

## تأثیر تمرین تناوبی پُرشدت (HIIT) بر میزان پروتئین‌های مرتبط با مسیر میتوفاژی (LC3 و BNIP3L) در بافت عضلانی نعلی رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو

مجیا شریفی‌راینی<sup>۱</sup>، فرهاد دریانوش<sup>۱\*</sup>، محسن ثالثی<sup>۱</sup>، مریم کوشکی جهرمی<sup>۱</sup>

### چکیده

مقدمه: میتوفاژی نوعی مرگ سلولی برای تنظیم کیفیت میتوکندری است که در شرایط بیماری مانند دیابت می‌تواند منجر به اختلال شود؛ بنابراین، هدف از انجام تحقیق حاضر، تأثیر تمرین تناوبی پُرشدت (HIIT) بر میزان پروتئین‌های مرتبط با مسیر میتوفاژی (LC3 و BNIP3L) در بافت عضلانی نعلی رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو است.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۱۸ سر رت نر سه ماهه از نژاد اسپراگ‌داولی با میانگین وزن  $270 \pm 30$  گرم انتخاب شدند. رت‌ها از طریق تزریق درون‌صفافی محلول استرپتوزوتوسین و نیکوتین‌آمید مبتلا به دیابت نوع دو شدند. این رت‌ها به روش تصادفی به دو گروه، تمرین دیابتی و کنترل دیابتی تقسیم شدند؛ یک گروه کنترل سالم نیز در نظر گرفته شد. گروه تمرینی، HIIT را به مدت هشت هفته با شدتی معادل ۸۵ تا ۹۵ درصد حداکثر سرعت انجام دادند. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون آنوای یک‌طرفه در نرم‌افزار گراف‌پد پریسم نسخه ۹/۵ انجام شد. سطح معناداری  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: محتوای پروتئین‌های LC3 و BNIP3L افزایش معنی‌داری را پس از هشت هفته HIIT نسبت به هر دو گروه کنترل دیابتی و کنترل سالم نشان داد ( $P=0/0001$ ).

نتیجه‌گیری: می‌توان نتیجه گرفت که HIIT با افزایش عوامل مرتبط با میتوفاژی می‌تواند سبب پاکسازی میتوکندری‌های ناکارآمد در عضلهٔ آرمودنی‌های دیابتی شود؛ با این وجود میتوفاژی بیش از حد نیز می‌تواند سبب نقص عملکردی در تنظیم کیفیت میتوکندری‌ها شود.

واژگان کلیدی: تمرین تناوبی پُرشدت، عضلهٔ نعلی، پروتئین LC3، پروتئین BNIP3L، دیابت نوع دو

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

\*تشنای: شیراز، میدان ارم، دانشگاه شیراز، دانشکدهٔ علوم تربیتی و روانشناسی، گروه علوم ورزشی، تلفن: ۰۹۱۷۳۰۱۴۰۳۲، پست الکترونیک: daryanoosh@shirazu.ac.ir

## مقدمه

میتوکندری‌ها تولیدکننده اولیه ATP سلولی در عضلات اسکلتی هستند که برای فعالیت‌های ورزشی و سایر عملکردهای فیزیولوژیکی مورد نیاز هستند [۱]. نقص در کیفیت میتوکندری عضله اسکلتی منجر به اختلال عملکرد بافتی می‌شود و تصور بر این است که این می‌تواند عامل اصلی ایجاد بیماری‌های مزمن مانند دیابت باشد [۲، ۳].

سازکارهای آنابولیک تنظیم‌کننده کیفیت میتوکندری، یعنی بیوژنز میتوکندری، گسترده‌ترین مورد مطالعه در عضلات اسکلتی هستند [۴]. با این حال، برای نقش سازکارهای کاتابولیک کنترل کیفیت میتوکندری، مانند میتوفاژی مطالعات محدودی وجود دارد. میتوفاژی یک فرآیند کاتابولیک چند مرحله‌ای است که مسئول تخریب انتخابی و وابسته به لیزوزومی میتوکندری‌های آسیب دیده و یا ناکارآمد است که برای حفظ کیفیت میتوکندری حیاتی است [۵]. یک فرضیه در حال ظهور این است که میتوفاژی، یک جزء کلیدی از کنترل کیفیت میتوکندری است که در نهایت منجر به عملکرد بهتر میتوکندری می‌شود و برای سازگاری با واسطه فعالیت‌های ورزشی در عضله اسکلتی بسیار مهم است [۲].

