

Effect of 12 weeks of HIIT and Q10 supplementation on soleus muscle mitochondrial biogenesis in high-fat diet-induced obese rats

Masoud Rafati¹, Jabbar Bashiri*¹, Roghayeh Poozesh Jadidi¹, Hassan Pourrazi²

¹ Department of Sports Science, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

² Department of Sports Science, Faculty of Social Sciences, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

Original Article

Abstract

Purpose: little is known about the concomitant effects of HIIT and Q10 supplementation in modification of the mitochondrial biogenesis and function in obesity conditions. The aim of this study was to investigate the concomitant effects of HIIT and Q10 supplementation on soleus muscle mitochondrial content as well as NRF2, SIRT-1 and Tfam levels in obese male rats.

Methods: 48 rats randomized into six groups of lean, obese reference, obese control, obese+HIIT, obese+Q10 and obese concomitant (HIIT+Q10). Obesity was induced by high fat diet and HIIT were done for 12 weeks (five sessions/week, with 10 interval bouts for four min at 85-90% of $v\text{VO}_2$ peak each session), while Q10 was consumed 500 mg/kg.bw daily. Data were measured using western blot and Mitotracker methods and were analyzed by one-way ANOVA.

Results: Mitochondrial content ($P = 0.049$) as well as NRF2 ($P = 0.002$), SIRT-1 ($P = 0.007$) and Tfam ($P = 0.040$) levels were significantly lower in obese control than lean group. Mitochondrial content and SIRT-1 levels of three intervention groups of obese+HIIT ($P = 0.001$), obese+Q10 ($P = 0.001$) and obese concomitant ($P = 0.001$) were significantly higher than obese control group and even could precede lean group values (with exception for mitochondrial content in obese+Q10 group ($P = 0.001$)). Moreover, only in both groups of obese+HIIT ($P = 0.033$), and obese concomitant ($P = 0.038$), NRF2 levels were significantly higher compared to obese control group. However, in none of the intervention groups the Tfam levels had significant differences compared to obese control group ($P > 0.05$ in all three cases).

Conclusion: Obesity likely suppresses soleus muscle mitochondrial biogenesis, or at least increases the removal rate of pre-existing mitochondria. However, HIIT as well as Q10 supplementation seems to partially capable to restore this down regulation, with a greater effects expected for HIIT. However, more investigations remain to be done due to lack of similar evidence and study limitations.

Keywords: Obesity, High Intensity Interval Training, Coenzyme Q10, Mitochondria, Skeletal Muscle

How to cite this article: Rafati M, Bashiri J, Poozesh Jadidi R, Pourrazi H. Effect of 12 weeks of HIIT and Q10 supplementation on soleus muscle mitochondrial biogenesis in high-fat diet-induced obese rats. *Journal of Sport and Exercise Physiology* 2022;15(1):29-40

*Corresponding Author; E-mail: bashiri.jabbar@gmail.com

DOI: 10.52547/joeppa.15.2.29

Received: 17/08/2020

Revised: 29/06/2021

Accepted: 07/11/2021

تأثیر ۱۲ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) و مکمل کوآنزیم Q10 بر بیوژنز میتوکندری عضله نعلی موش‌های صحرایی چاق شده با رژیم پرچرب

مسعود رفعتی^۱، جبار بشیری^{۲*}، رقیه پوزش جدیدی^۱، حسن پوررضی^۲

۱ گروه علوم ورزشی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲ گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم اجتماعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

مقاله پژوهشی

چکیده

هدف: در مورد تأثیر توأم HIIT و Q10 بر دستکاری بیوژنز و عملکرد میتوکندری‌های عضلانی در شرایط چاقی اطلاعات اندکی موجود است. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر توأم تمرین HIIT و مکمل Q10 بر محتوای میتوکندری و مقدار AMPK، NRF2، SIRT1 و Tfam عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق بود.

روش‌ها: ۴۸ موش صحرایی به طور تصادفی به شش گروه لاغر، چاق مرجع، چاق کنترل، چاق+HIIT، چاق+Q10 و چاق توأم (HIIT+Q10) تقسیم شدند. چاقی با رژیم پرچرب القا شد و تمرین HIIT به مدت ۱۲ هفته (پنج جلسه در هفته، هر جلسه شامل ۱۰ مرحله فعالیت تناوبی چهار دقیقه‌ای با شدت ۸۵-۹۰ درصد $\dot{V}O_2$ peak) انجام شد و Q10 روزانه (نیم گرم در هر کیلوگرم وزن بدن) مصرف شد. داده‌ها با روش وسترن بلات و mitotracker اندازه‌گیری و با ANOVA مقایسه شدند.

نتایج: محتوای میتوکندری ($P=0/049$) و مقدار پروتئین‌های NRF2 ($P=0/002$)، SIRT-1 ($P=0/007$) و Tfam ($P=0/040$) در گروه چاق کنترل به طور معنادار کمتر از گروه لاغر بود. محتوای میتوکندری و مقدار SIRT-1 در هر سه گروه چاق+HIIT ($P=0/001$)، چاق+Q10 ($P=0/001$) و چاق توأم ($P=0/001$)، به طور معناداری بیشتر از گروه چاق کنترل بود و حتی به سطوح بالاتر از گروه لاغر نیز (به جز محتوای میتوکندری گروه چاق+Q10) رسید ($P=0/001$). اما مقدار NRF2، فقط در گروه‌های چاق+HIIT ($P=0/033$) و چاق توأم ($P=0/038$) به طور معناداری بیشتر از گروه کنترل چاق بود. باین حال، در هیچ یک از گروه‌های مداخله، مقدار Tfam تفاوت معناداری با گروه کنترل چاق نداشت ($P>0/05$ در هر سه مورد).

نتیجه‌گیری: احتمالاً چاقی بیوژنز میتوکندری عضله نعلی را کاهش می‌دهد و یا اینکه حداقل سبب تخریب بیشتر میتوکندری‌های موجود می‌شود، اما تمرین HIIT و مکمل Q10 تا اندازه‌ای قابلیت جبران این کاهش را دارند که البته اثر HIIT تا حدی بیشتر است. باین حال به دلیل کمبود شواهد و محدودیت‌ها هنوز نیاز به بررسی باقی است.

واژه‌های کلیدی: چاقی، تمرین تناوبی پرشدت، کوآنزیم Q10، میتوکندری، عضله اسکلتی.

