Simultaneous effect of aerobic training and octopamine on inflammatory factors of brown adipose tissue produced as a result of feeding with deeply heated oil in male rats

Amrollah Taavonkerdar[1], Zaher Etemad[2], Kamal Azizbeigi[3], Khalid Mohamadzadeh Salamat[2]

1. PhD candidate of Exercise Physiology, Department of Physical Education, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran. ORCID: 0000-0002-4485-1734

2. Department of Physical Education, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran (Corresponding Author), Tel: 087-33288661. Email: zetemad2002@yahoo.com, ORCID: 0000-0001-5109-9571

3. Department of Physical Education, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran. ORCID: 0000-0002-5963-2323.

4. Department of Physical Education, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran. ORCID: 0000-0001-6327-0516

ABSTRACT

Background and Aim: Octopamine herbal supplement, recommended for weight loss along with exercise, has antioxidant effects. The purpose of this study was to investigate the simultaneous effect of aerobic training and octopamine on inflammatory factors of brown adipose tissue produced as a result of feeding with deeply heated oil in male rats.

Materials and Methods: 30 Wistar rats were selected and randomly divided into control-poisoning (CP; n=6), training-poisoning (TP; n=6), supplement-poisoning (SP; n= 6), supplement-training-poisoning (STP; n=6), and healthy control (HC; n=6) groups. The rats were fed for four weeks with deeply heated oil. The training program continued for four weeks with an average intensity of 50-65% vo2max for 20 minutes every other day. Octopamine (81 µmol / kg) was given as a supplement 5 days a week for 4 weeks by intraperitoneal injection. Also, we used real-time PCR and Western blot methods to evaluate the expressions of CCR2 gene and MCP1 protein respectively.

Results: The results showed that after training, MCP1 gene expression was significantly lower in the SP (p=0.001), TP (p=0.027), and STP (p=0.013) groups than that in the CP group. Also, we found that CCR2 gene expression was significantly lower in the SP (p=0.013) compared to that in the CP group, but, the least rate of CCR2 gene expression belonged to the TP and STP groups CP ($p \leq 0.05$).

Conclusion: The results showed that aerobic training with octopamine supplementation does not have synergistic effects on CCR2 and MCP-1 gene modifications although aerobic training or octopamine supplementation alone can affect the gene modifications.

Keywords: Aerobic exercise, Brown adipose tissue, Monocyte chemo attractant protein 1, Octopamine

Received: Dec 31, 2019 **Accepted:** Aug 14, 2020

How to cite the article: Amrollah Taavonkerdar, Zaher Etemad, Kamal Azizbeigi, Khalid Mohamadzadeh Salamat. Simultaneous effect of aerobic training and octapamine on inflammatory factors of brown adipose tissue produced as a result of feeding with deeply heated oil in male rats. SJKU 2021;25(6):21-34.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و پنج / بهمن و اسفند ۱۳۹۹/۳۱۴-۲۱

تاثیر هم‌زمان تمرین هوازی و اکتاپامین بر عوامل التهابی بافت چربی قهوه‌ای ناشی از تغذیه با روغن حرارت دیده عمیق در موش‌های صحرایی نر

امراله تعاون کردار[۱]، ظاهر اعتماد[۲]، کمال عزیزبیگی[۳]، خالید محمد زاده سلامت[۴]

۱.دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت‌بدنی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۴۴۸۵-۱۷۳۴

۲.گروه تربیت بدنی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران (نویسنده مسئول)، تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۳۲۸۸۶۶۱ ، پست الکترونیک: zetemad2002@yahoo.com ، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۵۱۰۹-۹۵۷۱

۳.گروه تربیت بدنی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۵۹۶۳-۲۳۲۳

۴.گروه تربیت بدنی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۶۳۲۷-۰۵۱۶

چکیده

زمینه و هدف: مکمل گیاهی اکتاپامین برای کاهش وزن در کنار تمرین ورزشی پیشنهاد شده و دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی است. این مطالعه با هدف میزان اثر بخشی هم زمان تمرین هوازی و اکتاپامین بر عوامل التهابی بافت چربی قهوه‌ای ناشی از تغذیه با روغن حرارت دیده عمیق در موش‌های صحرایی نر انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۳۰ رت نژاد ویستار انتخاب و به طور تصادفی در گروه‌های کنترل-مسمومیت (n=۶)، تمرین-مسمومیت (n=۶)، مکمل- مسمومیت (n=۶)، مکمل-تمرین-مسمومیت (n=۶) و کنترل- سالم (n=۶) قرار گرفتند و چهارهفته با روغن حرارت دیده تغذیه شدند. برنامه تمرینی چهار هفته، با شدت متوسط ۶۵-۵۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی به صورت یک روز در میان به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. اکتاپامین به مدت ۴ هفته و ۵ روز در هفته با دوز ۸۱µmol/kg به صورت تزریق درون صفاقی استفاده شد. به منظور بررسی بیان ژن‌های CCR2 از روش PCR-Real time و جهت بررسی پروتئین MCP1 از روش وسترن بلات استفاده شد.

یافته‌ها: بیان ژن و پروتئین MCP-1 در پایان دوره به طور معنی‌داری در گروه مکمل-مسمومیت (p=۰/۰۰۱)؛ گروه تمرین-مسمومیت (p=۰/۰۲۷) و گروه مکمل-تمرین-مسمومیت (p=۰/۰۱۳) از گروه کنترل-مسمومیت کمتر بود. همچنین بیان ژن CCR-2 به طور معنی‌داری در گروه مکمل-مسمومیت از گروه کنترل-مسمومیت (p=۰/۰۱۳) کمتر بود؛ هرچند کمترین میزان بیان CCR-2 در گروه تمرین-مسمومیت و مکمل-تمرین-مسمومیت نسبت به کنترل-مسمومیت مشاهده شد (p≤۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: تمرینات هوازی با مکمل اکتاپامین اثرات هم‌افزایی بر تغییرات ژن CCR2 و MCP-1 ندارد، هر چند تمرین هوازی و یا مکمل اکتاپامین به تنهایی بر تغییرات ژن متغییرهای مذکور می‌توانند مفید واقع شوند.

