Journal of Sport and Exercise Physiology
Autumn 2023/Vol.16/No.3

Effects of eight weeks of high-intensity interval training (HIIT) on the expression of Pink1 and Parkin proteins in the liver tissue of type 2 diabetic male rats

Javad Vakili *, Vahid Sari Sarraf, Sara Farajpour Khazaei

Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

ABSTRACT

Background and Purpose: There is a close relationship between liver mitochondrial dysfunction and the development of obesity and insulin resistance. As observed in type 2 diabetes, in conditions of insulin resistance, a decrease in insulin sensitivity of liver cells, skeletal muscle and fat cells is observed. In recent decades, physical activity has become a key tool in controlling many diseases, including type 2 diabetes, and studies have shown that various exercise protocols reduce the prevalence and improve some It is effective in the metabolic functions of the liver. The aim of this study was to evaluate the effect of eight weeks of high intensity interval training on Parkin and Pink1 proteins in the liver tissue of type 2 diabetic rats.

Materials and Methods: In an experimental study, 30 three-month-old adult male Wistar rats with a weight range (250-300 g) were randomly divided into four groups of 10 series including: healthy control (C: intraperitoneal injection of saline), Diabetic control (D: diabetic with high-fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin) and trained diabetic (D+T: diabetic with exercise) were divided. The training protocol includes running with an intensity of 85%-90% of the maximum speed in 6 to 12 two-minute intervals; It was 5 days a week for eight weeks. All rats, 48 hours after the last training session and after 12 to 14 hours of fasting, were anesthetized and operated by a trained specialist without pain. A method based on Western blotting was used to determine changes in the expression profile of Parkin and Pink1 proteins in the heart muscle tissue (left ventricle) of rats. The two-way analysis of variance and Bonferroni post hoc test were used to analyze the data.

Results: Induction of diabetes (D) causes a 51% and 63% increase in Parkin and Pink1 proteins, respectively, although it is not statistically significant ($P \geq 0.05$). Also, exercise intervention caused a 45% and 38% decrease in Parkin and Pink1 in the trained diabetic group (D+T) compared to the diabetic group (D), but it was not significant ($p \geq 0.05$).

Conclusion: According to the results, it can be stated that eight weeks of high intensity interval training (HIIT) is insufficient to observe a significant reduction of mitophagy in the liver tissue of diabetic rats. At the same time, due the partial changes of this study's indices, HIIT is a preventive measure against the abnormal increase of mitophagy due to type 2 diabetes. However, making a definite opinion about these indicators and how they are affected by different conditions depends on conducting further researches.

Keywords: High Intensity Interval Training, mitophagy, Type 2 Diabetes, Liver tissue.

*Corresponding author: E-mail: vakili@tabrizu.ac.ir

نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی

پاییز ۱۴۰۲/ دوره ۱۶/ شماره ۳

تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) بر بیان پروتئین‌های Parkin و Pink1 در بافت کبدی رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو

جواد وکیلی*، وحید ساری صرّاف، سارا فرج پور خزاعی

گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

مقدمه و هدف: ارتباط نزدیکی بین اختلالات عملکرد میتوکندری کبد و توسعه چاقی و مقاومت به انسولین وجود دارد. همان‌طور که در بیماری دیابت نوع دو مشاهده شده است، در شرایط مقاومت به انسولین، کاهش حساسیت انسولین سلولهای کبدی، عضله اسکلتی و سلولهای چربی مشاهده می‌شود. در طول دهه‌های اخیر فعالیت ورزشی به عنوان یک ابزار کمکی کلیدی در کنترل بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت نوع دو درآمده است و مطالعات نشان داده‌اند که پروتکل‌های تمرینی گوناگون در کاهش شیوع و بهبود برخی از عملکردهای متابولیکی کبد مؤثر است. هدف این مطالعه بررسی تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالا بر شاخص‌های Parkin و Pink1 در بافت کبد رت‌های دیابتی نوع دو می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در یک طرح تجربی، ۳۰ سر رت صحرایی نر ویستار سه ماهه با دامنه وزنی (۳۰۰-۲۲۵ گرم) به طور تصادفی در یکی از سه گروه ۱۰ سری شامل: کنترل سالم (C: تزریق درون صفاقی سرم سالین)، کنترل دیابتی (D: دیابتی شده با رژیم غذایی پرچرب همراه با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین) و دیابتی تمرین کرده (D+T: دیابتی شده به همراه تمرین) 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. تمامی رت‌ها، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرینی و پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، به روش بدون درد توسط متخصص کارآزموده بیهوش و جراحی شدند. برای تعیین تغییرات در نیمرخ بیان پروتئین‌های Parkin و Pink1 در بافت کبد رت‌ها از روش وسترن بلات استفاده شد. از تحلیل واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی بونفرونی برای تحلیل داده‌ها در سطح معنی‌داری کمتر از پنج صدم استفاده گردید.

