3K) در مدل اختلالات تغذیه‌ای ناشی از DFO است. لذا می‌توان بیان کرد که مکمل یاری اکتاپامین با تمرین ورزشی می‌تواند تأثیرات حفاظت قلب در شرایط تغذیه غیرهوشمندانه داشته باشد.

**کلیدواژه‌ها:** کمپلکس اینفلامازوم، فعالیت بدنی هوازی، روغن حرارت دیده عمیق، قلب، آپوپتوزیس

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره نهم، ص ۶۷۹-۶۶۷، آذر ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، گروه فیزیولوژی ورزشی، تلفن: ۰۹۱۲۱۱۲۴۴۳۴

Email: m.peeri@iauctb.ac.ir

### مقدمه

بیماری قلبی عروقی (CVD) عامل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر دنیا محسوب می‌شود تخمین زده شده که در سطح جهان

۱ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

۲ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

۳ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

محصولات باعث تولید رادیکال‌های آزاد، مولکول‌های قطبی و تغییرات ترکیبی در اسید چرب آزاد می‌شوند (۱۱). در طول مصرف این غذاهای سرخ شده، روغن به همراه محصولات تخریبی آن می‌توانند به گردش خون سیستمی وارد شوند (۱۲). بیان شده که مصرف این محصولات با تخریب پاتوفیزیولوژیکی به علت استرس اکسیداتیو مرتبط بوده است (۱۳). مطالعات حیوانی نشان داد که مصرف روغن‌های گیاهی با گرم شدن مکرر در دمای بالا باعث ایجاد اثرات منفی بر روی ساختار استخوان و سلول‌های استخوانی در موش‌های صحرایی اورکتومی و افزایش بروز فشارخون، اختلال عملکرد اندوتلیال، عوارض عروقی، افزایش اکسیداسیون لیپوپروتئین و در نهایت تقویت آترواسکلروز می‌شود (۱۴). افزایش استرس اکسایشی علاوه بر تخریب بافتی با افزایش آپوپتوزیس و پروتئین‌های اینفلامازوم NLRP1 در تخریب هومئوستاز سلول‌های عضله قلبی نقش دارد.

گسترش التهاب از جمله عوامل القاکننده بیماری‌های قلبی عروقی به‌ویژه آترواسکلروزیس می‌باشد. NOD-like receptors (NLRPs) مجموعه‌ی بزرگی از پروتئین‌های سیتوزولی هستند که نقش مهمی در التهاب و ایمنی ذاتی دارند. آن‌ها به‌عنوان سیستم‌عامل برای جذب و فعال‌سازی پروتئازاز کاسپاز-۱ در التهاب نقش دارند. فعال‌سازی کاسپاز-۱ منجر به پردازش و بلوغ اینترلوکین- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) و اینترلوکین ۱۸ (IL-18) می‌شود. مکانیسم‌های التهابی NLRP1 در شرایط اشتباهات تغذیه‌ای نظیر DFO که منجر به التهاب می‌شود مشخص نشده است (۱۵). بیان شده که محرک‌های التهابی در پلاسمای بیماران مبتلا به بیماری قلبی عروقی باعث تحریک بیان عامل التهابی NLRP1 در سلول‌های اندوتلیال آئورت انسانی می‌شود (۱۵). در همین حال، بهبود سبک زندگی با تمرین ورزشی و مصرف مکمل‌های گیاهی و دارویی برای کاهش وقایع قلبی عروقی در بیماران مبتلا به بیماری عروق محیطی نشان داده شده است (۱۶).

انجام تمرین ورزشی منظم یک استراتژی غیر دارویی است که قادر به کاهش عوامل خطر قلبی عروقی و محافظت از قلب و همچنین پیشگیری و درمان چاقی و عوارض متابولیکی آن می‌باشد (۱۷). این وجود، پاسخ تطبیقی ناشی از تمرینات ورزشی فرایندی پیچیده است که به عوامل مختلفی چون طول مدت ورزش بستگی دارد (۱۸). نشان داده شده که تمرین ورزشی در بافت قلبی قادر به بهبود رمودلینگ قلبی با تقویت مسیر سیگنالی AKT/PI3K می‌باشد. در مطالعات متعدد افزایش PI3K با تمرین ورزشی در بافت قلب مشاهده شده است. بیان شده که مهار PI3K با داروهای مختلف بقای سلول‌های آپوپتوزی را تحت تأثیر قرار

۳۲ درصد از کل مرگ‌ومیرها مربوط به بیماری‌های قلبی عروقی است (۱، ۲). در ایالات متحده به ازای هر ۳ مرگ، یک مرگ مربوط به بیماری قلبی عروقی است (۳). هزینه‌های مستقیم و غیرمستقیم ناشی از این بیماری تقریباً ۳۲۰ میلیارد دلار تخمین زده می‌شود. جدا از این هزینه‌ها این بیماری کیفیت زندگی افراد را نیز کاهش می‌دهد. اصلاح رژیم غذایی از اواسط قرن گذشته هنگامی که AHA برای اولین بار توصیه‌هایی را صادر کرد، سنگ بنای پیشگیری از CVD بوده است. برای اکثر قریب به اتفاق توجهات آن زمان، تمرکز روی چربی‌های اشباع، یا حتی چربی‌های اشباع نشده بود. این در حالی است که جدا از تأثیرات چربی‌های مختلف در القای بیماری‌های قلبی عروقی، نوع پخت‌وپز و دمایی که چربی در آن سرخ می‌شود هم می‌تواند بر سلامت دستگاه قلب و عروقی نیز تأثیر بگذارد.

سرخ کردن روغن یا چربی در دمای بالا (۱۵۰ درجه سانتی‌گراد-۱۹۰ درجه سانتی‌گراد) یکی از روش‌های معمول سرو غذا است که به دلیل وجود رنگ بهتر غذا، طعم و بافت غذای سرخ شده روشی محبوب می‌شود. این روش به‌طور گسترده در صنایع تولیدی کوچک و بزرگ و برای انواع محصولات مانند سیب‌زمینی سرخ شده، غذاهای دریایی، تخم‌مرغ و مرغ استفاده می‌شود. غذاهای سرخ شده معمولاً دارای طعم مطبوع، پوشاننده شده از سطح ترد و رنگ جذاب هستند و جذب روغن توسط محصول سرخ شده باعث خورده شدن جذاب‌تر غذا می‌شود (۴). بیان شده که سرخ کردن روغن در دمای بالا به‌صورت مکرر با عوارض جانبی سلامتی همراه است (۵). زمان بالای پخت‌وپز و سرخ کردن در درجه حرارت بالا با خطرات سرطان‌زایی (۶، ۷)، جهش‌زایی (۷) و سمیت سلولی (۸) در ارتباط می‌باشد. مطالعات حیوانی همچنین تعدادی از پاسخ‌های ژنوتوکسیک ناشی از مصرف روغن‌های مکرر سرخ شده که به‌طور بالقوه باعث سرطان‌های مختلفی می‌شوند را تأیید کرده است (۹). در دماهای بالا، روغن‌های گیاهی یک ماده سرطان‌زا و سمی به نام هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای ایجاد می‌کنند (۱۰). لوپیز-Abenteet و همکاران، (۲۰۰۱) تأیید کردند که افراد در معرض هیدروکربن آروماتیک چندحلقه‌ای در معرض خطر ابتلا به سرطان هستند. علاوه بر خطرات این نوع روغن‌ها در القای سرطان، می‌تواند تأثیرات تخریبی بر بسیاری از بافت‌های بدن به‌ویژه دستگاه قلبی عروقی داشته باشد.

