

تأثیر تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط نورموکسی و هایپوکسی بر بیان ژن‌های دخیل در میتوفاژی کبد موشهای نر ویستار تحت رژیم غذایی پرچرب

فائقه قاسمی^۱، حمید محبی^۲

چکیده

اهداف: مصرف رژیم غذایی پرچرب منجر به اختلال در عملکرد میتوکندری کبد و بروز اختلالات کبد چرب می‌شود و میتوفاژی که در حذف میتوکندری‌های آسیب دیده نقش دارد احتمالاً بتواند در بهبود کبدچرب غیرالکلی مؤثر باشد. هدف از پژوهش حاضر، تعیین اثر تغذیه، تمرین و هایپوکسی بر میتوفاژی کبد در موش صحرایی نر ویستار بود.

روش مطالعه: ۳۲ سر موش صحرایی نر به‌طور تصادفی به چهار گروه ۸ تایی شامل گروه‌های رژیم غذایی نرمال (ND)، رژیم غذایی پرچرب (HFD)، رژیم غذایی پرچرب و تمرین در شرایط نورموکسی (HFD-HIIT)، رژیم غذایی پرچرب و تمرین در شرایط هایپوکسی (HFD-HHIIT) تقسیم شدند. پس از تعیین حداکثر سرعت هوایی (MAV) در شرایط نورموکسی (ارتفاع حدود ۵۰ متر) و هایپوکسی - هایپوباریک (ارتفاع حدود ۳۰۰۰ متر)، پروتکل HIIT به مدت ۱۲ هفته و ۳ جلسه در هفته اجرا شد که شامل اجرای ۳ تا ۸ مرحله فعالیت ۴ دقیقه‌ای با شدتی معادل ۸۰ تا ۹۳ درصد MAV و با دوره‌های استراحت فعال ۲ دقیقه‌ای با شدت ۵۰ درصد MAV بود. در پایان، سطوح بیان ژن‌های HIF-1 α ، Parkin و Fundc1 به روش RT-PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بیان ژن‌های Parkin و Fundc1 در دو گروه HFD+HIIT و HFD+HHIIT نسبت به HFD افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). همچنین، بیان این دو ژن در گروه HFD-HHIIT افزایش معنی‌داری نسبت به گروه HFD-HIIT نشان داد ($P < 0.05$). محتوای چربی کبدی و بیان ژن HIF-1 α در دو گروه HFD-HIIT و HFD-HHIIT نسبت به HFD کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد، تمرین در شرایط هایپوکسی در مقایسه با نورموکسی تأثیر مازادی بر افزایش میتوفاژی کبد و به دنبال آن کنترل محتوای چربی کبدی دارد.

واژه‌های کلیدی: تمرین تناوبی با شدت بالا، هایپوکسی، میتوفاژی، کبد چرب غیر الکلی، رژیم غذایی پرچرب

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

^۲ استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. نویسنده مسئول: mohebbi@guilan.ac.ir

مقدمه

امروزه سبک زندگی مدرن که همراه با کم‌تحرکی و افزایش مصرف رژیم غذایی پرچرب است منجر به افزایش بروز بیماری‌های متابولیکی از جمله اختلالات کبدی می‌شود (Jump, 2011). مطالعات نشان داده‌اند که مصرف مداوم غذاهای پرچرب منجر به افزایش تری‌گلیسیرید کبدی و اختلال در متابولیسم کبدی می‌شود (Roberts & Markby, 2021). متابولیسم لیپید توسط میتوکندری که در سلول‌های پارانشیم کبد قرار دارد، تنظیم می‌شود (Asrani et al. 2019). نشان داده شده است که افزایش مصرف رژیم غذایی پرچرب، منجر به تغییر عملکرد میتوکندری کبد می‌گردد (Roberts & Markby, 2021). به همین دلیل، در بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD)^۱ اختلال عملکرد میتوکندری در سلول‌های کبدی مشاهده می‌شود (Roberts & Markby, 2020; Larson-Casey et al. 2020). سیستم کنترل کیفیت میتوکندری (MQC)^۲، شامل تنظیم پیچیده چندین فرآیند مانند پروتئوستاز^۳، بیوژنز^۴، پویایی (شکافت^۴ و همجوشی^۵) و میتوفاژی است که همه آنها برای حفظ هموستاز سلولی ضروری هستند (Larson-Casey et al. 2020). اختلال در فرآیندهای کنترل کیفیت منجر به اختلال عملکرد میتوکندری می‌شود (Gastaldelli, 2017). یکی از جنبه‌های کلیدی تنظیم هموستاز میتوکندری، از بین بردن میتوکندری آسیب دیده از طریق میتوفاژی است (Lee & Kim, 2014). مطالعات نشان می‌دهند مصرف رژیم غذایی پرچرب می‌تواند میتوفاژی کبد را کاهش دهد و فعالیت پروتئین‌های مرتبط با میتوفاژی که در حذف میتوکندری‌های آسیب دیده نقش دارد را مختل کند (Cioffi et al. 2022; Undamatla et al. 2023). همچنین، میتوفاژی معیوب با یک سری از فنوتیپ‌های مرتبط با NAFLD از جمله تجمع چربی، استرس اکسیداتیو بالا و التهاب مرتبط است (Ma et al. 2020). در حال حاضر، مسیرهای اصلی سیگنال‌دهی میتوفاژی ناشی از استرس شامل مسیر سیگنالینگ وابسته به PINK1^۶ (کیناز فرضی ۱ ناشی از Parkin/PTEN (لیگازهای یوئیکوئیتین E3) و همچنین مسیر غیروابسته به Parkin می‌باشد (Ni et al. 2015; Youle & Narendra, 2011). تجمع PINK1 می‌تواند باعث انتقال Parkin از سیتوزول به میتوکندری آسیب دیده شود که نشان‌دهنده پیشرفت میتوفاژی است (Narendra et al. 2010) و مسیر دیگر در میتوفاژی که مستقل از Parkin می‌باشد شامل چندین پروتئین گیرنده میتوفاژی روی میتوکندری می‌باشد که یکی از مهم‌ترین آن‌ها Fun14 دامنه حاوی 1 (FUNDC1)^۷ می‌باشد که در پاسخ به هایپوکسی در میتوفاژی نقش دارد و بسیار انتخابی عمل می‌کند و میتوکندری‌های ناکارآمد را فقط در شرایط هایپوکسیک از بین می‌برد (Liu et al. 2012). بنابراین، محرک‌های خارجی مانند هایپوکسی، محرومیت از مواد مغذی^۸ و فعالیت ورزشی سبب افزایش فعالیت میتوفاژی می‌شود و فعال شدن میتوفاژی منجر به پاکسازی میتوکندری‌های ناکارآمد می‌شود (Ke, 2020).

امروزه مزایای استفاده از تمرینات ورزشی به‌منظور بهبود و درمان غیردارویی برای بیماری‌های متابولیکی به خوبی نشان داده شده است به‌طوری‌که تمرینات ورزشی یکی از راهبردهای امیدوارکننده برای مقابله با بیماری‌های

¹ Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)

² Mitochondrial Quality Control (MQC)