نتایج: القاء دیابت (D) موجب افزایش ۵۱ و ۶۳ درصدی به ترتیب در پروتئین‌های Parkin و Pink1 می‌گردد، اگرچه از نظر آماری معنی‌دار نیست ($p\geq۰/۰۵$). همچنین با وجود اینکه، مداخلهٔ تمرینی باعث کاهش ۴۵ و ۳۸ درصدی در Parkin و Pink1 در گروه دیابتی تمرین کرده (D+T) در مقایسه با گروه دیابتی (D) شد، ولی معنی‌دار نبود. ($P\geq۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج می‌توان اظهار داشت که، هشت هفته تمرینات تناوبی با شدت بالا (HIIT) برای مشاهده کاهش معنی‌دار میتوفاژی در بافت کبد موش‌های دیابتی ناکافی است. در عین حال با توجه به اندک تغییرات مشاهده شده HIIT احتمالاً یک راهکار پیشگیرانه در مقابل افزایش بی‌رویه میتوفاژی ناشی از ابتلاء به بیماری دیابت نوع دو دارد. 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، بافت کبد.

* نویسنده مسئول؛ رایانامه:vakili@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت:۱۴۰۲/۰۳/۲۴ تاریخ ویرایش:۱۴۰۲/۰۶/۰۳ تاریخ پذیرش:۱۴۰۲/۰۶/۱۱

نسخه پیش انتشار

مقدمه

دیابت، شایع ترین بیماری متابولیک در جهان محسوب می‌شود و از سوی سازمان جهانی بهداشت، «همه‌گیری نهفته» لقب یافته است. به علاوه؛ دیابت همواره جزء ۱۰ علت اصلی مرگ در ایران است (۱). این بیماری با ایجاد اختلال در متابولیسم درون‌سلولی در بسیاری از بافت‌ها از جمله کبد همراه بوده و به‌عنوان یکی از عوامل اصلی شیوع اختلالات کبدی نیز محسوب می‌شود (۲). با توجه به وظایف مهم کبد در حفظ گلوکز خون با برداشت و ذخیره‌سازی گلوکز؛ مقاومت به انسولین، به ویژه مقاومت به انسولین کبدی، یک عامل خطر برای سندرم متابولیک است. تجمع اسیدهای چرب کبدی می‌تواند از طریق افزایش گلوکونئوژنز، لیپوژنز، التهاب مزمن، استرس اکسیداتیو و استرس شبکه آندوپلاسمی و اختلال در مسیر سیگنال انسولین باعث مقاومت به انسولین کبدی شود. در حقیقت شواهد مطالعاتی افزایش تجمع چربی و دیابت را یک ارتباط علت و معلولی در نظر می‌گیرند (۳, ۴).

اختلال عملکرد میتوکندری در ایجاد مقاومت به انسولین کبدی ناشی از اسیدهای چرب کبدی نقش دارد. اتوفاژی میتوکندری (میتوفاژی (Mitophagy))، به‌عنوان یک روند کاتابولیکی، میتوکندری آسیب دیده را به طور انتخابی تخریب می‌کند تا اختلال عملکرد میتوکندری را معکوس کرده و پویایی و عملکرد میتوکندری را حفظ کند. با توجه به اینکه میتوکندری، مکان تجزیه اسیدهای چرب است، بنابراین؛ میتوفاژی با حذف میتوکندری آسیب‌دیده، می‌تواند اکسیداسیون اسیدهای چرب میتوکندری را فراهم کند تا از تجمع اسیدهای چرب کبدی جلوگیری کرده و مقاومت به انسولین کبدی را بهبود بخشد (۳). فرایند میتوفاژی به وسیله لیگازهای یوبیکوئیتین مانند مسیر Parkin–Pink1 (Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase)-) (PTEN-induced kinase 1)) تنظیم می‌شوند. Pink1 یک سرین/ترئونین کیناز است که توسط ژن Pink1 کدگذاری می‌شود و از سلول در برابر استرس ناشی از اختلال در عملکرد میتوکندریایی محافظت می‌کند. Pink1 موجب اتصال Parkin به میتوکندری می‌شود (۵, ۶). این فرایند می‌تواند عوامل مبدل اتوفاژی را فعال کند که به نوبه خود می‌توانند به واکوئل‌های غشای دوتایی (اتوفاگوزوم (Autophagosome)) متصل شوند. بنابراین، میتوکندری آسیب‌دیده می‌تواند توسط اتوفاگوزوم‌ها احاطه شده، سپس با لیزوزوم‌ها برای تخریب میتوکندری‌ها ترکیب شود (۷). بنابراین با توجه به اینکه سنتز میتوکندری جدید و دفاع آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد؛ همگام با افزایش تجزیه میتوکندریایی، یک محتوی میتوکندریایی ناکارآمد پدید می‌آید و کاهش عملکرد آن در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو اتفاق می‌افتد (۸).