* نویسنده مسئول: رایانامه: bashiri.jabbar@gmail.com

مقدمه

میتوکندری‌ها در بسیاری از فعالیت‌های حیاتی مانند سوخت و ساز و هومئوستاز سلولی نقش دارند که افت کیفیت آنها به بسیاری از بیماری‌ها منجر می‌شود. ولی هنوز در مورد چگونگی اندازه‌گیری بیوژنز میتوکندری به عنوان گسترش شبکه میتوکندریایی توافق نظر وجود ندارد (۱). با این حال، فرآیندهای منجر شونده به بیوژنز میتوکندریایی حاصل یک الگوی زمانی هستند که شامل پیام‌رسانی، رونویسی، بیان پروتئین و تعدادی از رویدادهای پس‌ترجمه‌ای می‌باشند. این توالی از رویدادها با فعالیت انقباضی و یک سری از اختلالات هموستاتیک شروع می‌شوند که به عنوان پیام‌های فعال‌سازی پروتئین‌های حسگر مانند Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinases II، پروتئین‌کیناز 5' فعال شده با AMP (AMPK)، p38 MAPK و Sirtuin 1 عمل می‌کنند. این پروتئین‌ها رونویسی ژنی را از طریق فعال‌سازی عوامل مختلف آغاز می‌کنند که شامل فعال‌سازی عوامل همکار فعال‌سازی رونویسی (سازگارکننده رونویسی) مانند PGC-1 α و عوامل رونویسی مانند p53، عامل تنفس هسته‌ای ۱ و ۲ (NRF-1 و NRF-2)، عامل رونویسی میتوکندریایی A (Tfam) هستند (۲). اما اگرچه این رویدادهای رونویسی برای فعال‌سازی بیوژنز میتوکندری اهمیت دارند؛ ولی خود آنها شاخص بیوژنز میتوکندری نیستند و متداول‌ترین راه ارزیابی بیوژنز میتوکندری از طریق اندازه‌گیری مقدار سنتز پروتئین‌های میتوکندری می‌باشد (۱). با این حال، استفاده از روش‌های ارزیابی تهاجمی بیوژنز میتوکندری مانند محتوای میتوکندری‌ها به روش Mitotracker (یک ابزار مفید برای اندازه‌گیری توده و فعالیت هوازی میتوکندری بدون نیاز به جداسازی و تخلیص اندامک (۳)) هم به عنوان یکی از پیامدهای بیوژنز میتوکندری (افزایش در شبکه میتوکندریایی)، همراه با اندازه‌گیری تغییرات بیان ژنی و محتوای پروتئینی عوامل رونویسی‌کننده اصلی و پروتئین‌های تنظیم‌کننده فعالیت رونویسی، فهم بهتری در مورد سازوکارهای مولکولی مربوط به بیوژنز میتوکندریایی ناشی از ورزش فراهم می‌کنند.

البته رویدادهای اولیه تنظیم بیوژنز میتوکندری مانند فعال‌سازی پیام‌رسانی کینازها (مانند AMPK) و دآستیلازها (مانند سیرتوئین ۱) و افزایش محتوای میتوکندری تحت تأثیر یک تنظیم وابسته به شدت

ورزش (۴) هستند، ولی با توجه به تعداد اندک پژوهش‌های موجود هنوز باید بررسی‌های بیشتری برای تأیید این فرضیه انجام شوند.

از سویی افزایش وزن و چاقی به عنوان یک همه‌گیری در حال گسترش حتی در عضلات اسکلتی هم از مسیرهای مختلفی سبب ایجاد تغییر در محتوا و عملکرد میتوکندری می‌شود که این تغییرات نقش بسیار مهمی در سلامت سوخت و ساز دارند. در این راستا بروز کاهش هم در عملکرد و هم در مقدار بیوژنز میتوکندریایی بافت‌های مختلف در اثر چاقی تأیید شده است. ولی با اینکه به نظر می‌رسد که چاقی ناشی از مصرف رژیم پرچرب عمدتاً بتواند از طریق افزایش فشار اکسایشی به نارسایی عملکرد میتوکندری‌ها منجر شود (۵)، اما هنوز در مورد تأثیر مستقیم مصرف رژیم پرچرب بر بیوژنز میتوکندری عضلانی، نیاز به بررسی بیشتر باقی است.

اما تمرینات ورزشی منظم در نقطه مقابل، بهبود محتوا و بیوژنز میتوکندریایی عضلانی نقش دارند که به نظر می‌رسد از طریق فعال شدن AMPK روی می‌دهد. با اینکه پیشنهاد شده است حجم تمرین عامل مهمی در تعیین تغییر محتوای میتوکندری می‌باشد (۶)، ولی تمرین تناوبی شدید (HIIT) هم با وجود کمتر بودن حجم تمرین، سازگاری‌های سوخت و ساز سودمندی در عضلات ایجاد می‌کند و با افزایش بیوژنز میتوکندری از طریق افزایش تعداد و بهبود عملکرد میتوکندری‌ها (۷) به ویژه در شرایط چاقی، محتوای میتوکندری را مشابه با تمرین با شدت متوسط افزایش می‌دهد (۱). در این راستا، پیشنهاد شده است که افزایش محتوای سرتوئین ۱ (SIRT1)، PGC-1 α هسته‌ای و Tfam ممکن است که در هماهنگ کردن سازگاری‌های مربوط به بیوژنز میتوکندریایی در پاسخ به HIIT سهیم باشند (۸). اما هنوز مقایسه مستقیم انواع تمرین ورزشی و به ویژه تعیین تمرین HIIT بر بیوژنز میتوکندری عضلانی الگوهای چاق برای حل این تناقض‌ها مورد نیاز است (۱).

علاوه بر این، احتمال داده شده است که افزودن ضداکساینده‌ها به برنامه فعالیت بدنی منظم ممکن است راهبرد مؤثری در این زمینه ارائه کند. در این بین Q10 به دلیل قابلیت جذب و ذخیره پایین در میتوکندری‌های عضلات، توجه پژوهشگران را برای حمایت از بیوژنز میتوکندری‌های عضلانی در برابر چاقی به خود جلب کرده است. مکمل Q10 می‌تواند سبب

با چرخه ۱۲ ساعته روشنایی/خاموشی مساوی و دمای محیطی حدود ۲۲ درجه نگهداری شدند.

روش اجرای پژوهش: موش‌های صحرایی ابتدا به طور تصادفی به شش گروه شامل لاغر، چاق مرجع، چاق کنترل، چاق + HIIT، چاق + Q10 و چاق توأم (HIIT + Q10) تقسیم شدند. ابتدا برای تعیین اوج اکسیژن مصرفی، آزمون ورزشی (بعد از ۱۰ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و شیب ۱۰) کاملاً مطابق با روش رودریگوئز (Rodrigues) و همکاران (۱۱) انجام شد. مرحله اول آزمون با سرعت نوارگردان ۱۰ متر در دقیقه و شیب ۲۵ درجه آغاز شد (شیب تا انتها ثابت ماند) و در مراحل بعدی (هر مرحله به مدت دو دقیقه)، سرعت نوارگردان ۰/۰۳ متر بر ثانیه (حدود ۲-۱/۸ متر بر دقیقه) تا زمان رسیدن به واماندگی افزایش یافت. در پایان آزمون ورزشی، سرعت رسیدن به واماندگی عنوان سرعت $v \text{VO}_2 \text{ peak}$ تعیین شد.

چاقی از طریق رژیم امولسیون پرچرب القاء شد که ۷۷٪ انرژی آن متشکل از چربی، ۱۴٪ از پودر شیر کامل و ۹٪ از کربوهیدرات بود. در این امولسیون پروتئین‌ها از پودر شیر کامل، کربوهیدرات از سوکروز و چربی از روغن ذرت تأمین شد. به هر وعده از غذا، مخلوطی از مکمل ویتامین و مواد معدنی افزوده شد. این امولسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و در زمان مصرف پس از مخلوط کردن با آب ولرم و هم‌زدن کامل، به صورت خوراکی از طریق دهان گاوآژ شد.

