تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالا بر برخی شاخص‌های میتوفاژی کبد رت‌های دیابتی نوع دو

سارا فرج پور خزاعی[1]، جواد وکیلی[2*]، وحید ساری صرّاف[2]

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲ - دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

یافته / دوره ۲۵ / شماره ۱ / بهار ۱۴۰۲ / مسلسل ۹۵

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۱۱ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۳/۶

مقدمه: اختلال در عملکرد میتوکندری با بیماری‌هایی مانند چاقی، سرطان و دیابت نوع دو مرتبط است. تمرینات ورزشی در بهبود آسیب میتوکندریایی و استرس اکسیداتیو نقش دارد. لذا، هدف این مطالعه بررسی تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالا روی برخی شاخص‌های میتوفاژی بافت کبدی شامل: BNIP3 و NIX رت‌های دیابتی نوع دو می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ۳۰ سر رت نر ویستار سه ماهه با دامنه وزنی (۲۲۵-۳۰۰ گرم) به طور تصادفی در سه گروه ۱۰ سری شامل: کنترل سالم (C)، کنترل دیابتی (D) و دیابتی + تمرین (D+T) تقسیم شدند. پروتکل تمرینی شامل دویدن با شدت ۹۰-۸۵٪ سرعت بیشینه در ۶ الی ۱۲ وهلهٔ دو دقیقه‌ای؛ ۵ روز در هفته به مدت هشت هفته بود. برای تعیین تغییرات بیان پروتئین‌های BNIP3 و NIX در بافت کبد رت‌ها از روش وسترن بلات استفاده شد. از تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی بونفرونی برای تحلیل داده‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها: دیابت موجب افزایش غیر معنی‌دار پروتئین‌های BNIP3 (P= ۰/۱۶۶) و NIX (P= ۰/۱۴۰) گردید. تغییرات NIX در گروه دیابتی تمرین کرده در حدود ۵۷ درصد کمتر از گروه کنترل دیابتی و در مقایسه با آن معنی‌دار بود (P=۰/۰۳۳). در حالی‌که BNIP3 با وجود کاهش ۳۷ درصدی، تغییر معنی‌داری نداشت (P= ۰/۲۴۷).

بحث و نتیجه‌گیری: هشت هفته تمرین تناوبی شدید باعث کاهش قابل توجه در بیان برخی پروتئین‌های دخیل در میتوفاژی در گروه تمرینی شده است. با این‌حال، اظهار نظر قطعی در رابطه با این شاخص‌ها و نحوهٔ تأثیرپذیری آن‌ها از شرایط مختلف منوط به انجام تحقیقات بیشتری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تمرین تناوبی با شدت بالا، میتوفاژی، دیابت نوع دو.

*آدرس مکاتبه: تبریز، بلوار ۲۹ بهمن، دانشگاه تبریز، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی.

پست الکترونیک: : vakili@tabrizu.ac.ir

مقدمه

میتوکندری اندامکی پویا با تغییرپذیری بسیار زیاد به عنوان مرکز متابولیسم عضلانی شناخته می‌شود، که نقشی فراتر از تولید انرژی در سلول ایفا می‌کند و عملکرد صحیح این اندامک برای سلامت سلول بسیار مهم و ضروری می‌باشد (۱). مطالعات متعدد در موش و انسان ارتباط نزدیک بین اختلالات عملکرد میتوکندری کبد و توسعه چاقی و مقاومت به انسولین را نشان داده‌اند. همان‌طور که در بیماری دیابت نوع ۲ مشاهده شده است، در شرایط مقاومت به انسولین، کاهش حساسیت انسولین سلول‌های کبدی، عضله اسکلتی و سلول‌های چربی مشاهده می‌شود (۲، ۳). در نتیجه، تجمع اسیدهای چرب کبدی می‌تواند باعث تجمع میتوکندری آسیب دیده شود، که می‌تواند عملکرد زنجیره تنفسی میتوکندری و اکسایش اسید چرب را مختل کند (۴). در پاسخ به هیپوکسی و محرومیت از مواد مغذی، حذف برنامه-ریزی شده‌ی (programmatic elimination) میتوکندری آسیب‌دیده توسط میتوفاژی (Mitophagy) برای مهار توده بیش از حد میتوکندری آسیب‌دیده و حفظ عملکرد میتوکندری ایجاد می‌شود (۲).

در پاسخ به استرس‌های سلولی، میتوفاژی توسط دو مبدل کلیدی میتوفاژی: BCL-۲/آدنوویروس E1B پروتئین متقابل ۳ ((BCL-2/adenovirus E1B interacting protein3 (BNIP3)) و پروتئین X شبه Nip ((Nip-like protein X (NIX)) تنظیم می‌شود. دو پروتئین BNIP3 و NIX نقش مهمی در کنترل کیفیت میتوکندری با واسطه میتوفاژی دارند (۵). BNIP3 در غشای خارجی میتوکندری قرار دارد؛ جایی که در میتوفاژی و دینامیک میتوکندری عمل می‌کند. با این وجود که پروتئین BNIP3 به طور اساسی در کبد موش‌های بالغ تغذیه‌شده با چربی بیان می‌شود، تحقیقات نشان داده‌اند که بیان آن مطابق با نقشی در پاسخ به کمبود مواد مغذی القا می‌شود، با ناشتا بودن موش‌ها نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۶). در این زمینه، روزا و همکاران (۲۰۲۰) با بررسی عضله نعلی جوندگان نشان دادند که میتوفاژی ناشی از BNIP3 و اختلال در جذب قند را می‌توان با فسفوریلاسیون مستقیم BNIP3 توسط PRKA/PKA معکوس کرد، که منجر به انتقال BNIP3 از میتوکندری و شبکه سارکوپلاسمی به سیتوزول می شود. داده‌های آن‌ها مکانیسمی را نشان می‌دهد که توسط آن فعالیت ورزشی یا فعال‌سازی دارویی PRKA ممکن است بر مقاومت به انسولین غلبه کند (۷).