³ Proteostasis

⁴ Fission

⁵ Fusion

⁶ Kinase PTEN-Induced Putative Kinase Protein 1

⁷ FUN14 Domain Containing 1

⁸ Nutrient Deprivation

کبدی می‌باشد (Roberts & Markby.2021, Takahashi et al.2018). تمرینات ورزشی پروتئین-های سلولی و میتوکندریایی کبد را که مربوط به سیگنالینگ کنترل کیفیت میتوکندریایی هستند را افزایش می‌دهد که می‌تواند باعث بازسازی میتوکندری کبد و نوسازی سلول‌های کبدی شود (Santos-Alves et al.2015). با وجود این، دوزهای بهینه تمرینات ورزشی بر اساس مدت و شدت برای پیشگیری یا درمان بیماری‌های کبدی مشخص نشده است. با این حال، مطالعات نشان داده‌اند شدت عاملی اثرگذارتری نسبت به مدت و یا حجم کلی تمرین در بهبود علائم NAFLD می‌باشد (Kistler et al.2011). اگرچه، مطالعه‌ای روی بافت کبد تأثیر تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT)^۱ را بر میتوفاژی را بررسی نکرده است. با این حال، مطالعه روی بافت عضله نشان می‌دهد که تمرین HIIT در مقایسه با تمرین تداومی با شدت متوسط منجر به فعال-سازی بیشتر مسیر AMPK می‌شود و پروتئین‌های مرتبط با بیوژنز میتوکندری و میتوفاژی عضله را بیشتر افزایش می‌دهد (C. Han et al.2022). میتوفاژی و بیوژنز میتوکندری باید به دقت تنظیم شود تا تعادل بین حذف میتوکندری‌های آسیب دیده و ایجاد میتوکندری‌های جدید برقرار شود و اختلال در این تعادل می‌تواند منجر به کاهش ظرفیت سازگاری مثبت در پاسخ به ورزش شود (Roberts & Markby.2021). علاوه بر تمرینات ورزشی، شواهد نشان می‌دهند هایپوکسی نیز می‌تواند میتوفاژی را فعال کند (M. Chen et al.2016, Ke.2020). در مطالعه‌ای روی بافت کبد نشان داده شد که قرار گرفتن طولانی مدت در چرخه‌های هایپوکسی و نورموکسی باعث افزایش محتوای DNA میتوکندری (mtDNA) کبد در موش صحرائی می‌شود (Luo et al.2013). در مطالعه‌ای دیگر اثر ۸ هفته اقامت در ارتفاع بالا (۴۳۰۰ m) در موش‌های مبتلا به کبد چرب غیرالکلی ناشی از چاقی منجر به افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بیوژنز میتوکندری، عملکرد تنفسی میتوکندری و محتوای DNA میتوکندریایی در گروه رژیم غذایی پرچرب در ارتفاع بالا نسبت به گروه رژیم غذایی پرچرب در ارتفاع پایین شد (Song et al. 2020). مطالعاتی در رابطه با فعالیت ورزشی در شرایط هایپوکسی همراه با رژیم پرچرب بر میتوفاژی کبد انجام نگرفته است و بیشتر مطالعات انجام شده تاکنون مربوط به بافت‌های دیگر مثل عضله اسکلتی می‌باشد که نشان داده شده است هایپوکسی با فعال کردن HIF-1 α منجر به فسفوریله شدن AMPK می‌شود که می‌تواند مسیر میتوفاژی را فعال کند (Roberts & Markby.2021). از آنجایی که، مطالعات بیان کرده‌اند که افزایش میتوفاژی کبدی از سلول‌های کبدی در برابر آسیب محافظت می‌کند و از پیشرفت بیماری‌های کبدی جلوگیری می‌کند، بنابراین نشان می‌دهد که فعال-سازی دقیق میتوفاژی به طور بالقوه نشان دهنده یک استراتژی منطقی برای جلوگیری از توسعه بیماری‌های کبدی است (Ke.2020). به همین دلیل، در این پژوهش ما قصد داریم اثر تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) در شرایط هایپوکسی هیپوباریک و نورموکسی بر میتوفاژی کبد (هر دو مسیر وابسته به Parkin/PINK1 و میتوفاژی مستقل از Parkin/PINK1) در رت‌های نر و بیستار تحت رژیم غذایی پرچرب را مورد بررسی قرار دهیم.

روش‌شناسی تحقیق

پژوهش حاضر از نوع بنیادی و به روش تجربی بود. ۳۲ سر موش صحرائی نر نژاد بیستار (۶ هفته سن) با وزن $167/25 \pm 12/65$ گرم از موسسه پاستور (کرج، ایران) خریداری و به آزمایشگاه جانوری دانشکده تربیت بدنی و

¹ High Intensity Interval Training

علوم ورزشی دانشگاه گیلان منتقل شدند. حیوانات در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد، چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، رطوبت نسبی ۵۰ درصد و با دسترسی آزاد آب و غذا، در قفس‌های ۴ تایی نگهداری شدند. تمامی مداخلات حیوانی مطابق با دستورالعمل‌های اخلاقی مؤسسات ملی برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته اخلاق پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی تهران (با کد IR.SSRC.REC.1401.128) انجام شد. پس از یک هفته آشناسازی و سازگاری رت‌ها با محیط جدید به طور تصادفی به چهار گروه هشت تایی شامل: کنترل با رژیم غذایی نرمال (ND)، کنترل با رژیم غذایی پرچرب (HFD)، تمرین HIIT در شرایط نورموکسی (HFD-HIIT)، تمرین HIIT در شرایط هایپوکسی (HFD-HHIIT) تقسیم شدند. رژیم غذایی نرمال برای گروه کنترل سالم در این پژوهش شامل ۱۰٪ کیلوکالری از چربی، ۲۰٪ کیلوکالری از پروتئین و ۷۰٪ کیلوکالری از کربوهیدرات بود و رژیم غذایی پرچرب شامل ۶۰٪ کیلوکالری از چربی، ۲۰٪ کیلوکالری از پروتئین و ۲۰٪ کیلوکالری از کربوهیدرات بود (Ito et al.2007Pino-de la Fuente et al.2019). غذای پرچرب به سفارش پژوهشگر توسط انستیتو سرم سازی رازی تهیه شد و چربی اضافه شده به رژیم غذایی از روغن حیوانی (چربی گوسفند) بود. گروه‌های تمرینی (HFD-HIIT و HFD-HHIIT) ۳ جلسه در هفته و به مدت ۱۲ هفته به فعالیت بر روی نوارگردان در شرایط نورموکسی و هایپوکسی پرداختند. همچنین، رت‌های گروه‌های کنترل (ND و HFD) در طول این ۱۲ هفته هیچ نوع برنامه تمرینی را دریافت نکردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، تمامی رت‌ها با استفاده از ترکیب داروی کتامین- زایلازین بی‌هوش شده و بافت کبد سریعاً جدا و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی در میکروتیوب‌های عاری از RNAase و DNAase (جهت جلوگیری از هرگونه آلودگی برای انجام تلخیص mRNA و RT-PCR) قرار داده شد و فوراً در نیتروژن مایع در دمای -80 منجمد گردید. بخش دیگری از بافت کبدی در فالكون‌های حاوی فرمالین ۱۰ درصد برای عکس‌برداری توسط روش رنگ‌آمیزی Oil Red قرار داده شد. همچنین وزن بدن رت‌ها در طول مداخله هر هفته کنترل شد.

پروتکل تمرین HIIT در شرایط نورموکسی و هایپوکسی

پس از یک هفته آشناسازی، رت‌های گروه‌های تمرینی با راه رفتن و دویدن روی نوارگردان (با سرعت ۱۲ متر بر دقیقه و شیب صفر درجه به مدت ۱۰ دقیقه در روز) (Jendzjowsky & DeLorey)، حداکثر سرعت هوازی^۱ (MAV) رت‌ها برای تعیین شدت تمرینات ورزشی، به دلیل عدم دسترسی به دستگاه تجزیه و تحلیل گازهای تنفسی در این پژوهش، از پروتکل غیر مستقیم فعالیت روی نوارگردان و بدون شیب برآورد شد. بدین منظور سرعت نوار گردان در سه دقیقه ابتدایی 10 m/min بود و پس از آن هر سه دقیقه 5 m/min به سرعت نوارگردان اضافه شد و این پروتکل ادامه یافت تا علی‌رغم شوک الکتریکی حیوانات دیگر قادر به دویدن نبودند (Colak et al.2021). در شرایط هایپوکسی نیز پروتکل مشابه اجرا شد با این تفاوت که سرعت نوارگردان در سه دقیقه نخست 5 m/min بود. سرعت ثبت شده احتمالاً بیانگر حالتی است که VO_2 در آن به فلات می‌رسد. پروتکل تمرین HIIT به مدت ۱۲ هفته، هر هفته ۳ جلسه به صورت غیر متوالی به صورت پیش‌رونده با شیب صفر درجه اجرا شد که برگرفته از پروتکل تعدیل شده احمدی و همکاران (۲۰۲۱) بود (Ahmadi et al.2021). در ابتدا و انتهای برنامه‌های تمرینی، گرم کردن و سرد کردن به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۸ متر در

¹ Maximal Aerobic Velocity

دقیقه انجام شد. پروتکل HIIT شامل اجرای ۳-۸ مرحله فعالیت ۴ دقیقه‌ای با شدت ۸۰ تا ۹۳ درصد MAV و با دوره‌های استراحتی فعال ۲ دقیقه‌ای با شدت ۵۰ درصد MAV بود که تعداد وهله‌های تمرین به صورت پیش رونده تا پایان هفته دوازدهم افزایش می‌یافت (جدول ۱). به منظور حفظ شدت مناسب تمرین در پایان هفته‌های چهارم و هشتم آزمون حداکثر سرعت هوازی مجدداً اجرا شد. در این پژوهش برای ایجاد شرایط هایپوکسی و کاهش فشار اکسیژن مطابق آنچه در ارتفاع رخ می‌دهد از روش کاهش فشار هوا (هایپوکسی هیپوباریک) استفاده شد (SaiRam et al. 1998, Maiti et al. 2008, Flores et al. 2020). برای این منظور از اتاقک کم-فشار شبیه‌سازی شده ارتفاع معادل ۳۰۰۰ متر (فشار جو: ۶۹۷ mmHg، فشار سهمی اکسیژن: ۱۴/۴ درصد) در دانشگاه گیلان استفاده شد (Hosseini et al. 2023).