پروتئین کیناز فعال‌شده با ۵'-آدنوزین مونوفسفات (AMPK)<sup>۱</sup> یک کمپلکس آنزیمی بسیار حفاظت‌شده است [۶] که با فسفوریل‌اسیون کمپلکس توبروس اسکلوئوسیس ۲/۱ (TSC1/2)<sup>۲</sup> و غیرفعال کردن پروتئین Ras همولوگ غنی‌شده در مغز (Rheb)<sup>۳</sup>، منجر به مهار کمپلکس ۱ هدف راپامایسین در پستانداران (mTORC1)<sup>۴</sup> می‌شود. این فرایند می‌تواند اتوفاژی و میتوفاژی را تنظیم کند [۷، ۳]. با فعال شدن کمپلکس‌های پایین دست mTORC1، پروتئین‌های دیگری فعال می‌شود که می‌تواند میتوفاژی را انجام و به پایان برساند. در این میان پروتئین مرتبط با میکروتوبول A/IB1-زنجیره سبک ۳ (LC3)<sup>۵</sup> یک پروتئین محلول با جرم مولکولی تقریباً ۱۷ کیلودالتون است که در بافت‌های پستانداران توزیع می‌شود. عوامل مرتبط با اتوفاژیک میتوکندری با اتصال به LC3

می‌تواند میتوفاژی را فعال کند [۸]. در طی اتوفاژی میتوکندری فرم سیتوزولی LC3 (LC3-I) به فسفاتیدیل اتانول‌آمین<sup>۶</sup> متصل می‌شود تا فرم LC3-فسفاتیدیل اتانول‌آمین (LC3-II) را تشکیل دهد که به غشاهای اتوفاگوزومی اضافه می‌شود. اتوفاگوزوم‌ها با لیزوزوم‌ها ترکیب می‌شوند و اتولیزوزوم‌ها را تشکیل می‌دهند و اجزای داخل اتوفاگوزومی توسط هیدرولازهای لیزوزومی تجزیه می‌شوند. LC3 به صوت مجزا و به صورت اتصال به BNIP3L می‌تواند منجر به میتوفاژی شود [۹، ۱۰].

مسیرهای درگیر در تنظیم میتوفاژی را می‌توان با سه مسیر مستقل زیر تنظیم کرد: (۱) میتوفاژی با واسطه پینک ۱/پارکین<sup>۷</sup>، میتوفاژی با واسطه FUNDC1<sup>۸</sup> و میتوفاژی با واسطه BNIP3L (NIX)<sup>۹</sup> [۱۱]. میتوکندری‌ها دائماً تحت شکافت، همجوشی و میتوفاژی قرار می‌گیرند تا هموستاز و عملکرد خود را حفظ کنند و در صورت تنظیم نشدن دینامیک میتوکندری، میتوفاژی منجر به کاهش تولید ATP و جهش DNA آنها می‌شود، که در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود. یکی از پروتئین‌های درگیر در میتوفاژی پروتئین BNIP3L است؛ پروتئین BNIP3L که همچنین به عنوان NIX شناخته می‌شود و یک پروتئین مربوط به میتوکندری است که در غشای بیرونی میتوکندری قرار دارد و متعلق به پروتئین BH3 و از خانواده BCL2 است. پروتئین NIX در ابتدا به عنوان یک پروتئین پروپوتوز با اثر خفیف‌تر در القاء آپوتوز در مقایسه با سایر پروتئین‌های این خانواده شناخته شد [۱۲]. به تازگی مشخص شده است که پروتئین BNIP3L به عنوان یک گیرنده میتوفاژی نقشی اساسی دارد [۱۳].

در این میان فعالیت‌های ورزشی یکی از مؤثرترین روش‌ها برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های مزمن است. بسیاری از مزایای ناشی از فعالیت‌های ورزشی به دلیل سازگاری در عضلات اسکلتی است که در طول فعالیت‌های ورزشی به کار می‌روند. به طور خاص، بهبود عملکرد میتوکندری در عضلات اسکلتی یکی از مهم‌ترین سازگاری‌های سلولی ناشی از تمرین‌های هوازی است، که در آن میتوکندری‌ها برای دستیابی به عملکرد مطلوب از طریق

<sup>6</sup> phosphatidylethanolamine

<sup>7</sup> PTEN-induced putative kinase protein-1

<sup>8</sup> FUN14 domain-containing 1

<sup>9</sup> BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like

<sup>1</sup> 5'-Adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase

<sup>2</sup> Tuberous sclerosis proteins 1 and 2

<sup>3</sup> Ras homolog enriched in brain

<sup>4</sup> mammalian target of rapamycin complex 1

<sup>5</sup> Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

این پروتئین‌های مهم در عضله اسکلتی نعلی - یک عضله کند انقباض و غنی از میتوکندری - است. علاوه بر این ارتباط مسیر میتوفاژی میتوکندری از طریق تمرین HIIT مورد بررسی قرار می‌گیرد که یک تمرین جدید در ارتباط با عملکردهای میتوکندری نسبت به تمرین‌های سنتی مانند تمرین استقامتی و مقاومتی است. با توجه به توضیحات ارائه شده هدف از تحقیق حاضر، تأثیر HIIT بر میزان پروتئین‌های درگیر در مسیر میتوفاژی (LC3 و BNIP3L) در بافت عضلانی کند انقباض (نعلی) رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو است.

## روش‌ها

### نمونه و نوع پژوهش

این پژوهش از نوع تجربی و بنیادی خواهد بود. تعداد ۱۸ سر رت از نژاد ویستار با میانگین وزنی  $270 \pm 30$  گرم خریداری و تهیه شد. هر ۴ سر رت در قفس‌های پلی‌کربنات نگهداری شدند. دمای محیط آزمایشگاه  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی و تاریکی به صورت ۱۲ به ۱۲ و رطوبت حدود ۵۵ تا ۶۰ درصد بود. تمامی رت‌ها به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند.