روش‌های استفاده از روغن‌های سرخ شده مکرر معمولاً ناسالم است و خطر ابتلا به CVD را بیشتر نشان می‌دهد. در طی این فرایند سرخ کردن، یک لیپید، به‌ویژه اسید چرب غیراشباع چندگانه، تحت اکسیداسیون، هیدرولیز و پلیمریزاسیون قرار می‌گیرد که منجر به تولید فرآورده‌های فرار و غیر فرار می‌شود. این

اساس ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی تهران انجام شد (کد اخلاق: IR.MUK.REC.1398.242). حیوانات پس از یک هفته آشناسازی با محیط آزمایشگاه به صورت تصادفی به پنج گروه به طور تصادفی به ۵ گروه (n=6): کنترل، DFO، DFO + تمرین هوای (AE)، DFO + مکمل اکتاپامین (Sup) و DFO+AE+Sup تقسیم شدند.

#### القای مسمومیت با DFO:

بهمنظور تهیهی روغن حرارت دیده بر اساس مطالعات پیشین از ۸ لیتر روغن آفتابگردان استفاده شد. روغن به مدت ۴ روز متوالی روزی ۸ ساعت با حرارت ۱۹۰ تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد داغ شده و طبق منابع هر ۳۰ دقیقه مواد غذایی: ناگت مرغ، سیب‌زمینی، مرغ و فرآورده‌های پروتئینی (سوسیس و کالباس) داخل روغن غوطه‌ور شده و در انتها روغن روز چهارم بهممنظور استفاده به‌عنوان مداخله‌ی مسمومیتی تا زمان اجرا نگهداری و به‌صورت خوراکی (گاواژ، ۱۰ ml/kg) به مدت ۴ هفته (۵ روز در هفته) به موش‌های صحرایی خوراند شد (۲۳). گاواژ روغن سوخته هر روز ساعت ۸ صبح به انجام می‌شد. در بررسی آزمایشگاهی روغن مشخص شد که DFO تهیه‌شده حاوی هیدروپراکسید چربی ۹۰،۹۴ (meq / kg) بود، همچنین ترکیب اسیدهای چرب کل در جدول ۱ نشان داده شده است.

#### مکمل اکتاپامین:

مکمل مورد استفاده در این تحقیق اکتاپامین بود که به مدت ۴ هفته، ۵ روز در هفته اعمال شد. دوز مورد استفاده اکتاپامین بر اساس مقالات 81 mol/kg به‌صورت تزریق درون صفاقی IP و حل‌شده با نرمال سالین 9 % می‌باشد (۲۴) که دو ساعت بعد از انجام تمرین ورزشی تزریق انجام می‌شد. مکمل از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

#### پروتکل تمرینی:

برنامه تمرینی به مدت ۴ هفته، ۵ روز در هفته و در ساعت ۱۳ تا ۱۵ بعد از ظهر و با شدت متوسط بر روی تردمیل حیوانی انجام پذیرفت (Tajhiz gostar Iranian, Model 2016). بر اساس مطالعات شدت تمرین در هفته‌ی اول 50% vo2max و در هفته‌ی آخر به 65% vo2max رسید. بهممنظور سازگاری تمرینی، موش‌های صحرایی قبل از شروع برنامه اصلی تمرینی یک هفته تمرین سازگاری با سرعت 9 m/min به مدت ۲۰ دقیقه انجام دادند. مدت‌زمان تمرین بر اساس مطالعات پیشین ۲۰ دقیقه ثابت بوده و شدت تمرین از روز اول 16 m/min و در روز آخر به 26 m/min رسید. برای شروع تمرین ۵ دقیقه با سرعت 7 m/min گرم کردن و پس از تمرین اصلی ۵ دقیقه با سرعت 5 m/min سرد کردن در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است در طول برنامه

دهد. اکتاپامین نیز از جمله عواملی است که می‌تواند ضربان قلب را تحت تأثیر قرار دهد.

اکتاپامین نام یک آمین بیوژنیک درون‌زا است که ارتباط نزدیکی با نوراپی‌نفرین دارد، و بر روی سامانه‌های آدرنرژیک و دوپامینرژیک تأثیرگذار است (۱۹). این ماده به‌طور طبیعی در گیاهان متعدد مانند نارنج موجود است. بیوسنتز اکتاپامین به‌وسیله  $\beta$ -هیدروکسیلاسیون از تیرامین و از طریق آنزیم دوپامین  $\beta$ -هیدروکسیلاز صورت می‌گیرد. همچنین اکتاپامین از نظر بالینی به‌عنوان یک داروی مقلد سمپاتیک تجویز می‌شود و می‌تواند عملکرد قلب و سلول‌های قلبی را تحت تأثیر قرار دهد. در رابطه با تأثیر اکتاپامین در تمرین ورزشی بیان شده که تمرین ورزشی حاد با دوز پایین بر عملکرد استقامتی، اکسیداسیون سوستر، یا غلظت هورمون‌های جریان خون را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۰). آذربایجانی و همکاران اخیراً (۲۰۲۰)، تأثیرات سینرژیک تمرین ورزشی و مکمل اکتاپامین را بر PGC-1 $\alpha$  و UCPI در بافت قلبی موش‌های صحرایی با مصرف DFO مورد بررسی قرار داده و بیان کردند که درمان ترکیبی تمرین ورزشی با مصرف اکتاپامین عملکرد میتوکندری قلبی را بهبود می‌بخشد (۲۱). سوو همکاران (۲۰۱۷) نیز نشان دادند که در نمونه دروزوفیلا مصرف اکتاپامین سبب سازگاری بهتر در تمرین استقامتی می‌شود (۲۲). این در حالی است که تأثیرات تمرین ورزشی با مکمل دهی اکتاپامین بر کنترل ریسک فاکتورهای بیماری قلبی عروقی به‌ویژه مسیر التهابی اینفلامازوم مورد ارزیابی قرار نگرفته است. لذا در مطالعه حاضر بر آن شدیم که تغییرات تخریب سلولی DFO را بر سلول‌های عضله قلبی مورد بررسی قرار دهیم. در این مطالعه همچنین تأثیرات اکتاپامین و فعالیت بدنی هوازی در دوران مصرف DFO مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

#### مواد و روش کار

##### حیوانات و گروه‌بندی:

در پژوهش حاضر ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۱۶ هفته‌ای با دامنه وزنی  $20 \pm 350$  از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. پس از انتقال موش‌های صحرایی به محیط جدید حیوانات در شرایط کنترل‌شده با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر)، دما ( $22 \pm 3$  سانتی‌گراد)، و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. تعداد سه تا پنج عدد موش صحرایی در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ سانتی‌متر به‌گونه‌ای نگهداری شدند که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشته باشند. تمامی مراحل نگهداری و کشتار موش‌های صحرایی بر

تمرینی از هیچ‌گونه شوک تمرینی استفاده نشد و در صورت لزوم با استفاده از دست و یا ایجاد محرک صوتی بر روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات مجبور به ادامه تمرین شدند.