موش‌های صحرایی گروه‌های HIIT، ۱۲ هفته تمرینات دویدن بر روی نوارگردان را تجربه کردند. در هر هفته، پنج جلسه تمرین تناوبی ۱۰ مرحله‌ای (هر تناوب به مدت ۶ دقیقه متشکل از ۴ دقیقه دویدن با شدت ۹۰-۸۵ درصد $v \text{VO}_2 \text{ peak}$ و ۲ دقیقه استراحت فعال و با شدت ۵۰-۴۰ درصد $v \text{VO}_2 \text{ peak}$) انجام شد. در ابتدای هر جلسه ده دقیقه گرم کردن و در انتهای آن پنج دقیقه سرد کردن در نظر گرفته شد. مقدار $\text{VO}_2 \text{ peak}$ از طریق تکرار آزمون ظرفیت ورزشی در ابتدای هفته‌های پنجم و سیزدهم پژوهش تعیین شد و برای تنظیم سرعت دویدن مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که CoQ10 از شرکت JinTai چین (شماره سیایاس: ۳۰۳-۹۸-۰) خریداری شد و گروه‌های مصرف Q10، آن را به طور خوراکی با مقدار روزانه ۵۰۰ میلی‌گرم در هر کیلو وزن بدن به صورت حل شده در روغن آفتابگردان به مدت ۱۲ هفته دریافت کردند. گروه لاغر تا انتهای دوره

کاهش فشار اکسایشی ناشی از ورزش در موش‌های مبتلا به سندرم متابولیک شود (۹) و این مسئله می‌تواند این نکته را مطرح کند که شاید در بیماران متابولیک و شرایط چاقی، مصرف مکمل Q10 بتواند با کاهش فشار اکسایشی ناشی از فشار هر جلسه تمرین، ضمن دارا بودن اثرات محافظتی بر سلامت در درمان و یا تسکین بسیاری از عوارض جانبی بیماری‌های متابولیک که با منشاء فشار اکسایشی به کیفیت میتوکندری‌ها لطمه می‌زنند، نیز کمک‌کننده باشد. همچنین، اطلاعات پژوهش‌های گذشته، تأثیر احتمالی مصرف مکمل Q10 بر بیویژنز میتوکندریایی در عضلات افراد سالم ورزشکار و بیماران مختلف مبتلا به کمبود Q10 و یا مبتلا به اختلالات عملکردی میتوکندریایی را اثبات کرده‌اند (۱۰). ولی به دلیل تفاوت در نوع مکمل مصرفی، مقدار و مدت مصرف و تفاوت در ویژگی جمعیت و یا نمونه مورد بررسی، هنوز نیاز به شفاف‌سازی دقیق در این زمینه به ویژه در مورد تأثیر همزمان تمرینات HIIT و مکمل Q10 بر بیویژنز میتوکندری عضلات جمعیت افراد چاق باقی است.

بدین ترتیب، اطلاعات موجود نشان می‌دهند که احتمالاً تمرین HIIT و Q10 در شرایط چاقی نیز می‌توانند در بیویژنز میتوکندری عضلات نقش‌آفرینی کنند؛ اما در مورد تأثیر توأم تمرینات HIIT و مصرف مکمل Q10 بر بیویژنز میتوکندریایی عضلات در شرایط چاقی ناشی از رژیم پرچرب، هنوز اطلاعات مستقیمی فراهم نشده است که نیاز به بررسی تأثیر آنها در مورد محتوای میتوکندری و مقدار AMPK، NRF2، SIRT1 و Tfam در عضله اسکلتی را ضروری کرده است که هدف این پژوهش بود.

روش پژوهش

این پژوهش از نوع تجربی با طرح تصادفی شش گروهی بود که به طور آزمایشگاهی انجام شد.

نمونه‌های پژوهش: پس از تصویب طرح در کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز (کد اخلاقی IR.IAU.TABRIZ.REC.1397.013)، موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (سن ۱۶ هفته، وزن: $24/77 \pm 34/31$ گرم) از انستیتو پاستور خریداری شدند. شرایط نگهداری و کار با حیوانات براساس قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت که سه موش صحرایی در هر قفس با دسترسی آزاد به آب و غذا

مداخله، رژیم غذایی معمولی دریافت نمود که همراه سایر گروه‌ها در انتهای مداخله توسط تکنسین مجرب دامپزشکی پس از بیهوشی با آرتین، کشتار شدند، اما گروه چاق مرجع، پس از القای چاقی کشتار شدند.

روش‌های آزمایشگاهی: در همان روز کشتار بلافاصله میوفیبرهای عضله نعلی یک پا برای تصویربرداری میتوکندری (Mitotracker) در شرایط fresh نفوذپذیر شدند. بدین منظور عضله نعلی بلافاصله پس از استخراج در داخل بافر شل کننده روی یخ شکافته شد با ساپونین ۰/۰۵ میلی گرم بر میلی لیتر به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد تا میوفیبرها نفوذپذیر شوند. در ادامه میوفیبرها پس از سه بار شستشو به مدت ۲۰ دقیقه با Mitotracker Red ROX ۱۵ میکرومول در دمای ۳۰ درجه انکوبه شدند، سپس تارهای عضلانی رنگ آمیزی شده ما بین کف شیشه‌ای چاهک‌های پلیت و روکش مدور ساندویچ شد، سپس تصاویر بلافاصله با استفاده از میکروسکوپ لیزر کانونی تهیه شدند. در ادامه پس از مشخص کردن حاشیه میتوکندری‌های کاملاً مجزا در تصویر (به‌طور دستی)، تصاویر با استفاده از نرم افزار Image J کمی سازی شدند (۱۲).

اما عضله اسکلتی پای دیگر پس از جداسازی در طول شب در پارافورمالدهید حل شده در ۱۰۰ میلی مول بافر فسفات (pH=۷/۴) تثبیت شدند، سپس به منظور حفاظت از آسیب ناشی از یخ زدن (Cryoprotection) به محلول سوکروز ۳۰٪ منتقل شد. در ادامه استخراج نمونه از طریق هموزن کردن نمونه عضلانی در بافر لیز (Lysis buffer) در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بافت در یک میلی لیتر بافر انجام شد. نمونه‌های هموزن بر روی یخ قرار داده شده و سپس به مدت ۴۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شدند، سپس بخش سطحی نمونه سانتریفوژ شده جمع‌آوری شده و تا زمان تحلیل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

اندازه‌گیری مقدار بیان پروتئین‌های AMPK، NRF2، SIRT1 و Tfam به روش وسترن بلات انجام شد. بدین منظور برای استخراج پروتئین‌ها از بافر RIPA حاوی ۰/۰۵ میلی مولار بافر تریس (PH برابر ۸)، ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد EGTA، ۱٪ SDS به اضافه ۰/۱ درصد آنتی پروتئاز کوکتیل (ROCHE) استفاده شد، سپس ۱۰۰ میلی گرم بافت در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر حاوی آنتی پروتئاز هموزن شد و نیم ساعت در دمای ۴ درجه