جدول ۱. جزئیات تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT)

هفته	حداکثر سرعت هوازی (MAV%)	زمان (دقیقه)	تکرار	سرعت استراحت فعال (MAV%)	زمان استراحت فعال (دقیقه)
۱	٪۸۰	۴	۳	٪۵۰	۲
۲	٪۸۰	۴	۳	٪۵۰	۲
۳	٪۹۳	۴	۴	٪۵۰	۲
۴	٪۹۳	۴	۵	٪۵۰	۲
۵	٪۹۳	۴	۵	٪۵۰	۲
۶	٪۹۳	۴	۵	٪۵۰	۲
۷	٪۹۳	۴	۶	٪۵۰	۲
۸	٪۹۳	۴	۶	٪۵۰	۲
۹	٪۹۳	۴	۷	٪۵۰	۲
۱۰	٪۹۳	۴	۷	٪۵۰	۲
۱۱	٪۹۳	۴	۸	٪۵۰	۲
۱۲	٪۹۳	۴	۸	٪۵۰	۲

استخراج RNA و رونویسی معکوس Real Time –PCR

برای سنجش بیان ژن‌های HIF-1 α ، Parkin، و Fundc1 از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real-Time PCR) استفاده شد و در هر گروه ۳ نمونه به صورت تصادفی برای سنجش بیان این ژن‌ها انتخاب شد. برای تعیین میزان بیان ژن‌ها و استخراج RNA از کیت سیناکلون ساخت کشور ایران (Cat No EX6101) و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، Nano drop مدل Thermo scientific ساخت کشور آمریکا بررسی شد. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت سینا کلون ساخت کشور ایران (Cat No RT5201) استفاده شد. توالی ژن‌ها از سایت NCBI دریافت شده و برای ژن‌های HIF-1 α ، Parkin، Fundc1 و ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع از طریق نرم افزار primer3 plus آغازگرهای اختصاصی طراحی شد (جدول ۲). برای تکثیر قطعات از مستر میکس RT-PCR شرکت سیناکلون

ساخت کشور ایران (MM2062 Cat No) طبق دستورالعمل آن استفاده شد. برنامه تکثیر قطعات cDNA در دستگاه RT-PCR Rotorgen Q ساخت کشور آمریکا استفاده شد و به صورت واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت سه دقیقه، ۴۰ سیکل تکثیر با واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اختصاصی اتصال آغازگر به مدت ۲۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در انتها محاسبه نقطه ذوب محصولات از دمای ۶۵ تا ۹۵ درجه تنظیم شد. کارایی تکثیر برای هر آغازگر به صورت جداگانه محاسبه و کارایی بین ۹۰ تا ۱۱۰ برای محاسبه بیان هر ژن مطلوب در نظر گرفته شد. صحت ساخت cDNA، با ژن GAPDH و با مستر میکس آماده شرکت سیناکلون (Cat No MM2062) مورد سنجش قرار گرفت. برای کنترل متغیرها تمام داده‌های PCR در مقابل بیان ژن GAPDH نرمال سازی و سطح بیان نسبی mRNA ژن‌های هدف با استفاده از معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ از روش لیواک^۱ استفاده شد (Livak & Schmittgen, 2001).

جدول ۲. مشخصات و توالی آغازگرهای استفاده شده در پژوهش

ژن	توالی آغازگرها
HIF-1 α	GCGATGACACGGAAACTGAA-3' -F 5' TCTTGAATCTGGGGCATGGT-3' -R 5'
Parkin	CACACCCAACCTCAGACAAG-3' -F 5' CGATCGTTGAGCCTTGTGAC-3' -R 5'
Fundc1	CCCCTCCCCAAGACTATGAG-3' -F 5' AGTCACGCCACCCATTACTA-3' -R 5'
GAPDH	AACGACCCCTTCATTGACCT-3' -F 5' CCCATTGTGATGTTAGCGGG-3' -R 5'

سنجش محتوی چربی کبد

برای سنجش محتوی چربی کبد با استفاده از عکس برداری نمونه‌ها از روش رنگ‌آمیزی Oil Red استفاده شد و در هر گروه با استفاده از میکروسکوپ نوری و فلورسنت شرکت Germany-AXIOM مدل BM-600 LED EPI FLURESCENT و دوربین میکروسکوپ Mshot ساخت کشور چین و نرم‌افزار image J مساحت و تعداد قطرات چربی ذخیره شده در کبد مورد ارزیابی قرار گرفت.

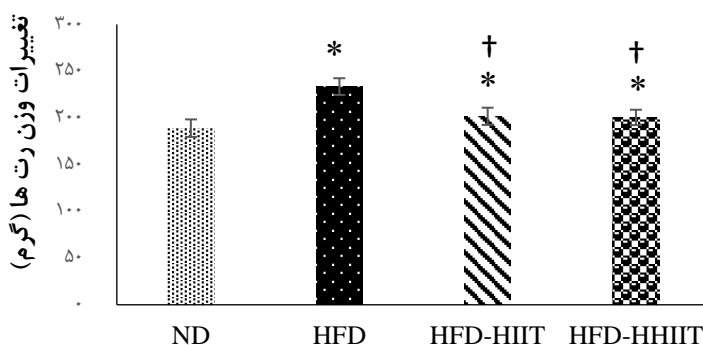
تحلیل آماری

برای گزارش توصیفی داده‌ها از آمار توصیفی (میانگین و انحراف استاندارد) استفاده شد. پس از این که نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیروویلیک تأیید شد، از آزمون تحیل واریانس یک طرفه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد و برای مقایسه تغییرات بین گروهی از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده گردید. اطلاعات مورد نیاز پس از جمع‌آوری، توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ در سطح معنی‌داری حداقل $P < 0.05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

¹ Livak

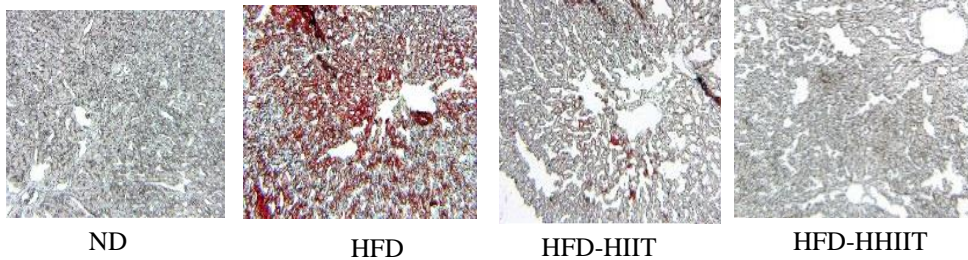
یافته‌ها

تغییرات وزن رت‌ها پس از مداخلات تغذیه‌ای و تمرینی در طول اجرای پروتکل در نمودار ۱ آمده است. نتایج تحلیل داده‌ها نشان داد که وزن بدن رت‌ها به طور پیوسته در همه گروه‌ها افزایش داشت. با این حال، رژیم غذایی پرچرب منجر به افزایش معنی‌دار در وزن رت‌ها (۲۳/۵۴ درصد) در گروه HFD نسبت به گروه ND شد ($P=0/001$). مقادیر وزن بدن رت‌ها در گروه‌های تمرینی HFD-HIIT و HFD-HHIIT (به ترتیب در حدود ۶/۷ درصد و ۶/۰۸ درصد) افزایش نسبت به گروه ND نشان داد. همچنین، هر دو گروه HFD-HIIT و HFD-HHIIT نسبت به HFD کاهش معنی‌داری (به ترتیب در حدود ۱۳/۶۳ درصد، ۱۴/۱۳ درصد) را نشان دادند ($P=0/001$). با وجود این، بین گروه‌های تمرینی (HFD-HIIT و HFD-HHIIT) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

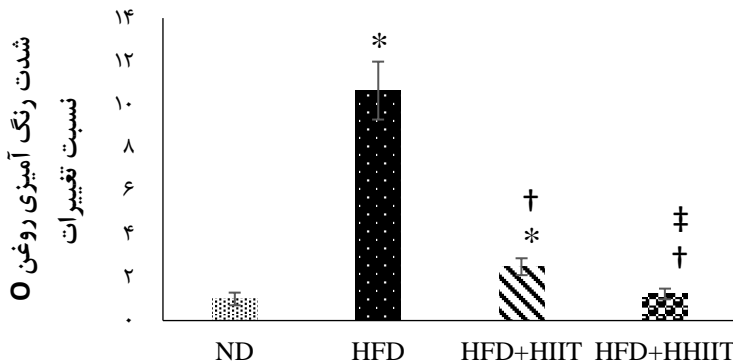


نمودار ۱. تغییرات وزن رت‌ها در گروه‌های مختلف پژوهش. ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD-HIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط نورموکسی، HFD-HHIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط هایپوکسی. * تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه ND؛ † تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه HFD ($P<0/05$).

