

Effect of Endurance Training and MitoQ on Expression of PGC-1 α , ERR- α , MCAD, and CPT-1 α Genes in Skeletal Muscle of Male Wistar Rats

Mahya Sharifi Rayeni¹,
Daruosh Moflehi²,
Soheil Aminizadeh³,
Malihe Aveseh⁴

¹ MSc Student in Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

² Associate Professor, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

³ Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

⁴ PhD in Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

(Received June 26, 2022 ; Accepted October 9, 2022)

Abstract

Background and purpose: Estrogen-related receptor α (ERR- α) and transcriptional activator (PGC-1 α) are important factors involved in regulating cellular energy. The aim of this study was to evaluate the expression of PGC1 α , ERR α genes after six weeks of endurance training and MitoQ supplementation in skeletal muscle of male Wistar rats and to determine their role in lipid metabolism indices.

Materials and methods: In this experimental study, 32 male Wistar rats were randomly divided into four groups (n= 8); control group, endurance training, MitoQ supplement, and endurance training + MitoQ supplement. Training groups performed endurance training for six weeks (five sessions/ week). One-way analysis of variance was applied to compare data between the study groups.

Results: Expression levels of ERR- α (P= 0.002), PGC-1 α (P= 0.000), MCAD (P= 0.041), and CPT-1b (P= 0.521) genes were significantly higher in endurance training groups compared with the control group. ERR- α and CPT-1b gene expression levels significantly increased in the supplement group compared with the control group (P= 0.036 and P= 0.000, respectively). Findings showed that PGC-1 α expression decreased in supplementation groups compared with the endurance training groups (P= 0.000).

Conclusion: Endurance training increases the expression of ERR- α and PGC-1 α genes, which is associated with an increase in expression of genes involved in lipid metabolism. Despite increase in the expression of ERR- α and CPT-1b following MitoQ supplement, the effects of MitoQ supplement was not additive to the effect of endurance exercise, which emphasizes that the effect of exercise on lipid metabolism is mediated through free radicals and oxidative stress.

Keywords: endurance training, ERR, lipid metabolism, MitoQ

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (215): 14-25 (Persian).

Corresponding Author: Daruosh Moflehi - Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran. (E-mail: d_moflehi@uk.ac.ir)

تاثیر توام تمرین استقامتی و MitoQ بر بیان ژنهای PGC-1 α ، MCAD، ERR- α و CPT-1 α در عضله اسکلتی رت‌های نر

محیا شریفی رابینی¹

داریوش مفلحی²

سهیل امینی زاده³

ملیحه آوسه⁴

چکیده

سابقه و هدف: گیرنده وابسته استروژنی آلفا (ERR- α) و PGC-1 α ، فاکتورهای مهم درگیر در تنظیم هموستاز انرژی سلولی به شمار می‌آیند. هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان ژنهای PGC-1 α و ERR- α متعاقب 6 هفته تمرین استقامتی همراه با مصرف مکمل MitoQ در عضله اسکلتی رت‌های نر نژاد ویستار و تعیین نقش آن‌ها با شاخص‌های متابولیسم لیپید در حضور مصرف مکمل MitoQ بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه که به روش تجربی انجام شد، تعداد 32 سر موش صحرایی نژاد ویستار به طور تصادفی به 4 گروه با تعداد مساوی (n=8) شامل گروه کنترل، تمرین استقامتی، مکمل MitoQ و گروه تمرین استقامتی + مکمل MitoQ تقسیم شدند. تمرین استقامتی دوییدن به مدت 6 هفته (پنج جلسه در هر هفته)، اعمال شد. از تحلیل واریانس یک راهه برای مقایسه گروه‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: بیان ژنهای ERR- α (P=0/002)، PGC-1 α (P=0/000)، MCAD (P=0/041) و CPT-1b (P=0/521) در گروه‌های تمرین استقامتی به‌طور معنی‌داری از گروه کنترل بیش‌تر بود. بیان ژن ERR- α (P=0/036) و CPT-1b (P=0/000) در گروه مصرف مکمل نسبت به گروه کنترل نیز به‌طور معنی‌داری افزایش داشت. هم‌چنین بیان PGC-1 α در گروه تمرین استقامتی همراه با مصرف مکمل نسبت به تمرین استقامتی کاهش داشت (P=0/000).

استنتاج: تمرین استقامتی موجب افزایش بیان ژنهای ERR- α و PGC-1 α می‌شود که با افزایش بیان ژنهای درگیر در متابولیسم لیپید همراه است. با وجود افزایش در بیان ERR- α و CPT-1b متعاقب مصرف مکمل آنتی‌اکسیدانی MitoQ، اثر این مکمل به اثر تمرین استقامتی قابل اضافه شدن نبود که مؤکد واسطه‌گری اثر تمرین بر متابولیسم لیپید از طریق رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تمرین استقامتی، ERR، متابولیسم لیپید، MitoQ

مقدمه

ورزش افزایش می‌دهد. افزایش ظرفیت اکسیداسیون چربی یک سازگاری متابولیک کلاسیک با تمرینات

تمرینات استقامتی به دلیل افزایش استفاده از چربی داخل عضلانی، ظرفیت اکسیداسیون چربی را در حین

E-mail: d_moflehi@uk.ac.ir

مؤلف مسئول: داریوش مفلحی - کرمان: دانشگاه شهید باهنر ایران، دانشکده تربیت بدنی

1. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

2. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

3. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

4. دکترای تخصصی فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: 1401/4/5 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/5/2 تاریخ تصویب: 1401/7/17

افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کمک می‌کند (8). تمرین استقامتی با افزایش فسفوریلاسیون پروتئین‌های کیناز فعال شده با AMP (AMPK) و فعال‌سازی مسیر AMPK/PGC-1 α در عضلات اسکلتی، سبب ایجاد لیپولیز در بافت چربی می‌شود (9). گیرنده وابسته استروژنی آلفا (ERR- α) با PGC-1 α فعال می‌شود و تنظیم‌کننده‌ای حیاتی در متابولیسم انرژی است. ERR- α زیر مجموعه‌ای از ژن‌های هدف PGC-1 α را که درگیر مسیرهای چندگانه تولید انرژی هستند شامل ژن‌های درگیر در انتقال اسیدهای چرب سلولی، اکسیداسیون اسیدهای چرب و تنفس میتوکندریایی را تنظیم مثبت می‌کند. ژن‌هایی مانند آسپیل کوا دهیدروژناز (MCAD) و کارنیتین پالمیتیل ترانسفراز 1 (CPT-1b) که جزء مهم در انتقال و بتا‌اکسیداسیون اسیدهای چرب هستند، تحت کنترل ERR- α و PGC-1 α هستند (10). هنگامی که ERR- α فعال می‌شود، بیان ژن‌های هدفش از جمله MCAD که یک آنزیم حیاتی برای بتا‌اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری عضله اسکلتی است را تنظیم می‌کند. در این میان PGC-1 α نیز به عنوان یک فاکتور مهم در اکسیداسیون لیپید است که می‌تواند انتخاب سوسترا را تحت تاثیر قرار دهد (11). از سوی دیگر اسیدهای چرب با زنجیره بلند (LCFA) برخلاف اسیدهای چرب با زنجیره متوسط یا کوتاه، نمی‌توانند با انتشار ساده وارد میتوکندری شوند بنابراین، توسط سیستم کارنیتین پالمیتیل ترانسفراز وارد می‌شوند و این مجموعه آنزیمی از دو پروتئین مجزا به نام‌های کارنیتین پالمیتیل ترانسفراز 1 (CPT1) و 2 (CPT2) تشکیل شده است (12). CPT1 آنزیم کنترل‌کننده سرعت در مسیر بتا‌اکسیداسیون اسیدهای چرب بلند زنجیر در میتوکندری عضلات است. این آنزیم برای حمل و نقل خالص چربی‌های بلند زنجیر از سیتوپلاسم به میتوکندری مورد نیاز است (13). تمرین استقامتی با افزایش کارنیتین ترانسفراز که حمل و نقل اسیدهای چرب را در غشاء میتوکندری تسهیل می‌کند باعث افزایش اکسیداسیون چربی می‌شود (1). تمرین استقامتی باعث افزایش مسیر

استقامتی است که با نرخ بالاتر اکسیداسیون چربی در زمانی که تمرین با حجم کاری مطلق مشابه انجام می‌شود نشان داده می‌شود (1). تمرینات استقامتی از مسیرهای مختلفی به افزایش لیپولیز و اکسیداسیون اسیدهای چرب کمک می‌کند، از جمله، تمرین استقامتی با افزایش تراکم میتوکندری در عضلات اسکلتی، باعث افزایش ظرفیت اکسیداسیون چربی می‌شود (2). هم‌چنین تمرین استقامتی با افزایش تکثیر مویرگ‌ها در عضله اسکلتی، باعث افزایش انتقال اسید چرب به عضله می‌شود (3). به‌علاوه تمرینات زیر بیشینه سبب افزایش انتقال‌دهنده کارنیتین ترانسفراز که حمل و نقل اسید چرب را در غشای میتوکندری تسهیل می‌کند (4) و هم‌چنین افزایش پروتئین‌های اتصال به اسید چرب، که تنظیم اسیدهای چرب میوسیت را تنظیم می‌کند، می‌شود (5) در واقع یک سازگاری مهم با تمرینات استقامتی، تغییر در استفاده متناسب از سوسترا از کربوهیدرات به اکسیداسیون چربی است (6). یکی از فاکتورهایی که اکسیداسیون اسیدهای چرب را کنترل می‌کند PGC-1 α ¹ است که تنظیم متابولیسم لیپید و اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره طولانی را با تنظیم بیان ژن‌های درگیر در چرخه اسیدتری کربو کسلیک و اکسیداسیون اسیدهای چرب میتوکندری تنظیم می‌کند. PGC-1 α تنظیم‌کننده اصلی مجموعه‌ای از مسیرهای متابولیک انرژی سلولی است، اما اثر اصلی آن در بافت‌های هدف تقویت متابولیسم اکسیداتیو میتوکندری است. PGC-1 α در هماهنگی بیان ژن اجزای اصلی بیوژنز میتوکندری و به عنوان یک تنظیم‌کننده متابولیک مهم در بسیاری از ارگان‌های حیاتی از جمله بافت چربی سفید و قهوه‌ای، عضله اسکلتی، قلب، کبد و کلیه نقش اساسی دارد (7). علاوه بر نقش PGC-1 α در حجم، ساختار و عملکرد میتوکندری، نشان داده شده است که PGC-1 α در تنظیم تعادل ردوکس سلولی از طریق مکانیسم‌های مختلف نقش دارد. از جمله این که PGC-1 α به کاهش تجمع ROS میتوکندریایی تا حدی از طریق

1. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

بگزارد (27). بیان MCAD، آنزیمی که اولین مرحله بتاکسیداسیون اسیدهای چرب را انجام می‌دهد با تمرین استقامتی افزایش می‌یابد (28). در مطالعه دیگری که روی رت‌های نر دیابتی انجام شد نشان‌دهنده شد که تمرین استقامتی باعث افزایش بیان $ERR-\alpha$ و به دنبال آن افزایش MCAD و CPT-1b می‌شود (14). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر افزایش CPT-1b متعاقب مصرف مکمل MitoQ نشان داده شده (17).