کلمات کلیدی: تمرین هوازی، بافت چربی قهوه‌ای، پروتئین -۱ جاذب شیمیائی مونوسیت‌ها، اکتاپامین

وصول مقاله:۹۸/۱۰/۱۰ اصلاحیه نهایی:۹۹/۴/۱۶ پذیرش:۹۹/۵/۲۴

مقدمه

عادت‌ها و رفتارهای سبک زندگی مدرن از مهم‌ترین عوامل چاقی و خطر بیماری قلبی-عروقی در جوامع امروزی است(۱). از جمله رفتارهای زندگی ماشینی امروزی می‌توان به تغییرات در سبک و نحوه طبخ غذاها و آشپزی اشاره نمود(۲). امروزه سرخ‌کردن 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(۳). در این روش و طی فرایند سرخ کردن، هم زمان با افزایش دما، جابجایی و انتقال مواد نیز رخ می دهد که از جمله می توان به انتقال روغن به درون محصول و خروج آب از آن اشاره نمود. به طوری که رطوبت موجود در ماده خام تبخیر و به صورت جزیی توسط روغن جایگزین می شود. این مقدار جایگزینی که بیش از ۴۰ درصد وزن محصول نهایی را تشکیل می‌دهد، بر ویژگی‌های نهایی محصول از جمله طعم، بو و بافت موثر می‌باشد(۴). دمای سرخ کردن از مهم‌ترین عوامل موثر بر مقدار جذب روغن است و به طور مستقیم بر مدت زمان فرایند و نیز طعم و مزه غذا تاثیر می‌گذارد(۵). طی طبخ غذا با دمای بالا (بیش از ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد) فرآورده‌های جانبی سرطان زایی مانند آکرولئین، هیتروسیکلیک آمین و آکریل آمید تولید می شود که این مواد برخی از عوامل رشد توموری و التهابی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و سلامتی افراد را به خطر می‌اندازد(۶). در مورد عوامل التهابی، مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و مولکولی متعدد بیوشیمیایی دخیل می باشند که می توان به نقش کموکاین‌ها و گیرنده‌هایشان در فراخوانی ماکروفاژها، التهاب و نیز مقاومت به انسولین در بافت چربی اشاره نمود. از این میان، پروتئین monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) عضوی از خانواده‌ی کموکاینهای C-C و عامل کموتاکتیک ماکروفاژها بوده و از بافت چربی احشایی نیز ترشح شده و منجر به افزایش فراخوانی ماکروفاژها به طور فزاینده به بافت‌ها از جمله بافت چربی می گردد(۷). همچنین این پروتئین موجب تسریع در فرایند التهاب می‌شود، به طوری که با فراخوانی فزاینده سلول‌های التهابی، آبشار التهابی را فعال می کند(۸). گزارش شده است کمبود و یا مهار بیان این پروتئین در رت‌ها موجب بهبود مقاومت به انسولین شده و مهاجرت سلول‌های ایمنی به بافت چربی را کاهش خواهد داد(۹). از طرفی دیگر C-C chemokine receptor type 2 (CCR2) که گیرنده MCP-1 بوده در التهاب بافت چربی نقش و تاثیر دارد. نشان داده شده که برخی عوامل محیطی از جمله روغن های حرارت مانند آنچه در فست فود ها دیده می‌شود، می‌توانند مقادیر پایه CCR2 و MCP-1 را تحت تاثیر قرار دهند و به طور نامطلوبی بر پدیده التهاب و مقاومت به انسولین ایجاد نماید(۶). White و همکاران (۲۰۱۶)، بیان کردند که اشتباهات تغذیه‌ای و رژیم‌های غذایی نامناسب به مدت طولانی سبب تنظیم CCR2 و التهاب عصبی در نمونه مایس می‌شود(۱۰). Huang و همکاران (۲۰۱۲) نیز نقش رژیم غذایی پرچرب در تکثیر سلول‌های سرطان از طریق فعال شدن مسیر سیگنالی MCP-1/CCR2 نشان دادند(۱۱). از آنجایی که مصرف فست فودها و سرخ کردن بیش از حد غذا نیز ساختار روغن‌ها را تغییر می‌دهد، می تواند به عنوان یک ریسک فاکتور التهابی نیز تلقی شود که برای سلامتی مضر است. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که افزایش فعالیت بدنی و همچنین استفاده از مکمل‌های آنتی اکسیدانی به عنوان یکی از راهکارهای پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی ناشی از اشتباهات تغذیه‌ای می باشد. رویکردهای متفاوتی از جمله استفاده از فعالیت بدنی و تمرینات ورزشی برای کاهش مقادیر CCR2 و MCP-1 مورد توجه قرار گرفته است. در معدود تحقیقاتی که در این زمینه انجام شده است. کاظمی و همکاران (۱۳۹۵) گزارش دادند که تمرینات اینتروال شدید موجب کاهش MCP-1 در بافت چربی زیر پوستی و احشایی موش‌های صحرایی شد(۱۲). همچنین غفاری و همکاران (۱۳۹۶) گزارش دادند که تمرینات اینتروال شدید و تمرینات

ترکیبی (قدرتی- اینتروال) به طور مطلوبی بر تغییرات MCP-1 تاثیر می‌گذارند(۱۳). در حالی که Wells و همکاران (۲۰۱۶) با نگاهی متفاوت و با رویکرد تسریع در ریکاوری متعاقب فعالیت مقاومتی، گزارش دادند که مکمل سازی با اسیدهای آمینه بعد از انجام فعالیت مقاومتی به عنوان یک محرک آسیب زا موجب حفظ غلظت پلاسمایی MCP-1 دو ساعت بعد از انجام فعالیت شده و بیان ژن CCR2 را افزایش می‌دهد(۱۴). چنین سازوکاری از دیدگاه ترمیم بافت های آسیب دیده حائز اهمیت است و ممکن است استفاده از مکمل‌ها موجب رفتار متفاوت CCR2 و MCP-1 گردد. با وجود این امروزه استفاده از مکمل‌ها در حوزه فیزیولوژی ورزشی به عنوان عامل سینرژیک در کنار تمرینات ورزشی جهت بهبود و تعدیل عوامل التهابی توجه زیادی را به خود معطوف کرده و تحقیقات زیادی در این زمینه صورت گرفته است. اکتاپامین (Octopamine) مکملی است که به تازگی مورد توجه ورزشکاران و محققان قرارگرفته و تحقیقات اندکی در این زمینه صورت گرفته است. عصاره‌های میوه مرکبات (نارنج) به طور سنتی به عنوان محصولاتی جهت کاهش وزن ، با اثرات آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. گاهی به عنوان یک ماده غذایی و گاهی به منظور یک مکمل دارویی یا رژیم غذایی مصرف می‌شود(۱۵). یکی از اجزای این عصاره‌ها اکتاپامین است. اکتاپامین نام یک آمین بیوژنیک درون‌زا است که ارتباط نزدیکی با نوراپی‌نفرین دارد، و بر روی سامانه‌های آدرنرژیک و دوپامینرژیک تاثیرگذار است و با تقلید عملکرد سمپاتیک، یک ماده آدرنرژیک محسوب می‌گردد(۱۶). از اثرات اکتاپامین می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، اثرات ضد التهابی، کاهش وزن و چربی سوزی و ضد سرطان اشاره کرد(۸). یکی از عواملی که باعث اختلاف در اثرات فارماکولوژیکی اکتاپامین در مقایسه با دیگر آمین‌های بیوژنیک به عنوان نوراپی نفرین و افدرین می‌شود، تفاوت در گیرنده آدنرژیک است(۱۷). ترکیبات فعال در اکتاپامین شامل آلکالوئیدهای مختلف با فعالیت آدرنرژیک، از جمله سینفرین است. بر اساس شواهد، این ماده بر دستگاه آدرنالین بدن اثر می‌گذارد و میزان متابولیسم پایه را افزایش می‌دهد و تا حد زیادی سوخت وساز بدن را بالا می‌برد. داشتن قابلیت گرمازایی از دیگر ویژگی‌های اکتاپامین است(۱۸). در این راستا محمودی و همکاران (۲۰۲۰) تاثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر مونسیت ها و ماکروفاژ های بافت چربی سفید موش های مسموم شده با روغن حرارت دیده را بررسی نمودند.آن‌ها به این نتیجه رسیدند که مصرف اکتاپامین موجب کاهش معنی‌دار نفوذپذیری ماکروفاژها در بافت چربی پس از مسمومیت با روغن های حرارت دیده می‌شود(۱۸).

