Journal of Sport and Exercise Physiology
2023, 16(3):101-109

Original Article

Effects of eight weeks of high-intensity interval training 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 training protocols are effective in reducing the epidemic and improvement of some metabolic functions of the liver. The purpose of this study was to evaluate the effect of eight weeks of high intensity interval training (HIIT) on Parkin and Pink1 proteins in the liver tissue of type 2 diabetic rats.

Materials and Methods: In an experimental design, 30 three-month-old adult male Wistar rats with a weight range of 250-300 g were randomly divided into three groups of 10 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 encompassed running at an intensity of 85%-90% of the maximum speed in 6 to 12 two-minute intervals; 5 days a week for eight weeks. Fourty eight hours after the last training session and after 12 to 14 hours of fasting, all rats 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's 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 ($P>0.05$). In addition, 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 ($P\geq0.05$).

Conclusion: According to the results, it can be stated that eight weeks of HIIT is insufficient to observe a significant reduction of mitophagy in the liver tissue of diabetic rats. At the same time, based on the partial changes of the indices, HIIT might be a preventive measure against the abnormal increase of mitophagy as a result of type 2 diabetes. However, to making a definite conclusion about these indices and how they are affected by different conditions more researches are needed.

Keywords: High Intensity Interval Training, Mitophagy, Type 2 Diabetes, Liver Tissue

How to cite this article: Vakili J, Sari Sarraf V, Farajpour Khazaei S. Effects of eight weeks of high-intensity interval training on the expression of Pink1 and Parkin proteins in the liver tissue of type 2 diabetic male rats. J Sport Exerc Physiol. 2023;16(3):101-109.

*Corresponding Author's E-mail: vakili@tabrizu.ac.ir

https://doi.org/10.48308/joeppa.2023.103909
Received: 14/06/2023 Revised: 25/08/2023 Accepted: 02/09/2023

Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی
۱۴۰۲/ دوره ۱۶/ شماره ۳/ صفحه‌های ۱۰۱-۱۰۹

مقاله پژوهشی

تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالا بر بیان پروتئین‌های Parkin و Pink1 در بافت کبدی موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت نوع دو

جواد وکیلی*، وحید ساری صراف، سارا فرج‌پور خزاعی
گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

زمینه و هدف: وابستگی نزدیکی بین اختلالات کارکرد میتوکندری کبد و توسعهٔ چاقی و مقاومت به انسولین وجود دارد. همان‌طورکه در بیماری دیابت نوع دو مشاهده شده است، در شرایط مقاومت به انسولین، کاهش حساسیت انسولین سلول‌های کبدی، عضلهٔ اسکلتی و سلول‌های چربی مشاهده می‌شود. در طول دهه‌های اخیر فعالیت ورزشی به ابزار کمکی کلیدی در کنترل بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت نوع دو تبدیل شده است و پژوهش‌ها نشان می‌دهند که روش‌های تمرینی گوناگون در کاهش همه‌گیری و بهبود برخی از عملکردهای سوخت‌وسازی کبد مؤثر است. هدف این تحقیق بررسی تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالا بر شاخص‌های Parkin و Pink۱ در بافت کبد موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو است.

مواد و روش‌ها: در یک طرح تجربی، ۳۰ سر موش صحرایی نر ویستار سه‌ماهه با دامنهٔ وزنی ۲۲۵-۳۰۰ گرم به‌طور تصادفی در یکی از سه گروه ۱۰ سری شامل کنترل سالم (C: تزریق درون‌صفاقی سرم سالین)، کنترل دیابتی (D: دیابتی‌شده با رژیم غذایی پرچرب همراه با تزریق درون‌صفاقی استرپتوزوتوسین) و دیابتی تمرین‌کرده (D+T: دیابتی‌شده به‌همراه تمرین) تقسیم شدند. روش تمرینی شامل دویدن با شدت ۸۵-۹۰ درصد سرعت بیشینه در ۶ تا ۱۲ وهلهٔ دودقیقه‌ای؛ پنج روز در هفته به مدت هشت هفته بود. همهٔ آزمودنی‌ها، 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 Pink۱ در بافت کبد موش‌ها از روش وسترن بلات استفاده شد. از تحلیل واریانس یکراهه و آزمون تعقیبی بنفرونی برای تحلیل داده‌ها در سطح معناداری کمتر از پنج‌صدم استفاده شد.