باتوجه به اثرات پاتولوژیک تولید زیاد رادیکال‌های آزاد بر روی میتوکنندری که جایگاه اصلی تولید انرژی است (29)، هرگونه اختلال در عملکرد میتوکنندری می‌تواند منجر به اختلال در اکسیداسیون اسیدهای چرب و تولید انرژی در بافت‌هایی چون عضله اسکلتی که نیاز به انرژی بالایی دارند شود. بنابراین مطالعه حاضر با هدف استفاده از مکمل MitoQ به عنوان مکملی آنتی‌اکسیدانی و موثر بر میتوکنندری در کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد حین تمرین استقامتی و نیز کاهش پراکسیداسیون لیپید و نیز با هدف بهبود عملکرد میتوکنندری در افزایش تولید انرژی انجام شد. با وجود انجام چند مطالعه بسیار محدود در زمینه اثر تمرین بر $ERR\alpha$ و PGC-1 در حیوان و انسان‌های سالم، تاکنون مطالعه‌ای به بررسی اثر تمرین استقامتی بر بیان این فاکتورها در عضله اسکلتی در حضور مکمل MitoQ نپرداخته است و از طرفی برای اطمینان از تاثیرگذاری این مکمل روی متابولیسم لیپید، بافت هدف، عضله اسکلتی انتخاب شد که محتوای میتوکنندری زیادی دارد و هرگونه اثر مثبت یا منفی به راحتی قابل شناسایی است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر تمرین استقامتی و مصرف مکمل MitoQ بر شاخص‌های اکسیداسیون لیپید (MCAD, CPT-1b) و بیان $ERR\alpha$ و PGC-1 در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی نر است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که به روش تجربی انجام گرفت،

PGC1 α / $ERR-\alpha$ و به تبع آن افزایش اکسیداسیون چربی می‌شود (14). اما از آن‌جا که تمرین استقامتی سبب تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود، برهم خوردن تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و دفاع آنتی‌اکسیدانی منجر به آسیب به طیف گسترده‌ای از گونه‌های مولکولی از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه می‌شود (15). مکمل MitoQ (Mitoquinone mesylate) به عنوان یک مکمل آنتی‌اکسیدانی و تاثیرگذار بر میتوکنندری برای کاهش ROS در میتوکنندری و مسدود کردن پراکسیداسیون لیپید طراحی شده (16) و این امر را از طریق بهبود در جابه‌جایی و عبور و مرور متابولیت‌ها به میتوکنندری انجام می‌دهد و موجب بهبود آسیب اکسیداتیو میتوکنندری می‌شود (17).

مکمل MitoQ از یک کاتیون لیپوفیلیک، تری فنیل فسفونیوم تشکیل شده است که توسط یک زنجیره آلکیل آلانینده 10 کربنی اشباع شده به یوبیکینون متصل شده است و پس از ورود به میتوکنندری، یوبیکینون توسط کمپلکس 2 به شکل فعال یوبیکینول کاهش می‌یابد (18,19). پس از ورود به میتوکنندری چند صد برابر در ماتریکس میتوکنندری تجمع می‌یابد (20). آن‌ها سپس به سرعت رادیکال‌های آزاد را در میتوکنندری‌ها پاکسازی کرده و از میتوکنندری و سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند (21,22).

در محدود مطالعات انجام شده اثرات سلولی تمرین استقامتی فاکتورهای درگیر در انعطاف‌پذیری متابولیکی را نیز در برمی‌گیرد. به عنوان مثال، تمرین منجر به افزایش در بیان PGC-1 α می‌شود (23). هم‌چنین تمرین استقامتی حاد منجر به افزایش سطوح $ERR-\alpha$ mRNA و PGC-1 α در عضله اسکلتی انسان در زمان 2 ساعت بعد از تمرین می‌شود (24). تمرین استقامتی سبب افزایش آنزیم‌های بتاکسیداسیون اسیدهای چرب می‌شود (25). هم‌چنین تمرین استقامتی با افزایش PGC-1 α موجب افزایش اکسیداسیون چربی می‌شود (26). نشان داده شده است که تمرین استقامتی باعث افزایش بیان $ERR-\alpha$ می‌شود که می‌تواند بر بیان MCAD و CPT-1b تاثیر

هفته پنجم سرعت 26 متر بر دقیقه و زمان 55 دقیقه و در نهایت هفته ششم با سرعت 27 متر بر دقیقه و زمان 60 دقیقه به پایان رسید.

72 ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، موش‌های صحرایی به وسیله تزریق درون صفاقی (i.p.) کتامین (90mg/kg) و زیلازین (10mg/kg) بی هوش و بافت عضله اسکلتی (دوقلوی میانی) به سرعت استخراج و در نیتروژن -80- منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی به یخچال -80- منتقل شد.

آماده سازی نمونه‌ها

ابتدا بافت‌ها به تکه‌های کوچک بریده شدند و سپس در نیتروژن مایع به شیوه هاون کوبی پودر شدند. بعد از این مرحله، 3 ml (300 لاندا) از بافر RLT، به 20mg-10 از بافت پودر شده اضافه شد. سپس 59 ml.