همچنین، بر اساس نتایج کیفی (شکل ۱) و کمی (نمودار ۲) با روش رنگ آمیزی Oil Red Oil Stain مشخص شد که محتوای چربی کبد رت‌ها در گروه رژیم غذایی پرچرب افزایش ۱۰/۶۴ برابری نسبت به گروه ND داشت ($P=0/001$). همچنین، محتوای چربی کبد رت‌ها در هر دو گروه تمرینی کاهش معنی‌داری را (HFD-HIIT: ۷۶/۵۸ درصد، HFD-HHIIT: ۸۸/۴۲ درصد) نسبت به گروه HFD نشان داد ($P=0/001$). با وجود این، گروه HFD-HHIIT نسبت به گروه HFD-HIIT کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P=0/001$). با این حال، بین گروه HFD-HHIIT و گروه ND تفاوت معنی‌داری در کاهش محتوای چربی کبدی وجود نداشت.

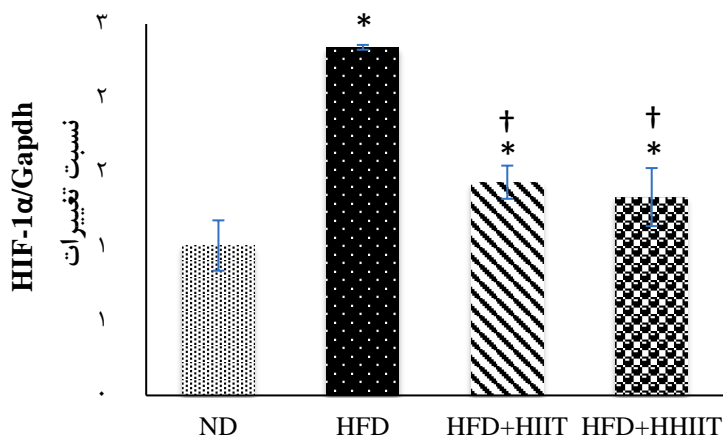


شکل ۱. رنگ آمیزی به روش Oil-Red بافت کبد در گروه‌های مختلف پژوهش. ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD-HIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط نورموکسی، HFD-HHIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط هایپوکسی.



نمودار ۲. محتوای چربی کبد رت‌ها در گروه‌های مختلف پژوهش. ND: رژیم غذایی استاندارد، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD-HIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط نورموکسی، HFD-HHIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط هایپوکسی * تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه ND؛ † تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه HFD؛ ‡ تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه HFD-HIIT ($P < 0.05$).

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که رژیم غذایی پرچرب منجر به افزایش معنی‌داری در بیان ژن HIF-1 α در گروه HFD نسبت به گروه ND می‌شود ($P = 0.001$). همچنین، دو گروه تمرین کاهش معنی‌داری را بر سطوح ژن HIF-1 α (HFD-HIIT: ۳۸/۷۴ درصد، HFD-HHIIT: ۴۳/۰۲ درصد) نسبت به گروه رژیم غذایی پرچرب نشان دادند ($P = 0.001$). درحالی که تغییرات بین گروه‌های تمرینی HFD-HIIT و HFD-HHIIT در مقادیر بیان ژن HIF-1 α معنی‌دار نبود (نمودار ۳).

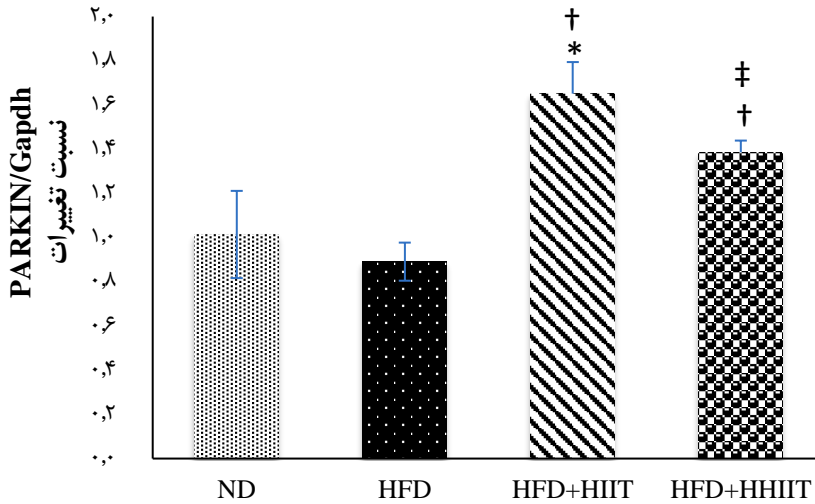


نمودار ۳. مقادیر بیان ژن HIF-1α بافت کبد در گروه‌های مختلف پژوهش. ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD-HIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط نورموکسی، HFD-HHIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط هایپوکسی. * تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه ND؛ † تفاوت معنی‌دار نسبت HFD. ($P < 0.05$).

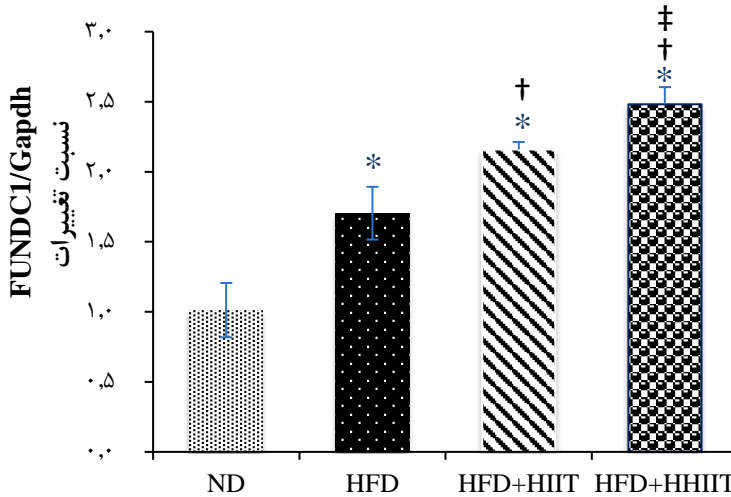
همچنین، بیان ژن Parkin در گروه رژیم غذایی پرچرب کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه ND نشان نداد. با این حال، گروه‌های تمرینی HFD-HIIT و HFD-HHIIT نسبت به گروه HFD افزایش معنی‌داری را نشان دادند ($P < 0.05$). همچنین، کاهش معنی‌داری در گروه HFD-HHIIT نسبت به گروه HFD-HIIT در مقادیر بیان ژن Parkin مشاهده شد ($P = 0.001$). (نمودار ۴). از طرفی، رژیم غذایی پرچرب افزایش معنی‌داری را بر بیان ژن FUNDC1 کبد در گروه‌های HFD و گروه‌های تمرینی (HFD-HIIT و HFD-HHIIT) نسبت به گروه ND نشان دادند ($P < 0.05$). همچنین، افزایش معنی‌داری در بیان این ژن در گروه‌های تمرینی HFD-HIIT و HFD-HHIIT نسبت به گروه HFD نشان داد ($P < 0.05$) و گروه HFD-HHIIT نسبت به HFD-HIIT افزایش معنی‌داری در بیان ژن FUNDC1 کبد نشان داد ($P = 0.001$) (نمودار ۵).

بحث و بررسی:

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد تمرین HIIT به همراه مصرف رژیم غذایی پرچرب در شرایط نورموکسی و هایپوکسی توانسته است مسیر میتوفاژی کبد را با افزایش بیان ژن‌های Parkin و Fundc1 نسبت به گروه HFD افزایش و محتوای چربی کبدی را کاهش دهد. با این حال، تمرین در شرایط هایپوکسی تأثیر مازادی بر افزایش میتوفاژی کبد و به دنبال آن کنترل محتوای چربی کبدی نسبت به شرایط نورموکسی داشت.



نمودار ۴. مقادیر بیان ژن PARKIN بافت کبد در گروه‌های مختلف پژوهش. ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD-HIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط نورموکسی، HFD-HHIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط هایپوکسی. * تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه ND؛ † تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه HFD؛ ‡ تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه HFD-HIIT ($P < 0.05$).



نمودار ۵. مقادیر بیان ژن FUNDC1 بافت کبد در گروه‌های مختلف پژوهش. ND: رژیم غذایی نرمال، HFD: رژیم غذایی پرچرب، HFD-HIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط نورموکسی، HFD-HHIIT: تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط هایپوکسی. * تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه ND؛ † تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه HFD؛ ‡ تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه HFD-HIIT ($P < 0.05$).