سانتی‌گراد گذاشته شدند و بعد در یک سانتریفوژ یخچال دار در دور ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری شده و غلظت پروتئین آن با کیت تعیین‌کننده پروتئین (Bio-Rad, USA: کد کاتالوگ: ۵۰۰-۰۰۱) اندازه‌گیری گردید (در طول موج ۵۹۵ نانومتر)، سپس هموزن به دست آمده به نسبت ۱:۱ با سمپل لودینگ بافر (۵۰ mM تریس-کلرید هیدروژن، pH=۶/۸، ۲٪ سدیم دودسیل سولفات، ۱۰٪ گلیسرول، ۵٪ بتا-مرکاپتو اتانول و ۰/۰۰۵٪ برموفنول آبی Perkin-ElmerTM, Life Sciences) مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد تا تمام پروتئین‌ها کاملاً دناتوره شوند. در ادامه از دستگاه مینی الکتروفورز عمودی ساخت BioRad, USA استفاده شد. از هر نمونه به اندازه ۱۰ میکرو لیتر (تقریباً ۵۰ میکروگرم) در چاهک مربوطه قرار داده شد و سپس با برقراری جریان الکتریکی (ولتاژ ثابت) ۱۰۰ ولت و ۳۵ میلی آمپر پروتئین‌ها در ژل بالا (۱۰٪) حرکت کرده و به محض ورود به ژل پایین ولتاژ به ۲۰۰ افزایش داده شد. با رسیدن رنگ برموفنول آبی به انتهای ژل، جریان قطع و ژل از قالب خارج شد. برای انجام کار الکتروترانسفر مراحل پایین به ترتیب انجام شد. ابتدا لایه‌های مرتب شده به ترتیب (از پایین به بالا): ۱- یک لایه ابر (اسکاج)، ۲- یک پد، ۳- ژل پلی آکریل آمید، ۴- غشا PVDF (قبل از استفاده با متانول به مدت ۵ دقیقه فعال گردید)، ۵- یک پد، ۶- یک لایه اسکاج) در میان صفحات شبکه قرار داده شدند. پیک حاصله با یک نورد پلاستیکی حباب‌گیری شده و در داخل تانک الکتروترانسفر (Thermo Fischer Scientific, USA) قرار گرفت. بعد از پر کردن تانک الکتروترانسفر با بافر مخصوص، صفحات شبکه غشا PVDF و ژل پلی آکریل آمید به صورتی در داخل آن قرار داده شد که غشا PVDF به صورت آند و ژل به صورت کاتد قرار گرفت، سپس جریان با ولتاژ ثابت ۹۰ ولت برقرار شد. به طور متوسط زمان ۲ ساعت برای ژل آکریل آمید با ضخامت یک میلی متر در نظر گرفته شد. بعد از سپری شدن زمان فوق ضخامت پلی گلاس از تانک خارج گردید و غشا از ژل پلی آکریل آمید (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) جدا شده، سپس به منظور ثابت کردن پروتئین‌ها و رنگ آمیزی آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در داخل رنگ پانسو S قرار گرفتند. سپس غشا PVDF برای رنگ‌زدایی چندین بار در داخل آب

داده‌ها از آزمون Welch و برای مقایسه‌های تعقیبی آنها نیز از آزمون جیمز هاول استفاده شد.

طبق بررسی‌ها به جز در مورد مقدار AMPK عضله نعلی ($P=0/081$)، در بقیه موارد شامل محتوای میتوکندری و مقدار پروتئین‌های NRF2، SIRT-1 و Tfam، نتایج تحلیل واریانس تک راهه حاکی از وجود تفاوت معنادار بین گروهی بود ($P=0/001$ در تمام موارد). به طوری که در گروه چاق کنترل، محتوای میتوکندری ($P=0/049$) و مقدار پروتئین‌های NRF2 ($P=0/002$)، SIRT-1 ($P=0/007$) و Tfam ($P=0/040$) به طور معناداری کمتر از گروه لاغر بود.

اما در هر سه گروه چاق+HIIT، چاق+Q10 و چاق توأم، هم محتوای میتوکندری و هم مقدار SIRT-1 به طور معناداری بیشتر از گروه چاق کنترل بودند ($P=0/001$ در همه موارد) و در دو گروه تحت تمرین، شامل گروه های چاق+HIIT ($P=0/001$) و چاق توأم ($P=0/001$) مقدار این دو متغیر حتی به سطوح بالاتر از گروه لاغر ($P=0/001$ در همه موارد) نیز رسیدند (ولی از نظر محتوای میتوکندری در گروه چاق+Q10 تفاوت معناداری نسبت گروه لاغر مشاهده نشد ($P=0/98$)).

مقدار NRF2 فقط در دو گروه چاق تحت تمرین تناوبی شدید، شامل گروه‌های چاق+HIIT ($P=0/033$) و چاق توأم ($P=0/038$) به طور معناداری بیشتر از گروه کنترل چاق بود. با این حال، در هیچ یک از گروه‌های مداخله شامل چاق+HIIT ($P=0/15$)، چاق+Q10 ($P=0/27$) و چاق توأم ($P=0/09$)، تفاوت معناداری در مقدار Tfam نسبت به گروه کنترل چاق مشاهده نشد ($P>0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

مهمترین یافته این پژوهش آن بود که چاقی سبب کاهش محتوای میتوکندری عضله‌ی نعلی موش صحرایی می‌شود که بر کاهش بیوژنز میتوکندری عضله اسکلتی در شرایط چاقی دلالت می‌کند. اگرچه این احتمال نیز وجود دارد که چاقی بدون تأثیر بر بیوژنز، فقط سرعت تخریب میتوکندری‌های معیوب (۱۳) را بدون دستکاری سرعت نوسازی آنها افزایش دهد. بنابراین کاهش محتوای میتوکندری عضله ریشه در تغییر پویایی میتوکندری‌ها داشته باشد (۱۴)، اما به دلیل عدم اندازه‌گیری متغیرهای مرتبط با پویایی

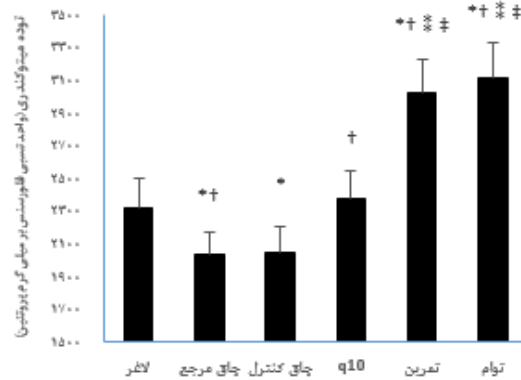
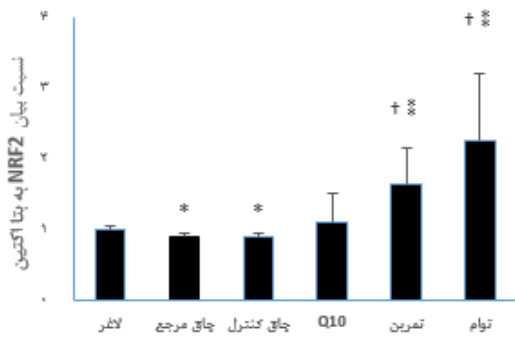
مقطر قرار داده شد برای اشیاع جایگاه‌ها، غشا PVDF به مدت دو ساعت داخل محلول BSA-PBS-T (۸۰ میلی‌لیتر PBS+۲۰ میلی‌لیتر ۵٪ BSA + ۰/۱ میلی‌لیتر توپین ۲۰) قرار داده شد، سپس غشا به مدت یک شب در محلول حاوی آنتی‌بادی‌های AMPK (sc-398861)، NRF2 (sc-365949)، SIRT1 (sc-135792) و Tfam (sc-166965) ساخت شرکت سانتاکروز (Santa Cruz Bio-technology, Santa Cruz, CA) رقیق شده در محلول BSA-PBS-T قرار گرفت. غشا از محلول فوق خارج شد و چهار بار به مدت ۵ دقیقه در محلول PBS-T شستشو گردید. غشا PVDF از محلول فوق خارج شده و به صورت قبلی ولی این بار سه مرتبه هرکدام به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد. بعد از خروج غشا از PBS به مدت سی ثانیه در داخل محلول سوبسترای آماده شده ECL (Perkin-ElmerTM, Life Sciences) طبق دستورالعمل کیت (Bio-Rad, USA) قرار گرفت. بعد از پوشانده شدن با ورقه نازک نایلونی، فیلم رادیوگرافی در معرض نور لومینسانس ساطع شونده از غشا قرار داده شد. سپس چگالی باندها با استفاده از نسخه ۱/۶۲ بسته نرم‌افزاری دانسیتومتری (Image J, Maryland, USA) تعیین شد و در نهایت چگالی به دست آمده نسبت به مقدار بیان بتا اکتین (SANTA CRUZ, β -Actin (C4): sc-47778)، موجود در نمونه‌ها، طبیعی سازی شد و داده‌ها بر حسب نسبت (Fold Change) بیان شدند.