پژوهشگران همواره به‌دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای حفظ تعادل موجود بین وقایع مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلولی و حمایت از بافت سلولی در مقابل اتوفاژی مختل شده و یا آپوپتوز افزایش یافته و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن‌ها هستند (۸). در سال‌های اخیر، تأثیرات مداخلات ورزشی با شدت بالا بر انواع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز و اتوفاژی) توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است (۹). تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) از انواع مختلف فعالیت‌های ورزشی و شامل دوره‌های تمرین تناوبی همراه با دوره‌های بازیافت است که همه افراد به ویژه آزمودنی‌های چاق را قادر به افزایش شدت تمرینات ورزشی می‌کند (۱۰). این نوع تمرینات مانند تمرینات تداومی با شدت متوسط باعث افزایش ظرفیت سوخت و سازی، بهبود دستگاه‌های هوازی و بی‌هوازی و همچنین افزایش کارایی ورزشی و متابولیسم انرژی می‌شود (۱۱). از دهه ۱۹۶۰، دهه‌ها تحقیق نشان داده است که تمرینات ورزشی باعث افزایش قابل توجه محتوای میتوکندری و همچنین فسفوریلاسیون اکسیداتیو و ظرفیت تنفسی در میتوکندری می‌شود. علاوه بر این، تمرین منظم و طولانی‌مدت تولید ROS را کاهش می‌دهد، که نشان دهنده ظرفیت افزایش-یافته برای جریان الکترون از طریق زنجیره انتقال الکترون است (۱۲). از سویی؛ چنین پیشنهاد می‌شود که وقایع اتوفاژی می‌تواند مانند یک تیغ دولبه (Double-edged sword) عمل نماید (۱۳).

مطالعات مربوط به اثر تمرینات ورزشی بر فرآیندهای مربوط به میتوفاژی، با توجه به سازوکارهای سلولی-مولکولی پیچیده آن بسیار محدود است. لذا شناسایی اثر تمرین ورزشی بر جریان میتوفاژی در بافت کبدی رت‌های دیابتی شده جهت کاهش علائم دیابت و پیامدهای بعدی ناشی از آن در بین تمامی افراد جامعه بویژه بیماران مبتلاء به دیابت دو ضرورت انکارناپذیر به‌نظر می‌رسد. از این‌رو، هدف از انجام تحقیق حاضر این است که ضمن پاسخگویی به برخی ابهامات موجود، پیشنهادات کاربردی متناسبی در راستای نحوه‌ی انجام تمرینات ورزشی جهت پیشگیری و درمان پیامدهای احتمالی ناشی از دیابت ارائه داد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع تجربی است که با استفاده از سه گروه ۱۰ سری از رت‌ها بر اساس مقررات اخلاق پزشکی نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی در محل آزمایشگاه حیوانی علوم رفتاری مرکز تحقیقات آناتومی دانشگاه علوم پزشکی ایران پس از تصویب در کمیتهٔ اخلاق در پژوهش از دانشگاه تبریز (IR.TABRIZU.REC.1400.050) انجام شد. بدین منظور، تعداد ۳۰ سر رت‌های صحرایی نر سفید نژاد ویستار از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی مدزیست کرج با سن حدود سه ماه به روش در دسترس و در محدودهٔ وزنی ۲۲۵ الی ۳۰۰ گرمی خریداری شدند. در ادامه، به‌منظور ایجاد حالت سازش با محیط، جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیایی، شرایط تمامی مداخلات پس از گذشت دست کم دو هفته استقرار حیوانات و رعایت چرخهٔ روزانه-شبانه (شروع روشنایی از ساعت ۶:۰۰ صبح الی ۱۸:۰۰ عصر) در آزمایشگاه حیوانات انجام شد. به‌طوری‌که آزمودنی‌ها در محیط آزمایشگاهی ویژه حیوانات با دارا بودن شرایط ذیل؛ دما ۲±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد، با کمترین سروصدا به‌صورت ۳ تا ۵ عدد رت در هر قفس از جنس پلی‌کربنات شفاف قرار داده شدند. در طی این دوره، تمامی حیوانات به‌صورت آزادانه به آب و غذای استاندارد حیوانی (پِلت تهیه شده از شرکت خوراک‌سازان بهپرور) به‌مدت سه ماه (فصل پاییز و در طول مدت تحقیق) دسترسی داشتند. به‌علاوه، در این تحقیق از آن دسته رت-های صحرایی استفاده گردید که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری، میزان گلوکز سرم آن‌ها پائین‌تر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود. سپس در پایان این دوره (سازگاری)، ابتدا ۱۰ سر رت در گروه کنترل سالم (C) قرار گرفتند، ۲۰ سر رت باقی‌مانده پس از القای دیابت، در یکی از گروه‌های کنترل دیابتی (D) و دیابتی تمرین کرده (D+T) قرار گرفتند.