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، وزن بدن رت‌ها به‌طور پیوسته در طول دوازده هفته در تمامی گروه‌ها افزایش یافت. با این حال، دوازده هفته رژیم غذایی پرچرب منجر به افزایش بیشتر وزن بدن (۲۳/۵ درصد) نسبت به رژیم غذایی نرمال شد. در بخش دیگر بیانگر آن بود که دوازده هفته رژیم غذایی پرچرب سبب افزایش قطرات چربی ذخیره‌شده در کبد گردید. پژوهش‌های دیگر نیز نشان دادند رژیم غذایی پرچرب سبب بروز NAFLD پس از ۱۰ تا ۱۲ هفته خواهد شد (Gauthier et al.2006).

نتایج مطالعه حاضر، با استفاده از اندازه‌گیری‌های بافت‌شناسی، نتایج مطالعات قبلی را تأیید نمود و نشان داد که کبد چرب را می‌توان با رژیم غذایی پرچرب (۶۰ درصد کالری از چربی) القا کرد. افزایش محتوی چربی کبد در گروه‌های دارای رژیم غذایی پرچرب همسو با مطالعاتی است که نشان می‌دهند سبک زندگی غیرفعال و رژیم غذایی پرچرب احتمال افزایش ابتلا به کبد چرب را افزایش می‌دهد (Undamatla et al.2023). همچنین، نتایج مطالعه حاضر نشان داد، مداخله تمرینی همراه با رژیم غذایی پرچرب در طول دوازده هفته، باعث تخفیف در افزایش چربی کبدی نسبت به گروه HFD می‌شود که همسو با مطالعه‌ی گونسالوس^۱ و همکاران می‌باشد (Gonçalves et al.2016). یکی از مکانیسم‌هایی که احتمالاً سبب تجمع چربی کمتر در کبد رت‌های گروه تمرینی شده است افزایش تام اکسیداسیون چربی‌ها به منظور مشارکت در تولید انرژی در حین تمرینات ورزشی می‌باشد (Muscella et al.2020). همچنین، همسو با مطالعه‌ی حاضر، مطالعاتی نشان می‌دهند که تمرین HIIT می‌تواند منجر به کاهش بیشتری در محتوی چربی کبد شود (Khalafi & Symonds.2021 Sabag et al.2022 Tondpa Khaghani et al.2019). از طرفی شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد که مصرف رژیم غذایی پرچرب می‌تواند میتوفاژی کبد را کاهش دهد، که فرآیندی برای حذف میتوکندری‌های آسیب‌دیده از سلول‌ها است و منجر به اختلال در کنترل کیفیت میتوکندری که نشان دهنده‌ی کاهش عملکرد میتوکندری است شود (Cioffi et al.2022 Undamatla et al.2023). با این حال، مکانیسم دقیقی که توسط آن HFD میتوفاژی کبد را کاهش می‌دهد به‌طور کامل شناخته نشده است. برخی از مطالعات نشان می‌دهند که HFD می‌تواند باعث اختلال عملکرد میتوکندری، استرس اکسیداتیو و اختلال در متابولیسم لیپید شود که می‌تواند منجر به تجمع چربی کبد و آسیب شود (Cioffi et al.2022 Yang et al.2019 Zheng et al.2023). مطالعات دیگر نشان می‌دهند که HFD می‌تواند فعالیت پروتئین‌های مرتبط با میتوفاژی، مانند PARKIN که در حذف میتوکندری‌های آسیب دیده نقش دارد را مختل کند (Undamatla et al.2023).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد رژیم غذایی پرچرب سبب کاهش (۱۲ درصدی) بیان ژن Parkin مسیر میتوفاژی کبد در گروه HFD نسبت به گروه ND گردید. اما این کاهش نسبت به گروه ND معنی‌دار نشد. در مقابل مداخله‌ی تمرین ورزشی همراه با رژیم غذایی پرچرب سبب معکوس شدن این روند و افزایش معنی‌دار نشانگرهای میتوفاژی (Parkin و FUNDC1) کبد نسبت به گروه HFD شد. اگرچه تعداد مطالعاتی که اثر تمرینات ورزشی بر روی میتوفاژی کبد را مورد بررسی قرار داده‌اند محدود می‌باشد. با این حال، مطالعه‌ی گونسالوس و همکاران (۲۰۱۶) که بر روی کبد موش‌های صحرایی که تحت دو رژیم غذایی نرمال و رژیم غذایی پرچرب (پس از ۹ هفته) بودند نشان داد که سطوح Parkin در گروه رژیم غذایی پرچرب -کم تحرک کاهش معنی‌داری نسبت به گروه رژیم غذایی نرمال -کم تحرک داشت و تمرین استقامتی همراه با رژیم غذایی

¹ Goncalves

پرچرب افزایش معنی‌داری را در سطوح بیان Parkin در مقایسه با گروه رژیم غذایی پرچرب- کم تحرک نشان داد (Gonçalves et al.2016). همچنین، مطالعات گزارش کرده‌اند که تمرینات ورزشی سازوکار کنترل کیفیت میتوکندری کبد را تنظیم می‌کند (R. Li et al.2020). تمرینات ورزشی پروتئین‌های سلولی و میتوکندریایی کبد را که مربوط به سیگنالینگ کنترل کیفیت میتوکندری هستند تعدیل می‌کند و بدین صورت می‌تواند باعث بازسازی میتوکندری کبد و نوسازی سلول‌های کبدی شود (Santos-Alves et al.2015). این عمل در بخشی از طریق افزایش میتوفاژی با حذف انتخابی میتوکندری‌های آسیب دیده صورت می‌گیرد (Gonçalves et al.2016 Santos-Alves et al.2015). مکانیسم‌های زیربنایی فعال‌سازی میتوفاژی با تمرینات ورزشی به خوبی درک نشده است. شواهد آزمایشگاهی نشان می‌دهد که میتوفاژی در طی تمرینات ورزشی توسط AMPK تنظیم می‌شود زیرا مهار AMPK ممکن است میتوفاژی را مختل کند، بنابراین منجر به تجمع میتوکندری‌های با کیفیت پایین می‌شود (Drake et al.2016). تمرینات ورزشی ممکن است از طریق محور AMPK-ULK1 باعث افزایش میتوفاژی شود (Drake et al.2016). فسفوریلاسیون AMPK در طی تمرینات ورزشی که در مسیر بالادست سیگنالینگ میتوفاژی قرار دارد منجر به فعال‌سازی ULK1 می‌شود (Laker et al.2017) و فعال شدن ULK1 منجر به فرارگیری ULK1 در میتوکندری و منجر به افزایش میتوفاژی می‌شود (Tian et al.2015). با وجود این، شناسایی میتوکندری‌های آسیب دیده توسط دستگاه میتوفاژی در پاسخ به ورزش از طریق مسیر پیام‌رسانی وابسته به Parkin / PINK1 و همچنین مسیر غیروابسته به Parkin می‌باشد (Ni et al.2015). PINK1 یک کیناز سرین/ترئونین میتوکندری است (Ni et al.2015). که معمولاً در میتوکندری‌های طبیعی تجزیه و در سطح بسیار پایینی حفظ می‌شود، با این حال، زمانی که میتوکندری‌ها آسیب می‌بینند و پتانسیل غشای میتوکندری^۱ (MMP) کاهش می‌یابد، می‌تواند به سرعت در غشای میتوکندری جمع شود (Youle & Narendra.2011). تجمع PINK1 می‌تواند باعث انتقال Parkin از سیتوزول به میتوکندری آسیب دیده می‌شود که Parkin منجر به فراخوانی لیگاز E3 یوبیکوئیتین به میتوکندری آسیب دیده می‌شود (Drake et al.2016). مطالعات نشان داده‌اند که Parkin برای جریان میتوفاژی در پاسخ به فعالیت ورزشی و برای حفظ عملکرد میتوکندری ضروری است (Roberts & Markby.2021). همچنین، Parkin اتوفاگوزوم را به میتوکندری آسیب دیده برای تخریب از طریق میتوفاژی فرا می‌خواند (Drake et al.2016). نتایج یافته‌های پژوهش حاضر حاکی از آن است که احتمالاً تمرینات ورزشی با فعال کردن مسیر وابسته به Parkin میتوفاژی، می‌تواند منجر به بهبود عملکرد میتوکندری شود و با حذف میتوکندری‌های آسیب دیده در طی مصرف رژیم غذایی پرچرب منجر به بهبود محتوی چربی کبد شود.