### روش القای دیابت از طریق تزریق محلول استرپتوزوتوسین

#### و نیکوتین‌آمید

برای ایجاد دیابت نوع دو در رت‌ها (۱۲ سر)، در مرحله اول محلول نیکوتین‌آمید با دوز ۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق گردید و سپس، بعد از ۱۵ دقیقه، محلول استرپتوزوتوسین (STZ)<sup>۲</sup> (حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با  $PH= 4/5$ ) به صورت درون صفاقی و فقط یک مرتبه با دوز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق شد. ۷۲ ساعت بعد از تزریق محلول‌های نیکوتین‌آمید و استرپتوزوتوسین با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری قند خون، میزان قند خون از خونی که از نوک دم رت‌ها گرفته، سنجیده شد. قند خون در دامنه ۱۲۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تا ۲۶۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی شدن نوع دو در نظر گرفته شد [۱۸].

مجموعه‌ای از فرآیندهایی که به عنوان کنترل کیفیت میتوکندری نامیده می‌شوند، بازسازی می‌شوند [۴]. تمرین تناوبی پُرشدت (HIIT)<sup>۱</sup> شامل تمرین با شدت بالا همراه با دوره‌های ریکاوری غیرفعال یا فعال است. معمولاً شامل تکرار دوره‌های کوتاه تمرین برای ۳۰ ثانیه تا ۴ دقیقه با شدت نزدیک یا بالاتر از  $VO_{2peak}$ ، همراه با دوره ریکاوری با شدت پایین حدود ۳۰ تا ۴۰ ثانیه است [۱۵، ۱۴]. HIIT به عنوان یک راهبرد درمانی برای بهبود ظرفیت هوایی در تمرین‌ها استفاده شده است و ورزشکاران و بیماران مبتلا به بیماری‌های مزمن را مورد علاقه قرار داده است زیرا سریع و کارآمد است [۱۶].

در تحقیقی Brinkmann و همکاران (۲۰۱۷) محتوای و عملکرد میتوکندری در عضله اسکلتی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو طی یک تمرین استقامتی ۳ ماهه بر پروتئین‌های تنظیم‌کننده میتوفاژی مورد بررسی قرار گرفت. در زمان‌های ۶ هفته قبل از تمرین، ۱ هفته قبل از تمرین و ۳ تا ۴ روز پس از تمرین محتوای پروتئین‌های LC3 و BNIP3 سنجیده شد. تفاوت معنی‌داری بین سه زمان در محتوای پروتئین‌ها مشاهده نشد. این محققان بیان کردند که تغییراتی در پروتئین‌های تنظیم‌کننده میتوفاژی در مردان مبتلا به دیابت نوع دو همراه نیست. مطالعات آینده باید روشن کند که آیا ورزش حاد ممکن است بر فرآیندهای میتوفاژیک در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو تأثیر بگذارد (و اینکه آیا تنظیم گذرا پروتئین‌های تنظیم‌کننده میتوفاژی مشهود است) تا به طور کامل نقش فعالیت بدنی و میتوفاژی برای سلامت میتوکندری در این گروه بیمار خاص مشخص شود [۱۷].

بنابراین، درک اینکه چگونه کیفیت میتوکندری تنظیم می‌شود و اینکه چگونه این فرآیندها تحت تأثیر فعالیت‌ها و تمرین‌های ورزشی قرار می‌گیرند، می‌تواند به توسعه درمان‌های جدید برای حفظ عملکرد عضلات اسکلتی و در نتیجه سلامت کلی کمک کند. بعد از بررسی‌های انجام شده مشخص می‌شود که فرآیندهای بسیار مهمی مانند میتوفاژی و پویایی میتوکندری در کیفیت عملکرد میتوکندری‌ها، مهم هستند. این پژوهش در راستای بررسی مسیرهای سلولی و ملکولی مرتبط به میتوفاژی میتوکندری انجام می‌شود. میتوفاژی از نزدیک با هموستاز عضلانی اسکلتی ارتباط دارد، بنابراین هدف دیگر اندازه‌گیری

<sup>2</sup> Streptozotocin

<sup>1</sup> High intensity interval training

روش آزمایشگاهی وسترن-بلات محتوای درون سلولی فرم‌های تام و فسفریله پروتئین LC3 و BNIP3L اندازه‌گیری شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون آماری شاپیرو-ویلک بررسی شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، داده‌های متغیرهای تحقیق حاضر از طریق آزمون‌های آماری آنوای یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند. بررسی داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار گراف‌پد پریسم نسخه ۹/۵ انجام گرفت. سطح معناداری پژوهش حاضر،  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شده است.