از RNase-free water به مخلوط اضافه شد و مخلوط به طور کامل ترکیب شد و به مدت 10 دقیقه در دمای 55 درجه سانتی گراد در دستگاه Dry Bath اینکوبه شد. سپس، مخلوط به دست آمده با سرعت 12000g به مدت 3 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ شد. بعد از این مرحله، سوپرناتانت به تیوب RNase-free (1.5ml) منتقل شد. سپس، 500 لاندا محلول RPE به ستون اضافه و در دمای اتاق به مدت یک دقیقه با دور 12000g سانتریفیوژ شد و سپس مواد اضافی بیرون ریخته شد. این مرحله یک بار دیگر تکرار شد. در ادامه پروتکل، با سرعت 12000g به مدت 2 دقیقه و با دمای 25 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ انجام شد. سپس، تمام RNA استخراج شده در مرحله سنتز CDNA وارد شد. بر اساس غلظت RNA استخراج شده مقدار مشخص برای رسیدن به غلظت 700 لاندا برداشته شد و بر اساس پروتکل کیت سنتز CDNA، بافر میکس 10 لاندا، آنزیم الیگودیتی 2 لاندا و میزان مورد نیاز آب تا رسیدن 20µL به نمونه‌ها برای سنتز اضافه شد و CDNA سنتز شد و مخلوط به دمای 4 درجه سانتی گراد رسانده

تعداد 32 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن 8 هفته و میانگین وزنی 20 ± 200 گرم در آزمایشگاه با شرایط دمایی 22 ± 2 درجه سانتی گراد تحت سیکل 12:12 ساعت تاریکی - روشنایی نگهداری شد و با غذای مخصوص موش صحرایی (Pellet، شرکت جوانه خراسان) و آب تغذیه شدند. پس از سازگاری با محیط آزمایشگاه بعد از دو هفته، به‌طور تصادفی به 4 گروه با تعداد مساوی (n=8) تقسیم شدند. گروه‌ها شامل 1. کنترل، 2. مکمل MitoQ، 3. تمرین استقامتی، 4. تمرین استقامتی + MitoQ بودند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، در سنجش بیان ژن از هر گروه 8 سر برای آنالیزها استفاده شد. مقاله حاضر توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان مورد تایید قرار گرفت (IR.UK.VETMED.1399-005).

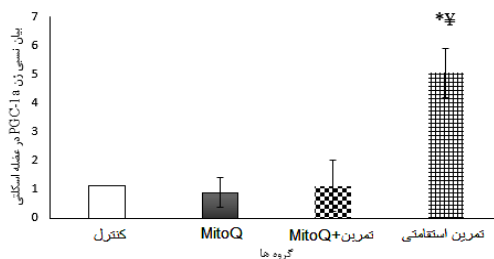
نحوه بارگیری مکمل MitoQ

با توجه به این که این مکمل به صورت مستقیم از کمپانی MitoQ در کشور نیوزلند تهیه شد، روش مکمل دهی براساس نظر متخصصان این کمپانی صورت گرفت. بنابراین، براساس روش ارسالی از کمپانی، حداقل 4 ساعت قبل از شروع تمرین، رت‌ها در گروه‌ها مکمل MitoQ را به میزان 122 mg/kg/day از طریق گاواژ دریافت کردند.

پروتکل تمرینی

پروتکل تمرینی پس از دو هفته آشناسازی با تردمیل به مدت 6 هفته (5 روز در هفته) انجام شد. ابتدا گروه‌های تمرین به مدت 2 هفته با سرعت 15 متر بر دقیقه به مدت 20 دقیقه با دوییدن روی تردمیل آشنا شدند. پس از دو هفته آشناسازی پروتکل اصلی به شرح زیر بود: هفته اول سرعت 20 متر بردقیقه به مدت 35 دقیقه، هفته دوم سرعت 22 متر بر دقیقه و زمان 40 دقیقه، هفته سوم سرعت 24 متر بر دقیقه و زمان 45 دقیقه، هفته چهارم سرعت 25 متر بر دقیقه و زمان 50 دقیقه،

نمودار شماره 1 مقادیر بیان ژن PGC-1 α را در عضله دوقلوی میانی گروه‌های مطالعه نشان می‌دهد. تمرین استقامتی منجر به افزایش معنی‌دار بیان PGC-1 α در گروه تمرین استقامتی ($0/85 \pm 0/05$) نسبت به گروه کنترل ($0/60 \pm 1/125$) ($P=0/000$) شد. با انجام 6 هفته تمرین استقامتی افزایش معنی‌دار بیان PGC-1 α در گروه تمرین استقامتی ($0/85 \pm 0/05$) نسبت به گروه تمرین استقامتی + مکمل MitoQ ($0/87 \pm 1/12$) ($P=0/000$) مشاهده شد. همچنین در سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.



نمودار شماره 1: نتایج آزمون تعقیبی دانت C در متغیر PGC-1 α
 *: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.
 †: اختلاف معنی‌دار با گروه تمرین + مکمل

میزان بیان ژن ERR- α در گروه‌های تمرین استقامتی ($0/68 \pm 2/53$) ($P=0/02$)، مکمل ($0/42 \pm 2/015$) ($P=0/036$) و گروه تمرین + مکمل ($0/78 \pm 3/29$) ($P=0/000$) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ($0/52 \pm 1/08$) داشت ($P=0/036$). انجام 6 هفته تمرین استقامتی همراه با مصرف مکمل MitoQ ($0/78 \pm 3/29$) منجر به افزایش معنی‌دار ($P=0/019$) بیان ERR- α نسبت به گروه مصرف مکمل به تنهایی ($0/42 \pm 2/015$) شد (نمودار شماره 2).