روش القاء دیابت

پس از گذشت دو هفته از شرایط سازگاری با محیط آزمایشگاه، برای القای دیابت نوع دو، طبق روش گروه مطالعاتی ساسیدهاران و همکاران (۲۰۱۳)، دو هفته مصرف غذای پُرچرب (۴۵٪ چربی، ۲۱٪ پروتئین و ۳۴٪ کربوهیدرات) که توسط محققان و با همکاری شرکت خوراک‌سازان بهپرور تهیه و سپس تزریق درون صفاقی (Intraperitoneal injection) سم استرپتوزوسین (Streptozotocin (STZ)) (شرکت سیگما آلدریچ (Sigma-Aldrich)، آمریکا) در یک دوز ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار (PH=۴/۵) بعد از شش ساعت ناشتایی به‌صورت تک وهله‌ای اعمال شد (۱۴). برای گروه کنترل سالم نیز همان مقدار سرم فیزیولوژیک سالین (Saline) برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با گروه‌های دریافت کنندهٔ STZ تزریق گردید. یک هفته پس از روش دیابتی کردن، میزان گلوکز نمونه خونی از ورید دُمی حیوان جمع‌آوری و با استفاده از روش آنزیمی گلوکز اُکسیداز بررسی و غلظت گلوکز خون بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به‌عنوان رت‌های دیابتی نوع دو وارد تحقیق شدند (۱۵).

پروتکل تمرینی

رت‌های گروه تمرینی تحقیق حاضر (T+D) برای ۵ روز در هفته (شنبه، یکشنبه، سه‌شنبه، چهارشنبه و پنج‌شنبه) به

مدت ۸ هفته در یک برنامهٔ تمرین تناوبی شدید (HIIT) در پایان دوره سازگاری و شروع فعالیت حیوانات (ساعت ۱۹ عصر) بر روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی (Bionic mobin مُدل DSI-580، ساخت شرکت کیمیا کهربای مبین، تهران، ایران) تمرین داده شدند. قبل از اجرای پروتکل، آزمون رسیدن به واماندگی بیدفورد و همکاران (۱۹۷۹) برای محاسبهٔ سرعت بیشینه رت‌ها انجام گرفت (۱۶). بطوری‌که، سرعت دویدن با ۱۰ متر بر دقیقه شروع و در هر سه دقیقه یک‌بار، سرعتی معادل با سه متر بر دقیقه به آن تا زمان رسیدن به حالت واماندگی افزوده شد.

زمان رسیدن به خستگی (یا واماندگی) با عدم توانایی رت‌ها در دویدن روی نوارگردان با وجود ایجاد شوک الکتریکی مشخص گردید. به‌طوری‌که میانگین بیشینه سرعت بدست آمده به‌هنگام واماندگی ابتدای شروع برنامه تمرینی معادل ۳±۱۸ متر بر دقیقه بود. به منظور اندازه‌گیری اثربخشی عملکرد تمرین هر دو هفته آزمون سرعت بیشینه گرفته شد و شدت تمرین بر اساس سرعت بیشینه به دست آمده تنظیم شد. به طوری‌که در هفته هشتم تمرین میانگین سرعت بیشینه معادل معادل ۳±۲۸ بود.

پروتکل HIIT شامل سه مرحلهٔ گرم‌کردن، بدنهٔ اصلی تمرین و سرد کردن بود. تمرینات در مرحلهٔ گرم و سرد کردن بمدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه (معادل با شدت ۴۰-۳۰٪ VO2max) برای رت‌ها در نظر گرفته شد. بدنهٔ اصلی تمرین نیز برابر با شدت ۹۰-۸۵٪ سرعت بیشینه در آزمون وامانده ساز (تقریباً برابر با ۲۵/۵-۲۴ متر بر دقیقه) سرعت بیشینه در ۶ تا ۱۲ وهله (هر هفته یک نوبت به وهله‌های فعالیتی حیوانات اضافه گردید) بود. به‌علاوه، تناوب‌های سه دقیقه‌ای استراحت فعال که شامل دویدن‌های ادامه‌دار روی نوارگردان با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بود که میان وهله‌های فعالیتی اعمال گردید.

همچنین، دو گروه کنترل سالم (C) و کنترل دیابتی (D) که در هیچگونه برنامهٔ فعالیتی شرکت نکردند، برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با گروه تمرینی، ۵ روز در هفته بمدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوارگردان بی‌حرکت قرار داده شدند. به‌منظور تحریک رت‌ها برای دویدن از محرک الکتریکی با وُلتاژ کم تعبیه شده در قسمت عقبی نوارگردان، استفاده گردید (۱۷).

روش تجزیه و تحلیل وسترن بلاتینگ

تمامی رت‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرینی (جهت از بین بردن اثرات حاد تمرین) و پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، با تزریق داخل صفاقی کتامین (۹۰ mg.kg-1) و زایلازین (۱۰ mg.kg-1) به روش بدون درد توسط متخصص کارآزموده بیهوش و جراحی شدند. سپس بخشی از بافت کبد آزمودنی‌ها با دقت برداشته شده و پس از شستشو با سرم نرمال سالین در نیتروژن مایع (۱۹۶ C°-) منجمد و در دمای (۷۰ C°-) نگهداری شد. در ادامه نیز برای ارزیابی میزان بیان پروتئین‌های BNIP3 و NIX از روش وسترن بلات (western blot) استفاده گردید.