در طی عمل سرخ‌کردن عمیق روغن مصرفی با دمای بالا (۱۸۰-۱۹۰ درجه سانتی‌گراد)، در مجاورت رطوبت و هوا نیز قرار می‌گیرد، در چنین شرایطی تخریب روغن همچون اتواکسیداسیون، پلیمریزاسیون حرارتی، اکسیداسیون حرارتی و هیدرولیز نیز اتفاق می‌دهد(۴). با توجه به آثار منفی روغن‌های حرارت دیده عمیق در تولید اسید چرب ترانس و نقش اسید چرب ترانس در تولید عوامل التهابی، بیماری‌های قلبی عروقی و سرطانی و همچنین آمار بالای مرگ و میر ناشی از بیماری های قلبی عروقی و سرطانی(۱۸)، امروزه از تمرینات ورزشی به عنوان یکی از گزینه‌ها در جهت مهار عوامل بیماری‌های قلبی عروقی، مهار ادیپوکاینهای التهابی تاثیرگذار بر روند التهاب(۱۹) و حتی جلوگیری از بیماریهای سرطان استفاده می‌شود(۲۰). با عنایت به اثرات مفید تمرینات هوازی بر بهبود سلامتی به‌ویژه سیستم قلبی-عروقی(۲۲ ,۲۱) و همچنین اثرات مفید استفاده از مکمل‌های گیاهی به دلیل کم‌هزینه بودن، عدم سوء مصرف بودن ، اثرات آنتی اکسیدانی و تاثیر مطلوب به عنوان یک استراتژی غیر دارویی(۱۶)؛ محققان در نظر داشتند تاثیر هم‌افزایی مکمل اکتاپامین را در کنار تمرین‌های هوازی بر تغییرات فاکتورهای التهابی بررسی نمایند و به این

پرسش پاسخ دهند که آیا تمرین هوازی و اکتاپامین بر عوامل التهابی بافت چربی قهوه ای ناشی از تغذیه با روغن حرارت دیده عمیق در موش‌های صحرایی نر تاثیری دارد؟ یا خیر؟

مواد و روش‌ها

حیوانات:

تعداد ۳۰ رت نرآزمایشگاهی صحرایی نژاد ویستار با سن ۲۰ هفته و میانگین وزنی ۳۰۰ -۲۵۰ گرم بعد از تهیه از انستیتوپاستور ایران در قالب پنج گروه شش تایی به عنوان نمونه آماری انتخاب و به طور تصادفی در گروه های کنترل- مسمومیت (n=۶)، گروه تمرین- مسمومیت (n=۶)، گروه مکمل-مسمومیت (n=۶)، گروه مکمل-تمرین-مسمومیت (n=۶) و گروه کنترل- سالم (n=۶) قرار داده شدند. حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی با درجه دمای تقریبی ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۵ درصد در چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته تا زمان کامل آزمایش‌ها و دوره تمرینات ورزشی نگهداری شدند. (زمان روشنایی از ۷ صبح تا ۱۹ عصر بود). هدف از برقراری این سیکل ایجاد وضعیت طبیعی زندگی برای رت ها بود. تمامی حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی داشتند. لازم به ذکر است کلیه اصول اخلاقی تحقیق حاضر مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کردستان رعایت گردید و طرح تحقیق و کلیه مراحل آن توسط کمیته اخلاق این دانشگاه با شماره IR.MUK.REC.1398/500 تایید شد.

تهیه روغن با حرارت:

جهت تهیه روغن حرارت دیده مقدار هشت لیتر روغن مایع سرخ کردنی آفتاب گردان ساخت شرکت بهار، کشور ایران، به مدت چهار روز متوالی روزی هشت ساعت با حرارت ۱۹۰-۲۰۰ درجه سانتی‌گراد داغ شد(۱۸) و سپس هر ۳۰ دقیقه مواد غذایی شامل ناگت مرغ، سیب‌زمینی، مرغ و فرآورده‌های پروتئینی (سوسیس و کالباس) داخل روغن غوطه ور شده و در انتها روغن روز چهارم به منظور استفاده به عنوان مداخله‌ی مسمومیتی تا زمان اجرا نگه‌داری و به صورت خوراکی (گاواژ) به مدت ۴ هفته به رت ها خورانده شد(۲۳).

مکمل اکتاپامین:

اکتاپامین (سیگما آلدریچ) به عنوان مکمل به مدت چهار هفته و پنج روز در هفته با استفاده از غلظت ۸۱μmol/kg به صورت تزریق درون صفاقی (IP محلول با نرمال سالین ۰/۹ درصد) انجام شد(۲۴).

برنامه تمرینات ورزشی:

برنامه تمرینی به مدت چهار هفته و با شدت متوسط به صورت یک روز در میان انجام شد. شدت تمرین در هفته‌ی اول ۵۰ درصد vo2max و در هفته‌ی آخر به ۶۵ درصد حداکث اکسیژن مصرفی (vo2max) رسید. به منظور سازگاری رت‌ها قبل از شروع برنامه اصلی تمرینی یک هفته تمرین سازگاری با سرعت ۹m/min و زمان ۲۰ دقیقه انجام گردید. مدت زمان تمرین ۲۰ دقیقه ثابت بوده و شدت تمرین از روز اول ۱۶m/min و در روز آخر به ۲۶m/min رسید. برای شروع تمرین ۵ دقیقه با سرعت ۷m/min گرم کردن و پس از تمرین اصلی ۵ دقیقه با سرعت ۵ m/min سرد کردن انجام شد(۱۸).