نتایج: القای دیابت (D) موجب افزایش ۵۱ و ۶۳ درصدی به‌ترتیب در پروتئین‌های Parkin و Pink۱ می‌شود، اگرچه از نظر آماری معنادار نیست (P≥۰/۰۵). با این همه، مداخلهٔ تمرینی موجب کاهش ۴۵ و ۳۸ درصدی در Parkin و Pink۱ در گروه دیابتی تمرین‌کرده (D+T) در مقایسه با گروه دیابتی (D) شد، ولی معنادار نبود (P≥۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج می‌توان گفت که هشت هفته تمرینات تناوبی با شدت بالا (HIIT) برای مشاهدهٔ کاهش معنادار میتوفاژی در بافت کبد موش‌های دیابتی ناکافی است. با توجه به اندک تغییرات مشاهده‌شده، HIIT شاید یک راهکار پیشگیرانه برای افزایش بی‌رویهٔ میتوفاژی ناشی از ابتلا به بیماری دیابت نوع دو داشته باشد. با این همه، نتیجه‌گیری قطعی دربارهٔ این شاخص‌ها و نحوهٔ تأثیرپذیری آن‌ها از شرایط گوناگون نیازمند پژوهش‌های بیشتری است.

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

نحوه استناد به این مقاله: وکیلی ج، ساری صرّاف و، فرج‌پور خزاعی س. تأثیر تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالا بر بیان پروتئین‌های Parkin و Pink۱ در بافت کبدی موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت نوع دو.نشریهٔ فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی.۱۴۰۲؛۱۶(۳):۱۰۱-۱۰۹.

* رایانامهٔ نویسندهٔ مسئول: vakili@tabrizu.ac.ir

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

مقدمه

دیابت، شایع‌ترین بیماری سوخت‌وسازی در جهان به‌شمار می‌رود و از سوی سازمان جهانی بهداشت، «همه‌گیری نهفته» لقب یافته است. افزون‌بر این، دیابت همواره جزء ده علت اصلی مرگ در ایران است (۱). این بیماری با ایجاد اختلال در سوخت‌وساز درون‌سلولی در بسیاری از بافت‌ها از جمله کبد همراه است و از عوامل اصلی همه‌گیری اختلالات کبدی نیز به‌شمار می‌رود (۲). با توجه به کارکرد مهم کبد در حفظ گلوکز خون با برداشت و ذخیره‌سازی گلوکز، مقاومت به انسولین، به‌ویژه مقاومت به انسولین کبدی، یک عامل خطر برای نشانگان سوخت‌وسازی است. انباشت اسیدهای چرب کبدی می‌تواند با افزایش گلوکونئوژنز، لیپوژنز، التهاب مزمن، فشار اکسایشی و فشار وارده به شبکهٔ آندوپلاسمی و اختلال در مسیر پیام‌رسانی انسولین موجب مقاومت به انسولین کبدی شود. به‌درستی، یافته‌های پژوهشی افزایش انباشت چربی و دیابت را یک ارتباط علت و معلولی در نظر می‌گیرند (۳، ۴).

اختلال در کار میتوکندری در ایجاد مقاومت به انسولین کبدی ناشی از اسیدهای چرب کبدی نقش دارد. اتوفاژی میتوکندری (میتوفاژی (Mitophagy))، به‌عنوان یک روند کاتابولیکی، میتوکندری آسیب‌دیده را به‌طور انتخابی تخریب می‌کند تا اختلال کار میتوکندری را وارونه کرده و پویایی و کار میتوکندری را حفظ کند. با توجه به اینکه میتوکندری، مکان تجزیهٔ اسیدهای چرب است، بنابراین میتوفاژی با حذف میتوکندری آسیب‌دیده، می‌تواند اکسایش اسیدهای چرب میتوکندری را فراهم کند تا از انباشت اسیدهای چرب کبدی جلوگیری کند و مقاومت به انسولین کبدی را بهبود بخشد (۳). فرایند میتوفاژی به‌وسیلهٔ لیگازهای یوبیکوئیتین مانند مسیر Parkin–Pink1 (Parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase)-(PTEN-induced kinase 1)) تنظیم می‌شود. Pink1 یک سرین/ترئونین کیناز است که توسط ژن Pink1 رمزگذاری می‌شود و از سلول در برابر فشار ناشی از اختلال در کار میتوکندریایی محافظت می‌کند. Pink1 موجب اتصال Parkin به میتوکندری می‌شود (۵، ۶). این فرایند می‌تواند عوامل مبدل اتوفاژی را فعال کند که به نوبهٔ 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). با توجه به اینکه ساخت میتوکندری نو و دفاع ضداکسایشی کاهش می‌یابد، همگام با افزایش تجزیهٔ میتوکندریایی، یک محتوای میتوکندریایی ناکارامد پدید می‌آید و کاهش عملکرد آن در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو اتفاق می‌افتد (۸).