### یافته‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس آزمون آنوای یک‌طرفه نشان داد ۸ هفته HIIT بر میزان پروتئین LC3 در بافت عضلانی کند انقباض (نعلی) رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو تأثیر معنی‌داری دارد ( $P=0/0001$ ). آزمون تعقیبی توکی نشان داد این تغییر معنی‌دار برای محتوای پروتئین LC3 بین جفت گروه‌های کنترل سالم نسبت به کنترل دیابتی ( $P=0/0001$ )، کنترل سالم نسبت به HIIT ( $P=0/0001$ ) و همچنین جفت گروه‌های کنترل دیابتی نسبت به HIIT است ( $P=0/0001$ ) (شکل ۱). همچنین براساس تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داده شد که ۸ هفته HIIT بر میزان پروتئین BNIP3L در بافت عضلانی کند انقباض (نعلی) رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو تأثیر معنی‌داری دارد ( $P=0/0001$ ). آزمون تعقیبی توکی نشان داد این تغییر معنی‌دار برای محتوای پروتئین BNIP3L بین جفت گروه‌های کنترل سالم نسبت به کنترل دیابتی ( $P=0/002$ )، کنترل سالم نسبت به HIIT ( $P=0/0001$ ) و همچنین جفت گروه‌های کنترل دیابتی نسبت به HIIT است ( $P=0/0001$ ) (شکل ۲).

پس از القای دیابت نوع دو، رت‌ها (۱۲ سر) به روش تصادفی به ۲ گروه: گروه HIIT دیابتی (۶ سر) و کنترل دیابتی (۶ سر) تقسیم می‌شوند؛ یک گروه کنترل سالم (۶ سر) نیز در نظر گرفته خواهد شد.

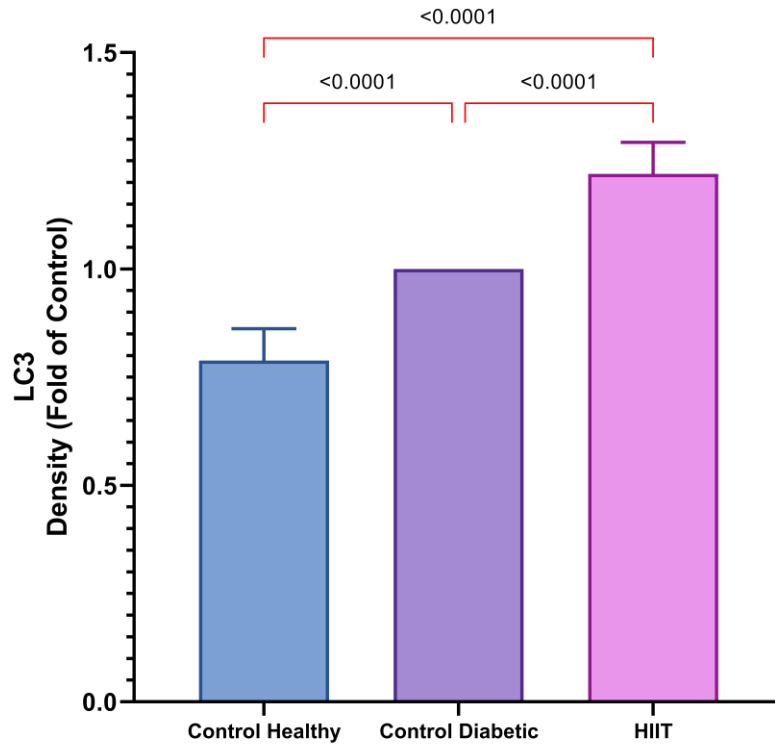
### برنامه تناوبی با شدت بالا (HIIT)

در ابتدا جهت اندازه‌گیری سرعت تمرین رت‌های گروه تمرینی از یک گروه پایلوت (۴ سر و مبتلا به دیابت) که یک هفته از برنامه تمرین اصلی جلوتر هستند، استفاده شد. آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت با سرعت ۵ متر در دقیقه شروع و هر ۳ دقیقه سرعت ترمیل ۵ متر در دقیقه افزایش یافت تا رت‌ها به خستگی (چسبیدن موش‌ها به انتهای ترمیل) رسیدند. سرعتی که در آن رت‌ها به خستگی رسیدند، به‌عنوان حداکثر سرعت در نظر گرفته شد [۱۹].

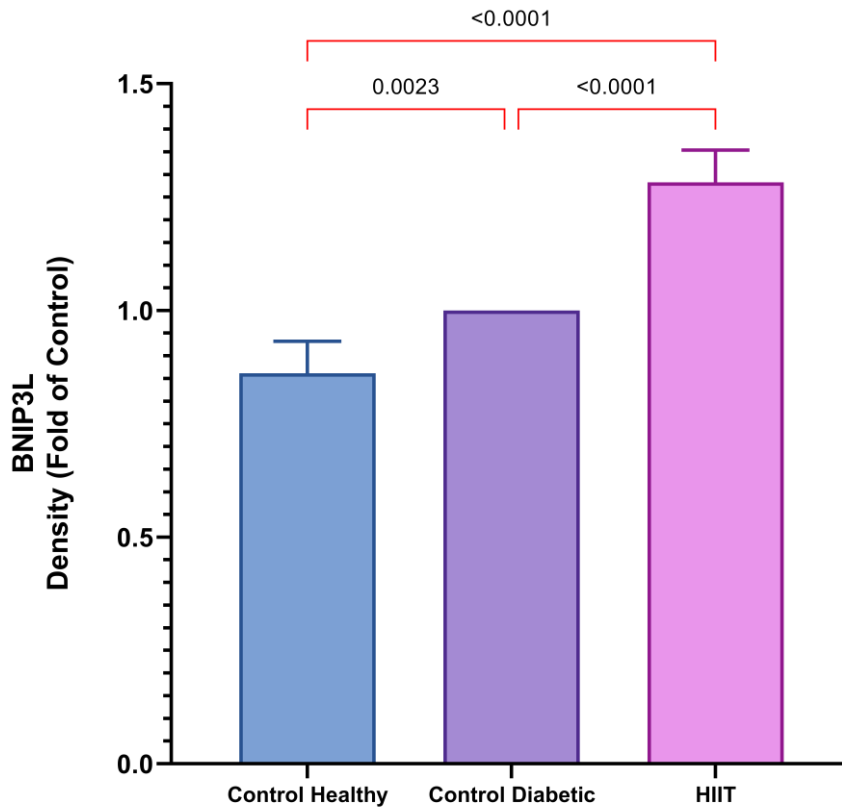
رت‌های گروه تمرین به مدت یک هفته با سرعت ۵ تا ۱۰ متر بر دقیقه بر روی ترمیل دویدند و با آن آشنا شدند. برنامه گروه HIIT به مدت ۸ هفته و هر هفته ۵ جلسه بود. در شروع هر جلسه با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه (۳۰ تا ۵۰ درصد حداکثر سرعت) به مدت ۵ دقیقه گرم کردند. سپس برنامه تمرینی اصلی شامل ۴ دوره ۳ دقیقه‌ای با سرعتی حدود ۲۰ تا ۳۰ متر بر دقیقه (شدت معادل ۸۵ تا ۹۵ درصد حداکثر سرعت) و دوره‌های استراحت فعال ۲ دقیقه‌ای با سرعتی حدود ۱۲ تا ۱۵ متر بر دقیقه (شدت معادل ۵۰ تا ۶۰ درصد حداکثر سرعت) انجام شد. در پایان هر جلسه نیز رت‌ها با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه (۳۰ تا ۵۰ درصد حداکثر سرعت) به مدت ۵ دقیقه سرد کردند. شیب ترمیل صفر درجه و در ۸ هفته تغییری نداشت [۲۰].

### روش بافت برداری و آزمایشگاهی

بعد از ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، رت‌ها با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از ۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کتامین و سه تا پنج میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن زایلازین، بی‌هوش شدند. بعد از آن بافت عضله اسکلتی نعلی جدا و در سرم فیزیولوژیک جهت برطرف کردن آلودگی‌های خونی و بافتی تمیز و درون میکروتیوب‌ها قرار داده شدند. سپس با استفاده از مایع ازت منجمد و برای سنجش‌های بعدی با دمای ۸۰- منجمد شدند. با استفاده از



شکل ۱- میانگین و انحراف استاندارد میزان پروتئین LC3 در گروه‌های مختلف (در شکل معنی‌داری بین گروه‌ها مشخص شده است)



شکل ۲- میانگین و انحراف استاندارد میزان پروتئین BNIP3L در گروه‌های مختلف (در شکل معنی‌داری بین گروه‌ها مشخص شده است)

## بحث و نتیجه‌گیری

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد ۸ هفته HIIT محتوای درون سلولی پروتئین‌های LC3 و BNIP3L را در بافت عضلانی کند انقباض نعلی رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو افزایش می‌دهد.

مورفولوژی، کمیت و کیفیت میتوکندری که توسط شاخه‌های متعدد سیگنالینگ تنظیم و هماهنگ می‌شود، اساساً و در طول استرس‌های فیزیولوژیکی تحت نظارت قابل توجهی قرار می‌گیرند [۲۱]. درک مسیرهای سنتی و کشف شبکه‌های بیولوژیکی جدید که تنظیم دقیق میتوکندری را در عضلات اسکلتی هماهنگ می‌کنند، از جمله بازسازی اندامک، بیوژنز، میتوفاژی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در تفسیر سازگاری مولکولی عضله با عوامل استرس‌زای تحمیلی، مانند فعالیت‌های ورزشی فرصت‌هایی را برای این مسیرها جهت مداخلات درمانی در پیشگیری از بیماری‌های متابولیک، برای افزایش عملکرد عضلانی و در نهایت برای بهبود سلامت و رفاه عضلانی ارائه می‌دهد [۲۱، ۲۲].

در ارتباط با نقش فعالیت‌های ورزشی بر تنظیم مسیرهای مرتبط با میتوکندری در تحقیقی توسط Moller و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که تمرین هوازی سیگنالینگ اتوفاژیک را از طریق ULK1 در عضله اسکلتی انسان افزایش می‌دهد. این مطالعه اثرات تمرین هوازی را بر پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی در عضله اسکلتی انسان بررسی کرد. نویسندگان دریافتند که تمرین ورزشی بیان LC3-II دو نشانگر تشکیل و بلوغ اتوفاگوزوم را افزایش می‌دهد. نویسندگان به این نتیجه رسیدند که تمرین هوازی از طریق سیگنالینگ با واسطه ULK1 و بیان LC3-II باعث اتوفاژی در عضله اسکلتی انسان می‌شود [۲۳]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که محتوای درون سلولی LC3 به دنبال انجام تمرین‌های هوازی افزایش می‌یابد و در تحقیق Moller و همکاران نیز میزان پروتئین LC3-II نیز افزایش یافت بود. می‌توان به این نتیجه رسید که تمرین‌های ورزشی با شدت و نوع مختلف اثرات متفاوتی بر فرآیند اتوفاژی در عضلات دارند. در تحقیق حاضر HIIT، با شدت بالا و مدت زمان هشت هفته، باعث افزایش سطح پروتئین‌های LC3 و BNIP3L شد که نشان دهنده فعال شدن فرآیند میتوفاژی در بافت عضله تهرلی آزمودنی‌های دیابتی نوع دو است. این فرآیند می‌تواند به دو صورت عمل کند: (۱) باعث افزایش بیش از حد میتوفاژی و

کم شدن تعداد و کیفیت میتوکندری در آزمودنی‌های دیابتی شود که این امر می‌تواند سبب نقص عملکردی عضلانی شود؛ (۲) می‌تواند باعث حذف میتوکندری‌های آسیب‌دیده و بهبود کارایی انرژی‌زایی عضلات شود [۲۴، ۲۵]. با این وجود در تحقیق Moller و همکاران، تمرین‌های هوازی با شدت پایین تا متوسط و مدت زمان طولانی، باعث افزایش میزان پروتئین LC3-II شد، که نشان‌دهنده تشکیل و بلوغ اتوفاگوزوم است. این فرآیند باعث حذف پروتئین‌های آسیب‌دیده و بهبود عملکرد عضلات می‌شود؛ بنابراین، می‌توان گفت که HIIT و هوازی هر دو باعث فعال شدن اتوفاژی در عضلات می‌شوند.

در مقابل در تحقیقی دیگر Zhao و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی تأثیر تمرین‌های ورزشی بر مسیرهای مسئول میتوفاژی و پویایی میتوکندری در عضله قلبی پرداختند. تمرین ورزشی شامل ۱۰ هفته افزایش تمرین شنا و ۵ روز در هفته بود. مدت زمان در هفته اول ۲۰ دقیقه و سپس ۱۰ دقیقه در هفته افزایش می‌یافت. نتایج کاهش محتوای پروتئین BNIP3L را نشان داد [۲۶]. در تحقیق Zhao و همکاران، تمرین‌های شنا با شدت پایین و مدت زمان طولانی، باعث کاهش میزان پروتئین BNIP3L شد که نشان‌دهنده کاهش فعالیت میتوفاژی است. این فرآیند می‌تواند باعث حفظ میتوکندری‌های سالم و افزایش تولید میتوکندری جدید از طریق بیوژنز می‌شود. بنابراین، می‌توان گفت که نوع، شدت و مدت زمان تمرین‌های ورزشی بستگی به هدف درمانی دارد. برای درمان بیماران دیابت نوع دو که دارای مشکلات در عملکرد میتوکندری هستند، HIIT می‌تواند گزینه مناسب‌تری باشد.

نشان داده شد که فعالیت‌های بدنی باعث ایجاد اتوفاژی در عضله اسکلتی می‌شود و برخی مطالعات نشان می‌دهد که HIIT ممکن است به‌ویژه در این زمینه مؤثر باشد. علاوه بر این، پیشنهاد شده است که اتوفاژی ناشی از ورزش ممکن است در میانجی‌گری اثرات مفید ورزش، از جمله بهبود کیفیت میتوکندری، نقش داشته باشد [۲۷]. HIIT به دلیل کارایی آن در بهبود تناسب اندام قلبی تنفسی و حساسیت به انسولین شناخته شده است. همچنین نشان داده شده است که بیوژنز میتوکندریایی را القا می‌کند که انعطاف‌پذیری متابولیک و ظرفیت استقامت عضله را افزایش می‌دهد [۲۸، ۲۹]. اتوفاژی و میتوفاژی فرآیندهای ضروری برای حفظ کیفیت میتوکندری

طولانی (سه ماه) بود. از عوامل مهم می‌توان نوع، شدت تمرین، مکان اندازه‌گیری و نوع و ماهیت عضله، زمان‌های اندازه‌گیری، نوع آزمودنی و غیره اشاره کرد. در نهایت نتایج تحقیق حاضر نشان داد که به‌دنبال هشت هفته HIIT محتوای درون سلولی پروتئین‌های LC3 و BNIP3L افزایش می‌یابد. با افزایش این عوامل مرتبط با میتوفاژی می‌توان نتیجه گرفت که هم می‌تواند با افزایش میتوفاژی در بافت عضلانی آزمودنی‌های دیابتی نوع دو، میتوکندری‌های ناکارآمد را پاکسازی کند و هم می‌تواند سبب نقص عملکردی در تنظیم کیفیت میتوکندری‌ها شود.

### سپاسگزاری

این پژوهش حاصل رساله دکتری در دانشگاه شیراز است که با همکاری یکدیگر به سرانجام رسیده است. از تمامی افرادی که در این امر مهم ما را یاری کردند، تشکر می‌شود.

هستند. LC3 و BNIP3L (یا NIX) پروتئین‌هایی هستند که در این فرآیندها نقش دارند. LC3 در تشکیل اتوفاگوزوم نقش دارد، درحالی‌که BNIP3L/NIX واسطه پاکسازی میتوکندری است [۳۰، ۳۱].

در تحقیقی دیگر Brinkmann و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد محتوای پروتئین‌های LC3 و BNIP3 در عضله اسکلتی بیماران مبتلا به دیابت نوع دو طی یک تمرین استقامتی ۳ ماهه در زمان‌های ۶ هفته قبل از تمرین، ۱ هفته قبل از تمرین و ۳ تا ۴ روز پس از تمرین، تفاوت معنی‌داری بین سه زمان وجود ندارد [۱۷]. نتایج تحقیق حاضر افزایش میزان پروتئین‌های LC3 و BNIP3L را نشان داد و این درحالی است که در تحقیق Brinkmann و همکاران تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. می‌توان به این نتیجه رسید که تمرین‌های ورزشی با مدت زمان مختلف اثرات متفاوتی بر سطح پروتئین‌های تنظیم‌کننده میتوفاژی در عضلات دارند. در تحقیق حاضر، HIIT با مدت زمان کوتاه (هشت هفته) و این درحالی است که در تحقیق Brinkmann و همکاران تمرین‌های استقامتی با مدت زمان

### مآخذ

- Cartee GD, Hepple RT, Bamman MM, Zierath JR. Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. *Cell Metabolism*. 2016; 23(6):1034-47.
- Laker RC, Drake JC, Wilson RJ, Lira VA, Lewellen BM, Ryall KA, et al. Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nature Communications*. 2017; 8(1):548.
- Call JA, Wilson RJ, Laker RC, Zhang M, Kundu M, Yan Z. Ulk1-mediated autophagy plays an essential role in mitochondrial remodeling and functional regeneration of skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2017; 312(6):C724-32.
- Drake JC, Wilson RJ, Yan Z. Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. *The FASEB Journal*. 2016; 30(1):13.
- Guan Y, Drake JC, Yan Z. Exercise-induced mitophagy in skeletal muscle and heart. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2019; 47(3):151.
- Ross FA, MacKintosh C, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *The FEBS Journal*. 2016; 283(16):2987-3001.
- Krishan S, Richardson DR, Sahni S. Adenosine monophosphate-activated kinase and its key role in catabolism: Structure, regulation, biological activity, and pharmacological activation. *Molecular Pharmacology*. 2015; 87(3):363-77.
- Marinković M, Novak I. A brief overview of BNIP3L/NIX receptor-mediated mitophagy. *FEBS Open Bio*. 2021; 11(12):3230-6.
- Towers CG, Wodetzki DK, Thorburn J, Smith KR, Caino MC, Thorburn A. Mitochondrial-derived vesicles compensate for loss of LC3-mediated mitophagy. *Developmental Cell*. 2021; 56(14):2029-42.
- Lampert MA, Orogo AM, Najor RH, Hammerling BC, Leon LJ, Wang BJ, et al. BNIP3L/NIX and FUNDC1-mediated mitophagy is required for mitochondrial network remodeling during cardiac progenitor cell differentiation. *Autophagy*. 2019; 15(7):1182-98.
- Liu H, Zang C, Yuan F, Ju C, Shang M, Ning J, et al. The role of FUNDC1 in mitophagy, mitochondrial dynamics and human diseases. *Biochemical Pharmacology*. 2022; 197:114891.
- Li Y, Zheng W, Lu Y, Zheng Y, Pan L, Wu X, et al. BNIP3L/NIX-mediated mitophagy: molecular mechanisms and implications for human disease. *Cell Death & Disease*. 2021; 13(1):14.

13. Turkieh A, El Masri Y, Pinet F, Dubois-Deruy E. Mitophagy regulation following myocardial infarction. *Cells*. 2022; 11(2):199.
14. Robinson MM, Lowe VJ, Nair KS. Increased brain glucose uptake after 12 weeks of aerobic high-intensity interval training in young and older adults. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2018; 103(1):221-7.
15. Bagheri R, Robinson I, Moradi S, Purcell J, Schwab E, Silva T, et al. Muscle protein synthesis responses following aerobic-based exercise or high-intensity interval training with or without protein ingestion: a systematic review. *Sports Medicine*. 2022; 52(11):2713-32.
16. Zhang Y, Liao B, Hu S, Pan SY, Wang GP, Wang YL, et al. High intensity interval training induces dysregulation of mitochondrial respiratory complex and mitophagy in the hippocampus of middle-aged mice. *Behavioural Brain Research*. 2021; 412:113384.
17. Brinkmann C, Przyklenk A, Metten A, Schiffer T, Bloch W, Brixius K, et al. Influence of endurance training on skeletal muscle mitophagy regulatory proteins in type 2 diabetic men. *Endocrine Research*. 2017; 42(4):325-30.
18. Khalili A, Nekooeian AA, Khosravi MB. Oleuropein improves glucose tolerance and lipid profile in rats with simultaneous renovascular hypertension and type 2 diabetes. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2017; 19(10):1011-21.
19. Garcia NF, Sponton AC, Delbin MA, Parente JM, Castro MM, Zanesco A, et al. Metabolic parameters and responsiveness of isolated iliac artery in LDLr<sup>-/-</sup>-mice: role of aerobic exercise training. *American Journal of Cardiovascular Disease*. 2017; 7(2):64.
20. Khoramshahi SH, Kordi MR, Delfan M, Gaeini AA, Safa M. Effect of five weeks of high-intensity interval training on the expression of miR-23a and Atrogin-1 in gastrocnemius muscles of diabetic male rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2017; 18(5).
21. Slavin MB, Memme JM, Oliveira AN, Moradi N, Hood DA. Regulatory networks coordinating mitochondrial quality control in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2022; 322(5):C913-26.
22. Houzelle A, Jørgensen JA, Schaart G, Daemen S, van Polanen N, Fealy CE, et al. Human skeletal muscle mitochondrial dynamics in relation to oxidative capacity and insulin sensitivity. *Diabetologia*. 2021; 64:424-36.
23. Moller AB, Vendelbo MH, Christensen B, Clasen BF, Bak AM, Jørgensen JO, et al. Physical exercise increases autophagic signaling through ULK1 in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2015; 118(8):971-9.
24. Nijholt KT, Sánchez-Aguilera PI, Voorrips SN, de Boer RA, Westenbrink BD. Exercise: a molecular tool to boost muscle growth and mitochondrial performance in heart failure?. *European Journal of Heart Failure*. 2022; 24(2):287-98.
25. Memme JM, Erlich AT, Phukan G, Hood DA. Exercise and mitochondrial health. *The Journal of Physiology*. 2021; 599(3):803-17.
26. Zhao Y, Zhu Q, Song W, Gao B. Exercise training and dietary restriction affect PINK1/Parkin and Bnip3/Nix-mediated cardiac mitophagy in mice. *General Physiology and Biophysics*. 2018; 37(6):657-66.
27. Aguilar CD, Malek EM, Reynolds CR, Dial MB, McGinnis GR. Time Of Day Dependent Effect On Exercise-induced Autophagy In Mouse Cardiac And Skeletal Muscle. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2022; 54(9S):104.
28. Aparecido JM, Marquezi ML, Couto HL, Santos TM, Cruz AF, Lopes NB, et al. Six HIT sessions improve cardiorespiratory fitness and metabolic flexibility in insulin resistant and insulin sensitive adolescents with obesity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022; 19(17):10568.
29. Dos Santos EC, Ribeiro DS. Efeitos do HIIT no perfil metabólico de idosos com Diabetes Mellitus tipo 2. *Research, Society and Development*. 2021; 10(2):e40910212656-.
30. Song J, Herrmann JM, Becker T. Quality control of the mitochondrial proteome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2021; 22(1):54-70.
31. Da Silva Rosa SC, Martens MD, Field JT, Nguyen L, Kereliuk SM, Hai Y, et al. BNIP3L/Nix-induced mitochondrial fission, mitophagy, and impaired myocyte glucose uptake are abrogated by PRKA/PKA phosphorylation. *Autophagy*. 2021; 17(9):2257-72.



## The Effect of High-Intensity Interval Training (HIIT) on the Content of Proteins Related to the Mitophagy Pathway (LC3 And BNIP3L) in the Muscle Tissue Soleus of Rats with Type 2 Diabetes

Mahya Sharifi Rayeni<sup>1</sup>, Farhad Daryanoosh\*<sup>1</sup>, Mohsen Salesi<sup>1</sup>, Maryam Kooshki Jahromi<sup>1</sup>

1. Department of Sport Sciences, School of Education and Psychology, Shiraz university, Shiraz, Iran

### ABSTRACT

**Background:** Mitophagy is a type of cell death that regulates the quality of mitochondria and can lead to disorders in diseases such as diabetes. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of high-intensity interval training (HIIT) on the content of proteins related to the mitophagy pathway (LC3 and BNIP3L) in muscle tissue soleus of rats with type 2 diabetes.

**Methods:** In this experimental study, 18 three-month-old male Sprague Dawley rats with an average weight of 270±30 g were selected. Rats were infected with type 2 diabetes by intraperitoneal injection of a streptozotocin and nicotinamide solution. Rats were randomly divided into two groups: diabetic and diabetic. A healthy control group was also included. The training group performed HIIT for eight weeks at an intensity of 85-95% of the maximum speed. Data analysis was performed using a one-way ANOVA test in GraphPad Prism version 9.5 software. A significance level of  $P \leq 0.05$  was considered statistically significant.

**Results:** The levels of LC3 and BNIP3L proteins significantly increase after eight weeks of HIIT compared to both the diabetic and healthy control groups ( $P = 0.0001$ ).

**Conclusion:** It can be concluded that HIIT by increasing the factors related to mitophagy can cause the cleaning of dysfunctional mitochondria in the muscle of diabetic subjects; However, excessive mitophagy can also cause functional defects in regulating the quality of mitochondria.

**Keywords:** High-Intensity Interval Training, Soleus Muscle, LC3 Protein, BNIP3L Protein, Type 2 Diabetes

\* Shiraz University, Eram Square, School of Education and Psychology, Department of Sports Sciences Shiraz, Iran. Tel: +989173014032, Email: daryanoosh@shirazu.ac.ir