تحلیل آماری: ابتدا پس از بررسی شکل طبیعی توزیع داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک، در ادامه، مقایسه گروه‌ها با استفاده از آزمون ANOVA انجام شد. در ادامه مقایسه‌های تعقیبی بر حسب نتایج آزمون همسانی واریانس (لون) با استفاده از آزمون‌های تعقیبی توکی و یا جیمز هاول در سطح معناداری آماری ۰/۰۵ انجام شدند.

نتایج

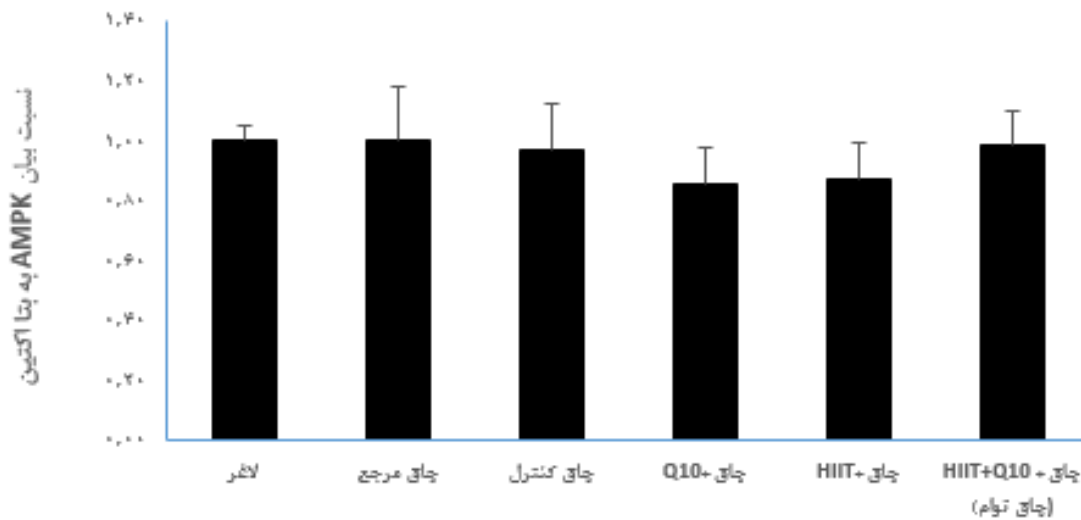
ابتدا باید اشاره شود که پس از مداخله، هیچ یک از متغیرها تفاوت معناداری در بین گروه چاق کنترل و چاق مرجع نداشتند و بنابراین فقط نتایج گروه چاق کنترل مبنای مقایسه آماری با سایر گروه‌های مداخله قرار داده شد.

همچنین، لازم به توضیح است که در برخی موارد نتایج آزمون لون حاکی از عدم تساوی واریانس گروه‌ها با همدیگر بود. بنابراین در آن موارد در مقایسه بین گروهی



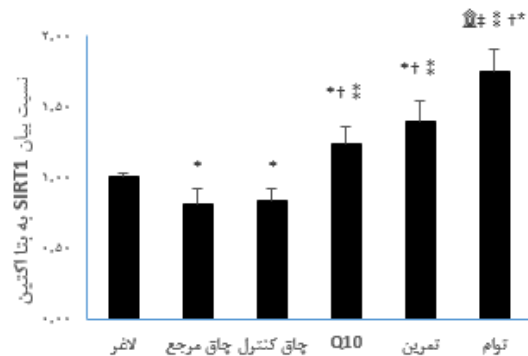
شکل ۳. مقدار پروتئین NRF2 عضله نعلی موش های صحرائی نر چاق تحت تمرین HIIT و یا مصرف مکمل Q10
*، † و ‡: به ترتیب نمایانگر تفاوت معنادار نسبت به گروه های لاغر، چاق مرجع و چاق کنترل بر مبنای آزمون تعقیبی جیمز هاول (P<0/05).

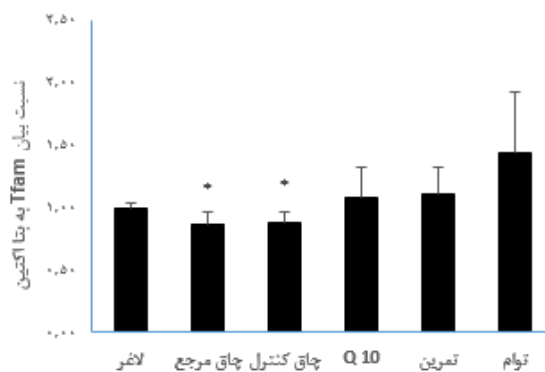
شکل ۱. محتوای میتوکندری عضله نعلی موش های صحرائی نر چاق تحت تمرین HIIT و یا مصرف مکمل Q10
*، † و ‡: به ترتیب نمایانگر تفاوت معنادار نسبت به گروه های لاغر، چاق مرجع، چاق کنترل و Q10 بر مبنای آزمون تعقیبی توکی (P<0/05).



شکل ۲. مقدار AMPK عضله موش های صحرائی نر چاق تحت تمرین HIIT و یا مصرف مکمل Q10
*: تفاوت معنادار وجود ندارد (P>0/05).

شکل ۴. مقدار پروتئین SIRT1 عضله نعلی موش های صحرائی نر چاق تحت تمرین HIIT و یا مصرف مکمل Q10
*، †، ‡ و §: به ترتیب نمایانگر تفاوت معنادار نسبت به گروه های لاغر، چاق مرجع، چاق کنترل، Q10 و تمرین بر مبنای آزمون تعقیبی جیمز هاول (P<0/05).





شکل ۵. مقدار پروتئین Tfam عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق تحت تمرین HIIT و یا مصرف مکمل Q10
* تفاوت معنا دار نسبت به گروه لاغر بر مبنای آزمون تعقیبی جیمز هاول ($P < 0.05$).

میتوکندری و به‌ویژه شکافت میتوکندری، شفاف‌سازی این مسئله مقدور نمی‌باشد.