از طرفی فاکتور القای هایپوکسی (HIF-1) یک فاکتور کلیدی رونویسی است که در پاسخ هموستاتیک سلولی و سیستمیک به هایپوکسی نقش دارد (Semenza.1998). اثرات مفید هایپوکسی یا هایپوکسی شبیه‌سازی شده بر روی ورزشکاران بیشتر در بافت‌های عضله اسکلتی و قلبی متمرکز شده است، مانند تمرین در محیط هایپوکسی هیپوباریک می‌تواند پاسخ رونویسی میتوکندری عضله اسکلتی را در ورزشکاران نخبه تقویت کند (Brocherie et al.2018). با توجه به نتایج پژوهش حاضر، بیان ژن HIF-1 α در طی ۱۲ هفته رژیم غذایی پرچرب منجر به افزایش بیش از حد (۱۳۲/۲ درصدی) نسبت به گروه ND شد. در حالی که، تمرین

¹ Mitochondrial Membrane Potential (MMP)

HIIT به همراه رژیم غذایی پرچرب در شرایط هایپوکسی و نورموکسی بیان ژن HIF-1 α را معکوس کرد و کاهش معنی‌داری (HFD-HIIT: ۳۸/۷۴ درصد، HFD-HHIIT: ۴۳/۰۲ درصد) را نسبت به HFD نشان داد. با این حال، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه تمرین در شرایط هایپوکسی و نورموکسی دیده نشد. با توجه به مطالعات پیشین، نشان داده شده است که مصرف رژیم غذایی پرچرب منجر به افزایش معنی‌دار در بیان ژن HIF-1 α در کبد نسبت به رژیم غذایی نرمال می‌شود (Carabelli et al. 2011). همسو با مطالعه‌ی حاضر، باقری و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که بیان ژن HIF-1 α در گروه رژیم غذایی پرچرب افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل در مدل موش‌های مبتلا به بیماری کبد چرب غیر الکی نشان داد و هر دو تمرین تناوبی با شدت بالا و تمرین استقامتی با شدت کم پس از ۸ هفته، محتوی چربی داخل کبدی را با کاهش بیان ژن HIF-1 α کاهش می‌دهد (Bagheri et al. 2021). در مطالعه‌ی دیگر تأثیر شدت تمرین بر بیان ژن HIF-1 α و محتوای TG قلبی در موش‌های صحرائی مبتلا به بیماری کبد چرب غیر الکی را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که تمرین تناوبی با شدت بالا و تداومی با شدت کم به همراه ۱۶ هفته رژیم غذایی پرچرب می‌تواند با کاهش بیان HIF-1 α و افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب، میزان تری‌گلیسیرید قلبی را کاهش دهد (Bagherian et al. 2022). به طور کلی، این مطالعات نشان می‌دهد که رژیم غذایی پرچرب می‌تواند منجر به هایپوکسی بافت کبد و تجمع بیش از حد HIF-1 α شود که می‌تواند به ایجاد فیروز کبد در NAFLD کمک کند (J. Han et al. 2019). در حالی تمرینات ورزشی می‌تواند آثار منفی رژیم غذایی پرچرب را کاهش دهد و از پیشرفت NAFLD بکاهد و منجر به بهبود محتوی چربی کبد شود. مطالعاتی که بر روی بافت عضله اسکلتی انجام شده است گزارش کردند که سطح HIF-1 α mRNA با یک جلسه فعالیت ورزشی افزایش می‌یابد و این پاسخ با تمرین پس از سازگاری کاهش می‌یابد (Lundby et al. 2006). مطالعه‌ی دیگر نشان داد که تمرینات استقامتی منظم می‌تواند بیان HIF-1 α ناشی از ورزش را در عضلات اسکلتی انسان در شرایط نورموکسی کاهش دهد (Lindholm & Rundqvist. 2016) که نتایج این مطالعات با پژوهش حاضر همسوست. با این حال، مطالعه‌ی بر روی دوندگان نخبه استقامتی نشان داد که تمرین در ارتفاع (۴ هفته) باعث کاهش HIF-1 α و تمرین در شرایط نورموکسی (۳ هفته) باعث افزایش سطوح HIF-1 α می‌شود (Soori et al. 2020). در شرایط کمبود اکسیژن در بدن انسان، مکانیسم‌های حسگر اکسیژن برای بازیابی اکسیژن و سازگاری سریع با شرایط هایپوکسی با آغاز پاسخ‌های سازگاری مانند افزایش تنفس و جریان خون فعال می‌شوند (J. Li et al. 2020). به همین دلیل یکی از دلایلی که منجر به کاهش میزان HIF-1 α در پژوهش حاضر در گروه‌های تمرینی در شرایط هایپوکسی و نورموکسی نسبت به HFD شد، احتمالاً خونرسانی کافی به بافت کبد طی تمرینات ورزشی می‌باشد. دلایل دیگر با توجه به نتایج این مطالعات استنباط می‌شود که هایپوکسی و فاکتور القا‌ی آن یعنی HIF-1 α مانند چاقوی دو لبه عمل می‌کند و افزایش بیان بیش از حد آن منجر به اختلال عملکرد میتوفاژی می‌شود. با این حال، افزایش بیان آن تا حدی که به سازگاری‌های فیزیولوژیک ختم شود احتمالاً مفید واقع می‌شود. همان‌طوری که در مطالعه‌ی حاضر، تمرین در شرایط هایپوکسی و نورموکسی توانست آثار منفی رژیم غذایی پرچرب را معکوس کند. احتمالاً در مطالعه‌ی حاضر تمرین در شرایط هایپوکسی و نورموکسی توانسته است تا حدی منجر به افزایش بیان HIF-1 α شود که آبخار سیگنالینگ پایین دستی را فعال کرده و باعث کاهش محتوی چربی کبد شود و از آسیب و فیروز بافت کبد جلوگیری کرده است. بدین صورت که،

تمرین در شرایط نورموکسی و هایپوکسی با فعال کردن HIF-1 α منجر به فسفوریله شدن AMPK می‌شود که می‌تواند مسیر میتوفاژی را فعال کند (Roberts & Markby, 2021). همان طوری که، مطالعات گزارش کرده‌اند که هایپوکسی ناشی از ارتفاع بالا ممکن است عملکرد میتوکندری مختل شده را بهبود بخشد و سیگنال‌دهی AMPK را در NAFLD ناشی از چاقی را فعال کند (Song et al. 2020). در این راستا، لو و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای روی بافت کبد نشان دادند که قرار گرفتن طولانی مدت در چرخه‌های هایپوکسی و نوروکسی منجر به افزایش معنی‌داری در بیان mRNA محتوی میتوکندریایی می‌شود و به سازگاری با ارتفاع بسیار بالا در موش‌ها کمک می‌کند (Luo et al. 2013). همچنین، کنگ سانگ و همکاران نشان دادند که هیپوکسی مزمن (نگهداری به مدت ۸ هفته) در موش‌های گروه رژیم غذایی پرچرب در ارتفاع ۴۳۰۰ متر نسبت به گروه رژیم غذایی پرچرب در ارتفاع ۵۰ متر افزایش معنی‌داری را در بیان ژن‌های مرتبط با بیوژنز میتوکندری، عملکرد تنفسی میتوکندری و محتوای DNA میتوکندری دارد و خاطر نشان کردند که هایپوکسی مزمن در ارتفاعات می‌تواند یک استراتژی درمانی جدید برای NAFLD ناشی از چاقی باشد (Song et al. 2020). همچنین، مسیر دیگر در میتوفاژی که مستقل از Parkin می‌باشد شامل چندین پروتئین گیرنده میتوفاژی روی میتوکندری می‌باشد که با LC3 (نشانگر اتوفاگوزومی) تعامل دارند تا اتوفاگوزوم‌ها را به میتوکندری‌های آسیب‌دیده فرا بخواند، از جمله FUNDC1 می‌باشد (Ni et al. 2015). با توجه به نتایج پژوهش حاضر، بیان ژن FUNDC1 در گروه تمرین در شرایط هایپوکسی افزایش بیشتری (۴۵/۶۳ درصدی) را نسبت به تمرین در شرایط نورموکسی (۲۶/۷۰ درصدی) نشان داد. FUNDC1 اخیراً به عنوان گیرنده خاص در غشای خارجی میتوکندری^۱ (OMM) برای فعال شدن میتوفاژی شناسایی شده است (Liu et al. 2012). اساساً، FUNDC1 در شرایط نرمال فیزیولوژیکی، توسط عنصر پاسخ دهنده به استرس^۲ (SRC) و کازئین کیناز^۳ (CK2) فسفوریله و مهار می‌شود و در نتیجه از اتصال LC3 جلوگیری می‌کند (G. Chen et al. 2014). با این حال، در طول هایپوکسی یا از دست دادن پتانسیل غشای میتوکندری^۴ ($\Delta\psi_m$)، FUNDC1 بیان SRC را به شدت سرکوب می‌کند و منجر به دفسفوریلاسیون FUNDC1 در Tyr18 می‌شود (G. Chen et al. 2014). دفسفوریلاسیون FUNDC1 تعامل بین FUNDC1 و LC3 را افزایش می‌دهد و به آن اجازه می‌دهد با LC3 بر روی غشاهای اتوفاگوزوم تعامل کند (Liu et al. 2012; Schöenberger & Kovacs. 2015). بنابراین تعامل FUNDC1-LC3 منجر به میتوفاژی می‌شود (Z. Chen et al. 2017). همچنین، در طول هایپوکسی، ULK1 به طور همزمان فعال می‌شود و به میتوکندری منتقل می‌شود، جایی که FUNDC1 را با فسفوریلاسیون در Ser17 فعال می‌کند و در نتیجه با تعامل با LC3 تجزیه میتوکندری را از طریق میتوفاژی تسهیل می‌کند (Lee & Kim. 2014; Schöenberger & Kovacs. 2015).