جدول (۱): کروماتوگرام و ترکیب اسیدهای چرب کل برای DFO

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Name
1	8.656	2815	1503	0.183	C12:0
2	9.268	9363	5572	0.607	C14:0
3	10.108	334877	166330	21.715	C16:0
4	10.397	3634	1687	0.236	
5	10.451	35710	17566	2.316	C16:1
6	10.660	2205	1022	0.143	C17:0
7	11.058	1336	536	0.087	C17:1
8	11.390	87737	35935	5.689	C18:0
9	11.766	13205	3807	0.856	C18:1t
10	11.864	607740	205169	39.410	C18:1c
11	12.491	5220	1700	0.338	C18:2t
12	12.586	8008	2810	0.519	C18:2t
13	12.687	375676	132580	24.361	C18:2c
14	13.433	8743	1644	0.567	C20:0
15	13.742	4289	1088	0.278	C18:3t
16	13.857	25153	8150	1.631	C18:3n3
17	14.134	6940	2151	0.450	C20:1
18	14.349	1698	317	0.110	
19	15.421	1212	355	0.079	
20	16.656	4868	1185	0.316	C22:0
21	19.970	1683	540	0.109	C24:0
Total		1542115	591647	100.000	

بهم‌منظور بازیابی آنتی‌ژنی، در بافر TBS1X (pH:9.2) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه انکوبه شد. سپس تریتون ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه بهم‌منظور نفوذپذیر کردن غشاء سلول‌ها استفاده گردید پس از شست‌وشو با PBS، سرم بز ۱۰ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه بهم‌منظور بلوک کردن واکنش آنتی‌بادی ثانویه به‌صورت رنگ اضافی زمینه اضافه شد. آنتی‌بادی اولیه رقیق شده ضد PI3K (۱ به ۱۰۰) با PBS به مدت یک شب به نمونه اضافه گردید و در دمای ۲ تا ۸ درجه انکوبه شد. پس از شست‌وشو با PBS آنتی‌بادی ثانویه متصل شده با رنگ FITC اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت در تاریکی انکوبه گردید. در نهایت بهم‌منظور رنگ‌آمیزی هسته، به نمونه‌ها DAPI اضافه شد. در مرحله آخر نمونه توسط میکروسکوپ فلوروسنت مدل Olympus و با لنز ۴۰۰ برای تأیید مارکرها مشاهده شدند.

#### اندازه‌گیری تانل:

در بخش رنگ‌آمیزی تانل، از کیت تانل ساخت شرکت Roche آلمان استفاده شد (Insitu cell death detection kit, POD). اساس بر دستورالعمل شرکت سازنده، مقاطع بافتی در دمای ۶۲ درجه انکوبه و در سری الکل نزولی آبدهی شدند. سپس در محلول بافری PBS شست‌وشو و بعداز آن به مدت ۳۲ دقیقه در

#### ارزیابی‌های بافتی (H&E و تری کروماتسون):

پس از ۴ هفته، کلیه موش‌های صحرایی با تزریق کتامین (۷۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلارین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند سپس بافت قلب برداشته و قسمت اپکس در پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (قسمت قسمت بالایی بطن چپ بافت قلب نیز پس از فریز در یخچال با دمای ۸۰- نگهداری و برای ارزیابی بیان ژن استفاده شد). بعد از گذشت ۲۴ ساعت از مرحله تثبیت اولیه، برش ۵ میکرومتری از ناحیه اپکس بافت قلب تهیه و با رنگ‌آمیزی H&E و تری کروماتسون برای ارزیابی‌های بافتی تهیه شد. بهم‌منظور درجه‌بندی شاخص‌های پاتولوژی بررسی شکل هسته و غشا هسته، بررسی رنگ‌پذیری سیتوپلاسم سلول‌ها، بررسی پارگی یا حذف سلول‌های قلبی و بررسی میزان حضور لنفوسیت‌ها در بافت موردتوجه قرار گرفت. هر مورد از درجه ۰-۴ درجه‌بندی شد. و در نهایت شاخص کمتر به معنی آسیب کمتر در نظر گرفته شد.

#### بررسی ایمونوهیستوشیمی:

پس از تثبیت نمونه‌های فیکس شده (فرمالین ۱۰٪)، بافت‌های قالب‌گیری شده در پارافین توسط دستگاه میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر گرفته شد. برش‌های به‌دست‌آمده

انجماد خرد شد و به منظور لیز نمونه‌ها میزان ۱۰۰ لاندا کلروفرم به مدت ۱ دقیقه به آن‌ها اضافه شد. محلول حاصل، با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. ۱ سی‌سی ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست‌به‌هم زده شد. نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب آن ۱ سی‌سی الکل ۷۰ درصد اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. مایع رویی تخلیه گردید و پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه بر روی پلاک ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه‌ی ۶۰ درجه قرار داده شد. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده ( Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری سطوح بیان NLRP1 از روش کمی Real time-Pcr انجام شد. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های NLRP1 و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکروژن انجام شد. از ژن گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به‌عنوان ژن کنترل استفاده گردید و میزان بیان ژن مورد نظر با فرمول  $-\Delta\Delta CT$  محاسبه شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ گزارش شده است.

دمای 37 درجه سانتی‌گراد با محلول پروتئیناز K مجاور گردیدند. پس از انکوباسیون، نمونه‌ها در محلول PBS شستشو و سپس در مجاورت محلول واکنش تانل به مدت ۶۲ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس‌از آن، مقدار ۵۰ لاندا از محلول Converter-POD که به‌صورت آماده بود، بر روی هر نمونه اضافه گردید و به مدت ۳۲ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. مجدداً در PBS شستشو و میزان ۵۰ لاندا از سوبسترای دی‌آمینو بنزیدین بر روی نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در انتها، جهت رنگ‌آمیزی زمینه، نمونه‌ها در داخل هماتوکسیلین قرار داده شدند. سلول‌های آپوپتوتیک مثبت در زیر میکروسکوپ به رنگ قهوه‌ای تیره قابل مشاهده بودند. جهت بررسی شاخص اندازه‌گیری تانل (Tunel Index [%]) در هر الاید، ۵ ناحیه به‌طور تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و تعداد سلول‌های آپوپتوزی در هر ناحیه به‌صورت چشمی در زیر میکروسکوپ شمارش گردید. سپس میانگین ۵ ناحیه مورد بررسی، به‌عنوان تعداد سلول آپوپتوزی نسبت به کل سلول در هر اسلاید در نظر گرفته شد. پس از رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus با بزرگنمایی ۴۲× مورد بررسی قرار گرفتند.