مداخله‌های مربوط به شیوهٔ زندگی علاوه‌بر بهبود کیفیت زندگی، برای پیشگیری و کنترل دیابت نوع دو مقرون‌به‌صرفه‌تر است. اکنون به‌خوبی شناخته شده است که فعالیت‌های بدنی محرک قوی برای القای مسیرهای پیام‌رسانی توصیف‌شده در بالاست که در نهایت موجب ایجاد تغییرات فنوتیپی قوی در محیط میتوکندری می‌شود و کمیت و کیفیت شبکهٔ اندامک را بهبود می‌بخشد، که به بهبود سلامتی منجر می‌شود (۹). افزون‌بر این، تمرینات بدنی ظرفیت میتوکندریایی را در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو بازیابی می‌کند، اما در این بین، نقش میتوفاژی در این زمینه بررسی نشده 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 به‌دلیل تناوب در شدت اجرا، موجب ایجاد هایپوکسی می‌شود که پس از اجرا به‌دلیل تولید NO خون‌رسانی افرایش می‌یابد و موجب فعال‌سازی آنزیم‌های میتوکندریایی، مصرف چربی‌ها، افزایش حساسیت به انسولین و کاهش قند خون می‌شود (۱۱). احمدی و همکاران (۲۰۲۲) دو مداخلهٔ تمرینی HIIT و MICT را روی ۴۰ سر موش صحرایی تغذیه‌شده با رژیم پرچرب انجام دادند و بیان کردند که هر دو مداخلهٔ تمرینی به افزایش Parkin عضلهٔ نعلی نسبت به گروه کنترل منجر شد (۱۲). با این همه، اکسلورد و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که ۱۲ هفته تمرینات ورزشی هوازی (پنج روز/ HRMAX ۸۵ درصد) موجب کاهش Parkin عضلهٔ اسکلتی در نمونه‌های بیوپسی بزرگسالان غیرفعال می‌شود (۱۳). اریبات و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی افراد مسن، وضعیت میتوفاژی را پیش و پس از ۱۶ هفته مداخلهٔ ورزشی بررسی کردند و نشان دادند Pink1 افزایش معناداری نسبت به پیش از مداخله داشت، درحالی‌که این افزایش بین گروه کنترل و تمرین تفاوت معناداری نداشت. Parkin به مداخلهٔ تمرینی پاسخی نداد و تغییر معناداری نداشت (۱۴). با توجه به تناقضات بین یافته‌های تحقیقات مختلف که چند نمونه در بالا ذکر شد، شناسایی اثر تمرین ورزشی بر جریان میتوفاژی در بافت کبدی موش‌های دیابتی‌شده جهت کاهش علائم دیابت و پیامدهای بعدی ناشی از آن در بین تمامی افراد جامعه به‌ویژه بیماران مبتلا به دیابت نوع دو ضرورتی انکارناپذیر به‌نظر می‌رسد. ازاین‌رو پژوهش 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 پس از القای دیابت نوع دو در موش‌های صحرایی نر

ویستار می‌پردازد تا پیشنهادهای کاربردی متناسبی در راستای نحوهٔ انجام تمرینات ورزشی به‌منظور پیشگیری و درمان پیامدهای احتمالی ناشی از دیابت ارائه دهد.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش: پژوهش حاضر از نوع تجربی در قالب طرح پس‌آزمون دوعاملی است که با استفاده از سه گروه ۱۰ سری از موش‌ها (تعیین حجم نمونه با در نظر گرفتن بتای ۰/۸ و آلفای ۰/۰۵) بر پایهٔ مقررات اخلاق پزشکی نحوهٔ کار با حیوانات آزمایشگاهی در محل آزمایشگاه حیوانی علوم رفتاری مرکز پژوهش‌های آناتومی دانشگاه علوم پزشکی ایران پس از تصویب در کمیتهٔ اخلاق در پژوهش از دانشگاه تبریز (IR.TABRIZU.REC.1400.050) انجام گرفت. بدین‌منظور ۳۰ سر موش‌های 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 تا ۳۰۰ گرمی خریداری شد. در ادامه، به‌منظور ایجاد حالت سازش با محیط، جلوگیری از تنش و تغییر شرایط فیزیولوژیایی، شرایط تمامی مداخلات پس از گذشت دست‌کم دو هفته استقرار حیوانات و رعایت چرخهٔ روزانه-شبانه (شروع روشنایی از ساعت ۶:۰۰ صبح تا ۱۸:۰۰ عصر) در آزمایشگاه حیوانات انجام شد. به‌طوری‌که موش‌های صحرایی در محیط آزمایشگاهی ویژهٔ حیوانات با دارا بودن شرایط ذیل، دمای ۲±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد، با کمترین سروصدا به‌صورت سه تا پنج موش در هر قفس از جنس پلی‌کربنات شفاف قرار داده شدند. طی این دوره، همهٔ حیوانات به‌صورت آزادانه به آب و غذای استاندارد حیوانی (پلت تهیه‌شده از شرکت خوراک‌سازان بهپرور) به مدت سه ماه (فصل پاییز و در طول مدت تحقیق) دسترسی داشتند. افزون‌بر این، در این پژوهش از آن دسته موش‌های صحرایی استفاده شد که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری، مقدار گلوکز سرم آن‌ها کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود. در پایان این دوره (سازگاری)، ابتدا ده 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 تمرین‌کرده (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)، غذای پرچرب (۴۵ درصد چربی، ۲۱ درصد پروتئین و ۳۴ درصد کربوهیدرات) برای مصرف دو هفته با همکاری شرکت خوراک‌سازان بهپرور توسط پژوهشگران تهیه شد. سپس تزریق درون‌صفاقی (Intraperitoneal injection) سم استرپتوزوسین (Streptozotocin (STZ)) (شرکت سیگما آلدریچ (Sigma-Aldrich)، آمریکا) در یک دوز ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن حل‌شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار (PH=۴/۵) پس از شش ساعت ناشتایی به‌صورت تک‌وهله‌ای اعمال شد (۱۵). برای گروه کنترل سالم نیز همان مقدار سرم فیزیولوژیک سالین (Saline) برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با گروه‌های دریافت‌کنندهٔ STZ تزریق شد. یک هفته پس از روش دیابتی کردن، میزان گلوکز نمونهٔ خونی از ورید دُمی حیوان جمع‌آوری و با استفاده از روش آنزیمی گلوکز اکسیداز بررسی و غلظت گلوکز خون بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به‌عنوان موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو وارد تحقیق شدند (۱۶).