بافت برداری از حیوانات:

۴۸ ساعت پس از آخرین مداخله، تمامی رت ها بعد از ۱۰-۸ ساعت ناشتایی و قبل از شروع بافت برداری وزن کشی انجام شد. بعد از وزن کشی بی هوشی به شکل استنشاقی و با کتامین و زایلازین انجام گردید(۲۵).

نمونه آزمایش از بافت چربی قهوه‌ای از اینترا اسکاپولار بین کتفی گرفته شد و با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن کشی شد. بافت داخل لوله آزمایش فالکون ۱۵ قرار داده شد و به نسبت ۰/۵ گرم بافت مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول لیز کننده تک فازی روی آن ریخته شد. برای حفظ پروتئین های بافت، آپروتینین به آن

اضافه شد و با استفاده از هموژنایزر الکتروسونیک فرا صوت و دما به مدت پنج دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه بافت هموژن شد. محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی توسط سمپلر به داخل میکروتیوب منتقل شد، جهت ارزیابی متغیرهای مورد تحلیل قرار گرفت و رسوب باقیمانده دور ریخته شد.

بررسی ژن به روش Real Time PCR:

به منظور بررسی بیان ژن‌های CCR2 و MCP بافت چربی قهوه‌ای از روش PCR-Real time استفاده گردید. 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 کیازول به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰- انکوبه شد. پلاک موجود در کرایوتیوب در حالت نیمه انجماد خرد شد و به منظور لیز نمونه ها میزان ۱۰۰ لاندا کلروفرم به مدت ۱ دقیقه به آن ها 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 سی سی ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. نمونه ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب آن ۱ سی سی 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 CCR2 از روش کمی Real time-Pcr انجام شد. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن های CCR2 و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکروژن انجام شد. از ژن گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل استفاده گردید و میزان بیان ژن مورد نظر با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۲ گزارش شده است.

جدول ۱. پروتکل تمرین هوازی

هفته	گرم کردن	شدت تمرین	سرد کردن
اول	۷m/min (۵ دقیقه)	۵۰vo2max درصد	۵m/min (۵ دقیقه)
دوم	۷m/min (۵ دقیقه)	۵۵vo2max درصد	۵m/min (۵ دقیقه)
سوم	۷m/min (۵ دقیقه)	۶۰vo2max درصد	۵m/min (۵ دقیقه)
چهارم	۷m/min (۵ دقیقه)	۶۵vo2max درصد	۵m/min (۵ دقیقه)

جدول ۲. توالی پرایمرها

Gene	Oligo sequence 5'-3'	Accession Number
CCR2	F 5' CAAAATGTCTGCCCTTCTTCTCT 3' R 5' ACTATCCCCCTCACTCTCCTCT 3'	NM_020542.2
MCP	F 5' CATCCACTCTCTTTTCCACAAC 3' R 5' ACTTTACCCATTCATCTCTCATAC 3'	NM_031530.1
GAPDH	F 5' CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C 3' R 5' AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G 3'	XM_017593963.1

بررسی پروتئین با روش وسترن بلات:

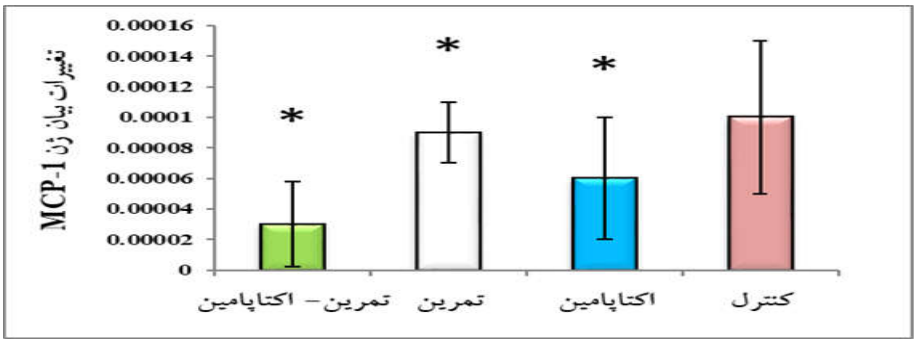
برای بررسی پروتئین های MCP1 از روش وسترن بلات استفاده شد. به این ترتیب که به روش بالا لیز شد. سپس پروتئین توسط روش SDS-PAGE با استفاده از ژل ۱۲٪ Tris-Glycine (Invitrogen) از هم جدا شد و با دستگاه وسترن بلات ساخت شرکت BioRad کشور انگلستان پروتئین بررسی گردید. وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی MCP1 USA (ab9669; Abcam) (رقت ۱: ۱۰۰۰) انجام شد، سپس با آنتی بادی‌های کونژوگه شده HRP ثانویه مربوطه واکنش نشان داد (رقت ۱: ۲۰۰۰، Abcam, USA). سرانجام، بلات با استفاده از سیستم تشخیصی ECL (Amersham Life Science Inc، Arlington) تشخیص داده شد. تصاویر به دست آمده از باندهای مورد بررسی از هر پروتئینن با استفاده از نرم‌افزار ImageJ تجزیه‌وتحلیل شد. برای اطمینان از مقادیر مساوی پروتئین در زمان اندازه‌گیری، قبل از انجام تست میزان پروتئین با روش لوری تعیین غلظت شد. پروتئین GAPDH به عنوان کنترل داخلی در این مطالعه استفاده شد.

روش‌های آماری:

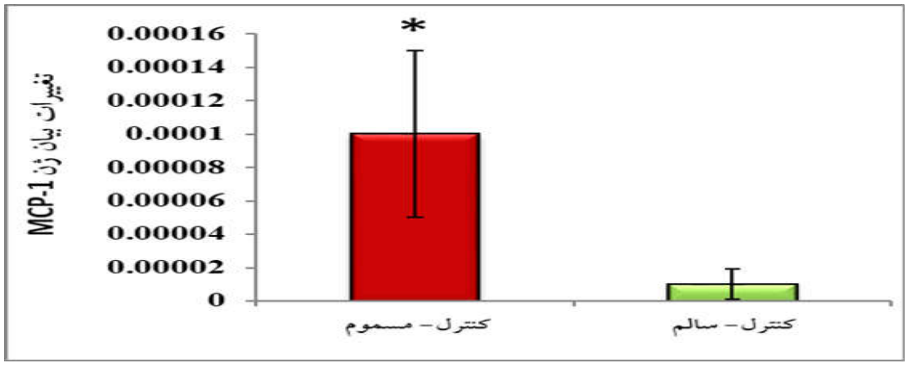
توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف–اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون لِوِن بررسی شد. بعد از مشخص شدن طبیعی بودن توزیع داده‌ها جهت تعیین اختلاف میانگین متغیرهای مورد مطالعه از آزمون آماریANOVA یک استفاده شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار از آزمون بونفرونی برای مقایسه میانگین ها استفاده شد. تمامی تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گرفت. سطح معنی‌داری نیز $p\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه های مورد مطالعه وجود دارد (p=۰/۰۰۱). آزمون تعقیبی نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن MCP-1 بین گروه کنترل-سالم و کنترل-مسمومیت وجود دارد (p=۰/۰۰۱) به طوری که در اثر مسمومیت با روغن حرارت دیده عمیق بیان ژنMCP-1 با افزایش معنی‌دار همراه بود. همچنین مشاهده شد اختلاف معنی‌داری در بیان ژن MCP-1 بین گروه‌های مداخله وجود دارد (p=۰/۰۲۷). بررسی دقیق‌تر با استفاده از آزمون تعقیبی نشان داد بیان ژن MCP-1 در پایان دوره به طور معنی‌داری در گروه مکمل-مسمومیت (p=۰/۰۰۱) و تمرین-مسمومیت (p=۰/۰۲۷) از کنترل-مسمومیت کمتر بود. همچنین مشاهده شد که تعامل تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین (گروه مکمل- تمرین-مسمومیت) بر بیان ژن MCP-1 در رتهای مسموم شده با روغن حرارت دیده عمیق نسبت به گروه کنترل-مسمومیت کمتر بود (p=۰/۰۱۳). هر چند بین گروه‌های مداخله (گروه‌های دریافت کننده مکمل و تمرین) تفاوت معنی داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). به این معنی که تعامل تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین در مقایسه با تمرین هوازی و یا مکمل اکتاپامین بر بیان ژن MCP1 اثر معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۵). لازم به ذکر است اطلاعات تمامی نمودارها **اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است** (نمودار ۱و۲).

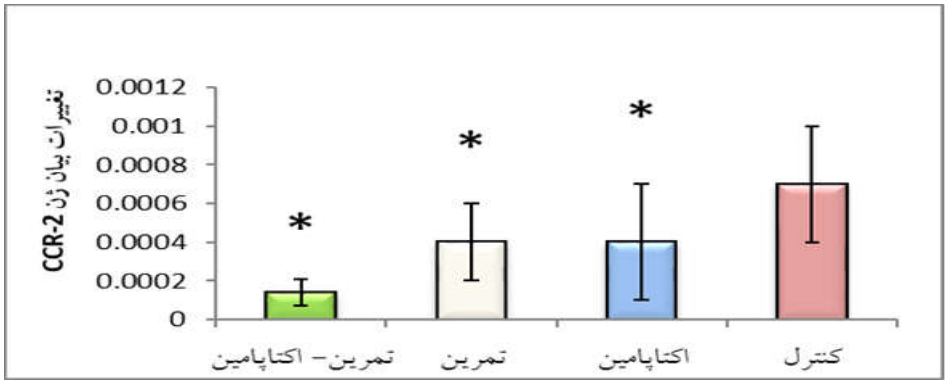


نمودار۱. تغییرات MCP-1 در گروه‌های اکتاپامین (p<۰/۰۵*)، تمرین (p<۰/۰۵*)، تمرین-اکتاپامین (p<۰/۰۵*) و کنترل.**
*نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل است.

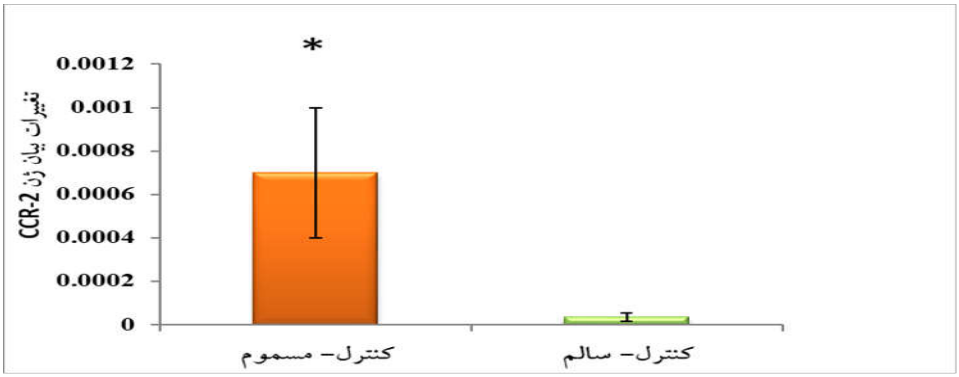


نمودار۲. مقایسه بیان ژن MCP-1 در گروه کنترل سالم و کنترل مسموم شده با روغن حرارت دیده عمیق (p<۰/۰۵*).** *نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم

نتایج نشان داد تغییرات ژن CCR-2 به طور معنی‌داری تحت تاثیر تمرین یا مکمل (مداخله) قرار گرفت (p=۰/۰۳۹). بررسی دقیق تر با آزمون تعقیبی نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری در بیان ژنCCR-2 بین گروه کنترل-سالم و گروه کنترل-مسمومیت وجود دارد (p=۰/۰۰۱) به این معنی در اثر مسمومیت با روغن حرارت دیده عمیق بیان ژن CCR-2 به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین مشاهده شد بیان ژن CCR-2 در پایان دوره به طور معنی‌داری در گروه مکمل-مسمومیت از گروه کنترل-مسمومیت (p=۰/۰۱۳) کمتر بود؛ هر چند که کمترین میزان بیان CCR-2 در گروه تمرین-مسمومیت و مکمل-تمرین-مسمومیت مشاهده شد (p≤۰/۰۵). همچنین نتایج نشان داد اثر تعاملی بین تمرین و مکمل اکتاپامین (گروه مکمل- تمرین- مسمومیت) بر میزان بیان CCR-2 نسبت به گروه کنترل-مسمومیت معنی‌دار بود (p=۰/۰۱۹)؛ اما بین گروه‌های مداخله تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). بر این اساس تعامل تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین در مقایسه با تمرین هوازی و یا مکمل اکتاپامینبه تنهایی بر فعالیتCCR-2 در رتهای مسموم شده با روغن حرارت دیده عمیق اثر معنی-داری نداشت (p>۰/۰۵) (نمودار ۳و۴).