از سویی، کاهش بیوژنز میتوکندری و عضله در آزمودنی‌های اضافه وزن و چاق هم مسئله‌ای تقریباً مسلم است (۱۵) و همچنین با در نظر گرفتن تغییر سایر متغیرهای مورد مطالعه احتمال تغییر در بیوژنز میتوکندری در اثر چاقی قوت بیشتری به خود می‌گیرد. اما برای اندازه‌گیری دقیق بیوژنز میتوکندری باید از میکروسکوپ الکترونی TEM (Transmission Electron Microscopy) استفاده شود که هزینه بالایی دارد و دسترسی به آن محدود است. بنابراین معمولاً بیوژنز میتوکندری به صورت غیرمستقیم از روی تغییرات شاخص‌های مرتبط با مقدار DNA، آنزیم‌ها و ژن‌های رونویسی دخیل در تکثیر میتوکندری، رصد می‌شود. ولی در این پژوهش با استفاده از روش Mitotracker Green FM (معتبر برای ارزیابی بیوژنز میتوکندری‌ها (۳)) افزایش محتوای میتوکندری‌های عضله نعلی در هر سه گروه از موش‌های صحرایی چاق (شامل چاق+HIIT، چاق+Q10 و چاق توأم (HIIT+Q10)) مشاهده شد که البته مقدار اثرگذاری تمرین HIIT در این مورد، بیشتر از Q10 بود. این یافته زمینه کاربرد تمرین HIIT و مکمل Q10 را در نمونه‌های چاق انسانی با تأکید بر اهمیت بیشتر تمرین HIIT فراهم می‌کند.

علاوه بر این، در گروه‌های تمرین (گروه‌های چاق+HIIT و چاق توأم (HIIT+Q10))، محتوای میتوکندری از گروه لاغر نیز بیشتر شد که این مسئله البته

با آثار مورد انتظار از تمرین بدنی در افزایش چشمگیر بیوژنز میتوکندری و قابلیت‌های هوازی عضلات افراد چاق (وابسته به محتوا و فعالیت میتوکندری‌ها) قابل توجیه است. اگرچه که طبق نتایج یک پژوهش شاید به دلیل شدت بالای HIIT بیوژنز میتوکندری در عضله پهن جانبی انسان در حد انتظار روی ندهد (۱۶). ولی در یک مطالعه نیز با اندازه‌گیری محتوای میتوکندری‌های عضلانی آزمودنی‌های انسانی غیرفعال از طریق MitoTracker به دنبال شش جلسه شرکت در تمرینات HIIT هم، افزایش قابلیت‌های هوازی و محتوای میتوکندری‌های عضلانی مشاهده شد (۱۷) که بر وجود تناقض در این زمینه دلالت می‌کند. با این حال، اگر چه عضله نعلی عموماً کند انقباض است و قطعاً افزایش محتوای میتوکندری آن به معنا بهبود بیشتر استقامت عضلانی و سوخت و ساز هوازی است، اما به نظر می‌رسد که از نظر مقدار بهبود بیوژنز میتوکندری‌های عضلانی در پاسخ به تمرین، یک نوع فلات وجود دارد (۶). به بیان دیگر، نیاز به افزایش مداوم و پیشرونده بیوژنز میتوکندری و گسترش نامحدود نسبت حجم اشغال شده سلول عضلانی توسط میتوکندری‌ها وجود ندارد و شاید در چنین شرایطی، ظرفیت محدود بدن برای تأمین سوخت و همچنین تحویل اکسیژن مورد نیاز میتوکندری‌ها، عامل محدود کننده ظرفیت تنفسی عضلات فعال (۱۸) محسوب شود (و نه محتوا و عملکرد میتوکندری). از سویی حجم تمرین هم با تغییرات حجم میتوکندری‌ها همبستگی بسیار قوی دارد (۱۹) و شاید با بیشتر شدن حجم تمرین HIIT انجام شده در هر جلسه، تغییرات بیشتری در بیوژنز میتوکندری عضلات اسکلتی موش‌های صحرایی چاق محتمل باشد.

بدین ترتیب، شاید هم مدت زمان بررسی در پژوهش حاضر به اندازه کافی نبوده است. در این راستا، پیشنهاد شده است که برای شناسایی دقیق زمان بروز تغییرات محتوا، مکان و یا فعالیت پروتئین‌های میتوکندریایی در پاسخ به HIIT، نیاز به بیوپسی‌های عضلانی متعدد در دوره‌های زمانی مختلف و جمعیت‌های مختلف جنسیتی و سنی وجود دارد (۱). بنابراین فهم بیشتر در این زمینه نیازمند بررسی تأثیر دوره‌های طولانی‌تر تمرینات HIIT و همچنین مصرف Q10 خواهد بود.

در بخش دیگر یافته‌ها هم نه چاقی ناشی از رژیم پرچرب، نه HIIT و نه Q10، تغییری در مقدار AMPK

به ذکر است که مواجهه سلول‌ها با فشار اکسایشی سبب جابجا شدن NRF2 از سیتوپلاسم به هسته می‌شود و می‌تواند سبب تنظیم بیوژنز میتوکندری شود (۲۵). بنابراین شاید در پژوهش حاضر کاهش NRF2 عضله در اثر چاقی به کاهش بیوژنز میتوکندری عضلانی دلالت می‌کند که با سایر نتایج پژوهش در مورد کاهش محتوای میتوکندری نیز همخوانی دارد. طبق شواهد گذشته نیز کاهش NRF2 می‌تواند سبب تشدید نارسایی انقباضی و از دست دادن توده عضلانی در وضعیت چاقی شود (۲۶). در یک پژوهش دیگر نیز هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، افزایش فعالیت NRF2 عضله در پاسخ به تمرین ورزشی گزارش شده است. با این حال، فقط NRF2 در عملکرد میتوکندری مؤثر نیست و احتمالاً متغیرهای دیگری نیز دخالت داشته باشند (۲۷). همچنین در پژوهش حاضر در مورد چگونگی و سازوکار دقیق ارتباط بین مقدار NRF2 و مقدار تغییرات ساختاری میتوکندری‌های عضلانی امکان اظهار نظر میسر نشد که از سایر محدودیت‌های آن به شمار می‌رود.

در بخش دیگر نتایج چاقی سبب کاهش مقدار پروتئین SIRT1-عضله نعلی شد و هم HIIT، هم مکمل Q10 و هم اثر توأم آنها ضمن جبران این کاهش ناشی از چاقی، حتی مقدار آن را از افراد لاغر نیز فراتر بردند. همچنین، تأثیر توأم تمرین HIIT و Q10 برای افزایش نسبت به هریک از آنها (HIIT و Q10) بیشتر بود که بر مزیت استفاده توأم مکمل Q10 همراه با تمرین HIIT دلالت دارد. اما چون در این زمینه شواهد مستقیمی در دسترس نیست، هنوز باید این مسئله بیشتر بررسی شود. به هر حال، SIRT1 تغییرات نسبت NADH/NAD عضلانی را حس کرده و با ایجاد تغییرات در بیان ژنی عضله بر حسب نیازهای سوخت و سازی به این تغییرات ردوکس پاسخ می‌دهد (۱۶). ولی در مورد اهمیت تغییرات SIRT1 در عضله همراه با تغییرات محتوای میتوکندریایی عضلانی ناشی از ورزش در شرایط *in vivo* تناقض گسترده‌ای وجود دارد (۲۸). بنابراین هنوز نباید مشاهده افزایش SIRT1 در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی چاق به دنبال تمرین HIIT و یا مصرف Q10 را به عنوان دلیل قطعی برای افزایش محتوای میتوکندریایی عضلانی در نظر گرفت و شاید این پروتئین نقش‌های دیگری مانند پاک‌سازی اندامک‌های آسیب‌دیده از طریق مسیر اتوفازی و همچنین تنظیم زمان‌بندی

عضله نعلی ایجاد نکردند. آنزیم AMPK در تنظیم سوخت و ساز اسیدهای چرب اهمیت دارد، ولی تأثیر آن بر تنظیم بیوژنز میتوکندریایی عضله در شرایط استراحت و ورزش با تناقض مواجه است (۲۰). البته پژوهشگران دیگری هم نشان داده‌اند که تمرین ورزشی شدید با وجود بهبود حساسیت انسولینی نمی‌تواند پیام‌رسانی AMPK در عضله اسکلتی را تغییر دهد (۲۱). این مسئله پیشنهاد می‌کند که شاید بهبود سوخت و ساز مستقل از عملکرد و بیوژنز میتوکندری اتفاق می‌افتد و تغییر بیان پروتئین‌های میتوکندری لزوماً دلیل بر تغییر عملکرد میتوکندری نیستند و از سویی، تغییر عملکرد میتوکندری‌ها هم می‌تواند به‌طور مستقل از تغییر بیان پروتئین‌های آنها اتفاق بیافتد (۲۲). بنابراین تفسیر تغییرات تمام پروتئین‌های تخلیص شده در این پژوهش به عنوان سازگاری دستگاه‌های زیر سلولی مانند میتوکندری، شاید خیلی هم صحیح نباشد.