موش‌های صحرایی گروه تمرینی پژوهش حاضر (T+D) برای پنج روز در هفته (شنبه، یکشنبه، سه‌شنبه، چهارشنبه و پنج‌شنبه) به مدت هشت هفته در یک برنامهٔ تمرین تناوبی شدید (HIIT) شرکت داده شدند. برای این منظور موش‌های صحرایی در پایان دورهٔ سازگاری و شروع فعالیت حیوانات (ساعت ۱۹ عصر) روی نوار گردان الکترونیکی هوشمند حیوانی (Bionic mobin مدل DSI-580، ساخت شرکت کیمیا کهربای مبین، تهران، ایران) تمرین داده شدند. پیش از اجرای روش، آزمون رسیدن به واماندگی بیدفورد و همکاران (۱۹۷۹) برای برآورد سرعت بیشینهٔ موش‌ها انجام گرفت. به‌طوری‌که سرعت دویدن با ده 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 ناتوانی موش‌ها در دویدن روی نوار گردان با وجود ایجاد شوک الکتریکی مشخص شد (۱۷). میانگین بیشینهٔ سرعت به‌دست‌آمده در ابتدای شروع برنامهٔ تمرینی معادل ۳±۱۸ متر بر دقیقه بود. به‌منظور اندازه‌گیری اثربخشی عملکردی تمرین هر دو هفته آزمون سرعت بیشینه مجدداً گرفته شد و شدت تمرین بر پایهٔ سرعت بیشینهٔ به‌دست‌آمده تنظیم می‌شد. به‌طوری‌که در هفتهٔ هشتم تمرین میانگین سرعت بیشینه معادل ۳±۲۸ متر بر دقیقه بود.

روش HIIT شامل سه مرحلهٔ گرم کردن، بدنهٔ اصلی تمرین و سرد کردن بود. تمرینات در مرحلهٔ گرم و سرد کردن به مدت پنج دقیقه با سرعت ده متر در دقیقه (معادل با شدت۳۰-۴۰٪ VO_{2max}) برای موش‌ها در نظر گرفته شد. بدنهٔ اصلی تمرین نیز برابر با شدت ۸۵-۹۰ درصد سرعت بیشینه بود که برابر با ۲۴-۲۵/۵ متر بر دقیقه، در ۶ تا ۱۲ وهله (هر هفته یک نوبت به وهله‌های فعالیتی حیوانات اضافه شد) بود. افزون‌بر این، تناوب‌های سه‌دقیقه‌ای استراحت فعال شامل دویدن‌های ادامه‌دار روی نوار گردان با سرعت ده متر در دقیقه بود که در بین وهله‌های دویدن اعمال شد. 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، پنج روز در هفته به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط روی نوار گردان بی‌حرکت قرار داده شدند. به‌منظور تحریک موش‌های صحرایی برای دویدن از محرک الکتریکی با ولتاژ کم تعبیه‌شده در قسمت عقبی نوار گردان، استفاده شد (۱۸).