مداخله‌های مربوط به شیوه زندگی علاوه بر بهبود کیفیت زندگی، برای پیشگیری و کنترل دیابت نوع دو مقرون به صرفه‌تر است. اکنون به خوبی شناخته شده است که فعالیت‌های بدنی یک محرک قوی برای القای مسیرهای سیگنالینگ توصیف شده در بالا است که در نهایت باعث ایجاد تغییرات فنوتیپی قوی در محیط میتوکندری شده و کمیت و کیفیت شبکه اندامک را بهبود می بخشد، که منجر به بهبود سلامتی می‌شود (۹). بعلاوه؛ تمرینات بدنی ظرفیت میتوکندریایی را در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو بازیابی می کند، اما در این بین، نقش میتوفاژی در این زمینه مورد بررسی قرار نگرفته است (۸).

با توجه به تنوع تمرینات ورزشی از نظر ساختار و روش اجرا، تمرینات تناوبی با شدت بالا (HIIT) شامل تناوب‌های فعالیت ورزشی شدید و وهله‌های استراحتی فعال با شدت متوسط تا کم است که برای افراد مختلف با توجه به موقعیت و شرایط جسمانی قابلیت تغییر دارد (۱۰). اثرگذاری تمرینات HIIT به دلیل تناوب در شدت اجرا، باعث ایجاد هایپوکسی می‌شود که بعد از اجرا به دلیل تولید NO خون‌رسانی افزایش یافته و باعث فعال‌سازی آنزیم‌های میتوکندریایی، مصرف چربی‌ها، افزایش حساسیت به انسولین و کاهش قند خون می‌شود (۱۱). احمدی و همکاران (۲۰۲۲) دو مداخله تمرینی HIIT و MICT را روی ۴۰ سر رت صحرایی تغذیه شده با رژیم پرچرب انجام دادند و بیان کردند که هر دو مداخله تمرینی به افزایش Parkin عضله نعلی نسبت به گروه کنترل منجر شد (۱۲). در حالی‌که؛ اکسلورد و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که ۱۲ هفته تمرینات ورزشی هوازی (۵ روز/ HRMAX ٪۸۵) باعث کاهش Parkin عضله اسکلتی در نمونه‌های بیوپسی بزرگسالان غیر فعال می-

شود (۱۳). اریبات و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیق‌شان روی افراد مسن؛ وضعیت میتوفاژی را قبل و بعد از ۱۶ هفته مداخله ورزشی بررسی نمودند. و نشان دادند Pink1 افزایش معنی‌داری نسبت به قبل از مداخله داشت، در حالی‌که این افزایش بین گروه کنترل و تمرین تفاوت معنی‌داری نداشت. Parkin به مداخله تمرینی پاسخی نداد و تغییر معنی‌داری نداشت (۱۴). با توجه به تناقضات بین یافته‌های مطالعات مختلف که چند نمونه در بالا ذکر شد؛ شناسایی اثر تمرین ورزشی بر جریان میتوفاژی در بافت کبدی موش‌های دیابتی شده جهت کاهش علائم دیابت و پیامدهای بعدی ناشی از آن در بین تمامی افراد جامعه بویژه بیماران مبتلاء به دیابت نوع دو یک ضرورت انکارناپذیر به‌نظر می‌رسد. از این‌رو، تحقیق حاضر به بررسی تأثیر اعمال تمرینات تناوبی شدید (HIIT) بر میزان بیان برخی از پروتئین‌های کلیدی مسیر میتوفاژی یعنی پروتئین‌های Pink1 و Parkin در بافت کبد متعاقب القای دیابت نوع دو در رت‌های نر ویستار می‌پردازد تا پیشنهادات کاربردی متناسبی در راستای نحوه‌ی انجام تمرینات ورزشی جهت پیشگیری و درمان پیامدهای احتمالی ناشی از دیابت ارائه دهد.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش: تحقیق حاضر از نوع تجربی در قالب یک طرح پس‌آزمون دو عاملی است که با استفاده از سه گروه ۱۰ سری از رت‌ها (تعیین حجم نمونه با در نظر گرفتن بتای ۰/۸ و آلفای ۰/۰۵) 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 رت‌ها 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 (پلت 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 رت‌های 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) جایگزین شدند.

روش اجرای پژوهش: پس از گذشت دو هفته از شرایط سازگاری با محیط آزمایشگاه، برای القای دیابت نوع دو، طبق روش گروه مطالعاتی ساسیدهاران (Sasidharan) و همکاران (۲۰۱۳)، دو هفته مصرف غذای پُرچرب (۴۵٪ چربی، ۲۱٪ پروتئین و ۳۴٪ کربوهیدرات) که با همکاری شرکت خوراک‌سازان بهپرور توسط محققان تهیه شد. 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 (۱۵). 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 (۱۶).