از محدودیت‌های این پژوهش می‌توان عدم اندازه‌گیری دیگر عوامل تنظیم کننده میتوفاژی مانند AMPK و ULK1 در پاسخ به مداخله تمرین HIIT اشاره کرد. بنابراین توصیه می‌شود روش‌های تمرینی مختلف بر سطوح میتوفاژی میتوکندری کبد همراه با تعیین عوامل فوق مورد بررسی قرار گیرد.

¹ Outer Mitochondrial Membrane (OMM)

² Stress Response Component (SRC)

³ Casein Kinase 2 (CK2)

⁴ Loss of Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\psi_m$)

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین تناوبی با شدت بالا در شرایط هایپوکسی و نورموکسی منجر به افزایش سطوح ژن‌های دخیل در میتوفاژی کبد در رت‌های تحت رژیم غذایی پرچرب شد و توانست اثرات منفی رژیم پرچرب در مسیر میتوفاژی کبد را معکوس کند. با این حال، احتمالاً تمرین در شرایط هایپوکسی تأثیر مازادی بر افزایش میتوفاژی کبد و به دنبال آن کنترل محتوای چربی کبدی نسبت به شرایط نورموکسی دارد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر از طرح رساله دکتری تخصصی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه گیلان استخراج شده است. بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود از مسئولان محترم دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه گیلان را اعلام میدارم. همچنین، پژوهش حاضر بدون هیچگونه حمایت مالی انجام گرفته است.

تضاد منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

منابع

- Ahmadi, Akbar, Sheikholeslami-Vatani, Dariush, Ghaeeni, Saeed, & Baazm, Maryam. (2021). The effects of different training modalities on monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4, hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), and PGC-1 α gene expression in rat skeletal muscles. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2153-2161.
- Asrani, Sumeet K, Devarbhavi, Harshad, Eaton, John, & Kamath, Patrick S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of hepatology*, 70(1), 151-171.
- Bagheri, M Hossein, Azamian-Jazi, A, Banitalebi, E, Kazeminasab, F, & Nasr-Esfahani, M Hossein. (2021). Both high-intensity interval training and low-intensity endurance training decrease intrahepatic lipid deposits via alterations of the expression of HIF-1 α , HIG2 in a murine model of non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Science & Sports*, 36(2), 120-128.
- Bagherian, Mahdi, Banaeifar, Abdolali, Arshadi, Sajad, & Azarbayjani, Mohammad Ali. (2022). Effect of Training Intensity on HIF-1 α Gene Expression and Cardiac TG Content in Rats with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*.
- Brocherie, Franck, Millet, Grégoire P, D'Hulst, Gommaar, Van Thienen, Ruud, Deldicque, Louise, & Girard, Olivier. (2018). Repeated maximal-intensity hypoxic exercise superimposed to hypoxic residence boosts skeletal muscle transcriptional responses in elite team-sport athletes. *Acta Physiologica*, 222(1), e12851.
- Carabelli, Julieta, Burgueño, Adriana L, Rosselli, Maria Soledad, Gianotti, Tomas Fernández, Lago, Nestor R, Pirola, Carlos J, & Sookoian, Silvia. (2011). High fat diet-induced liver steatosis promotes an increase in liver mitochondrial biogenesis in response to hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(6), 1329-1338.

- Chen, Guo, Han, Zhe, Feng, DU, Chen, Yanfang, Chen, Linbo, Wu, Hao, . . . Fu, Changying. (2014). A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Molecular cell*, 54(3), 362-377.
- Chen, Ming, Chen, Ziheng, Wang, Yueying, Tan, Zheng, Zhu, Chongzhuo, Li, Yanjun, . . . Liu, Lei. (2016). Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy*, 12(4), 689-702.
- Chen, Ziheng, Siraj, Sami, Liu, Lei, & Chen, Quan. (2017). MARCH5-FUNDC1 axis fine-tunes hypoxia-induced mitophagy. *Autophagy*, 13(7), 1244-1245.
- Cioffi, Federica, Giacco, Antonia, Petito, Giuseppe, de Matteis, Rita, Senese, Rosalba, Lombardi, Assunta, . . . Lanni, Antonia. (2022). Altered mitochondrial quality control in rats with metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) induced by high-fat feeding. *Genes*, 13(2), 315.
- Çolak, Ridvan, Ağaçcıoğlu, Eda, & Çakatay, Ufuk. (2021). “Live High Train Low” Hypoxic Training Enhances Exercise Performance with Efficient Redox Homeostasis in Rats' Soleus Muscle. *High Altitude Medicine & Biology*, 22(1), 77-86.
- Drake, Joshua C, Wilson, Rebecca J, & Yan, Zhen. (2016). Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *The FASEB Journal*, 30(1), 13.
- Flores, Karen, Siques, Patricia, Brito, Julio, Ordenes, Stefany, Arriaza, Karem, Pena, E, . . . Arribas, Silvia. (2020). Lower body weight in rats under hypobaric hypoxia exposure would lead to reduced right ventricular hypertrophy and increased AMPK activation. *Frontiers in Physiology*, 11, 342.
- Gastaldelli, Amalia. (2017). Insulin resistance and reduced metabolic flexibility: cause or consequence of NAFLD? *Clinical science*, 131(22), 2701-2704.
- Gauthier, Marie-Soleil, Favier, Roland, & Lavoie, Jean-Marc. (2006). Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *British Journal of Nutrition*, 95(2), 273-281.
- Gonçalves, Inês O, Passos, Emanuel, Diogo, Cátia V, Rocha-Rodrigues, Sílvia, Santos-Alves, Estela, Oliveira, Paulo J, . . . Magalhães, José. (2016). Exercise mitigates mitochondrial permeability transition pore and quality control mechanisms alterations in nonalcoholic steatohepatitis. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 41(3), 298-306.
- Han, Chong, Lu, Peng, & Yan, Shi-zhan. (2022). Effects of high-intensity interval training on mitochondrial supercomplex assembly and biogenesis, mitophagy, and the AMP-activated protein kinase pathway in the soleus muscle of aged female rats. *Experimental Gerontology*, 158, 111648.
- Han, Jie, He, Yaping, Zhao, Hui, & Xu, Xiaowei. (2019). Hypoxia inducible factor-1 promotes liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease by

- activating PTEN/p65 signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(9), 14735-14744.
- Hosseini, Seyed Morteza, Mohebbi, Hamid, Ghafoori, Hossein, & Rezadoost, Mohammad Hosseine. (2023). The effect of hypoxia and normoxia training on autophagy in male rats hepatocytes with a high-fat diet. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*(Articles in Press).
- Ito, Makoto, Suzuki, Jun, Tsujioka, Shigeharu, Sasaki, Minoru, Gomori, Akira, Shirakura, Takashi, . . . Iwaasa, Hisashi. (2007). Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatology Research*, 37(1), 50-57.
- Jendzjowsky, Nicholas G, & DeLorey, Darren S. (2011). A prospective evaluation of non-interval-and interval-based exercise training progressions in rodents. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 36(5), 723-729.
- Jump, Donald B. (2011). Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 14(2), 115.
- Ke, Po-Yuan. (2020). Mitophagy in the Pathogenesis of Liver Diseases Review (1, Trans.). In 1 (Ed.), *CELLS* (1 ed., Vol. 1, pp. 1). 1: 1. (Reprinted from: 1).
- Khalafi, Mousa, & Symonds, Michael E. (2021). The impact of high intensity interval training on liver fat content in overweight or obese adults: A meta-analysis. *Physiology & Behavior*, 236, 113416.
- Kistler, Kristin D, Brunt, Elizabeth M, Clark, Jeanne M, Diehl, Anna Mae, Sallis, James F, Schwimmer, Jeffrey B, & Group, NASH CRN Research. (2011). Physical activity recommendations, exercise intensity, and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *The American journal of gastroenterology*, 106(3), 460.
- Laker, Rhianna C, Drake, Joshua C, Wilson, Rebecca J, Lira, Vitor A, Lewellen, Bevan M, Ryall, Karen A, . . . Goodyear, Laurie J. (2017). Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nature communications*, 8(1), 548.
- Larson-Casey, Jennifer L, He, Chao, & Carter, A Brent. (2020). Mitochondrial quality control in pulmonary fibrosis. *Redox biology*, 33, 101426.
- Lee, Sooyeon, & Kim, Jae-Sung. (2014). Mitophagy: therapeutic potentials for liver disease and beyond. *Toxicological research*, 30(4), 243-250.
- Li, Jia, Li, Yanchun, Atakan, Muhammed M, Kuang, Jujiao, Hu, Yang, Bishop, David J, & Yan, Xu. (2020). The molecular adaptive responses of skeletal muscle to high-intensity exercise/training and hypoxia. *Antioxidants*, 9(8), 656.
- Li, Ruibing, Toan, Sam, & Zhou, Hao. (2020). Role of mitochondrial quality control in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Aging (Albany NY)*, 12(7), 6467.
- Lindholm, Malene E, & Rundqvist, Helene. (2016). Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise. *Experimental physiology*, 101(1), 28-32.