روش‌های آزمایشگاهی: تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرینی (به‌منظور از بین بردن تأثیرات حاد تمرین) و پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، با تزریق داخل‌صفاقی 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 موش‌های صحرایی با دقت برداشته شده و پس از شست‌وشو با سرم نرمال سالین در نیتروژن مایع (۱۹۶-درجهٔ سانتی‌گراد) منجمد و در دمای ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. در ادامه نیز برای ارزیابی میزان بیان پروتئین‌های BNIP3 و NIX از روش وسترن بلات (western blot) استفاده شد. ابتدا، برای تهیهٔ هموژنه ۱۰ درصد وزنی حجم بافت کبد از بافر ریپا (شرکت سیگما) حاوی مهارکنندهٔ پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده شد. غلظت تام پروتئین‌ها با روش برآدفورد (Bradford) (سیگما) اندازه‌گیری شد. سپس پروتئین‌ها در ژل ۱۰ درصد دِناتوره‌کنندهٔ پلی‌آکریل‌آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate) با دستگاه الکتروفورز (Biorad) تفکیک شد. پس از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی غشای پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید (Sodium dodecyl sulfate) سیگما منتقل شد. پس از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشا از آنتی‌بادی اولیهٔ رت ضد BNIP3 و ضد NIX ساخت شرکت سانتاکروز (Santa Cruz Biotechnology) آمریکا به‌ترتیب با کد E-AB-61061 و sc-166332 به‌نسبت ۱ به ۵۰۰ (در طول شب) استفاده شد. غشاها پس از چهار بار شست‌وشو هر بار به مدت پنج دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی ۰/۰۵٪ توین ۲۰، در معرض آنتی‌بادی ثانویهٔ کونژوگه با Hrp (Horseradish peroxidase) به مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شست‌وشوی مجدد با روش قبلی این بار به‌صورت سه تکرار از کیت BioRad،ECL که برای آشکارسازی مجموعه‌های ایمنی تشکیل شده است، استفاده شد. غشاها در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفتند و چگالی باندها توسط نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری و دانسیتهٔ باندهای پروتئین هدف در مقابل لودینگ کنترل بتا-اکتین نرمالیزه شدند. در انتها نیز نتایج به‌صورت چگالی نسبی (نسبت به گروه کنترل) ارائه شد.

تحلیل آماری: ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلک بررسی شد. سپس تأثیرات تمرین روی متغیرهای وابسته در قالب یک طرح آماری عاملی یکراهه و آزمون تعقیبی بنفرونی تجزیه‌وتحلیل شد. سهم اثر تمرین در هریک از متغیرها نیز با استفاده از درصد تغییرات مشخص شد. همهٔ بررسی‌های آماری در سطح معناداری P<۰/۰۵ و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS26 تحت ویندوز انجام گرفت.

نتایج

جدول ۱ داده‌های توصیفی وزن و وضعیت گلوکز موش‌های صحرایی را در آغاز و پایان پژوهش نشان می‌دهد.

جدول ۱. وزن و گلوکز سرم (پیش و پس از مداخله) در گروه‌های مورد بررسی (هر گروه شامل ده سر موش)

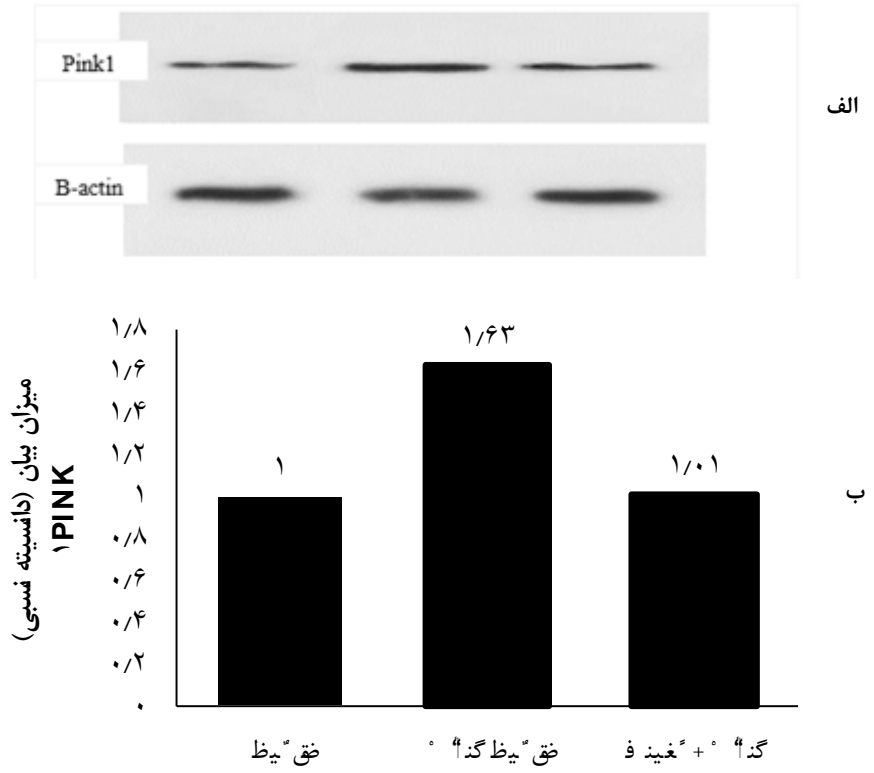
گروه‌ها / متغیر	کنترل سالم (C)	کنترل دیابتی (D)	دیابتی با تمرین (D+T)
وزن اولیه (گرم)	۲۵۵/۶۷ ±۱۰/۷۴	۲۵۹/۹۳ ± ۹/۵۸	۲۵۱/۰۰ ± ۵/۳۶
وزن ثانویه (گرم)	۳۲۵/۹۷ ±۹/۴۴	۲۹۹/۵۷ ± ۳۰/۲۶	۲۸۸/۹۰ ± ۲۷/۰۷
گلوکز سرم (mg/dl) پیش	۷۵/۰۲ ± ۰/۵۰	۲۹۷/۵۲ ± ۰/۷۰	۲۸۵/۰۴ ± ۰/۹۰
پس	۶۸/۰۰ ± ۰/۵۸	۲۴۰/۶۷ ± ۵/۶۱	۱۴۷/۳۳ ± ۸/۸۴