علاوه بر این، افزایش سوخت و ساز مرتبط با HIIT در هر گونه تار عضلانی به صورت ویژه اتفاق می‌افتد و به دلیل آستانه بالای شدت فراخوانی تارهای نوع II که فقط در طی HIIT به‌طور کامل به کار گرفته می‌شوند. بنابراین تصور می‌شود که شاید انتخاب عضله نعلی (عمدتاً قرمز و کند انقباض) برای مطالعه تأثیر تمرین HIIT و از جمله در مورد AMPK هم خیلی مناسب نبوده است.

از سویی باید اشاره شود که پس از تمرینات HIIT، معمولاً غلظت لاکتات در حین هر جلسه تمرین متعاقب، کاهش دارد و بنابراین پیش‌بینی می‌شود که فعال‌سازی AMPK به دلیل وابسته بودن به pH (۲۳)، کاهش یابد. همچنین پیام‌رسانی AMPK در عضله وابسته به تغییر غلظت واسطه‌های سوخت و سازی و شارژ انرژی می‌باشد و در وضعیت تخلیه ATP، فعال‌سازی می‌شود (۲۴). بنابراین به دلیل نمونه‌برداری عضلانی این پژوهش در حالت استراحت و محتمل نبودن کاهش شارژ انرژی سلولی، مشاهده عدم تفاوت آن در بین گروه‌ها منطقی است و پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های مشابه آینده، نمونه‌گیری بلافاصله پس از پایان یک جلسه فعالیت حاد انجام شود.

در بخش دیگری از نتایج مشاهده شد که چاقی سبب کاهش مقدار پروتئین NRF2 عضله نعلی شد و تنها تمرین HIIT (در گروه‌های چاق + HIIT و چاق توأم) سبب جبران این کاهش شد (Q10 تأثیر نداشت). لازم

مصرف Q10 مرتبط باشد. بدین ترتیب، این پژوهش با وجود محدودیت‌هایی مانند عدم بررسی تفکیکی در تارهای سفید و قرمز عضله، عدم اندازه‌گیری شاخص‌های مرتبط با عملکرد میتوکندری، مدت نسبتاً اندک دوره مداخله، عدم بررسی جذب Q10 به میتوکندری‌ها و مهمتر از همه عدم اندازه‌گیری ترکیب‌بندی و ظرفیت هوازی موش‌های صحرایی نشان داد که احتمالاً چاقی بیوژنز میتوکندری عضله اسکلتی را تضعیف می‌کند. اگرچه که شاید در شرایط چاقی فقط شکافت میتوکندری‌های معیوب بدون تغییر در بیوژنز، افزایش یابد. در عوض انتظار می‌رود که مکمل Q10 تا حدی و تمرین HIIT با احتمال بیشتر، سبب جبران آثار چاقی بر پیام‌رسانی مولکول‌های دخیل در بیوژنز میتوکندری و همچنین محتوای میتوکندری‌های عضله نعلی شوند. با این حال، به دلیل کمبود شواهد مشابه به ویژه در جمعیت انسانی و همچنین محدودیت‌های مذکور، همچنان نیاز به پژوهش بیشتر باقی است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی از زحمات کلیه دستیاران پژوهش اعلام می‌گردد. پژوهش حاضر مستخرج از رساله دکتری م.ر. به راهنمایی ج.ب و مشاوره ر.پ.ج و ح.پ است که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام شده است.

منابع

1. Bishop D, Botella J, Genders A, Lee M, Saner N, Kuang J, et al. High-Intensity Exercise and Mitochondrial Biogenesis: Current Controversies and Future Research Directions. *Physiology* (Bethesda, Md). 2019;34(1):56-70.
2. Islam H, Bonafiglia JT, Granata C, Gurd BJ. Exercise-Induced Mitochondrial Biogenesis: Molecular Regulation, Impact of Training, and Influence on Exercise Performance. *The Routledge Handbook on Biochemistry of Exercise*: Routledge; 2020. p. 143-61.
3. de Brito Monteiro L, Davanzo GG, de Aguiar CF, Moraes-Vieira PM. Using flow cytometry for mitochondrial assays. *MethodsX*. 2020;7:100938.
4. Granata C, Jamnick NA, Bishop DJ. Principles of exercise prescription, and how they influence exercise-induced changes of transcription factors and other regulators of mitochondrial biogenesis. *Sports Medicine*. 2018;48(7):1541-59.

فیزیولوژیک بیان ژن‌های مختلف در عضله (۲۹) نیز داشته باشد، اما چون متغیرهای مرتبط با چرخه حیات و ساعت زیستی سلولی را اندازه‌گیری نشده است، هنوز باید پژوهش‌های بیشتری در این زمینه انجام شوند. علاوه بر این، افزایش بیوژنز میتوکندریایی ناشی از HIIT علاوه بر AMPK، PGC-1 α و SIRT1، همچنین از طریق مسیرهای ROS و دستکاری هومئوستاز کلسیم هم روی می‌دهد که بایستی در تفسیر سازوکارهای مربوطه در نظر گرفته شوند (۳۰).

در بخش دیگر نتایج مشاهده شد که چاقی سبب کاهش مقدار پروتئین Tfam عضله نعلی می‌شود، ولی هیچ یک از مداخلات قادر به جبران کاهش مقدار این پروتئین در موش‌های صحرایی چاق نبودند. ولی در یک پژوهش سطوح Tfam در شرایط افزایش ظرفیت اکسایشی ناشی از تمرین بیشتر شد (۳۱). در یک پژوهش اخیر (۳۲) نیز، مکمل Q10 تأثیری بر بیان mRNA مربوط به Tfam و PGC1 α و همچنین انرژی زیستی عضله اسکلتی نداشت. البته عدم افزایش سطوح Tfam در عضله اسکلتی دارای ظرفیت اکسایشی پایین قبلاً هم تأیید شده است (۳۳). بنابراین تصور می‌شود که احتمالاً ظرفیت اکسایشی موش‌های صحرایی نر در اثر تمرین HIIT یا مصرف Q10، تا حدی افزایش نیافته بود که بتواند با افزایش چشمگیر در مقدار Tfam در عضله نعلی همراه شود. ولی به دلیل عدم اندازه‌گیری ظرفیت اکسایشی، شفاف‌سازی دقیق این نکته مقدور نشد و نیازمند بررسی بیشتر در آینده می‌باشد.