شد و به یخچال 20- منتقل شد. برنامه Real time-PCR شامل واسرشت اولیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد و به مدت 10 دقیقه واسرشت در هر سیکل PCR در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 ثانیه و با توجه به دمای اتلینگ پرایمرها هر سیکل به مدت 30 ثانیه (40 سیکل) در نظر گرفته شد. از 18S به عنوان کنترل استفاده شد و میزان بیان این ژن به صورت توامان با هر ژن اندازه‌گیری شد و میزان بیان ژن‌های مورد نظر با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

روش آماری

از شاخص‌های میانگین و پراکندگی در سطح آمار توصیفی استفاده شد. برای مقایسه گروه‌های مطالعه از آزمون تحلیل واریانس یک‌راه استفاده شد. آزمون تعقیبی دانت C (در صورت ناهمگنی واریانس‌ها) و توکی (در صورت همگنی واریانس‌ها) برای مقایسه چندگانه گروه‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری $\alpha=0/05$ در نظر گرفته شد. از آزمون شاپیروویلک برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. همگن بودن واریانس‌ها با استفاده از آزمون لوین بررسی شد. نرم‌افزار آماری مورد استفاده SPSS نسخه 22 بود.

یافته‌ها

بیان ژن‌های PGC-1 α ، ERR- α و MCAD، CPT-1b در عضله دوقلوی میانی گروه تمرین استقامتی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) بیش‌تر بود. مصرف مکمل MitoQ تنها باعث افزایش معنی‌دار بیان ERR- α و CPT-1b نسبت به گروه کنترل شد (جدول شماره 2).

جدول شماره 1: جدول توالی پرایمرها

اندازه (bp)	Reverse primer 5'-3'	Forward primer 5'-3'	ژن
122	GGCCTCACTAAACCATCCAA	GCAATTATTCCTCCATGAACG	18s
100	5-CCCCAAAGAATTGC-3	5-CAAGAGAGCCTGGGA-3	MCAD
107	5'-CGTGGACTCGCTAGTACAGGAA	5'-CATTTCGCGACAAA	CPT-1b
152	5'-GACAAATGCTCTTTTGCTTTATTGC	5'-ACCCACAGGATCAGAACAAACC	PGC-1 α
	GAAGCCTGGGATGCTCTTG	AAGCCCTGATGGACACCTC	ERR- α

بحث

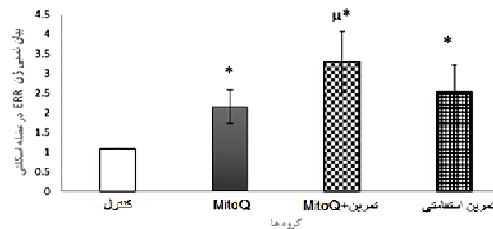
مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر تمرین، اثر مکمل MitoQ و اثر تمرین + مکمل MitoQ بر بیان ژن‌های $ERR-\alpha$ و $PGC-1\alpha$ به عنوان ژن‌های اصلی در گیر در مسیر اکسیداسیون لیپید و برخی فاکتورهای تنظیمی این دو شاخص در عضله اسکلتی رت‌های نر نژاد ویستار انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که تمرین استقامتی به تنهایی بیان ژن‌های $ERR-\alpha$ ، $CPT-1b$ ، $MCAD$ ، $PGC-1\alpha$ را در عضله ی دوقلوی میانی افزایش می‌دهد. در حالی مصرف مکمل MitoQ به تنهایی سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های $CPT-1b$ و $ERR-\alpha$ شد، اما اثر این مکمل نمی‌تواند به اثر تمرین استقامتی بر بیان این دو ژن اضافه شود.

اعمال 6 هفته تمرین استقامتی باعث افزایش معنی‌دار بیان $PGC-1\alpha$ می‌شود که نتیجه‌ای قابل انتظار بود، چرا که اعمال تمرین استقامتی با افزایش فاکتورهای درگیر در بیورژنز میتوکندریایی همراه است که در رأس آن فاکتور $PGC-1\alpha$ قرار دارد (30). در واقع افزایش در بیان $PGC-1\alpha$ به نوعی تأییدکننده اثربخشی تمرین انجام شده در مطالعه حاضر بود.

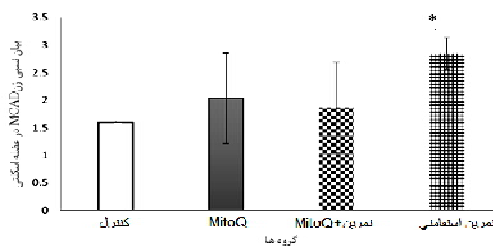
در واقع $PGC-1\alpha$ به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی بیورژنز میتوکندری و عملکرد میتوکندریایی شناخته می‌شود (31، 32). چرائی افزایش $PGC-1\alpha$ در اثر تمرین استقامتی، از یک طرف ریشه در عملکرد این فاکتور دارد که با افزایش بیورژنز میتوکندری در جهت تسهیل نیازهای انرژی‌تیک افزایش یافته در حین تمرین عمل می‌کند و از طرف دیگر به دلیل فعال شدن مسیرهای بالادستی این فاکتور بواسطه تمرین می‌باشد (33).