### بررسی بیان ژن:

جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت‌ها در همه گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن، آلمان) انجام گرفت. برای این کار، میزان ۲۰۰ لاندا کیاژول به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰- انکوبه شد. پلاک موجود در کرایوتیوب در حالت نیمه

جدول ۲- توالی پرایمرها

Gene name	Oligo sequence 5'-3'
NLRP1	F 5' CAAGAGGGAAAGGTGGACAG 3' R 5' GGAAGTGATGGGGATGAAGTGT 3'
GAPDH	F 5' AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG3' R 5' CATACTCAGCACCAGCATCACC3'

پس از جمع‌آوری، به‌وسیله نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ در سطح معناداری حداقل ۰/۰۵ < P تجزیه و تحلیل شد.

### یافته‌ها

#### تغییرات بافتی با روش H&E و تری کروماتسون:

به‌منظور ارزیابی بافت‌های از روش‌های H&E و تری کروماتسون استفاده شد. در بررسی تغییرات بافتی مشاهده شد که

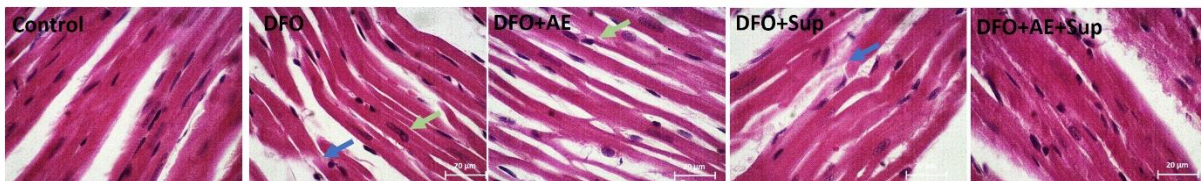
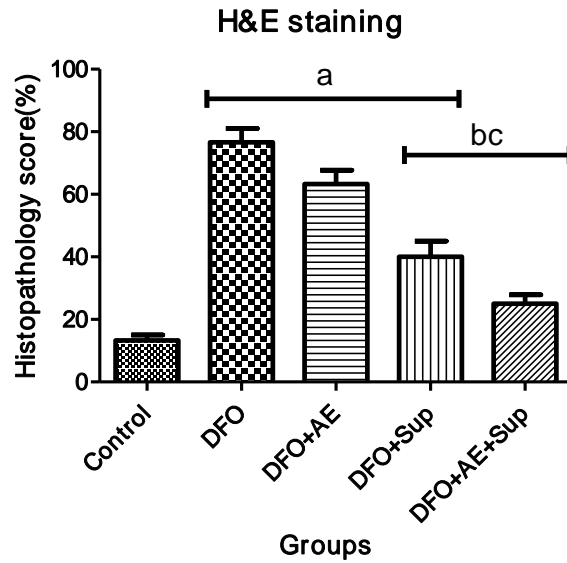
### آزمون آماری:

از میانگین و انحراف استاندارد برای گزارش توصیفی داده‌ها استفاده شد. پس از تأیید نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک، به منظور تعیین معنادار بودن تفاوت میانگین متغیرهای گروه‌های تحقیق، از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی توکی استفاده شد. اطلاعات مورد نیاز

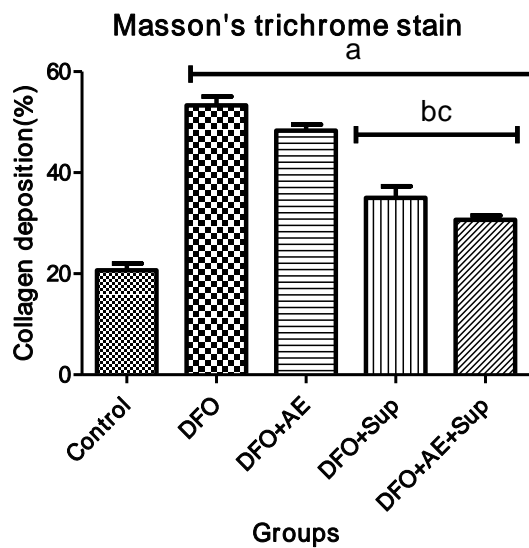
این در حالی بود که گروه‌های DFO+Sup و به‌ویژه DFO+AE+Sup کاهش معنی‌داری را در تخریب بافتی نشان دادند ( $p < 0.05$ ). همچنین بیشترین کاهش در خون‌ریزی و نفوذ لنفوسیتی در گروه DFO+AE+Sup بود.

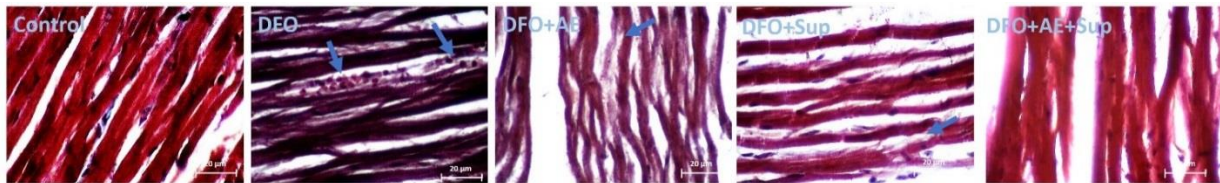
مصرف DFO افزایش معنی‌داری در تخریبات بافتی ( $P=0.001$ ) و رسوب کلاژن ( $p=0.001$ ) به بافت قلب ایجاد کرد (تصویر ۱ الف و ب). بر اساس این نتایج مصرف DFO به مدت ۴ هفته سبب افزایش فیلتراسیون لنفوسیتی شده و ریسک فیبروزیس را بالا برد.

(الف)



(ب)



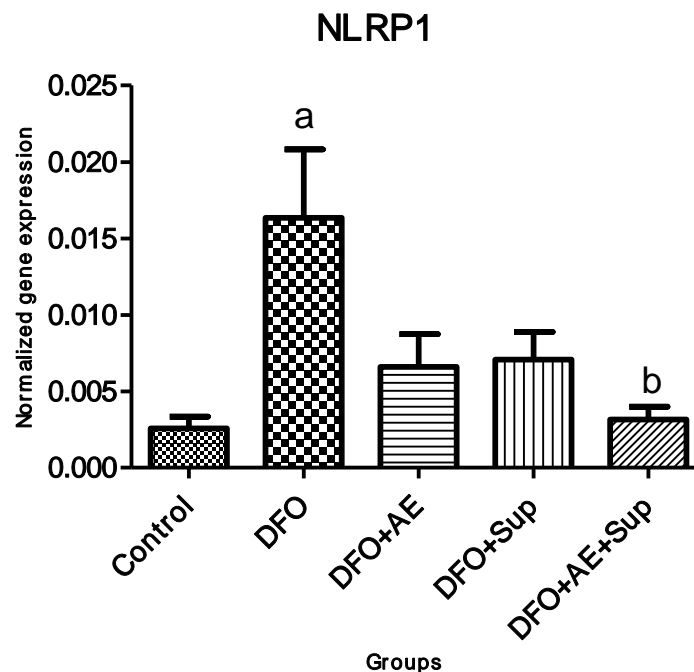


**تصویر (۱):** تغییرات بافتی قلب در گروه‌های مختلف پژوهش (الف: تصاویر H&E، ب: تری کروماتون) بزرگنمایی ۲۰. فلش آبی نشان‌دهنده تخریب بافتی و به هم خوردن انسجام بافتی و فلش سبز نشان‌دهنده انفیلتراسیون لکوسیت‌ها می‌باشد. نتایج به صورت میانگین و انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. a: نشانه معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، b: نشانه معنی‌داری نسبت به گروه DFO، c: نشانه معنی‌داری نسبت به گروه DFO+AE، علائم اختصاری: DFO: روغن حرارت دیده عمیق، AE: تمرین هوازی، Sup: مکمل اکتاپامین.