در کل در پژوهش حاضر اثرات زیادی در مورد Q10 در یافته‌ها مشاهده نشد که البته طبیعی و مورد انتظار است. چون بیشتر Q10 به بیماران و سالمندان تجویز می‌شود (۱۰) و قابلیت تجمع آن در میتوکندری هم به دلیل چربی دوستی و وزن مولکولی بالا محدود است. بنابراین می‌توان تصور نمود که شاید جذب پایین آن در میتوکندری‌های عضله نعلی موش‌های صحرایی، مسئول اثرات کمتر آن نسبت به HIIT در تمام متغیرهای مورد اندازه‌گیری باشد. همچنین ضد اکسایندگی‌های درون‌زاد و Q10 بیشتر با افزایش عملکرد میتوکندری‌ها مرتبط هستند (۳۲). بنابراین شاید افزایش کمتر محتوای میتوکندری عضله نعلی با وجود افزایش‌های معنادار در شاخص‌های مربوط به بیوژنز، به افزایش عملکرد میتوکندری‌ها به جای بیوژنز میتوکندری در اثر

16. Boyd JC, Simpson CA, Jung ME, Gurd BJ. Reducing the Intensity and Volume of Interval Training Diminishes Cardiovascular Adaptation but Not Mitochondrial Biogenesis in Overweight/Obese Men. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e68091.
17. Jacobs RA, Flück D, Bonne TC, Bürgi S, Christensen PM, Toigo M, et al. Improvements in exercise performance with high-intensity interval training coincide with an increase in skeletal muscle mitochondrial content and function. *Journal of Applied Physiology*. 2013;115(6):785-93.
18. Lee J, Zhang X. Physiological determinants of VO₂max and the methods to evaluate it: A critical review. *Science & Sports*. 2021.
19. Bishop DJ, Granata C, Eynon N. Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2014;1840(4):1266-75.
20. O'Neill HM, Holloway GP, Steinberg GR. AMPK regulation of fatty acid metabolism and mitochondrial biogenesis: Implications for obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013;366(2):135-51.
21. Clark SA, Chen Z-P, Murphy KT, Aughey RJ, McKenna MJ, Kemp BE, et al. Intensified exercise training does not alter AMPK signaling in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2004;286(5):E737-E43.
22. Jacobs RA, Siebenmann C, Hug M, Toigo M, Meinild AK, Lundby C. Twenty-eight days at 3454-m altitude diminishes respiratory capacity but enhances efficiency in human skeletal muscle mitochondria. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(12):5192-200.
23. Vancura A, Nagar S, Kaur P, Bu P, Bhagwat M, Vancurova I. Reciprocal regulation of AMPK/SNF1 and protein acetylation. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(11):3314.
24. Dengler F. Activation of AMPK under hypoxia: many roads leading to Rome. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(7):2428.
25. Merry TL, Ristow M. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. *The Journal of Physiology*. 2016;594(18):5195-207.
26. Ahn B, Pharaoh G, Premkumar P, Huseman K, Ranjit R, Kinter M, et al. Nrf2 deficiency exacerbates age-related contractile dysfunction and loss of skeletal muscle mass. *Redox biology*. 2018;17:47.
27. Crilly MJ, Tryon LD, Erlich AT, Hood DA. The role of Nrf2 in skeletal muscle contractile and mitochondrial function. *Journal of Applied Physiology*. 2020;129(3):505-14.
5. Langley MR, Yoon H, Kim HN, Choi C-I, Simon W, Kleppe L, et al. High fat diet consumption results in mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and oligodendrocyte loss in the central nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(3):165630.
6. Granata C, Jammick NA, Bishop DJ. Training-Induced Changes in Mitochondrial Content and Respiratory Function in Human Skeletal Muscle. *Sports Medicine*. 2018;48(8):1809-28.
7. Bakhtiyari A, Gaeni A, Chobineh S, Kordi MR, Hedayati M. Effect of 12-weeks high-intensity interval training on SIRT1, PGC-1 α and ERR α protein expression in aged rats. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2018;5(2):95-102.
8. Pengam M, Amérand A, Simon B, Guernec A, Inizan M, Moisan C. How do exercise training variables stimulate processes related to mitochondrial biogenesis in slow and fast trout muscle fibres? *Experimental Physiology*. 2021;106(4):938-57.
9. Chis B, Chis A, Muresan A, Fodor D. Q10 Coenzyme Supplementation can Improve Oxidative Stress Response to Exercise in Metabolic Syndrome in Rats. *International journal for vitamin and nutrition research*. 2019;90(1-2):33-41.
10. Andreani C, Bartolacci C, Guescini M, Battistelli M, Stocchi V, Orlando F, et al. Combination of Coenzyme Q10 Intake and Moderate Physical Activity Counteracts Mitochondrial Dysfunctions in a SAMP8 Mouse Model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018:8936251.
11. Rodrigues B, Figueroa DM, Moštarda CT, Heeren MV, Irigoyen M-C, De Angelis KJ Cd. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology*. 2007;6(1):38-47.
12. Picard M, Gentil BJ, McManus MJ, White K, St Louis K, Gartside SE, et al. Acute exercise remodels mitochondrial membrane interactions in mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2013;115(10):1562-71.
13. Heo JW, No MH, Cho J, Choi Y, Cho EJ, Park DH, et al. Moderate aerobic exercise training ameliorates impairment of mitochondrial function and dynamics in skeletal muscle of high-fat diet-induced obese mice. *The FASEB Journal*. 2021;35(2):e21340.
14. Ebadi B, Damirchi A, Alamdari KA, Darbandi-Azar A, Naderi N. Cardiomyocyte mitochondrial dynamics in health and disease and the role of exercise training: A brief review. *Research in Cardiovascular Medicine*. 2018;7(3):107-15.
15. Pileggi CA, Parmar G, Harper ME. The lifecycle of skeletal muscle mitochondria in obesity. *Obesity Reviews*. 2021;22(5):e13164.

32. Pham T, MacRae CL, Broome SC, D'souza RF, Narang R, Wang HW, et al. MitoQ and CoQ10 supplementation mildly suppresses skeletal muscle mitochondrial hydrogen peroxide levels without impacting mitochondrial function in middle-aged men. *European Journal of Applied Physiology*. 2020;120(7):1657-69.
33. Konokhova Y, Spendiff S, Jagoe RT, Aare S, Kapchinsky S, MacMillan NJ, et al. Failed upregulation of TFAM protein and mitochondrial DNA in oxidatively deficient fibers of chronic obstructive pulmonary disease locomotor muscle. *Skeletal muscle*. 2016;6(1):1-16.
28. Gurd BJ, Little JP, Perry CG. Does SIRT1 determine exercise-induced skeletal muscle mitochondrial biogenesis: differences between in vitro and in vivo experiments? *Journal of Applied Physiology*. 2012;112(5):926-8.
29. Xu C, Wang L, Fozouni P, Evjen G, Chandra V, Jiang J, et al. SIRT1 is downregulated by autophagy in senescence and ageing. *Nature Cell Biology*. 2020;22(10):1170-9.
30. Torma F, Gombos Z, Jokai M, Takeda M, Mimura T, Radak Z. High intensity interval training and molecular adaptive response of skeletal muscle. *Sports Medicine and Health Science*. 2019;1(1):24-32.
31. Norrbom J, Wallman SE, Gustafsson T, Rundqvist H, Jansson E, Sundberg CJ. Training response of mitochondrial transcription factors in human skeletal muscle. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2010;198(1):71-9.