در ادامه میانگین و انحراف استاندارد شاخص‌های مورد بررسی به‌صورت جدول و نمودار ارائه شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس یکراهه نشان‌دهندهٔ نبود تغییر معنادار در میزان بیان پروتئین‌های Parkin و Pink1 در موش‌های صحرایی به‌دنبال القای دیابت نوع دو و اعمال تمرینات HIIT است (جدول ۲).

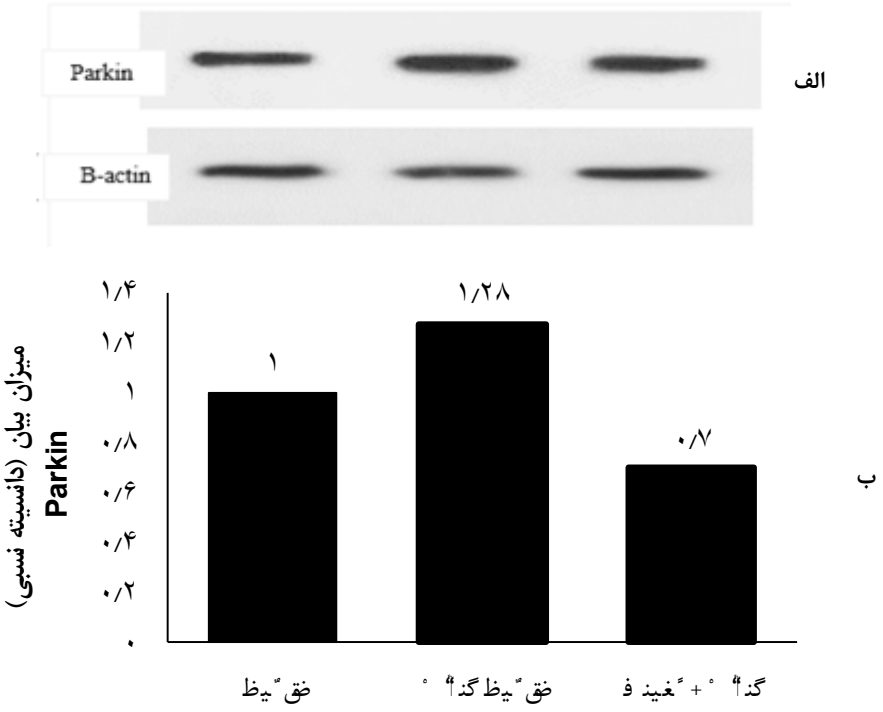
جدول ۲. نتایج آزمون تحلیل واریانس یکراهه

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

شکل‌های ۱ و ۲ تغییرات پروتئین‌های مورد بررسی را به‌صورت نمودار نشان می‌دهند.