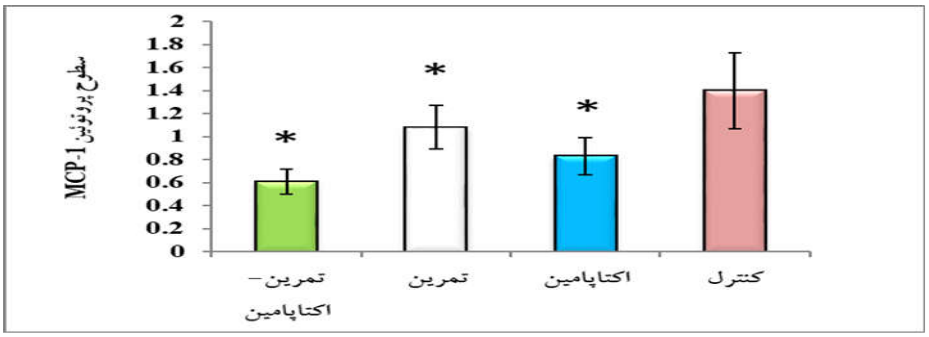
نمودار۳. تغییرات CCR-2 در گروه‌های اکتاپامین (p<۰/۰۵*)، تمرین (p<۰/۰۵*)، تمرین-اکتاپامین (p<۰/۰۵*) و کنترل. *نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل است.



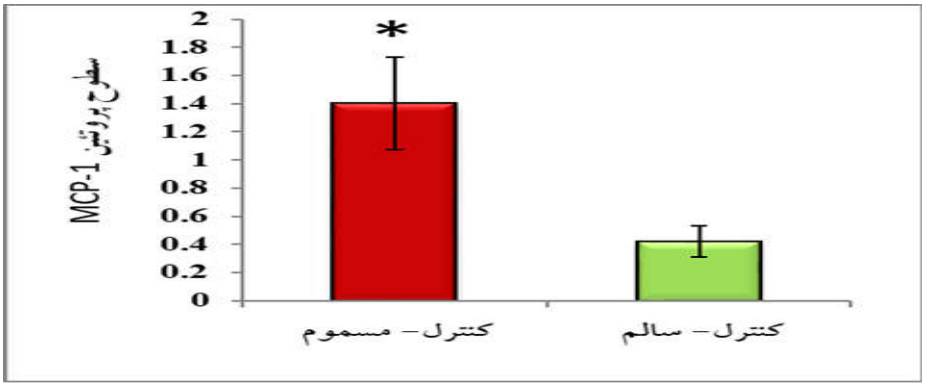
نمودار۴. مقایسه بیان ژن CCR-2 در گروه کنترل سالم و کنترل مسموم شده با روغن حرارت دیده عمیق (p<۰/۰۵*)**. *نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل سالم

در مطالعه بررسی پروتئین MCP-1، نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود دارد (p=۰/۰۰۱). آزمون تعقیبی نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان پروتئین MCP-1 بین گروه کنترل-سالم و کنترل-مسمومیت وجود دارد (p=۰/۰۰۱) به طوری که در اثر مسمومیت با روغن حرارت دیده عمیق بیان ژن MCP-1به طور معنی‌داری افزایش یافت.

همچنین مشاهده شد اختلاف معنی‌داری در بیان ژن MCP-1 بین گروه‌های مداخله وجود دارد (p=۰/۰۱۹۲). بررسی دقیق تر با استفاده از آزمون تعقیبی نشان داد، بیان ژن MCP-1 در پایان دوره به طور معنی‌داری در گروه مکمل-مسمومیت (p=۰/۰۰۱) و تمرین-مسمومیت (p=۰/۰۲) از کنترل-مسمومیت کمتر بود. همچنین مشاهده شد که تعامل تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین (گروه مکمل- تمرین- مسمومیت) بر بیان ژن MCP-1 در رت-های مسموم شده با روغن حرارت دیده عمیق نسبت به گروه کنترل-مسمومیت کمتر بود (p=۰/۰۱) هر چند بین گروه‌های مداخله (گروه‌های دریافت کننده مکمل و تمرین) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵) به این معنی تعامل تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین در مقایسه با تمرین هوازی و یا مکمل اکتاپامین بر بیان ژن MCP1 اثر معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۵) (نمودار ۵و۶)



نمودار۵. تغییرات MCP1 در گروه‌های اکتاپامین (p<۰/۰۵*)، تمرین (p<۰/۰۵*)، تمرین-اکتاپامین (p<۰/۰۵*) و کنترل.
*نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل است.



نمودار۶. مقایسه غلظت پروتئین MCP-1 در گروه کنترل سالم و کنترل مسموم شده با روغن حرارت دیده عمیق (p<۰/۰۵***). *نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم

بحث

در مطالعات متعدد نشان داده شده است که تمرین ورزشی هوازی از مکانیسم‌های مختلف تاثیرات ضدالتهابی بر جای می‌گذارد. از جمله بافت‌های هدف تمرینات ورزشی بافت چربی است. این فرضیه وجود دارد که تمرینات ورزشی ممکن است با افزایش ترشح کاتکولآمین ها، تغییرات در UCP-1، اثرات مزمن بر فعالیت BAT و همچنین تبدیل چربی سفید به شکل قهوه ای را دارد. با این وجود ترکیب تمرین هوازی و مکمل‌های گیاهی قادر به کنترل التهاب ناشی از بافت چربی نیز است؛ لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر تعاملی تمرین هوازی و مکمل اکتاپامین بر نشانگران کموتاکسیک بافت چربی قهوه‌ای در موش‌های نر تغذیه شده با روغن حرارت دیده عمیق بود. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که چهار هفته تمرین هوازی به طور معنی-داری بیان ژن ادیپوکاین MCP1 را به طور معنی‌داری کاهش داد. چاقی به شدت با التهاب مزمن همراه است که در این فرآیند ماکروفاژهای بافت چربی نقش اساسی دارند. تمرین ورزشی میزان اکسیداسیون بافت چرب را بالا برده؛ لذا کاهش بافت چرب می‌تواند ماکروفاژهای بافت چربی از جمله MCP1 را کاهش دهد که نتایج گروه تمرینی مطالعه حاضر نیز موید این مطلب بود. در رابطه با MCP1 نیز بیان شده که افزایش MCP1 در بافت چربی و گسترش فعالیت آن باعث تعدیل فعالیت ماکروفاژها شده و اختلال در قهوه-ای شدن بافت چربی ایجاد می‌کند که می‌تواند انرژی مصرفی را تحت تاثیر قرار دهد(۲۶). از آنجایی که ممانعت از تبدیل بافت چربی سفید به قهوه ای نیز عاملی در جهت گسترش التهاب ناشی از بافت چربی است؛ لذا کاهش MCP1 بافت چرب می‌تواند یک هدف درمانی در اختلالات التهابی ناشی از بافت چرب باشد که با توجه به تغییرات کاهشی MCP1 با تمرین وزرشی پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد ازجمله مکانیسم‌های تمرین در گسترش بافت چرب قهوه‌ای نیز مهار فعالیت MCP1 باشد. همسو با نتایج تحقیق حاضر گزارش شده است پنج هفته تمرینات اینتروال شدید موجب کاهش MCP1 چربی زیر پوستی و نیز احشایی موش‌های نر صحرایی می شود(۱۲). این در حالی بود که در مطالعه حاضر کاهش MCP1 بافت چربی قهوه‌ای با تمرین هوازی مورد تایید قرار گرفت؛ لذا به نظر می‌رسد صرفه نظر از شدت، تمرینات ورزشی می‌توانند سطوح MCP1 را کاهش دهد. همسو با نتایج تحقیق حاضر در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است که تمرینات ورزشی با شدت متوسط می تواند موجب کاهش MCP1 گردد(۲۷). نشان داده شده که سایتوکاین هایی مانند IL-10 ارتباط مستقیمی با تغییرات MCP1 دارند. از آنجایی که تمرین ورزشی قادر به افزایش IL-10 است به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر نیز تغییرات برخی سایتوکاین های ضد التهابی در مهار MCP1 نقش داشته باشد. این در حالی بود که در مطالعه حاضر مقادیر سایتوکاین های ضد التهابی نظیر IL10 ارزیابی نشد.

جدا از تاثیرات تمرین ورزشی استفاده از مکمل اکتاپامین نیز در کاهش MCP1 موثر بود. در رابطه با اکتاپامین بیان شده که خاصیت و ساختار آن به گونه ای بوده که نظیر اپی نفرین برگیرنده‌های سلولی تاثیرگذار است. اکتاپامین به عنوان یک آگونیست انتخابی درون زا beta(3)-AR با مسیرهای فعالیت کموکاین ها در سلول‌های چربی، تداخل ایجاد می‌کنند و موجب کاهش بیان ژن MCP-1 می‌شود(۱۸). در حالی‌که برخی از گزارش ها کاهش فعالیت NF-κβ و افزایش تحریک تولید آنتاگونیست گیرنده IL-1 که در نهایت منجر به کاهش مقادیر شاخص‌های پیش التهابی IL-6 و TNF-alpha می‌شود را در کاهش MCP1 نسبت داده‌اند(۲۸). مکانیسم‌های متعدد در رابطه با تاثیر اکتاپامین بر مهار MCP1 می‌توانند نقش داشته باشند. یک مکانیسم احتمالی دیگر توسط اکتاپامین را می توان به کمپلکس mTORC1 نسبت داد. تمرین ورزشی نیز این فاکتور را تحت تاثیر قرار می دهد. بیان شده که mTORC1 منجر به کاهش فسفوریلاسیون Ser727 و اتصال STAT3 به پروموتر MCP-1 می شود، در نتیجه

بیان MCP-1 کاهش می‌یابد(۷). با این وجود در مطالعه حاضر تغییرات mTORC1 ارزیابی نشد. از طرفی تغییرات کاهشی MCP-1 در مطالعه حاضر را همچنین می‌توان به تنظیم منفی گیرنده آن (CCR2) نیز نسبت داد که در مطالعه حاضر با مداخله تمرین و اکتاپامین کاهش نشان داد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که چهار هفته تمرین هوازی موجب کاهش بیان ژن CCR2 گردید. CCR2 پروتئین گیرنده ادیپوکاین MCP1 بوده و گزارش شده است که در رت ها کاهش بیان این پروتئین موجب کاهش مقاومت به انسولین شده و هموستاز گلوکز را بهبود می‌بخشد(۲۹).تمرین ورزشی هوازی نیز از مسیرهای متعدد قادر به بهبود حساسیت انسولینی است؛ لذا کاهش CCR2 در مطالعه حاضر با تمرین ورزشی نیز می‌تواند به عنوان مسیر کنترلی ناشی از تمرین ورزشی در بهبود حساسیت به انسولین باشد. در مورد اثرات دوره تمرینی بر تغییرات این گیرنده تحقیقات زیادی صورت نگرفته است با وجود این در پاسخ به دوره های کوتاه مدت ورزشی گزارش ها حاکی از افزایش این گیرنده ، در منوسیت ها در پاسخ به فعالیت جسمانی است(۳۰). این مساله نشان می‌دهد که این گیرنده پروتئینی می‌تواند به تمرینات ورزشی پاسخ دهد و در نهایت سازگاری نسبت به تمرینات ورزشی ایجاد شود. در هر صورت به سبب عدم ادبیات تحقیق کافی بررسی و تفسیر تغییرات این گیرنده در سازگاری به چهار تمرین هفته هوازی مقدور نیست. نتایج نشان داد ترکیب تعاملی تمرینات هوازی با مصرف مکمل اکتاپامین نسبت به تمرینات هوازی و مکمل اکتاپامین بر تغییرات CCR2 اثر فزاینده‌ای نداشت. با وجود این مشاهده شد که مکمل اکتاپامین و تمرین هوازی به تنهایی موجب کاهش بیان ژن CCR2 گردید. با توجه به عدم تفاوت معنی‌دار در CCR2 می توان بیان نمود که بیان ژن CCR2 پس از مواجهه با سیگنال‌های استرس اکسیداتیو ناشی از تمرین هوازی و شاخص‌های التهابی به سرعت فعال شده و مونوسیت‌ها باید به مناطق آسیب دیده مهاجرت کنند(۳۱). این مساله نشان می‌دهد که گیرنده‌های سلولی مانند گیرنده کموکاینها در پاسخ به محرک‌های محیطی در تعداد کافی بیان می‌شوند(۳۱). از سوی دیگر به نظر می‌رسد تمرینات هوازی یا مکمل اکتاپامین با فعال سازی سیگنالینگ AMPK، کمپلکس mTOR را از طریق L-leucine در جهت منفی کنترل کرده که نهایتا موجب کاهش تنظیم بیان CCR2 در مونوسیت‌ها خواهد شد.