ابتدا، برای تهیهٔ هموژنه ۱۰٪ وزنی حجم بافت کبد از بافر ریپا (شرکت سیگما) حاوی مهارکنندهٔ پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده گردید. غلظت تام پروتئین‌ها با روش برآدفورد (Bradford) (سیگما) اندازه‌گیری شد. سپس پروتئین‌ها در ژل ۱۰٪ دِناتوره کنندهٔ پلی‌آکریل‌آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate) با دستگاه الکتروفورز (Biorad) تفکیک شد. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی غشاء پلی وینیلیدین دی فلوراید (Sodium dodecyl sulfate) سیگما منتقل گردید.

بعد از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشاء از آنتی بادی اولیه رت ضد BNIP3 و ضد NIX ساخت شرکت سانتاکروز (Santa Cruz Biotechnology) آمریکا به ترتیب با کُد E-AB-61061 و sc-166332 به نسبت ۱ به ۵۰۰ (در طول شب) استفاده شد. غشاها پس از چهار بار شستشو هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی ۰/۰۵٪ توین ۲۰، در

معرض آنتی بادی ثانویه کونژوگه با Hrp (Horseradish peroxidase) به‌مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد با روش قبلی این بار به صورت سه تکرار از کیت (BioRad،ECL) که برای آشکارسازی مجموعه‌های ایمنی تشکیل شده استفاده گردید. غشاها در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفته و دانسیته باندها توسط نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری و دانسیتهٔ باندهای پروتئین هدف در مقابل لودینگ کنترل بتا-اکتین نرمالیزه شدند. در انتها نیز نتایج بصورت دانسیتهٔ نسبی (نسبت به گروه کنترل) ارائه گردیدند (۱۸).

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک بررسی گردید. سپس اثرات تمرین روی متغیرهای وابسته در قالب یک مدل آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسات چندگانه بون-فرونی تجزیه و تحلیل شد. سهم اثر تمرین در هر یک از متغیرها نیز با استفاده از درصد تغییرات مشخص شد. تمامی مراحل تجزیه و تحلیل آماری در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ با استفاده از نرم افزار آماری SPSS26 و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel2019 تحت ویندوز انجام گردید.

یافته ها

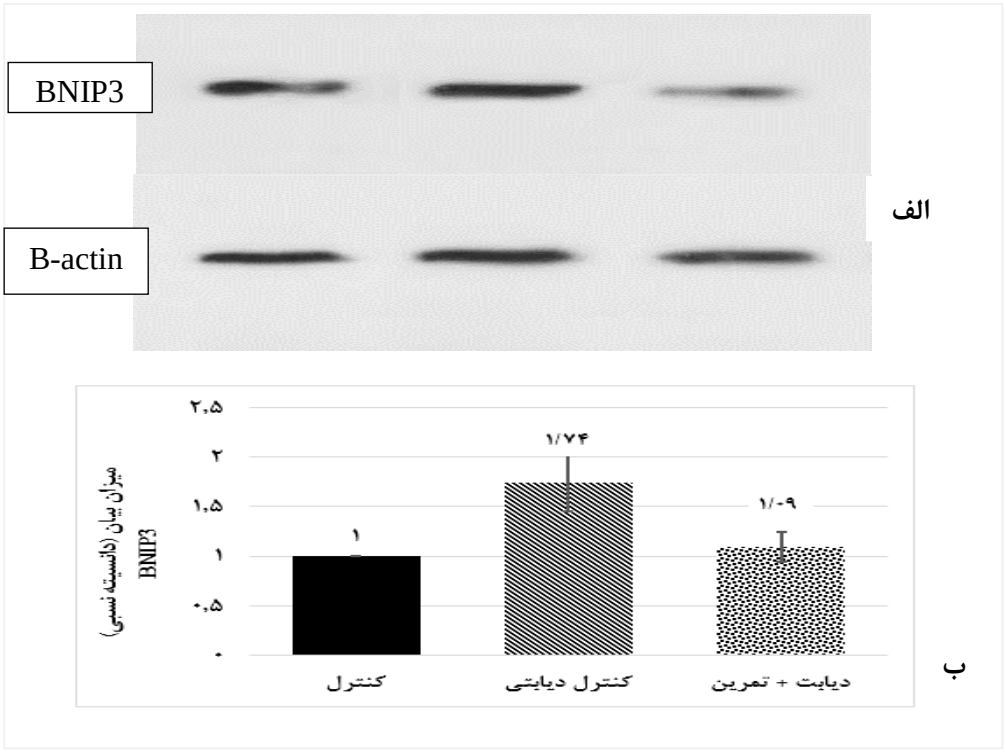
میانگین و انحراف معیار شاخص‌های مورد مطالعه به صورت نمودار ۱ و ۲ ارائه شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان دهندهٔ وجود تغییرات معنی‌دار در میزان بیان پروتئین NIX و عدم تغییر معنی‌دار در بیان پروتئین BNIP3 در آزمودنی‌ها به‌دنبال القاء دیابت نوع دو و تمرین HIIT می‌باشد (جدول ۱).

استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که میانگین میزان بیان پروتئین BNIP3 بین سه گروه مورد مطالعه با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارد. اگر چه گروه کنترل دیابت نسبت به گروه سالم ۷۴ درصد افزایش و گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه دیابتی سالم ۳۷ درصد کاهش داشته است، اما این تفاوت ها از نظر آماری معنی دار نبوده است (نمودار ۱).