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) شرکت داده شدند. برای این منظور رت‌ها 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. به طوری که، 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 (۱۷). میانگین بیشینه سرعت بدست آمده در ابتدای شروع برنامه تمرینی معادل ۳±۱۸ متر بر دقیقه بود. به منظور اندازه‌گیری اثربخشی عملکردی تمرین هر دو هفته آزمون سرعت بیشینه مجدداً گرفته شد و شدت تمرین بر اساس سرعت بیشینه به دست آمده تنظیم می‌گردید. به طوری‌که در هفته هشتم تمرین میانگین سرعت بیشینه معادل ۳±۲۸ متر بر دقیقه بود.

پروتکل HIIT شامل سه مرحلهٔ گرم‌کردن، بدنهٔ اصلی تمرین و سرد کردن بود. تمرینات در مرحلهٔ گرم و سرد کردن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه (معادل با شدت ۴۰-۳۰٪ VO_{2max}) برای رت‌ها در نظر گرفته شد. بدنهٔ اصلی تمرین نیز برابر با شدت ۹۰-۸۵٪ سرعت بیشینه بود که برابر با ۲۵/۵-۲۴ متر بر دقیقه، 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 در بین وهله‌های دویدن 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 (۱۸).

روش‌های آزمایشگاهی: 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 رت‌ها 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 گردید.

تحلیل آماری: ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلک بررسی گردید. سپس اثرات تمرین روی متغیرهای وابسته در قالب یک طرح آماری عاملی یک‌راهه و آزمون تعقیبی بونفرونی تجزیه و تحلیل گردید. سهم اثر تمرین در هر یک از

نسخه پیش انتشار

متغیرها نیز با استفاده از درصد تغییرات مشخص شد. تمامی عملیات آماری در سطح معنی‌داری p<۰/۰۵ و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS26 تحت ویندوز انجام شد.

نتایج

جدول ۱ داده‌های توصیفی وزن و وضعیت گلوکز رت‌ها را در ابتدا و انتهای تحقیق نشان می‌دهد.

جدول ۱ . وزن و گلوکز سرم (قبل و بعد از مداخله) در گروه‌های مورد مطالعه (هر گروه شامل ۱۰ سر موش)

متغیر / گروه‌ها		کنترل سالم (C)	کنترل دیابتی (D)	دیابتی با تمرین (D+T)
وزن اولیه (گرم)		۲۵۵/۶۷ ±۱۰/۷۴	۲۵۹/۹۳ ± ۹/۵۸	۲۵۱/۰۰ ± ۵/۳۶
وزن ثانویه (گرم)		۳۲۵/۹۷ ± ۹/۴۴	۲۹۹/۵۷ ± ۳۰/۲۶	۲۸۸/۹۰ ± ۲۷/۰۷
گلوکز سرم (mg/dl)	پیش	۷۵/۰۲ ± ۰/۵۰	۲۹۷/۵۲ ± ۰/۷۰	۲۸۵/۰۴ ± ۰/۹۰
	پس	۶۸/۰۰ ± ۰/۵۸	۲۴۰/۶۷ ± ۵/۶۱	۱۴۷/۳۳ ± ۸/۸۴

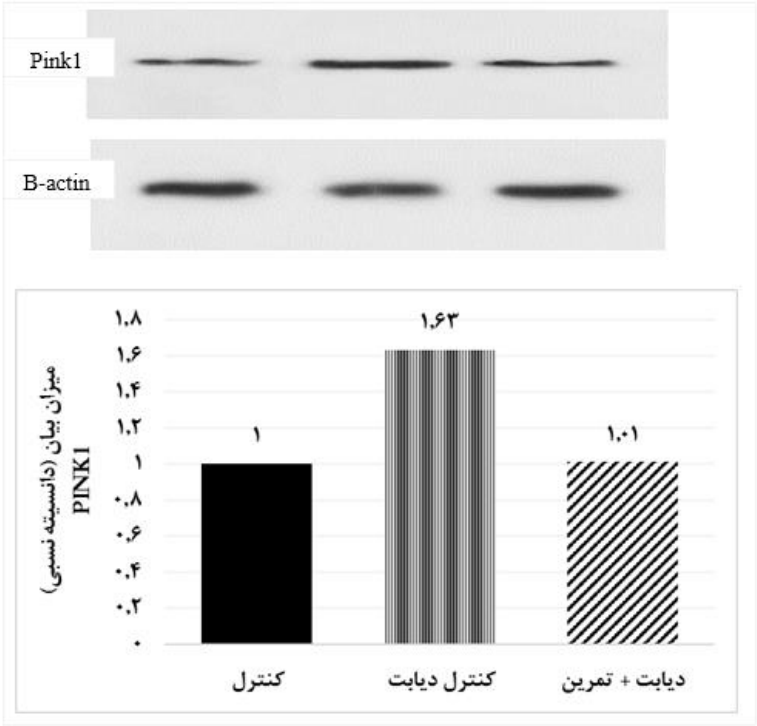
میانگین و انحراف استاندارد شاخص‌های مورد مطالعه به صورت جدول و نمودار در ادامه ارائه شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه نشان دهندهٔ عدم وجود تغییر معنادار در میزان بیان پروتئین‌های Parkin و Pink1 در رت‌ها به‌دنبال القاء دیابت نوع دو و اعمال تمرینات HIIT می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲ . نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه

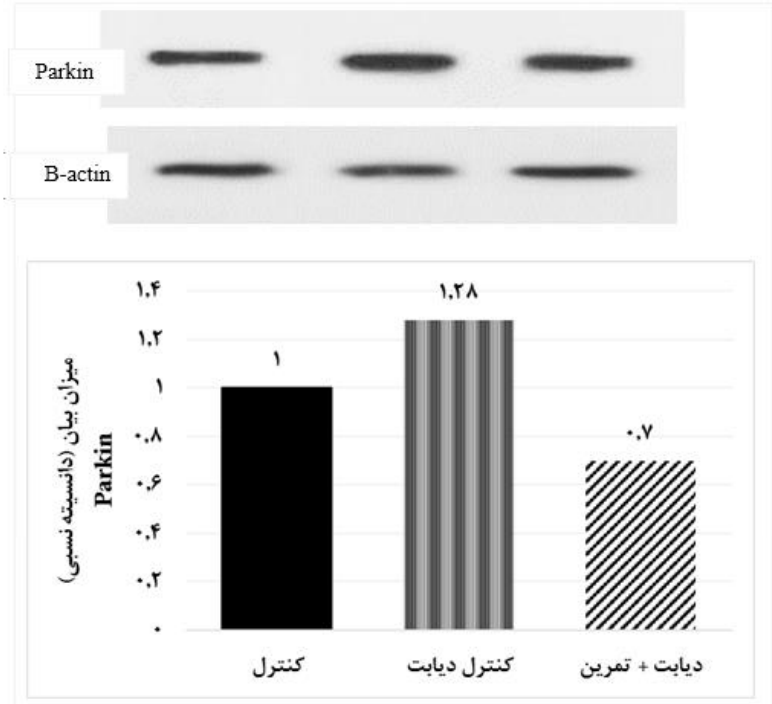
متغیر	گروه	M±SD	مقدار F	معنی‌داری	درصد تغییرات	معنی‌داری
Parkin	کنترل سالم	۱			–	–
	دیابتی	۱/۲۸ ± ۰/۰۷	۲/۶۵۷	۰/۱۴۹	٪۵۱	۰/۲۶۱
	دیابت + تمرین	۱/۰۱ ± ۰/۱۵			٪۴۵	۰/۲۹۹
Pink1	کنترل سالم	۱			–	–
	دیابتی	۱/۶۳ ± ۰/۲۲	۴/۷۸۳	۰/۰۵۷	٪۶۳	۰/۰۷۶
	دیابت + تمرین	۱/۱۵ ± ۰/۱۴			٪۳۸	۰/۱۹۴

اشکال ۱ و ۲ تغییرات پروتئین‌های مورد مطالعه را به صورت نمودار نشان می‌دهند.

نسخه پیش انتشار



شکل ۱. نشان دهندهٔ میزان بیان پروتئین Pink1 در گروه‌های تجربی مورد مطالعه در مقابل بتا-آکتین به‌عنوان گروه کنترل. الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها.



شکل ۲. نشان دهندهٔ میزان بیان پروتئین Parkin در گروه‌های تجربی مورد مطالعه در مقابل بتا-آکتین به‌عنوان گروه کنترل. الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌ها.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد میزان بیان Pink1 و Parkin در رت‌های دیابتی‌شده با استرپتوزوسین با وجود افزایش ۶۳ و ۵۱ درصدی، تغییرات معناداری در مقایسه با گروه کنترل سالم نداشت، همسو با مطالعه حاضر 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، رژیم پرچربی منجر به افزایش میتوفاژی 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 Parkin- Pink1، به سمیت چربی پاسخ می‌دهد و در پاسخ به تغذیه با چربی بالا تجمع می‌یابد (۷). افزایش Pink1 نشان از سیستم دفاعی سلول برای از بین بدن نواحی آسیب‌دیده میتوکندریایی است که در بیماری دیابت نوع دو ایجاد می‌شود (۶, ۱۳). که افزایش این پروتئین در گروه دیابتی (D) در مطالعه حاضر را توجیه می‌کند.