$AMPK$ و $p38MAPK$ به عنوان کینازهای سیگنالی بالادست برای بیان $PGC-1\alpha$ شناخته شده‌اند (34). $AMPK$ با تغییرات انرژی‌تیک سبب انقباض عضلانی در عضله اسکلتی فعال می‌شود (35) و به‌طور مستقیم $PGC-1\alpha$ را فعال می‌کند (36). این فعال‌سازی احتمالاً توسط فسفوریلاسیون $PGC-1\alpha$ توسط $P38 MAPK$ رخ می‌دهد

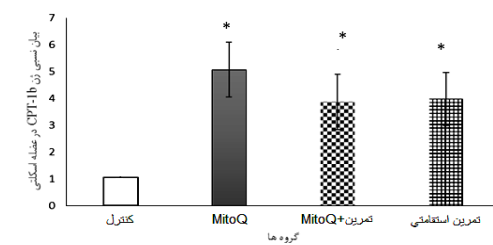
همان‌گونه که در نمودار شماره 3 مشاهده می‌شود با انجام 6 هفته تمرین استقامتی سطح بیان $MCAD$ تنها در گروه تمرین استقامتی ($0/28 \pm 2/85$) نسبت به گروه کنترل ($1/06 \pm 1/59$) افزایش معنی‌داری ($P=0/041$) داشت و در سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نمودار شماره 4 مقادیر بیان ژن $CPT-1b$ را در عضله دوقلوی میانی گروه‌های مطالعه نشان می‌دهد. در گروه‌های مکمل ($1/01 \pm 5/08$)، مکمل و تمرین استقامتی ($1/03 \pm 3/87$) و تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ($0/98 \pm 3/98$) مشاهده شد ($P=0/000$).



نمودار شماره 2: نتایج آزمون تعقیبی توکی در متغیر $ERR-\alpha$.
*: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.
#: اختلاف معنی‌دار با گروه مکمل MitoQ



نمودار شماره 3: نتایج آزمون تعقیبی توکی در متغیر $MCAD$.
*: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.



نمودار شماره 4: نتایج آزمون تعقیبی توکی در متغیر $CPT-1b$.
*: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل.

سطوح بالای انرژی در پاسخ به رویدادهایی همانند محرک‌های تمرینی لازم است (42). در خلال تمرین استقامتی انرژی مصرفی به بیش‌تر از 5 برابر حالت استراحت افزایش می‌یابد (43). تمرین اعمال شده در مطالعه حاضر (27 متر بر دقیقه) شدتی معادل با تمرین با 75 درصد حداکثر اکسیژن مصرفی دارد که در خلال چنین تمرینی انرژی مصرفی عضله اسکلتی به بیش‌تر از پنج برابر حالت استراحت افزایش می‌یابد (44). پیامد این سطح نیاز به انرژی، سازگاری‌هایی است که در عضله اسکلتی اتفاق می‌افتد تا این نیاز متابولیک را مرتفع سازد. افزایش CPT-1b و MCAD مشاهده شده در مطالعه حاضر خود مؤید این نیاز متابولیکی اعمال شده بر عضله اسکلتی گروه‌های تمرین استقامتی است. بنابراین، با توجه به نقش $ERR-\alpha$ در تنظیم انرژی سلولی بخشی از افزایش بیان $ERR-\alpha$ در اثر تمرین استقامتی، می‌تواند در جهت تامین این نیاز متابولیکی باشد. ژن MCAD، آنزیم کلیدی چرخه بتااکسیداسیون و ژن CPT-1b به عنوان آنزیم محدودکننده‌ی برداشت میتوکندریایی اسیدهای چرب به عنوان ژن‌های هدف و مهم $ERR-\alpha$ شناسایی شده‌اند. به عنوان مثال نشان داده شده است که بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسئول بتااکسیداسیون لیپید نظیر CPT-1b و MCAD در پاسخ به افزایش بیان $ERR-\alpha$ افزایش می‌یابد (11). یا در بررسی اثر $ERR-\alpha$ بر بیان MCAD در محیط‌های آزمایشگاهی (in vitro) افزایش مجازی سطوح $ERR-\alpha$ در میوسیت‌های قلبی عاری از $ERR-\alpha$ منجر به افزایش معنی‌دار اکسیداسیون پالمیتات شده است (45). در نتایج مطالعه حاضر نیز افزایش در سطح $ERR-\alpha$ موازی با افزایش در بیان ژن CPT-1b و MCAD در گروه تمرین استقامتی اتفاق افتاد. افزایش هم‌راستای $ERR-\alpha$ با CPT-1b و MCAD به نوعی این مطلب را تاکید می‌نماید که بخشی از افزایش $ERR-\alpha$ در عضله اسکلتی در جهت تسهیل هر چه بیش‌تر اکسیداسیون لیپید در عضله اسکلتی اتفاق می‌افتد.

که وابسته به مسیر NF-KB است (37). عامل دیگر تولید ROS ناشی از تمرین استقامتی که سبب فعال شدن PGC-1 α می‌شود (38)، مکانیسمی که در نتایج مطالعه حاضر به وضوح دیده شد.