- Liu, Lei, Feng, Du, Chen, Guo, Chen, Ming, Zheng, Qiaoxia, Song, Pingping, . . . Qi, Wanjun. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature cell biology*, 14(2), 177-185.
- Livak, Kenneth J, & Schmittgen, Thomas D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lundby, Carsten, Gassmann, Max, & Pilegaard, Henriette. (2006). Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1 α and HIF-2 α mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *European journal of applied physiology*, 96, 363-369.
- Luo, Yongjun, Lu, Guoshou, Chen, Yu, Liu, Fuyu, Xu, Gang, Yin, Jun, & Gao, Yuqi. (2013). Long-term cycles of hypoxia and normoxia increase the contents of liver mitochondrial DNA in rats. *European journal of applied physiology*, 113(1), 223-232.
- Ma, Xiaowen, McKeen, Tara, Zhang, Jianhua, & Ding, Wen-Xing. (2020). Role and mechanisms of mitophagy in liver diseases. *Cells*, 9(4), 837.
- Maiti, Panchanan, Muthuraju, S, Ilavazhagan, G, & Singh, Shashi B. (2008). Hypobaric hypoxia induces dendritic plasticity in cortical and hippocampal pyramidal neurons in rat brain. *Behavioural brain research*, 189(2), 233-243.
- Muscella, Antonella, Stefàno, Erika, Lunetti, Paola, Capobianco, Loredana, & Marsigliante, Santo. (2020). The regulation of fat metabolism during aerobic exercise. *Biomolecules*, 10(12), 1699.
- Narendra, Derek P, Jin, Seok Min, Tanaka, Atsushi, Suen, Der-Fen, Gautier, Clement A, Shen, Jie, . . . Youle, Richard J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology*, 8(1), e1000298.
- Ni, Hong-Min, Williams, Jessica A, & Ding, Wen-Xing. (2015). Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox biology*, 4, 6-13.
- Pino-de la Fuente, Francisco, Quezada, Laura, Sepúlveda, Carlos, Monsalves-Alvarez, Matias, Rodríguez, Juan M, Sacristan, Camila, . . . Troncoso, Rodrigo. (2019). Exercise regulates lipid droplet dynamics in normal and fatty liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(12), 158519.
- Roberts, Fiona Louise, & Markby, Greg Robert. (2021). New Insights into Molecular Mechanisms Mediating Adaptation to Exercise; A Review Focusing on Mitochondrial Biogenesis, Mitochondrial Function, Mitophagy and Autophagy. *Cells*, 10(10), 2639.
- Sabag, Angelo, Barr, Loren, Armour, Mike, Armstrong, Alex, Baker, Callum J, Twigg, Stephen M, . . . George, Jacob. (2022). The effect of high-intensity interval training vs moderate-intensity continuous training on liver fat: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 107(3), 862-881.

- SaiRam, M, Sharma, SK, Dipti, P, Pauline, T, Kain, AK, Mongia, SS, . . . Devendra, K. (1998). Effect of hypobaric hypoxia on immune function in albino rats. *International journal of biometeorology*, 42(1), 55-59.
- Santos-Alves, E, Marques-Aleixo, I, Rizo-Roca, D, Torrella, JR, Oliveira, PJ, Magalhães, J, & Ascensão, A. (2015). Exercise modulates liver cellular and mitochondrial proteins related to quality control signaling. *Life sciences*, 135, 124-130.
- Schönenberger, Miriam Johanna, & Kovacs, Werner Josef. (2015). Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles. *Frontiers in cell and developmental biology*, 3, 42.
- Semenza, Gregg L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Current opinion in genetics & development*, 8(5), 588-594.
- Song, Kang, Zhang, Yifan, Ga, Qin, Bai, Zhenzhong, & Ge, Ri-Li. (2020). High-altitude chronic hypoxia ameliorates obesity-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice by regulating mitochondrial and AMPK signaling. *Life sciences*, 252, 117633.
- Soori, Rahman, Mohamad Zadeh, Mahla, Ghram, Amine, Choobineh, Siroos, Mohammadi Mirzaei, Roohallah, & Azevedo Voltarelli, Fabrício. (2020). Effects of Hypoxic and Normoxic Training in Altitude on HIF-1 α and PGC-1 α Levels in Elite Endurance Runners. *Sport Sciences and Health Research*, 11(1), 61-70.
- Takahashi, Hirokazu, Kotani, Kazuhiko, Tanaka, Kenichi, Egucih, Yuichiro, & Anzai, Keizo. (2018). Therapeutic approaches to nonalcoholic fatty liver disease: exercise intervention and related mechanisms. *Frontiers in endocrinology*, 588.
- Tian, Weili, Li, Wen, Chen, Yinqin, Yan, Zeming, Huang, Xia, Zhuang, Haixia, . . . Lin, Chunxia. (2015). Phosphorylation of ULK1 by AMPK regulates translocation of ULK1 to mitochondria and mitophagy. *FEBS letters*, 589(15), 1847-1854.
- Tondpa Khaghani, Behdad, Dehkhoda, Mohammad Reza, & Amani Shalamzari, Sadegh. (2019). Improvement of aerobic power and health status in overweight patients with non-alcoholic fatty liver disease with high intensity interval training. *Payavard Salamat*, 13(1), 71-80.
- Undamatla, R, Fagunloye, OG, Chen, J, Edmunds, LR, Murali, A, Mills, A, . . . Gibson, G. (2023). Reduced mitophagy is an early feature of NAFLD and liver-specific PARKIN knockout hastens the onset of steatosis, inflammation and fibrosis. *Scientific Reports*, 13(1), 7575.
- Yang, Xing-Xin, Wang, Xi, Shi, Ting-Ting, Dong, Jin-Cai, Li, Feng-Jiao, Zeng, Lin-Xi, . . . Yu, Jie. (2019). Mitochondrial dysfunction in high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease: The alleviating effect and its mechanism of *Polygonatum kingianum*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117, 109083.
- Youle, Richard J, & Narendra, Derek P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(1), 9-14.

Zheng, Youwei, Wang, Shiting, Wu, Jialiang, & Wang, Yong. (2023). Mitochondrial metabolic dysfunction and non-alcoholic fatty liver disease: new insights from pathogenic mechanisms to clinically targeted therapy. *Journal of Translational Medicine*, 21(1), 510..

The effect of high intensity interval training in normoxia and hypobaric hypoxia situation on the expression of genes involved in liver mitophagy in male Wistar rats fed with high fat diet

Faeghe Ghasemi, Hamid Mohebbsi *

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

*Corresponding author: mohebbsi@guilan.ac.ir

Abstract

Objectives: Consuming a high-fat diet leads to dysfunction of liver mitochondria and the occurrence of fatty liver disorders, and mitophagy, which plays a role in removing damaged mitochondria, can probably be effective in improving non-alcoholic fatty liver disease. The aim of this study was to determine the effect of nutrition, training and hypoxia on liver mitophagy in male Wistar rats

Methods: Thirty-two male rats were randomly divided into four groups of eight including normal diet (ND), high-fat diet (HFD), high-fat diet and training in normoxia (HFD-HIIT) and high-fat diet and training in hypoxia (HFD-HHIIT). After determining the maximum aerobic velocity (MAV) in normoxia and hypoxia-hypobaric, the HIIT protocol was performed for 12 weeks and three sessions per week, which included 3 to 8 bouts 4-minute activity with an intensity of 80 to 93 percent of MAV and 2-minute active rest periods with an intensity of 50 percent of MAV. At the end, the levels of HIF-1 α , Parkin and Fundc1 genes were measured through RT-PCR

Results: The expression of Parkin and Fundc1 genes in HFD-HIIT and HFD-HHIIT groups increased significantly compared to HFD ($P<0.05$). Also, the HFD-HHIIT group showed a significant increase compared to the HFD-HIIT group ($P<0.05$). Also, liver fat content and HIF-1 α gene expression showed a significant decrease in HFD-HIIT and HFD-HHIIT groups compared to HFD ($P<0.05$).

Conclusion: It seems that training in hypoxic conditions compared to normoxia has an additional effect on increasing liver mitophagy and subsequently controlling liver fat content.

Key words: High Intensity Interval Training, Hypoxia, Mitophagy, NAFLD, High Fat Diet