همچنین در این تحقیق هشت هفته تمرین HIIT تغییر معنی‌داری در میزان بیان Pink1 در رت‌های دیابتی تمرین کرده (D+T) ایجاد نکرد، با این وجود ۳۸ درصد کاهش در مقایسه با گروه کنترل دیابتی داشت. در این راستا، حدیدی و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه بر روی تغییرات ژن Pink1 در عضله نعلی رت‌های تمرین‌کرده و بی تمرین بیان کردند که افزایش بیان Pink1 در رت‌های تمرین‌کرده (۱۲ هفته تمرین استقامتی (۳۰-۱۵ متر بر دقیقه)) کمتر از گروه بی‌تحرک بود (۲۰). در مقابل؛ اریبات و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند Pink1 بعد از ۱۶ هفته مداخله ورزشی در افراد مسن افزایش معنی‌داری نسبت به قبل از مداخله داشت (۱۴). همچنین، کوآن و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که اعمال شش هفته فعالیت‌بدنی مزمن (۵ روز در هفته، ۳۰ دقیقه در روز دویدن روی نوارگردان با سرعت ۱۲ متر در دقیقه) موجب افزایش معنی‌دار در پروتئینPink1 در بافت مغزی رت‌های جوان نر گردید (۲۱). از دلایل ایجاد تناقض در یافته‌ها با بررسی حاضر می‌توان به طول دوره تمرین، نوع تمرین، شدت تمرین و آزمودنی‌ها اشاره نمود.

تمرینات ورزشی سازوکار کنترل کیفیت میتوکندری را تنظیم می‌کنند. این عمل در بخشی از طریق میتوفاژی با حدف انتخابی میتوکندری‌های آسیب‌دیده صورت می‌گیرد. کیفیت میتوکندری در بدن بسیار مهم است، مشخص شده است که فعالیت ورزشی کیفیت میتوکندری عضلانی و سوختن سوبستراها را افزایش می‌دهد، در نتیجه به بهبود هومئوستاز متابولیک کل بدن منجر می‌شود (۱۲). اکسلورد و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که تمرینات ورزشی نسبت پروتئین‌های شکافت و همجوشی میتوکندری را بهبود می‌بخشد که این عمل به طور مثبت با بهبود در دفع گلوکز ارتباط دارد. این تغییرات ممکن است به بهبود حساسیت انسولین و استفاده از سوبسترا که پس از تمرینات مشاهده می‌شود، کمک کند. شواهد نشان می‌دهد که میتوفاژی توسط AMPK تنظیم می‌شود. بنابراین، وقتی میتوکندری مختل می‌شود، AMPK با افزایش گیرنده p62 موجب فعال سازی دستگاه میتوفاژی به دو روش می‌شود؛ اول، با مهار mTOR از طریق موضعی‌سازی به لیزوزوم، چرا که mTORاز طریق فسفریلاسیون ULK1 را غیر فعال می‌کندو دوم AMPK باعث پیشبرد میتوفاژی از طریق اثر مستقیم بر ULK1 می-شود (۱۳). از محدودیت‌های تحقیق حاضر عدم اندازه‌گیری AMPK و mTOR می‌باشد.

هنوز مشخص نیست که چگونه دستگاه میتوفاژی می‌تواند اختلال میتوفاژی را تشخیص دهد. مسلماً، بهترین روش قابل درک که از طریق آن مناطق آسیب دیده شبکه میتوکندری برای میتوفاژی متمایز می شوند، از طریق Pink1 است. در این مدل تصور می‌شود که Pink1 دائماً از سیتوزول به میتوکندری منتقل می‌شود و وقتی شبکه میتوکندری سالم است، Pink1 وارد شده، شکافته و متعاقباً در میتوکندری تجزیه می‌شود (۲۲, ۲۳). با این حال، زمانی که کیفیت میتوکندری به خطر بیفتد (به عنوان مثال کاهش در پتانسیل غشاء، تجمع در پروتئین‌های به اشتباه تا شده، و یا آسیب به mtDNA)، Pink1 روی غشای میتوکندری خارجی (OMM) تثبیت می‌شود (۲۴, ۲۵). پس از تثبیت، Pink1 لیگاز یوبیکوئیتین E3، پروتئین Parkin را به کار می‌گیرد، که آبشاری از رویدادها را آغاز می کند که منجر به تخریب ناحیه (های) آسیب دیده شبکه می‌شود (۲۶, ۲۷).

نسخه پیش انتشار

در مطالعه حاضر تغییر غیرمعنی‌داری در میزان بیان Parkin در رت‌های دیابتی تمرین کرده (D+T) وجود داشت. با توجه به میزان کاهش ۴۵ درصدی این پروتئین، همسو با این تحقیق، خیراندیش و همکاران (۲۰۲۱) که به بررسی تأثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر بیان ژن Parkin در کبد رت‌های نر تغذیه‌شده با روغن چندبار حرارت دیده پرداختند، به این نتیجه رسیدند که مصرف روغن چندبار حرارت دیده باعث افزایش بیان ژن Parkin شده و تعامل تمرین هوازی باعث اختلاف غیرمعنی‌دار بیان ژن Parkin در مقایسه با گروه مسموم شد (۲۷). همچنین؛ جیو و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که محتوای پروتئین Parkin عضله اسکلتی رت به دنبال تمرین استقامتی شنا (یک ساعت تمرین شنا در روز به مدت ۸ هفته) تغییر معناداری نداشت (۲۸). از طرفی؛ در مطالعه‌ای احمدی و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند دو مداخله تمرینی HIIT و MICT به افزایش معنی‌دار Parkinعضله نعلی نسبت به گروه کنترل منجر شدند (۱۲). تناقض در مطالعه حاضر با یافته‌های تحقیق آن‌ها می‌تواند ناشی از بکارگیری روش‌های تمرینی متفاوت (HIIT در مقابل تمرینات هوازی)، شدت، مدت و نوع دستگاه انرژی و نیز نوع بافت مورد مطالعه باشد.

چن و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند Parkin برای جریان میتوفاژی ناشی از فعالیت ورزشی مورد نیاز است. آن‌ها همچنین بیان کردند که میتوفاژی ناشی از فعالیت ورزشی با تمرین در عضله کاهش می‌یابد، که احتمالاً به دلیل سیگنالینگ ضعیف و در نتیجه افزایش محتوای میتوکندری و کیفیت آن است (۲۹). تمرینات ورزشی نسبت پروتئین‌های مرتبط با دینامیک میتوکندری را بهبود می‌بخشد، که این عمل به طور مثبت با بهبود در دفع گلوکز ارتباط دارد. این تغییرات ممکن است به بهبود حساسیت انسولین و استفاده از سوبسترا که پس از تمرینات مشاهده می‌شود، کمک کند (۱۳). فعالیت ورزشی ممکن است پویایی میتوکندری را از طریق مکانیسم دو فازی تغییر دهد؛ ابتدا، فعالیت ورزشی حاد باعث افزایش پویایی میتوکندری می شود و شبکه میتوکندری را برای مراحل بعدی آماده می‌کند. سپس فعالیت ورزشی مزمن ممکن است با بهبود یکپارچگی شبکه میتوکندری یا با افزایش اندازه و فراوانی شبکه های دست نخورده میتوکندری، پویایی میتوکندری را کاهش دهد. این مشاهدات بیشتر با افزایش فراوانی آنتی‌اکسیدان‌ها و جاذب‌کننده‌های رادیکال آزاد در عضلات اسکلتی تمرین‌کرده پشتیبانی می‌شود. واضح است که تحقیقات بیشتری برای روشن شدن اثرات فعالیت ورزشی مزمن بر میتوفاژی ضروری است (۹, ۱۳).

به طور خلاصه، القاء دیابت نوع دو احتمالاً موجب افزایش در فعالیت پروتئین‌های مسیر میتوفاژی از طریق افزایش در بیان Parkin و Pink1 می‌گردد. هر چند، اعمال تمرین تناوبی شدید سبب ممانعت از افزایش در پروتئین‌ها در رت‌های دیابتی می‌شود. از این‌رو با توجه به بهبود وزن و وضعیت قند خون در رت‌های تحقیق حاضر، به‌نظر می‌رسد انجام فعالیت‌های ورزشی مداخلهٔ مناسبی برای برقراری تعادل در عوارض ناشی از ابتلاء به دیابت در رت‌ها باشد. البته، برای نتیجه‌گیری قطعی در این مورد نیاز به مطالعات بیشتری است. با توجه به محدودیت‌های مطالعه حاضر اعم از طول دوره تمرین و عدم اندازه‌گیری برخی پروتئین‌های دیگر درگیر در مسیر میتوفاژی پیشنهاد می‌گردد برای روشن شدن هرچه بیشتر این مقوله در تحقیقات آینده این محدودیت‌ها رفع شود.

حامی/ حامیان مالی

پژوهش حاضر بخشی از رساله دکتری در رشته فیزیولوژی ورزشی است که در گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه تبریز تصویب شده و بدون هیچگونه حمایت مالی انجام گرفته است

مشارکت نویسندگان

نویسندهٔ اول استاد راهنما، نویسندهٔ دوم استاد مشاور و نویسندهٔ سوم دانشجو می‌باشند.

تعارض منافع

در این مقاله هیچگونه تعارض منافعی بین نویسندگان وجود ندارد.

نسخه پیش انتشار

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.

منابع

1. Sadeghpour Firozabadi E, Abdi A, Abbassi Daloii A. Effect of Aerobic Training with Aqueous Allium sativum L on IL-17, IL-22 Expression and Insulin Resistance in Diabetic Rats. Journal of Sport and Exercise Physiology. 2023;16(1):1-11. [In Persian]
2. Dethlefsen MM KC, 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. Physiol Rep. 2018;6(13):13731-32.
3. Su Z, Yutong Nie, Xiufang Huang, Ying Zhu, Bing Feng, Lipeng Tang, Guangjuan Zheng. Mitophagy in hepatic insulin resistance: Therapeutic potential and concerns. Frontiers in pharmacology 2019;10:1193.
4. Wu H WY, Li W, Chen H, Du L, Liu D, et al. Deficiency of mitophagy receptor FUNDC1 impairs mitochondrial quality and aggravates dietary-induced obesity and metabolic syndrome. Autophagy. 2019;4:1-17.
5. Twig G O. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. Antioxidants & redox signaling. 2011;14(10):1939-51.
6. Narendra D TA, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy The Journal of cell biology 2008;183(5):795-803.
7. Moreira OC EB, Martínez-Florez S, De Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. Mitochondrial function and mitophagy in the elderly: effects of exercise. Oxid Med Cell Longev. 2017;2012798.
8. Brinkmann C PA, Metten A, Schiffer T, Bloch W, Brixius K, Gehlert S. Influence of endurance training on skeletal muscle mitophagy regulatory proteins in type 2 diabetic men. Endocr Res 2017 42(4):325-30.
9. Memme JM, Avigail T. Erlich, Geetika Phukan, and David A. . Exercise and mitochondrial health. The Journal of physiology. 2021;599(3):803-17.
10. JM. G. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. J Physiol. 2012;590(5):1077-84.
11. Larsen S DJ, Søndergård SD, Søgaard D, Vigelsoe A, Dybboe R, et al. . The effect of high-intensity training on mitochondrial fat oxidation in skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2015;25(1).
12. Ahmadi M ABBN. The effect of training on mitochondrial mitophagy factors in obese male rats. Journal of Sport and Exercise Physiology. 2022;15(2):10-9. [In Persian]
13. Axelrod CL FC, Mulya A, Kirwan JP. Exercise training remodels human skeletal muscle mitochondrial fission and fusion machinery towards a pro-elongation phenotype. Acta Physiol 2019 225(4):13216.
14. Arribat Y, Broskey NT, Greggio C, Boutant M, Conde Alonso S, Kulkarni SS, Lagarrigue S, Carnero EA, Besson C, Cantó C, Amati F. Distinct patterns of skeletal muscle mitochondria fusion, fission and mitophagy upon duration of exercise training. Acta Physiologica. 2019 Feb;225(2):e13179.
15. Sasidharan SR JJ, 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;1.
16. Esmailee B AA ADA, 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):150-60. [In Persian]
17. 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.
18. Brown MB, Neves E, Long G, Graber J, Gladish B, Wiseman A, Owens M, Fisher AJ, Presson RG, Petrache I, Kline J. 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.
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 Jul;6(13):13731.

20. Hadidi V DF, Nemati J, et al. The Effect of Hind Limb Immobilization on Expression of Some Genes Involved in the Regulation of Mitochondrial Processes in Soleus Muscle of Trained and Untrained Rats. J Arak Uni Med Sci. 2019;22(1):51-61. [In Persian]
21. Kwon IJ, Y. Lee, Y. Endurance Exercise-Induced Autophagy /Mitophagy Coincides with a Reinforced Anabolic State and Increased Mitochondrial Turnover in the Cortex of Young Male Mouse Brain. Journal of Molecular Neuroscience. (2021).71(1):42-54.
22. Greene AW GK, Aguileta MA, et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. EMBO Rep. 2012;13:378-85.
23. Yamano K YR. PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. Autophagy. 2013;9:1758--69.
24. Aerts L CK, De Strooper B, et al. PINK1 kinase catalytic activity is regulated by phosphorylation on serines 228 and 402. J Biol Chem ; . 2015;290:2798-811.
25. Matsuda N SS, Shiba K, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. J Cell Biol. 2010;189:211-21.
26. Koyano F OK, Kosako H, et al. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. Nature. 2014;510:162-6.
27. kheirandish Pishkenari M FP, Moradi L. Effect of aerobic training and octopamine on the gene expression of LAMP2A, Parkin and concentration OF SOD in liver of male rats fed with repeated heated oil. RJMS. 2021;28(2):1-10. [In Persian]
28. Ju JS JS, Park JY, Lee JY, Lee SC, Cho KJ, Jeong JM. Autophagy plays a role in skeletal muscle mitochondrial biogenesis in an endurance exercise-trained condition. J Physiol Sci. 2016;66(5):417-30.
29. Chen CC EA, Crilly MJ, Hood DA. Parkin is required for exercise-induced mitophagy in muscle: impact of aging. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2018;315(3):404-15.

نسخه پیش انتشار