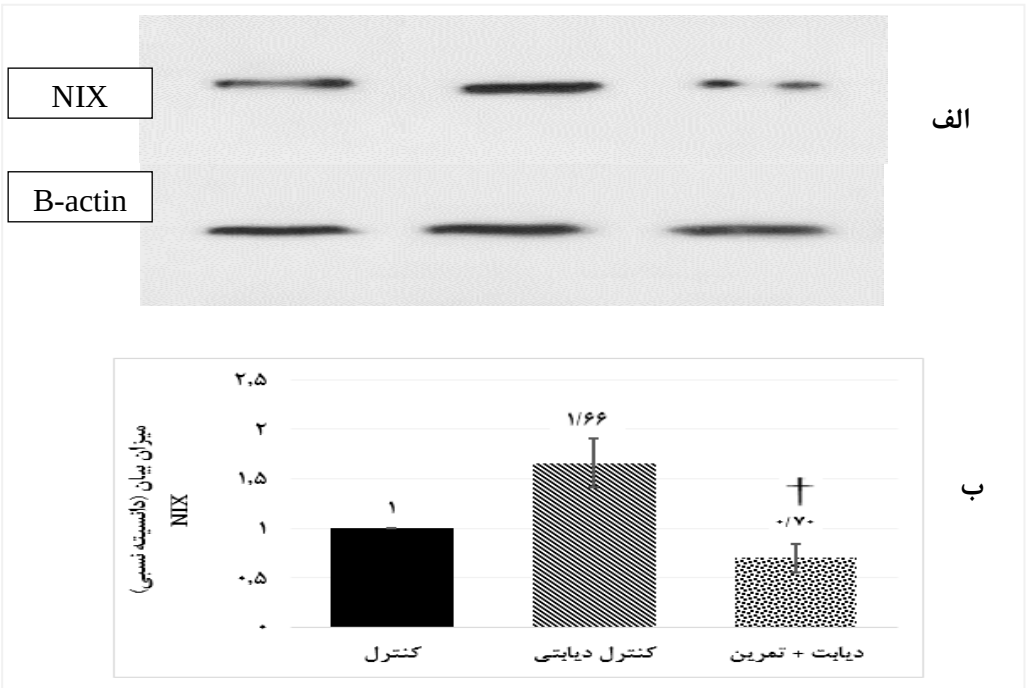
از طرفی استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه وجود تفاوت در بیان پروتئین NIX بین سه گروه را تأیید کرد. که با توجه به نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی؛ NIX در گروه کنترل دیابتی افزایش ۶۶ درصدی در مقایسه با گروه کنترل سالم پیدا می‌کند، ولیکن از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۲). تغییرات این پروتئین در گروه دیابتی تمرین کرده در حدود ۵۷ درصد کمتر از گروه کنترل دیابتی و در مقایسه با آن معنی‌دار بود.

جدول ۱. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه

متغیر	گروه	M±SD	مقدار F	معنی‌داری
BNIP3	کنترل	۱	۳/۳۵۴	۰/۱۰۵
	دیابت	۰/۲۹± ۱/۷۴		
	دیابت + تمرین	۰/۱۵± ۱/۰۹		
NIX	کنترل	۱	۶/۹۲۲	۰/۰۲۸
	دیابت	۰/۲۵± ۱/۶۶		
	دیابت + تمرین	۰/۱۴± ۰/۷۰		



نمودار ۱. نشان دهندهٔ میزان بیان پروتئین BNIP3 در گروه‌های تجربی مورد مطالعه در مقابل بتا-آکتین به‌عنوان گروه کنترل. الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار میله‌ای جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها. میله خطا نشان دهنده انحراف معیار درون گروهی می‌باشد.



نمودار ۲. نشان دهندهٔ میزان بیان پروتئین NIX در گروه‌های تجربی مورد مطالعه در مقابل بتا-آکتین به‌عنوان گروه کنترل. الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار میله‌ای جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها. میله خطا نشان دهنده انحراف معیار درون گروهی می‌باشد.

† معنی داری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (D) در سطح P<۰/۰۵.

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد میزان بیان BNIP3 و NIX در رت‌های دیابتی‌شده با استرپتوزوسین تغییرات فزاینده غیرمعنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل سالم داشت، در تأیید این یافته؛ دثلفسن و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیقی با هدف آزمون اینکه؛ آیا رژیم پرچرب باعث تغییر اتوفاژی و میتوفاژی کبدی می‌شود، به مدت ۱۳ هفته با رژیم پر چربی پر فروکتوز (HFF) رت‌های جوان را تغذیه نمودند. طبق یافته‌های تحقیق‌شان، HFF منجر به افزایش دایمر BNIP3 کبدی شد (۱۹). سمیت لیپوتاتیک نوعی استرس سلولی است که در اثر تجمع لیپیدها در نتیجه اختلال در عملکرد میتوکندری و مقاومت به انسولین در عضلات ایجاد می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند؛ گیرنده میتوفاژی BNIP3/Nix، به سمیت چربی پاسخ می‌دهد و در پاسخ به تغذیه با چربی بالا تجمع می‌یابد (۷).