### بیان ژن NLRP1:

همچنین گروه مکمل اکتاپامین مقادیر آن را کاهش دادند و بیشترین کاهش نیز مربوط به گروه DFO+AE+Sup بود (p=0.001).

در بررسی تغییرات mRNA ژن اینفلامازوم NLRP1 همچنین مشاهده شد که DFO به طور معنی‌داری مقادیر آن را افزایش می‌دهد (p=0.001) در حالی گروه‌های تمرین ورزشی و

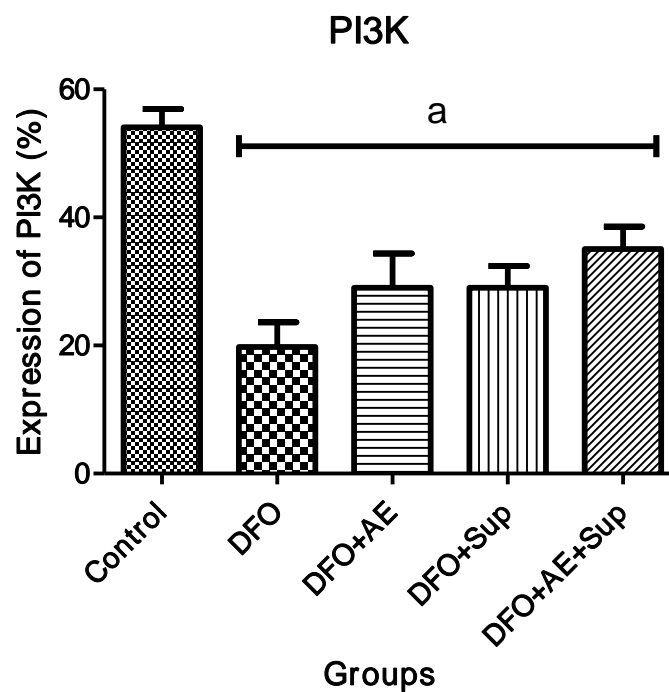
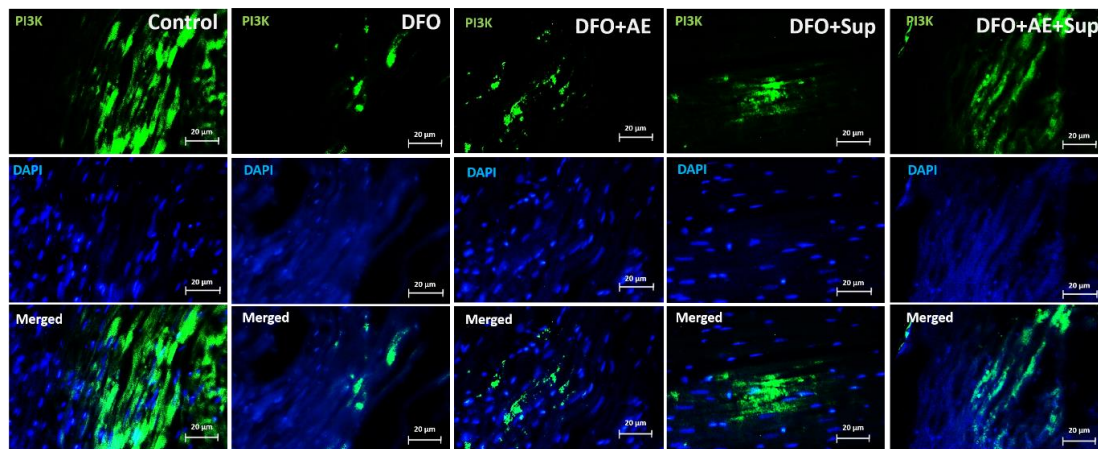


**تصویر (۲):** تغییرات بیان ژن NLRP1 در عضله قلب در گروه‌های مختلف پژوهش. نتایج به صورت میانگین و انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. a: نشانه معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، b: نشانه معنی‌داری نسبت به گروه DFO، علائم اختصاری: DFO: روغن حرارت دیده عمیق، AE: تمرین هوازی، Sup: مکمل اکتاپامین.

بود که مداخلات درمانی پژوهش حاضر قادر به افزایش این پروتئین در بافت قلب نسبت به گروه DFO نبودند. گروه DFO+AE+Sup هر چند افزایش بیشتری در PI3K نسبت به گروه DFO نشان داد اما این افزایش معنی‌دار نبود (p>0.05).

### پروتئین PI3K با روش IHC:

تغییرات بیان پروتئین PI3K با استفاده از روش ایمنووهیستوشیمی در تصویر ۳ نشان داده شده است. با توجه به تصویر ۳ مصرف DFO به مدت ۴ هفته سبب کاهش معنی‌دار در بیان پروتئینی PI3K در بافت قلبی شد (p=0.001). این در حالی



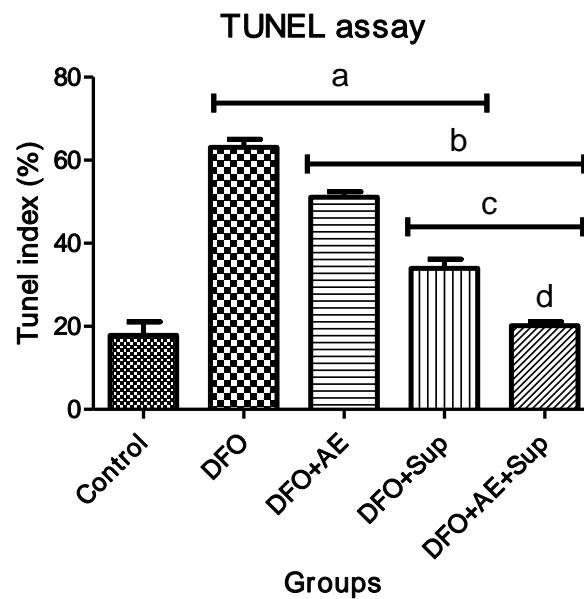
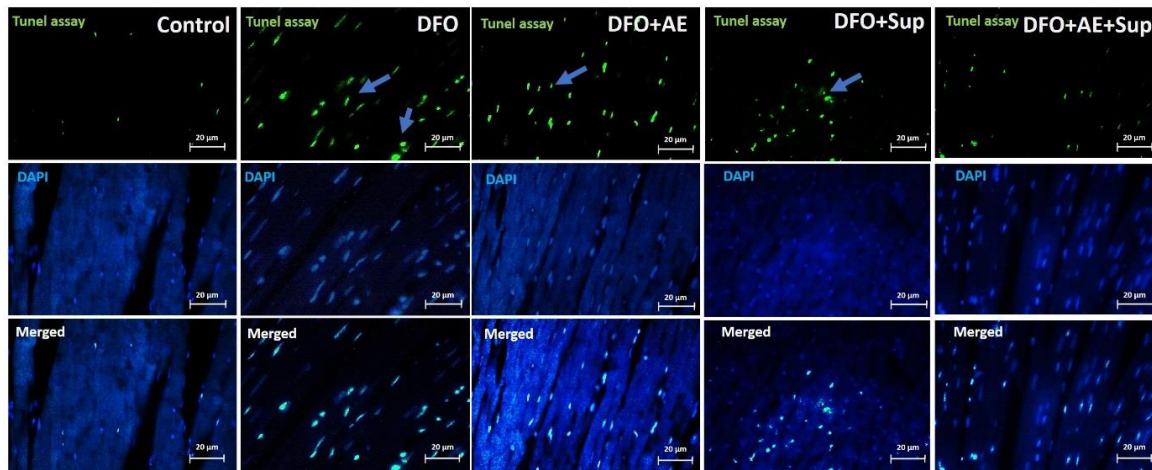
**تصویر (۳):** تغییرات بیان پروتئینی PI3K در عضله قلب در گروه‌های مختلف پژوهش با روش IHC. نتایج به صورت میانگین و انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. a: نشانه معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، علائم اختصاری: DFO: روغن حرارت دیده عمیق، AE: تمرین هوازی، Sup: مکمل اکتاپامین.