شکل ۱. نشان‌دهندهٔ 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. نشان‌دهندهٔ میزان بیان پروتئین Parkin در گروه‌های تجربی مورد بررسی 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 تحقیق حاضر نشان داد میزان بیان Pink1 و Parkin در موش‌های صحرایی دیابتی‌شده با استرپتوزوسین با وجود افزایش ۶۳ و ۵۱ درصدی، تغییرات معناداری در مقایسه با گروه کنترل سالم نداشت. همسو با پژوهش حاضر دثلفسن و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی با هدف آزمون اینکه آیا رژیم پرچرب موجب تغییر اتوفاژی و میتوفاژی کبدی می‌شود، به مدت ۱۳ هفته با رژیم پرچربی پر فروکتوز (HFF) موش‌های صحرایی جوان را تغذیه کردند. طبق یافته‌های تحقیقشان، رژیم پرچربی به افزایش میتوفاژی کبدی منجر شد (۱۹). سمیت لیپوتاتیک نوعی فشار سلولی است که در اثر انباشت لیپیدها در نتیجهٔ اختلال در کار میتوکندری و مقاومت به انسولین در عضلات ایجاد می‌شود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند گیرندهٔ میتوفاژی Parkin- Pink1، به سمیت چربی پاسخ می‌دهد و در پاسخ به تغذیه با چربی بالا تجمع می‌یابد (۷). افزایش Pink1 نشان از دستگاه دفاعی سلول برای از بین بدن نواحی آسیب‌دیدهٔ میتوکندریایی دارد که در بیماری دیابت نوع دو ایجاد می‌شود (۶، ۱۳) که افزایش این پروتئین در گروه دیابتی (D) در تحقیق حاضر را توجیه می‌کند.

در این تحقیق هشت هفته تمرین HIIT تغییر معناداری در میزان بیان Pink1 در موش‌های صحرایی دیابتی تمرین‌کرده (D+T) ایجاد نکرد، با این همه، ۳۸ درصد کاهش در مقایسه با گروه کنترل دیابتی داشت. در این زمینه حدیدی و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیق روی تغییرات ژن Pink1 در عضلهٔ نعلی موش‌های صحرایی تمرین‌کرده و بی‌تمرین بیان کردند که افزایش بیان Pink1 در موش‌های صحرایی تمرین‌کرده (۱۲ هفته تمرین استقامتی (۱۵-۳۰ متر بر دقیقه)) کمتر از گروه بی‌تحرک بود (۲۰). در مقابل اریبات و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند Pink1 پس از ۱۶ هفته مداخلهٔ ورزشی در افراد مسن افزایش معناداری نسبت به پیش از مداخله داشت (۱۴). همچنین کوآن و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که اعمال شش هفته فعالیت بدنی مزمن (پنج روز در هفته، ۳۰ دقیقه در روز دویدن روی نوار گردان با سرعت ۱۲ متر در دقیقه) موجب افزایش معنادار در پروتئین Pink1 در بافت مغزی موش‌های صحرایی جوان نر شد (۲۱). از دلایل ایجاد تناقض در یافته‌ها با بررسی حاضر می‌توان به طول دورهٔ تمرین، نوع تمرین، شدت تمرین و آزمودنی‌ها اشاره کرد.

تمرینات ورزشی سازوکار کنترل کیفیت میتوکندری را تنظیم می‌کنند. این عمل در بخشی از راه میتوفاژی با حذف 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 سوخت‌وسازی 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 به‌طور مثبت با بهبود در دفع گلوکز همبستگی دارد. این تغییرات شاید بتواند به بهبود حساسیت انسولین و استفاده از سوبسترایی کمک کند که پس از تمرینات مشاهده می‌شود. یافته‌ها نشان می‌دهد که میتوفاژی توسط AMPK تنظیم می‌شود. بنابراین، در صورت مختل شدن میتوکندری، AMPK با افزایش گیرندهٔ p62 موجب فعال‌سازی دستگاه میتوفاژی به دو روش می‌شود؛ اول، با مهار mTOR از راه موضعی‌سازی به لیزوزوم، چراکه mTOR از راه فسفریلاسیون ULK1 را غیرفعال می‌کند و دوم AMPK موجب پیشبرد میتوفاژی از راه اثر مستقیم بر ULK1 می‌شود (۱۳). از محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم اندازه‌گیری AMPK و mTOR است.

هنوز مشخص نیست که چگونه دستگاه میتوفاژی می‌تواند اختلال میتوفاژی را تشخیص دهد. بی‌شک بهترین روش قابل درک که با آن مناطق آسیب‌دیدهٔ شبکهٔ میتوکندری برای میتوفاژی متمایز می‌شوند، از راه Pink1 است. در این الگو تصور می‌شود که Pink1 پیوسته از سیتوزول به میتوکندری منتقل می‌شود و وقتی شبکهٔ میتوکندری سالم است، Pink1 وارد شده، شکافته و متعاقباً در میتوکندری تجزیه می‌شود (۲۲، ۲۳). با این همه، زمانی‌که کیفیت میتوکندری به خطر بیفتد (برای نمونه کاهش در توانایی غشا، انباشت در پروتئین‌های به‌اشتباه تاشده، یا آسیب به mtDNA)، Pink1 روی غشای میتوکندری خارجی (OMM) تثبیت می‌شود (۲۴، ۲۵). پس از تثبیت، Pink1 لیگاز یوبیکوئیتین E3، پروتئین Parkin را به‌کار می‌گیرد، که آبشاری از رویدادها را آغاز می‌کند که به تخریب ناحیه (های) آسیب‌دیدهٔ شبکه منجر می‌شود (۲۶، ۲۷).