نقش BNIP3 و NIX در ترویج مرگ سلولی در پاسخ به استرس‌های خاص، با شواهدی تعدیل می‌شود که گزارش کردند بیان بیش از حد BNIP3 برای از بین بردن سلول‌ها کافی نیست، بلکه باعث تکه‌تکه شدن میتوکندریایی و میتوفاژی از طریق تعامل با OPA-1 (optic atrophy1) و LC-3 می‌شود (۶). به طور مشابه، NIX نقش کلیدی در بلوغ گلبول‌های قرمز خون از طریق القاء تنظیم‌شده در توسعه میتوفاژی دارد که در تعامل با مولکول GABARAP مربوط به LC-3 می‌باشد (۱۸). بنابراین، به نظر می‌رسد BNIP3 و NIX نقش‌های دوگانه‌ای را در هر دوی میتوفاژی و مرگ سلولی ایفا می‌کنند، اگرچه نحوه تغییر سلول بین این عملکردهای مختلف، هنوز کاملا مشخص نیست (۶). بنابراین، از جمله محدودیت‌های تحقیق حاضر برای تأکید بر افزایش میتوفاژی ناشی از BNIP3/NIX پس از القای دیابت در رت‌ها می‌توان به عدم اندازه‌گیری OPA-1 و LC-3 اشاره‌کرد.

در مطالعه حاضر کاهش غیرمعنی‌دار BNIP3 و کاهش معنی‌دار NIX در رت‌های دیابتی تمرین کرده (D+T) متعاقب هشت هفته HIIT ایجاد گردید. در این زمینه؛ یوآن و همکاران (۲۰۱۸) تغییر معنی‌داری در BNIP3 ناشی از تمرین وامانده-ساز در بافت قلبی مشاهده نکردند (۲۰). بعلاوه؛ ژائو و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که ده هفته تمرین شنا در موش‌ها باعث کاهش بیان پروتئین‌های BNIP3 و NIX در بافت قلبی موش-های سالم می‌شود (۲۱). به نظر می‌رسد استفاده از تمرین‌های تناوبی شدید با افزایش بیان پراکسی زوم هسته‌ای آلفا و گاما موجب افزایش بتااکسیداسیون و کاهش تولید ROS از طریق کاهش پراکسیداسیون چربی‌ها (Lipid Peroxidation) و فعالیت کمتر سلول‌های اقماری (Hepatic Stellate Cell) در کبد می‌شود، که نتیجه‌ی بلند مدت چنین سازگاری‌هایی کاهش سلول‌های آسیب‌زننده به میتوکندری همچون HMGBI (High-Mobility Group Box-1) است (۲۲).

در تقابل با یافته بررسی ما؛ لیرا و همکاران (۲۰۱۳) اظهار داشتند که چهار هفته تمرین هوازی باعث افزایش در سطوح پایهٔ اتوفاژی از طریق افزایش بیان پروتئین Binp3 میتوفاژی (BNIP3) در تارهای اکسایشی در مقایسه با تارهای گلیکولیتیک غالب موش‌ها می‌گردد (۲۳). مشاهدهٔ تفاوت در اثرات ناشی از تمرین ورزشی در پژوهش حاضر (نقش سرکوب کنندگی) در مقایسه با تحقیق فوق‌الذکر (نقش تقویت-کنندگی) ممکن است ناشی از وضعیت پایهٔ بافت مورد بررسی در مواجهه با انواع استرس‌ها (مانند: پیری، آتروفی، هایپوکسی و دیابت) باشد که اعمال تمرین ورزشی به‌عنوان یک عامل محافظتی در تلاش برای برقراری هومئوستاز سلولی در سطحی طبیعی و پایه جهت تنظیم هماهنگ‌سازی سلولی کارآمد در شرایط اضطراری باشد (۲۴).

در ابتدا، BNIP3/NIX ممکن است بیان متوسط ROS را برای افزایش میتوفاژی؛ ارتقاء دهد. در ادامه، فسفوریلاسیون یک فرایند مهم در میتوفاژی ناشی از BNIP3 است. فسفوریلاسیون می‌تواند باعث اتصال BNIP3 به LC3-II، یک مولکول حیاتی برای تشکیل اتوفاگوزوم شده و فسفوریلاسیون Ser24 در BNIP3 می‌تواند باعث افزایش میل

ترکیبی شود (۲۵). موناسینگه و همکاران (۲۰۱۶) چنین بیان نمودند که ابتلاء به دیابت نوع دو باعث افزایش فعالیت اتوفاژی در قلب انسان از طریق افزایش در بیان نشانگر LC3-II رخ می‌دهد (۲۶).

در راستای تبیین نقش فعالیت ورزشی بر شاخص‌های اتوفاژیک؛ کیم و همکاران (۲۰۱۲) با مطالعهٔ یک وهله فعالیت متوسط دویدن روی نوارگردان به کاهش در سطوح Beclin-1 و LC3-II طی بازیافت (۳، ۶ و ۱۲ ساعت پس از فعالیت) در عضلات دوقلوی موش‌ها اظهار داشتند (۲۷). Beclin-1، ارتولوگ پستانداران مخمر Atg6 (mammalian ortholog of yeast Atg6)، اتوفاژی را به شکل کمپلکس Beclin-1-Vps34–Vps15 فعال می‌کند. Bcl-2 و Bcl-XL می‌توانند به دامنه‌ی BH3ی Beclin-1 به صورت کمپلکس‌های Beclin-1–Bcl-2 و Beclin-1–Bcl-XL برای مهار میتوفاژی متصل شوند.

با این حال، BNIP3 و NIX می‌توانند با Beclin-1 رقابت کنند تا به Bcl-2 و Bcl-XL متصل شوند. سپس Beclin-1 از این کمپلکس‌ها آزاد می‌شود تا میتوفاژی را فعال کند (۲). در این راستا؛ جعفری و همکاران (۱۳۹۹) با اعمال هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (۹۰-۸۵٪ سرعت بیشینه) روی رت‌های ویستار گزارش کردند بیان تمامی پروتئین‌های اتوفاژیک در گروه دیابتی بیشتر از گروه سالم بود و بیان شاخص‌های اتوفاژیک LC3-II, ULK-1, Beclin-1 در بافت قلبی رت‌های دیابتی در نتیجه تمرین تناوبی کاهش یافته بود (۱۸).