در واقع، مصرف مکمل MitoQ به تنهایی سبب تغییری در بیان PGC-1 α نشد و حتی در گروه تمرین + مکمل نیز سبب افزایش کم‌تر PGC-1 α نسبت به گروه تمرین صرف شد. هرچند رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو در مطالعه حاضر اندازه‌گیری نشد، لیکن به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی این مکمل این احتمال وجود دارد که تفاوت معنی‌دار بیان PGC-1 α در گروه تمرین استقامتی با گروه تمرین + مکمل MitoQ را به علت اثر مکمل در کاهش سطح ROS و استرس اکسیداتیو جستجو کرد. در واقع مکمل MitoQ احتمالاً می‌تواند با تمیز کردن رادیکال‌های آزاد میتوکندریایی، موجبات کاهش اثر تحریک ROS بر بیان PGC-1 α ناشی از تمرین را فراهم آورد (39). با این وجود اظهار نظر قطعی در مورد این احتمال نیازمند انجام مطالعات بعدی است. دیگر نتیجه مهم این مطالعه افزایش بیان $ERR-\alpha$ در اثر تمرین و مکمل MitoQ بود. دلیل اندازه‌گیری این فاکتور در مطالعه حاضر ارتباط متقابل متابولیکی آن با PGC-1 α بود. در واقع فعال سازی این دو برای کنترل هموستاز متابولیکی سلول، تکوین میتوکندریایی، فسفوریلاسیون اکسیداتیو و اکسیداسیون اسیدهای چرب ضروری می‌باشد (39). به طوری که نشان داده شده است با افزایش بیان PGC-1 α ، بیان $ERR-\alpha$ نیز افزایش می‌یابد (40). چنان که می‌توان علت افزایش بیان $ERR-\alpha$ در عضله اسکلتی رت‌های نر نژاد ویستار متعاقب 6 هفته تمرین استقامتی در این مطالعه را افزایش بیان PGC-1 α دانست. همچنین علت آن را می‌توان در نقش این فاکتور در فراهمی انرژی در بافت‌هایی که نیاز بالایی به انرژی دارند جست و جو کرد (41).

بیان بالای $ERR-\alpha$ برای رفع نیازهای انرژی پایه سلول غیرضروری اما حضورش برای فراهم کردن

افزایش با CPT-1b مؤکد تاثیر پذیری CPT-1b از ERR- α می‌باشد و دلیل دیگری در اثبات نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در افزایش اکسیداسیون لیپیدهاست. به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اعمال تمرین استقامتی موجب افزایش بیان ژن‌های ERR- α و PGC-1 α می‌شود که با افزایش بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم لیپید همراه است. با وجود افزایش در بیان ERR- α و CPT-1b متعاقب مصرف مکمل آنتی‌اکسیدانی MitoQ، اثر این مکمل به اثر تمرین استقامتی قابل اضافه شدن نیست که مؤکد واسطه‌گری اثر تمرین بر متابولیسم لیپید از طریق رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو می‌باشد.

دیگر نتیجه مهم این مطالعه افزایش معنی‌دار بیان ژن CPT-1 در اثر مصرف مکمل MitoQ بود، به طوری که این اثر حتی از اعمال تمرین استقامتی نیز تاثیرگذاری بیشتری داشت. نشان داده شد که افزایش ROS موجب مهار CPT-1 ناشی از افزایش مالونیل‌کوا می‌شود (46). در مطالعه حاضر مصرف مکمل MitoQ سبب افزایش معنی‌دار بیان CPT-1b در عضله دوقلوی میانی رت‌ها شد که علت آن را می‌توان در نقش آنتی‌اکسیدانی این مکمل در کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود بیوژنز میتوکندریایی دانست. همچنین از آنجا که سطح بیان ERR- α به عنوان مسیر بالادست CPT-1b تحت تاثیر مصرف مکمل MitoQ افزایش داشته، هم‌راستا شدن این

References

1. Shaw CS, Swinton C, Morales-Scholz MG, McRae N, Erftemeyer T, Aldous A, et al. Impact of exercise training status on the fiber type-specific abundance of proteins regulating intramuscular lipid metabolism. *J Appl Physiol* 2020; 128(2): 379-389.
2. Islam H, Bonafiglia JT, Granata C, Gurd BJ. Exercise-Induced Mitochondrial Biogenesis: Molecular Regulation, Impact of Training, and Influence on Exercise Performance. In *The Routledge Handbook on Biochemistry of Exercise*. New York USA: Routledge; 2020. p. 143-161.
3. Saltin B, Gollnick PD. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In Terjung R, (ed). *Comprehensive Physiology*. New York: Wiley Library; 2010: p. 555-631.
4. Mole PA, Oscai LB, Holloszy JO. Adaptation of muscle to exercise: increase in levels of palmitoyl CoA synthetase, carnitine palmitoyltransferase, and palmitoyl CoA dehydrogenase, and in the capacity to oxidize fatty acids. *J Clin Invest* 1971; 50(11): 2323-2330.
5. Turcotte L P, Swenberger JR, Tucker MZ, Yee AJ. Training-induced elevation in FABPPM is associated with increased palmitate use in contracting muscle. *J Appl Physiol* 1999; 87(1): 285-293.
6. Alghannam AF, Ghaith MM, Alhussain MH. Regulation of energy substrate metabolism in endurance exercise. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18(9): 4963.
7. Cheng CF, HC Ku, HLin. PGC-1 α as a pivotal factor in lipid and metabolic regulation. *Int J Mol Sci* 2018; 19(11): 3447.
8. Halling JF, Pilegaard H. PGC-1 α -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications. *Appl Physiol Nutr Metab* 2020; 45(9): 927-936.
9. Hashida R, Kawaguchi T, Bekki M, Omoto M, Matsuse H, Nago T, et al. Aerobic vs. resistance exercise in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *J Hepatology* 2017; 66(1): 142-152.

10. Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, et al. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 2003;115(5): 629-640.
11. Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguère V, Kelly DP. Estrogen-related receptor α directs peroxisome proliferator-activated receptor α signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 2004; 24(20): 9079-9091.
12. Bonnefont J, Demaugre F, Prip-Buus C, Saudubray JM, Brivet M, Abadi N, et al. Carnitine palmitoyltransferase deficiencies. *Mol Genet Metab* 1999; 68(4): 440-424.
13. Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1546(1): 21-43.
14. Aminizadeh S, Habibi A, Marefati H, Shakerian S. Response of estrogen-related receptor alpha ($\text{err}\alpha$) to endurance training and its participation in endurance training-induced adaptations in lipid metabolism in skeletal muscle of male wistar rats. *JSSU* 2017; 25(5): 414-425 (Persian).
15. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010; 4(8): 118-126.
16. Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem* 2001; 276(7): 4588-4596.
17. Li G, Chan LY, Sukjamnong S, Anwer AG, Vindin H, Padula M, et al. A Mitochondrial Specific Antioxidant Reverses Metabolic Dysfunction and Fatty Liver Induced by Maternal Cigarette Smoke in Mice. *Nutrients* 2019; 11(7): 1669.
18. Smith RA, Porteous CM, Coulter CV, Murphy MP. Selective targeting of an antioxidant to mitochondria. *Eur J Biochem* 1999; 263(3): 709-716.
19. James AM, Sharpley MS, Manas ARB, Frerman FE, Hirst J, Smith RAJ, et al. Interaction of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ with phospholipid bilayers and ubiquinone oxidoreductases. *J Biol Chem* 2007; 282(20): 14708-14718.
20. Reddy PH, Tripathi R, Troung Q, Tirumala K, Reddy T, Anekonda V, et al. Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822(5): 639-649.
21. McManus MJ, Murphy MP, Franklin JL. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroscience* 2011; 31(44): 15703-15715.
22. Mao P, Manczak M, Shirendeb UP, Reddy PH. MitoQ, a mitochondria-targeted antioxidant, delays disease progression and alleviates pathogenesis in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis. *Biochimica Biophys Acta* 2013; 1832(12): 2322-2331.
23. Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen MH, et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *The FASEB Journal* 2002; 16(14): 1879-1886.
24. Cartoni R, Léger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, et al. Mitofusins 1/2

- and $ERR\alpha$ expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* 2005; 567(1): 349-358.
25. Fritzen AM, Lundsgaard AM, Kiens B. Tuning fatty acid oxidation in skeletal muscle with dietary fat and exercise. *Nature Reviews Endocrinology* 2020; 16(12): 683-696.
 26. Cheng CF, Ku HC, Lin H. PGC-1 α as a pivotal factor in lipid and metabolic regulation. *Int J Mol Sci* 2018; 19(11): 3447.
 27. Aminizadeh S, Habibi A, Masoumi-Ardakani Y, Shahouzehi B, Marefati H, Shakerian S. The role of estrogen-related receptor α ($ERR\alpha$) in metabolic adaptations by endurance training in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Sport Sci Health* 2021; 17(3): 585-596.
 28. Kompare M, Rizzo WB. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Semin Pediatr Neurol* 2008; 15(3): 140-149.
 29. Venditti P, Di Meo S. The role of reactive oxygen species in the life cycle of the mitochondrion. *Int J Mol Sci* 2020; 21(6): 2173.
 30. Bishop DJ, Botella J, Genders AJ, Lee MJ, Saner NJ, Kuang J, et al. High-intensity exercise and mitochondrial biogenesis: current controversies and future research directions. *Physiology* 2019; 34(1): 56-70.
 31. 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): 1541-1559.
 32. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009; 458(7241): 1056-1060.
 33. Sylviana N, Natalia C, Goenawan H, Pratiwi YS, Setiawan I, Tarawan VM. Effect of Short-Term Endurance Exercise on COX IV and PGC-1 α mRNA Expression Levels in Rat Skeletal Muscle. *Biomed Pharmacol J* 2019; 12(3): 1309-1316.
 34. Cantó C, Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(20): 3407-3423.
 35. Yu M, Blomstrand E, Chibalin AV, Krook A, Zierath JR. Marathon running increases ERK1/2 and p38 MAP kinase signalling to downstream targets in human skeletal muscle. *J Physiol* 2001; 536(1): 273-282.
 36. Jäger S, Handschin CH, Julie St-Pierre, Bruce M Spiegelman. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(29): 12017-12022.
 37. 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 Med* 2018; 48(7): 1541-1559.
 38. Aquilano K, Baldelli S, Pagliei B, Cannata SM, Rotilio G, Ciriolo MR. p53 orchestrates the PGC-1 α -mediated antioxidant response upon mild redox and metabolic imbalance. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(4): 386-399.
 39. Jong-Yeon K, Hickner RC, Dohm GL, Houmard JA. Long-and medium-chain fatty acid oxidation is increased in exercise-trained human skeletal muscle. *Metabolism* 2002; 51(4): 460-464.
 40. Di W, Lv J, Jiang S, Lu C, Yang Z, Ma Z, et al. PGC-1: the energetic regulator in cardiac metabolism. *Curr Issues Mol Biol* 2018; 28(1): 29-46.

41. Sladek R, Bader JA, Giguere V. The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol* 1997; 17(9): 5400-5409.
42. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 2013; 17(2): 162-184.
43. Deblois G, Giguère V. Functional and physiological genomics of estrogen-related receptors (ERRs) in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812(8): 1032-1040.
44. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14(6): 753-760.
45. Giguère V. Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. *Endocr Rev* 2008; 29(6): 677-696.
46. Setoyama D, Fujimura Y, Miura D. Metabolomics reveals that carnitine palmitoyltransferase-1 is a novel target for oxidative inactivation in human cells. *Genes Cells* 2013; 18(12): 1107-1119.