به‌طور معنی‌داری تخریبات ناشی از DFO را جبران و سلول‌های آپوپتوزی در بافت قلبی را کاهش دادند ( $p < 0.05$ ). در بررسی بین گروه‌های مختلف درمانی نیز گروه ترکیبی DFO+AE+Sup نسبت به مداخلات تکی (DFO+Sup و DFO+AE) بیشترین کاهش را در سلول‌های آپوپتوزی نشان داد که این تغییرات نیز معنی‌دار بود.

#### تغییرات سلول‌های آپوپتوزی با روش تانل

تغییرات سلول‌های آپوپتوزی با روش تانل در تصویر ۴ نشان داده شده است. با توجه به این نتایج مصرف DFO به‌طور معنی‌داری سلول‌های آپوپتوزی را در بافت قلبی افزایش داد ( $p = 0.001$ ). در مقابل تمام مداخلات درمانی مطالعه حاضر (تمرین، مکمل اکتاپامین و ترکیب تمرین و مکمل اکتاپامین)





**تصویر (۴):** تغییرات سلول‌های آپوپتوزی در بافت قلبی در گروه‌های مختلف پژوهش. نتایج به صورت میانگین و انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. فلش آبی نشان‌دهنده سلول‌های آپوپتوزی در بافت قلبی می‌باشند. a: نشانه معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، b: نشانه معنی‌داری نسبت به گروه DFO، c: نشانه معنی‌داری نسبت به گروه DFO+AE، d: نشانه معنی‌داری نسبت به گروه DFO+Sup. علائم اختصاری: DFO: روغن حرارت دیده عمیق، AE: تمرین هوایی، Sup: مکمل اکتاپامین

## بحث و نتیجه گیری

سرخ کردن یکی از متداول‌ترین روش‌های پخت‌وپز در کشورهای غربی است. هنگامی که غذا سرخ می‌شود، محتوای شیمیایی غذایی تغییر می‌کند - غذا آب خود را از دست می‌دهد و چربی گسترش و باعث افزایش چگالی چربی می‌شود (۲۵). استفاده از روغن‌های حرارت دیده عمیق می‌تواند تأثیرات منفی بر بافت‌های بدن برجای گذارد. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی تغییرات التهابی و آپوپتوزی بافت قلب به دنبال فعالیت بدنی هوایی و مکمل اکتاپامین در موش‌های صحرایی نر مسموم شده DFO می‌باشد. نتایج بافتی مطالعه حاضر نشان داد که مصرف DFO به مدت ۴ هفته سبب تخریب و بهم هم ریختن انسجام بافت عضله قلبی

شده و می‌تواند در شروع فیبروزیس نیز دخیل باشد. همچنین مشاهده شد که گروه مصرف کننده DFO مقادیر مقادیر ژنی NLRP1 بالاتری نسبت به گروه کنترل سالم داشت این تغییرات همچنین با سلول‌های آپوپتوزی همسو بود. این در حالی بود که مقادیر PI3K بافت قلب کاهش پیدا کرد. روغن‌های سرخ شده برای صرفه جویی در هزینه‌ها بارها و بارها برای سرخ کردن مواد غذایی استفاده می‌شوند. با این حال، این روغن‌ها رنگ، بو، طعم و قوام خود را از دست می‌دهند. در طی این فرایند سرخ کردن، یک لیپید، به ویژه PUFA، تحت اکسیداسیون، هیدرولیز و پلیمریزاسیون قرار می‌گیرد که منجر به تولید فرآورده‌های فرار و غیر فرار می‌شود. که می‌تواند برای بافت‌های بدن مضر باشد بیان

نقش دارد (۳۰). Fann و همکاران بیان کردند که فعال‌سازی اینفلامازوم NLRP1 مسئول اولیه تخریب عصب کورتیکال در ایسکمیک رپرفیوژن و مدل‌های سکتی می‌باشد (۳۰). در مطالعه حاضر نیز یکی از ریسک فاکتورهای قلبی (DFO) ارزیابی شد که به نظر می‌رسد در این آسیب‌های نیز گسترش DFO در تخریبات قلبی مؤثر باشد. در مطالعه حاضر همچنین مشخص شد گروه‌های مکمل و مکمل تمرین در بهبود بافت قلبی نیز دخیل بوده‌اند. اکتاپامین از جمله مکمل‌هایی است که تغییرات عصبی بافت قلبی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد همانطور که بیان شد از آنجایی که NLRP1 اعصاب کورتیکال را تخریب می‌کند به نظر می‌رسد اکتاپامین قادر به کنترل این نوع تخریبات ناشی از DFO در کنار تمرین ورزشی نیز بوده باشد زیرا که مقادیر NLRP1 در گروه‌های مصرف کننده مکمل اکتاپامین با تمرین ورزشی کاهش را نشان داد. در رابطه با اکتاپامین بیان شده که این مکمل اثرات آنتی‌اکسیدانتی بالایی دارد. عصاره‌های میوه مرکبات (نارنج) که به‌عنوان محصولات کاهش وزن و سرکوب کننده اشتها استفاده می‌شوند، گاهی به‌عنوان یک ماده غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ اما بیشتر تحت عنوان یک مکمل دارویی یا رژیم غذایی مصرف می‌شود (۳۱). یکی از اجزای این عصاره‌ها اکتاپامین است که با تقلید عملکرد سمپاتیک یک ماده آدرنژیک محسوب می‌گردد. از اثرات اکتاپامین می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانتی، اثرات ضد التهابی، کاهش وزن، چربی سوزی و ضد سرطان اشاره کرد (۳۲). با توجه به اثرات ذکر شده از اکتاپامین به نظر می‌رسد ترکیب این مکمل با تمرین ورزشی برخی خواص آن نظیر آنتی‌اکسیدانتی و کنترل التهاب را دوچندان می‌کند که در مطالعه حاضر کاهش NLRP1 در گروه ترکیبی معنی‌دار بود

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از مکمل اکتاپامین در کنار تمرین ورزشی قادر به کنترل التهاب و کاهش آپوپتوزیس و بهبود رمودلینگ بافت قلبی در موش‌های صحرایی مسموم شده با DFO می‌باشد. لذا می‌توان استفاده از اکتاپامین را با تمرین ورزشی به‌عنوان یک روش سبک زندگی سالم در کشورهایی که تغذیه غیر هوشمندانه دارند توصیه کرد.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی به بررسی دوزهای مختلف DFO در حرارت‌های متفاوت پرداخته شود. همچنین برای بررسی دقیق‌تر التهاب نیز شاخص‌های التهابی از جمله TNF-a و اینترلوکین‌های التهابی با این فاکتورها در بافت قلبی مورد ارزیابی قرار گیرند.