همولوگ Ras غنی شده در مغز (Ras homolog (Rheb) enriched in brain) می‌تواند از طریق فعال‌سازی پروتئین هدف پستانداران راپامایسین (mTOR) میتوفاژی را سرکوب کند، در حالی که BNIP3 می‌تواند مسیر سیگنالینگ Rheb-mTOR را برای افزایش میتوفاژی مسدود کند (۲۸). به خوبی ثابت شده است که ابتلاء به دیابت سبب نقص در میتوکندری، ایجاد التهاب، استرس ER و افزایش در هایپوکسی می‌گردد که همگی منجربه غیرفعال‌سازی مجموعهٔ mTOR می‌شود (۲۹).

بنابراین، چنین به نظر می‌رسد که عدم بررسی چند محور پیام‌رسانی اصلی از جمله مسیر PI3k-Akt، mTORC1 و افکتورهای بالادستی آن‌ها از محدودیت‌های تحقیق حاضر برای درک هرچه بهتر تنظیم افزایشی و بیش بیانی شاخص‌های اتوفاژی و میتوفاژی ناشی از ابتلاء به دیابت باشد.

نتایج مطالعه حاکی است که القاء دیابت نوع دو موجب افزایش غیرمعنی‌دار در فعالیت پروتئین‌های مسیر میتوفاژی از طریق افزایش در بیان BNIP3 و NIX می‌گردد. هر چند، اعمال تمرین تناوبی شدید سبب ممانعت از افزایش بیش از حد و کاهش در این پروتئین‌ها در رت‌های دیابتی می‌شود. از این‌رو، به‌نظر می‌رسد انجام فعالیت‌های بدنی مداخلهٔ مناسبی برای برقراری تعادل در مسیر میتوفاژی ناشی از ابتلاء به دیابت در بافت کبدی رت‌ها باشد. البته، برای نتیجه‌گیری قطعی در این مورد نیاز به مطالعات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از تمامی افرادی که به هر نحوی زمینه انجام مطالعه حاضر را فراهم آوردند، نهایت تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. هیچگونه تعارض منافعی با فرد یا دستگاهی برای انتشار این مقاله وجود ندارد.

References

1. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. Proceedings of the National Academy of Sciences.2010;107(19):8788-8893.
2. Su, Z, Yutong N, Xiufang H, Ying Z, Bing F, Lipeng T, et all. Mitophagy in hepatic insulin resistance: Therapeutic potential and concerns. Frontiers in pharmacology 2019;10: 1193.
3. Szendroedi J, Phielix E, Roden, M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. Nat. Rev. Endocrinol. 2011;8: 92–103.
4. Wu H, Wang Y, Li W, Chen H, Du L, Liu D, et all. Deficiency of mitophagy receptor FUNDC1 impairs mitochondrial quality and aggravates dietary-induced obesity and metabolic syndrome. Autophagy. 2019;6(4):1-17.
5. Lampert MA, Orogo AM, Najor RH, Hammerling BC, Leon LJ, Wang BJ, et all. BNIP3L/NIX and FUNDC1-mediated mitophagy is required for mitochondrial network remodeling during cardiac progenitor cell differentiation. Autophagy. 2019 Jul 3;15(7):1182-98.
6. Glick D, Zhang W, Beaton M, Marsboom G, Gruber M, Simon MC, et all. BNip3 regulates mitochondrial function and lipid metabolism in the liver. Mol Cell Biol. 2012;32(13):2570-84.
7. da Silva Rosa SC, Martens MD, Field JT, Nguyen L, Kereliuk SM, Hai Y, Chapman D, et all. BNIP3L/Nix-induced mitochondrial fission, mitophagy, and impaired myocyte glucose uptake are abrogated by PRKA/PKA phosphorylation. Autophagy. 2021 Sep 2;17(9):2257-2272.
8. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et all. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. Diabetes research and clinical practice. 2019 Nov 1; 157:107843.
9. Mohammadi E, Nikseresht F. Effect Of 8 Weeks of Incremental Endurance Training on The Activity of Superoxide Dismutase Enzyme and Malondialdehyde Levels of Cardiac Tissue of Rats with Type 2 Diabetes. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism. 2020 Jun 10;19(5):261-8. [In Persian]
10. Türk Y, Theel W, Kasteleyn MJ, F Franssen ME, Hiemstra PS, Rudolphus AC, et all. High intensity training in obesity: A Me-ta-analysis Obes Sci Pract. 2017; 3(3): 258–271.
11. Ahmadi M, Aghaei Bahman Begloo N. The effect of training on mitochondrial mitophagy factors in obese male rats. Journal of Sport and Exercise Physiology 2022;15(2):10-19. [In Persian]
12. Greene NP, Nilsson MI, Washington TA, Lee DE, Brown LA, Papineau AM, et all. Impaired exercise-induced mitochondrial biogenesis in the obese Zucker rat, despite PGC-1α induction, is due to compromised