در تحقیق حاضر تغییر غیرمعناداری در میزان بیان Parkin در موش‌های صحرایی دیابتی تمرین‌کرده (D+T) وجود داشت. با توجه به مقدار کاهش ۴۵ درصدی این پروتئین، همسو با این پژوهش، خیراندیش و همکاران (۲۰۲۱) که به بررسی تأثیر تمرین هوازی و اکتاپامین بر بیان ژن Parkin در کبد موش‌های صحرایی نر تغذیه‌شده با روغن چند بار حرارت‌دیده پرداختند، به این نتیجه رسیدند که مصرف روغن چند بار حرارت‌دیده موجب افزایش بیان ژن Parkin شده و تعامل تمرین هوازی موجب اختلاف غیرمعنادار بیان ژن Parkin در مقایسه با گروه مسموم شد (۲۷). همچنین جیو و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که محتوای پروتئین Parkin عضلهٔ اسکلتی رت به‌دنبال تمرین استقامتی شنا (یک ساعت تمرین شنا در روز به مدت هشت هفته) تغییر معناداری نداشت (۲۸). از طرفی در تحقیقی احمدی و همکاران

(۲۰۲۲) نشان دادند دو مداخلهٔ تمرینی HIIT و MICT به افزایش معنادار Parkin عضلهٔ نعلی نسبت به گروه کنترل منجر شدند (۱۲). تناقض در تحقیق حاضر با یافته‌های تحقیق آن‌ها می‌تواند ناشی از به‌کارگیری روش‌های تمرینی متفاوت (HIIT در مقابل تمرینات هوازی)، شدت، مدت و نوع دستگاه انرژی و نیز نوع بافت مورد بررسی 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 به‌دلیل پیام‌رسانی ضعیف و در نتیجه افزایش محتوای میتوکندری و کیفیت آن است (۲۹). فعالیت ورزشی ممکن است پویایی میتوکندری را از راه سازوکار دومرحله‌ای تغییر دهد؛ نخست، فعالیت ورزشی حاد موجب افزایش پویایی میتوکندری می‌شود و شبکهٔ میتوکندری را برای مراحل بعدی آماده می‌کند. سپس فعالیت ورزشی مزمن شاید با بهبود یکپارچگی شبکهٔ میتوکندری یا افزایش اندازه و فراوانی شبکه‌های دست‌نخوردهٔ میتوکندری، پویایی میتوکندری را کاهش دهد. این مشاهدات بیشتر با افزایش فراوانی ضداکساینده‌ها و جذب‌کننده‌های بنیان‌های آزاد در عضلات اسکلتی تمرین‌کرده پشتیبانی می‌شود. روشن است که پژوهش‌های بیشتری برای روشن شدن تأثیر فعالیت ورزشی مزمن بر میتوفاژی ضروری است (۹، ۱۳).

به‌طور خلاصه، القای دیابت نوع دو احتمالاً موجب افزایش در فعالیت پروتئین‌های مسیر میتوفاژی با افزایش در بیان Parkin و Pink1 می‌شود. هرچند اعمال تمرین تناوبی شدید سبب ممانعت از افزایش در پروتئین‌ها در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود. ازاین‌رو با توجه به بهبود وزن و وضعیت قند خون در موش‌های صحرایی پژوهش حاضر، به‌نظر می‌رسد انجام فعالیت‌های ورزشی مداخلهٔ مناسبی برای برقراری تعادل در عوارض ناشی از ابتلا به دیابت در موش‌ها باشد. البته برای نتیجه‌گیری قطعی در این مورد نیاز به پژوهش‌های بیشتری است. با توجه به تنگناها و محدودیت‌های پژوهش حاضر اعم از طول دورهٔ تمرین و عدم اندازه‌گیری برخی پروتئین‌های دیگر درگیر در مسیر میتوفاژی، پیشنهاد می‌شود برای روشن شدن هرچه بیشتر این مقوله در پژوهش‌های آینده این تنگناها برطرف شود.

تشکر و قدردانی

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

حامی/ حامیان مالی

پژوهش حاضر بخشی از رسالهٔ دکتری در رشتهٔ 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 هستند.

تعارض منافع

در این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافعی بین نویسندگان 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.