## تشکر و قدردانی

شده که در هنگام استفاده مجدد از این روغن‌ها فرآیندهای اکسیداسیون و هیدروژناسیون تخریب و منجر به از بین رفتن چربی‌های اشباع نشده و افزایش چربی‌های ترانس می‌شوند (۲۵). لذا افزایش مصرف چربی ترانس نیز می‌تواند خود دلیلی بر تخریبات بافت قلبی ناشی از DFO در مطالعه حاضر باشد. در این رابطه در مطالعات مقطعی نیز بیان شده که غذاهای سرخ شده با خطرات مختلف قلبی عروقی همراه بوده‌اند. در اسپانیا، مطالعه Soriquer از ۱۲۲۶ بزرگسال نشان داد که مصرف مواد غذایی سرخ شده با روغن‌های چندبار مصرف با شیوع بالاتر فشارخون شریانی همراه است (۲۶). Zhen و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که قرار گرفتن در معرض روغن‌های سوخته و دود آن‌ها باعث تنظیم پروتئین طرفدار آپوپتوز Bax و تنظیم پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2 می‌شود. به‌طور خلاصه این محققان نشان دادند که، روغن‌های سوخته می‌تواند منجر به آپوپتوز از طریق مسیرهای گیرنده میتوکندری و مرگ در سلول‌های AEC II شود (۲۷). هر چند در مطالعه حاضر تغییرات سلول‌های آپوپتوزی با روش تانل مورد ارزیابی قرار گرفت اما این نتایج به‌گونه‌ای با نتایج Zhen و همکاران همسو بود. در رابطه با افزایش اینفلامازوم NLRP1 در گروه DFO نیز می‌توان بیان کرد که مصرف DFO به مدت ۴ هفته توانایی افزایش التهاب در بافت قلبی را دارد زیرا که بیان شده که NLRP1 و NLRP3 به‌عنوان پروتئین‌های التهابی می‌توانند التهاب را در بافت قلبی افزایش دهند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف اکتاپامین با تمرین ورزشی قادر به افزایش PI3K و کاهش سلول‌های آپوپتوزی و همچنین کاهش اینفلامازوم NLRP1 می‌شود. به نظر می‌رسد این تغییرات قادر به کنترل تخریبات ناشی از DFO و بیماری‌های قلبی عروقی ناشی از آن باشد. NLRP1 یکی از مؤلفه‌های اصلی فعال کننده کاسپاز-۱ و التهاب است که در پردازش پروتئولیتیک اینترلوکین- $1\beta$  (IL-1 $\beta$ ) و در مرگ سلول نقش دارد. وانگ و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که مهار اینفلامازوم NLRP1 می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی در بیماری‌های قلبی عروقی باشد (۲۸). لذا تغییرات کاهش اینفلامازوم NLRP1 گروه تمرین و مکمل پژوهش می‌تواند مؤلفه مثبتی تلقی گردد. از آنجایی که خانواده NLRP1 با کاسپازها مرتبط بوده به نظر می‌رسد که کاهش سلول‌های آپوپتوزی گروه DFO+AE+Sup در مطالعه حاضر نیز با تنظیم منفی mRNA NLRP مرتبط باشد. نشان داده شده که NLRP1 فعالیت کاسپاز-۱ را فعال کرده و منجر به بلوغ و ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌شوند (۲۹). هر چند در مطالعه حاضر تغییرات کاسپاز ارزیابی نشد. در رابطه با تأثیرات قلبی NLRP1 بیان شده که NLRP1 یکی از اینفلامازوم‌های شناخته شده است که در آسیب‌های ایسکمیک رپرفیوژن قلبی نیز

کلیه زحمات و مساعدت‌های حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی تهران سپاسگزاری می‌شود.

این مقاله مستخرج از پایان نامه محبوبه کاظمی دانشجوی فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی می‌باشد که بدین وسیله از

## References:

1. Sacks FM, Lichtenstein AH, Wu JH, Appel LJ, Creager MA, Kris-Etherton PM, et al. Dietary fats and cardiovascular disease: a presidential advisory from the American Heart Association. *Circulation* 2017;136(3):e1-e23.
2. Saritas T, Floege J. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Herz* 2020; 45:1-7.
3. Members WG, Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, et al. Heart disease and stroke statistics—2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2006;113(6):e85-e151.
4. Choe E, Min D. Chemistry of deep - fat frying oils. *Journal of food science* 2007;72(5):R77-R86.
5. Ng C-Y, Kamisah Y, Faizah O, Jubri Z, Qodriyah HMS, Jaarin K. Involvement of inflammation and adverse vascular remodelling in the blood pressure raising effect of repeatedly heated palm oil in rats. *Int J Vasc Med* 2012;2012:404025.
6. Srivastava S, Singh M, George J, Bhui K, Saxena AM, Shukla Y. Genotoxic and carcinogenic risks associated with the dietary consumption of repeatedly heated coconut oil. *Br J Nutr* 2010;104(9):1343-52.
7. Srivastava S, Singh M, George J, Bhui K, Shukla Y. Genotoxic and carcinogenic risks associated with the consumption of repeatedly boiled sunflower oil. *J Agric Food Chem* 2010;58(20):11179-86.
8. Dung C-H, Wu S-C, Yen G-C. Genotoxicity and oxidative stress of the mutagenic compounds formed in fumes of heated soybean oil, sunflower oil and lard. *Toxicol In Vitro* 2006;20(4):439-47.
9. Wu S-C, Yen G-C. Effects of cooking oil fumes on the genotoxicity and oxidative stress in human lung carcinoma (A-549) cells. *Toxicol In Vitro* 2004;18(5):571-80.
10. Pandey MK, Dhawan A, Das M. Induction of P53, P21Waf1, ornithine decarboxylase activity, and DNA damage leading to cell - cycle arrest and apoptosis following topical application of repeated fish fried oil extract to mice. *Mol Carcinog* 2006;45(11):805-13.
11. Mehta U, Swinburn B. A review of factors affecting fat absorption in hot chips. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2001;41(2):133-54.
12. Salter A. Dietary fatty acids and cardiovascular disease. *Animal* 2013;7(s1):163-71.
13. Perez-Herrera A, Rangel-Zuñiga OA, Delgado-Lista J, Marin C, Perez-Martinez P, Tasset I, et al. The antioxidants in oils heated at frying temperature, whether natural or added, could protect against postprandial oxidative stress in obese people. *Food Chem* 2013;138(4):2250-9.
14. Gupta R, Vind SK, Singh SP, Kumar S, Kumar M. The effect of different deep-fried vegetable oil on cardiovascular system in rats model. *World Journal of Pharmaceutical Research* 2014;3:1130-9.
15. Bleda S, de Haro J, Varela C, Esparza L, Ferruelo A, Acin F. NLRP1 inflammasome, and not NLRP3, is the key in the shift to proinflammatory state on endothelial cells in peripheral arterial disease. *Int J Cardiol Heart Vasc* 2014;172(2):e282-e4.
16. Westin GG, Armstrong EJ, Bang H, Yeo K-K, Anderson D, Dawson DL, et al. Association between statin medications and mortality, major adverse cardiovascular event, and amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2014;63(7):682-90.
17. Ringseis R, Eder K, Mooren FC, Krüger K. Metabolic signals and innate immune activation in