mitochondrial translation elongation. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2014 Mar 1;306(5): 503-11.
13. Thorburn A. Autophagy and its effects: making sense of double-edged swords. PLoS biology. 2014 Oct 14;12(10):1001967.
14. Sasidharan SR, Joseph JA, Anandakumar S, Venkatesan V, Ariyattu Madhavan CN, Agarwal A. An experimental approach for selecting appropriate rodent diets for research studies on metabolic disorders. BioMed research international. 2013.
15. Esmailee B AA, Abbassi Daloii A, Farzanegi P. The effect of aerobic exercise along with resveratrol supplementation on AMPK and MAFbx gene expression of myocardial diabetic rats. Journal of Birjand University of Medical Sciences, 2020; 27(2): 150-160: [In Persian]
16. Leandro CG LA, Hirabara SM, Manhães-de-Castro R. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. Journal of Strength and Conditioning Research. 2007;21(3):751-6.
17. Brown MB, Neves E, Long G, Graber J, Gladish B, Wiseman A, et all. High-intensity interval training, but not continuous training, reverses right ventricular hypertrophy and dysfunction in a rat model of pulmonary hypertension. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2017;312(2):197-210.
18. Jafari A, Zarghami khameneh A, Nikookheslat S, Karimi P. Effects of high intensity interval training (HIIT) with and without caffeine administration on the expression of myocardial autophageal proteins in diabetic mice. Iranian Magazine Diabetes and Metabolism.2020; 1 (1): 1-4. [In Persian]
19. Dethlefsen MM, Kristensen CM, Tøndering AS, Lassen SB, Ringholm S, Pilegaard H. Impact of liver PGC-1α on exercise and exercise training-induced regulation of hepatic autophagy and mitophagy in mice on HFF. Physiological reports. 2018;6(13):13731.
20. Schwarten M, Mohrlüder J, Ma P, Stoldt M, Thielmann Y, Stangler T, et all. Nix directly binds to GABARAP: a possible crosstalk between apoptosis and autophagy. Autophagy. 2009 Jul 1;5(5):690-8.
21. Yuan Y, Pan SS. Parkin mediates mitophagy to participate in cardioprotection induced by late exercise preconditioning but Bnip3 does not. Journal of cardiovascular pharmacology. 2018 May 1;71(5):303-16.
22. Zhao Y, Zhu Q, Song W, Gao B. Exercise training and dietary restriction affect PINK1/Parkin and Bnip3/Nix-mediated cardiac mitophagy in mice. General physiology and biophysics. 2018 Sep 1;37(6):657-66.
23. Van der Windt DJ, Sud V, Zhang H, Tsung A, Huang H. The Effects of physical exercise on fatty liver disease. Gene Expression. 2018;18(2):89-101.

24. Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, et all. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. The FASEB Journal. 2013 Oct;27(10):4184-93.
25. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et all. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death & Differentiation. 2018 Mar;25(3):486-541.
26. Moreira OC, Estébanez B, Martínez-Florez S, Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. Mitochondrial function and mitophagy in the elderly: effects of exercise. Oxidative medicine and cellular longevity. 2017 Oct; 2012798.
27. Munasinghe PE, Katare R. Maladaptive autophagy in diabetic heart disease. International Journal of Clinical and Experimental Physiology. 2016 Oct 31;3(4):155-65.
28. Kim YA, Kim YS, Song W. Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. Journal of physiology and biochemistry. 2012 Jun;68(2):229-35.
29. Lin A, Yao J, Zhuang L, Wang D, Han J, Lam EW, et all. The FoxO–BNIP3 axis exerts a unique regulation of mTORC1 and cell survival under energy stress. Oncogene. 2014 Jun;33(24):3183-94.

Effect of eight weeks of high-intensity interval training on some indices of liver mitophagy in type 2 diabetic rats

Farajpour Khazaei S [1], Vakili J [2]*, Sari Sarraf V [3]

1. PhD student of Exercise physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Associate Professor of Exercise physiology, *Department of* Exercise *Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran, vakili@tabrizu.ac.ir*

Received: *2023/1/31* Accepted: *2023/5/27*

Abstract

Background: Dysfunction of mitochondria is associated with such diseases as obesity, cancer, and type 2 diabetes. Training plays a major role in the improvement of mitochondrial damage and oxidative stress. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of eight weeks of high-intensity interval training on some mitophagy indices in the liver tissue, including BNIP3 and NIX in type 2 diabetic rats.

Materials and Methods: A total of 30 three-month-old adult male Wistar rats with a weight range (250-300 g) were randomly assigned to four groups of 10 series, including healthy control (C), Diabetic control (D), and diabetic+Training (D+T). The training protocol includes running with intensity at 85%-90% of maximum speed in 6-12 two-minute intervals five days a week for eight weeks. A method based on Western blotting was used to determine changes in the expression of BNIP3 and NIX proteins in the liver tissue of rats. The one-way analysis of variance and the Bonferroni post hoc test were used to analyze the data.

Results: Diabetes increased BNIP3 and NIX proteins; nonetheless, it was not significant. The changes of NIX in the trained diabetic group were about 57% less than in the diabetic control group, and this difference was significant (P=0.033), while BNIP3, despite a 37% decrease, did not change significantly (P>0.05).

Conclusion: Eight weeks of intense intermittent training caused a significant decrease in the expression of proteins involved in mitophagy in the training group. Nonetheless, arriving at a definite conclusion on these indicators and how they are affected by different conditions depends on conducting further studies.

Keywords: High-Intensity Interval Training, Mitophagy, Type 2 Diabetes.

Citation: Farajpour Khazaei S, Vakili J, Sari Sarraf V. Effect of eight weeks of high-intensity interval training on some indices of liver mitophagy in type 2 diabetic rats. Yafte. 2023; 25(1):15-26.