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد انجام تمرین هوازی و مصرف اکتاپامین تاثیرات ضد التهابی با تنظیم منفی CCR2 و MCP1 داشته باشد که کنترل و کاهش این فاکتورها در گسترش قهوه‌ای شدن بافت چربی، افزایش انرژی مصرفی و در نهایت بهبود حساسیت به انسولین نقش دارند؛ بنابراین جهت تعدیل التهاب و کاهش بیان ژن متغیرهای مذکور به نظر می‌رسد چهار هفته تمرین هوازی و یا مصرف مکمل اکتاپامین به تنهایی سودمند خواهد بود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج است که در سال ۱۳۹۸ به شماره ۹۸۶ مورد تصویب شورای پژوهش این واحد دانشگاهی قرار گرفته است. تحقیق حاضر در آزمایشگاه تحقیقاتی هیستوژنتیک پاسارگاد تهران و با نظارت اساتید فیزیولوژی ورزشی و پزشکان متخصص آزمایشگاهی و با هزینه شخصی دانشجو انجام شد. کلیه مراحل این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان با شماره IR.MUK.REC.1398/500 تایید شد. محققین از تمامی کسانی که در جهت انجام این تحقیق همکاری نمودند تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Egger G, Dixon J. Beyond obesity and lifestyle: a review of 21st century chronic disease determinants. BioMed research international.2014 ;2014:1-13doi.org/10.1155/2014/731685.
2.White S, Alva-Ruiz R, Chen L, Conger J, Kuang C, Murphy C, et al. The Eating and Cooking Healthy (TEACH) Kitchen: A Research Protocol. jGPHA. 2016;6(2):331-336.
3.Mellema M. Mechanism and reduction of fat uptake in deep-fat fried foods. Trends Food Sci Techno. 2003;14(9):364-373.
4.Naghavi E-A, Dehghannya J, Ghanbarzadeh B. Effect of hydrocolloid type on transfer phenomena during deep-fat frying of coated potato strips: Numerical modeling and experimental analysis. Comput Electron Agr. 2018;154:382-399.
5.Kita A, Lisińska G, Gołubowska G. The effects of oils and frying temperatures on the texture and fat content of potato crisps. Food Chem. 2007;102(1):1-5.
6.Moghe A, Ghare S, Lamoreau B, Mohammad M, Barve S, McClain C, et al. Molecular mechanisms of acrolein toxicity: relevance to human disease. Toxicol Sci. 2015;143(2):242-255.
7.Ai D, Jiang H, Westerterp M, Murphy AJ, Wang M, Ganda A, et al. Disruption of mammalian target of rapamycin complex 1 in macrophages decreases chemokine gene expression and atherosclerosis. Circulation research. 2014;114(10):1576-1584.
8.Sandblad KG, Jones P, Kostalla MJ, Linton L, Glise H, Winqvist O. Chemokine receptor expression on monocytes from healthy individuals. clin immunol. 2015;161(2):348-53.
9.O'Connor T, Borsig L, Heikenwalder M. CCL2-CCR2 Signaling in Disease Pathogenesis. Endocr Metab Immune Disord. 2015;15(14):105-118.
10.White KA, Hutton SR, Weimer JM, Sheridan PA. Diet-induced obesity prolongs neuroinflammation and recruits CCR2+ monocytes to the brain following herpes simplex virus (HSV)-1 latency in mice. Brain Behav Immun. 2016;57:68-78.
11.Huang M, Narita S, Numakura K, Tsuruta H, Saito M, Inoue T, et al. A high□fat diet enhances proliferation of prostate cancer cells and activates MCP□1/CCR2 signaling. Prostate. 2012;72(16):1779-1788.
12.Kazemi A. Effect of high intensity interval training on visceral and subcutaneous level of MCP-1 and plasma insulin glucose in male rats. RJMS.2017;23(152):29-37.
13.Ghafari M, Banitalebi E, Heidari A. Impact of High-Intensity Interval Training and at Concurrent Strength-Endurance Training on the Levels of Some Adipokines Associated with Insulin Resistance in Women with Diabetes Mellitus. JRH. 2017;2(3):193-206.
14.Wells AJ, Hoffman JR, Jajtner AR, Varanoske AN, Church DD, Gonzalez AM, et al. The effect of post-resistance exercise amino acids on plasma MCP-1 and CCR2 expression. Nutrients. 2016;8(7):409.
15.Thevis M, Koch A, Sigmund G, Thomas A, Schänzer W. Analysis of octopamine in human doping control samples. Biomed Chromatogr. 2012;26(5):610-615.
16.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):952-956.
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. Malays J Med Sci. 2012;19(1):20-29
18.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. GCT.2020; 7(1):1-7
19.Etemad Z, Nikbakht H, Azarbaijani MA, Gholami M. Concentrations of homocysteine and CRP after 8 weeks of resistance training circle with different rest intervals. SJKU. 2017;22(1):107-119.

20.Ahmadian M, Azizbeigi K, Delphan M, Atashak S. The Effect of High Intensity Interval Training on STAT-3 and Angiopoietin-1 Gene Expression, and tie-2 Protein in Mice with Breast Cancer. IJBD. 2018;11(1):37-46.
21.Alishahi A, Azizbeigi K, Mohammadzadeh Salamat K, Yektayar M. The Effect of Aerobic Training with Vitamin C Supplementation on Myeloperoxidase, Asymmetric Dimethyl Arginine and Blood Pressure in Middle-Age Hypertensive Overweight Men. J Clin Res Paramed Sci. 2019; 8(2):1-6.
22.Ahmadian M, Dabidi Roshan V, Leicht AS. Age-related effect of aerobic exercise training on antioxidant and oxidative markers in the liver challenged by doxorubicin in rats. Free Radic Res. 2018;52(7):775-782.
23.Wang L, Sun Y, Asahi M, Otsu K. Acrolein, an environmental toxin, induces cardiomyocyte apoptosis via elevated intracellular calcium and free radicals. Cell Biochem Biophys. 2011;61(1):131-136.
24.Bour S, Visentin V, Prévot D, Carpéné C. Moderate weight-lowering effect of octopamine treatment in obese Zucker rats. J Physiol Biochem. 2003;59(3):175-182.
25.Bolanle IO, Omogbai EKI, Bafor EE. Effects of amlodipine and valsartan on glibenclamide-treated streptozotocin-induced diabetic rats. Biomed Pharmacother. 2018;106:566-574.
26.Rajasekaran M, Sul O, Choi E, Kim J, Suh J, Choi H. MCP-1 deficiency enhances browning of adipose tissue via increased M2 polarization. J Endocrinol.2019; 242(2): 91-101.
27.Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, Georgiadis M, Karatzas D, Karavolias G, et al. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. Eur Heart J. 2001;22(9):791-797.
28.Kim J-H, Yoon M-S, Chen J. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mediates amino acid inhibition of insulin signaling through serine 727 phosphorylation. J Biol Chem. 2009; 284(51):35425-35432.
29.Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. J Biol Chem. 2006;281(36):26602-26614.
30. Blanks AM, Wagamon TT, Lafratta L, Sisk MG, Senter MB, Pedersen LN, et al. Impact of physical activity on monocyte subset CCR2 expression and macrophage polarization following moderate intensity exercise. Brain Behav Immun. 2020;2:1-8. doi.org/10.1016/j.bbih.2019.100033
31.Kumase F, Takeuchi K, Morizane Y, Suzuki J, Matsumoto H, Kataoka K, et al. AMPK-activated protein kinase suppresses Ccr2 expression by inhibiting the NF-κB pathway in RAW264.7 macrophages. PloS one. 2016; 11(1):1-14.