- obesity and exercise. *Exerc Immunol Rev* 2015;21:58-68.
18. Machado MV, Vieira AB, da Conceição FG, Nascimento AR, da Nóbrega ACL, Tibirica E. Exercise training dose differentially alters muscle and heart capillary density and metabolic functions in an obese rat with metabolic syndrome. *Exp Physiol* 2017;102(12):1716-28.
  19. Hengstmann J, Konen W, Konen C, Eichelbaum M, Dengler H. The physiological disposition of p-octopamine in man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1974;283(1):93-106.
  20. Beaumont RE, Cordery P, James LJ, Watson P. Supplementation with a low-dose of octopamine does not influence endurance cycling performance in recreationally active men. *J Sci Med Sport* 2017;20(10):952-6.
  21. Kianmehr P, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi P. Synergic effects of exercise training and octopamine on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1a and uncoupling protein 1 mRNA in heart tissue of rat treated with deep frying oil. *Biochemistry and biophysics reports* 2020;22:100735.
  22. Sujkowski A, Ramesh D, Brockmann A, Wessells R. Octopamine drives endurance exercise adaptations in *Drosophila*. *Cell Rep* 2017;21(7):1809-23.
  23. Zhou Z, Wang Y, Jiang Y, Diao Y, Strappe P, Prenzler P, et al. Deep-fried oil consumption in rats impairs glycerolipid metabolism, gut histology and microbiota structure. *Lipids Health Dis* 2016;15(1):86.
  24. Bour S, Visentin V, Prévot D, Carpéné C. Moderate weight-lowering effect of octopamine treatment in obese Zucker rats. *Cell Physiol Biochem* 2003;59(3):175-82.
  25. Fillion L, Henry C. Nutrient losses and gains during frying: a review. *Int J Food Sci Nutr* 1998;49(2):157-68.
  26. Soriguer F, Rojo-Martínez G, Dobarganes MC, García Almeida JM, Esteva I, Beltrán M, et al. Hypertension is related to the degradation of dietary frying oils. *Am J Clin Nutr* 2003;78(6):1092-7.
  27. Che Z, Liu Y, Chen Y, Cao J, Liang C, Wang L, et al. The apoptotic pathways effect of fine particulate from cooking oil fumes in primary fetal alveolar type II epithelial cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014;761:35-43.
  28. Wang W, Wang C, Gong Y, Zhang X. Inhibition of NLRP1 inflammasome might be a novel therapeutic target in the treatment of peripheral arterial disease. *International journal of cardiology* 2018;256:29.
  29. Yi Y-S. Role of inflammasomes in inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Korean J Physiol Pharmacol* 2018;22(1):1-15.
  30. Fann DY-W, Lee S, Manzanero S, Tang S-C, Gelderblom M, Chunduri P, et al. Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke. *Cell Death Dis* 2013;4(9):e790-e.
  31. Thevis M, Koch A, Sigmund G, Thomas A, Schänzer W. Analysis of octopamine in human doping control samples. *Biomed Chromatogr* 2012;26(5):610-5.
  32. 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.

## 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

Mahboubeh kazemi dareh bidi<sup>1</sup>, Maghsoud Peeri<sup>2\*</sup>, Mohamad Ali Azarbayjani<sup>1†</sup>

Received: 23 June, 2020; Accepted: 14 October, 2020

### Abstract

**Background & Aims:** Common nutritional mistakes cause inflammation and homeostasis disruption in heart cells. Inflammasome complex is one of the pathways that induces inflammation and degradation of cardiac protein regeneration. The aim of the present study was to investigate changes in NLRP1 inflammasome, PI3k, apoptosis, and histopathology of heart tissue following aerobic physical activity and octopamine supplementation in male rats poisoned with deep-fried oil (DFO).

**Materials & Methods:** 30 Wistar male rats (300 to 350 g) were randomly divided into 5 groups (n = 6): control, deep-fried oil, deep-fried oil + aerobic exercise, deep-fried oil + octopamine supplement (Sup), and deep-fried oil + aerobic exercise + octopamine. During the study, DFO was orally administered to the rats (gavage 10 ml/kg) for 4 weeks (morning). The dose of octopamine was 81 mol/kg (Intraperitoneal injection) and dissolved in 9% normal saline. It was injected into supplement groups 2 hours after the exercise program. The rats in the training group also exercised at a moderate intensity at 50% vo<sub>2</sub>max in the first week and 65% vo<sub>2</sub>max in the last week. Changes in NLRP1 gene expression and PI3k protein expression were performed by RT Pcr and IHC. The tunnel assay was also used to evaluate apoptotic cells.

**Results:** Consumption of DFO caused a significant increase in tissue damage (p = 0.001) and collagen deposition (p = 0.001) to heart tissue. Also, DFO gavage for 4 weeks in rat model increased tissue damage, mRNA NLRP1 inflammasome, and apoptotic cells (p = 0.001) and also significantly decreased protein expression of PI3K (p = 0.001). Examination of tissue changes also revealed that deep-fried oil + octopamine and deep-fried oil + aerobic exercise + octopamine groups showed a significant decrease in collagen deposition (p<0.05). Therapeutic interventions also reduced the levels of mRNA NLRP1 and Apoptosis cell and increased protein expression of PI3K. Most of these changes were related to the deep-fried oil + aerobic exercise + octopamine group (p<0.05).

**Conclusion:** The results of the present study showed that taking octopamine with aerobic exercise for 4 weeks can control the inflammasome complex (reduction of NLRP1 mRNA) followed by reduction of apoptosis and improvement of cardiac cell regeneration capacity (PI3K protein expression) in the model of nutritional disorders induced by DFO. Therefore, it can be concluded that octopamine supplementation with exercise can have a cardiac protection effect in non-smart nutritional conditions.

**Keywords:** Inflammasome complex, aerobic physical activity, deep-fried oil, heart, apoptosis

**Address:** Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Tel:** +989121124434

**Email:** m.peeri@iauctb.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(9): 679 ISSN: 2717-008X

<sup>1</sup> Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran  
(Correspondin Author)

<sup>3</sup> Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran