

Protective Effect of Aerobic Training along with Resveratrol on Mitochondrial Dynamics of Cardiac Myocytes in Animal Model of Non-alcoholic Fatty Liver Disease

Delroz H¹, Abdi A*¹, Barari A¹, Farzanegi P²

1. Department of Exercise Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

2. Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

*Corresponding author. Tel: +981143217126, Fax: +981143217009, E-mail: a.abdi58@gmail.com

Received: Jun 20, 2019 Accepted: Aug 21, 2019

ABSTRACT

Background & objectives: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with mitochondrial dysfunction. The aim of the present study was to examine the effect of aerobic training along with resveratrol on cardiac expression of OPA1 and DRP1 in NAFLD male rats.

Methods: In this experimental study, forty eight male Wistar rats were classified into two groups: NAFLD (n=40) and Control-Normal (CN), (n=8). NAFLD was induced in rats with high fat diet and then subdivided into five subgroups, including patient (NAFLD), sham (SHAM), exercise-patient (TRNAF), supplement-patient (SUPNAF) and exercise-supplement-patient (TRSUPNAF). Training groups performed a running program on a motor-driven treadmill for eight weeks. Resveratrol (20 mg/kg) was injected into the SUPNAF and TRSUPNAF groups. Forty eight hours after the last training session, rats were anesthetized; hearts were excised and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for measuring the indexes. Statistical analysis was performed using a one way analysis of variance, and Statistical significance was accepted at $p \leq 0.05$.

Result: The results indicated that the induction of NAFLD decreased OPA1 expression ($p=0.001$) and increased DRP1 expression ($p=0.001$) compared to CN. Also, in SUPNAFLD and TRSUPNAF groups, OPA1 ($p=0.014$ and $p=0.001$ respectively) increased and DRP1 ($p=0.043$ and $p=0.007$ respectively) decreased significantly compared to the NAFLD group.

Conclusion: It seems that exercise training and resveratrol alone or in combination by increasing OPA1 and decreasing DRP1 myocytes modulates heart damage in NAFLD patients.

Keywords: Aerobic Exercise; Resveratrol; OPA1; DRP1; Fatty Liver

اثر محافظتی تمرین هوازی و عصاره رزوراترول بر پویایی میتوکندریایی میوسیت‌های قلبی در موش‌های صحرایی کبد چرب غیرالکلی

حسن دلروز^۱، احمد عبدی^{۱*}، علیرضا براری^۱، پروین فرزائنگی^۲

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۱۱۴۳۲۱۷۱۲۶ فاکس: ۰۱۱۴۳۲۱۷۰۰۹ پست الکترونیک: a.abdi58@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) با اختلال عملکرد میتوکندری همراه می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تمرین هوازی همراه با مصرف رزوراترول بر بیان OPA1 و DRP1 بافت قلب موش‌های صحرایی نر مبتلا به NAFLD بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۸ موش صحرایی نر ویستار به دو گروه NAFLD ($n=۴۰$) و کنترل- سالم (CN) ($n=۸$) تقسیم شدند. NAFLD با رژیم غذایی پرچرب در موش‌ها القاء و سپس به ۵ زیر گروه تجربی بیمار (NAFLD)، شام (SHAM)، تمرین- بیمار (TRNAF)، مکمل- بیمار (SUPNAF) و تمرین- مکمل- بیمار (TRSUPNAF) تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی به مدت ۸ هفته برنامه تمرینی دویدن را روی تردمیل انجام دادند. به گروه‌های SUPNAF و TRSUPNAF (۲۰ میلی گرم/کیلوگرم) رزوراترول تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، موش‌های صحرایی بی‌هوش شدند، بافت قلب برداشته و بلافاصله در محلول نیتروژن فریز و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد برای اندازه‌گیری شاخص‌ها نگهداری شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از تحلیل واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری $p \leq ۰/۰۵$ استفاده شد. **یافته‌ها:** نتایج نشان داد که القای کبد چرب باعث کاهش بیان OPA1 ($p=۰/۰۰۱$) و افزایش بیان DRP1 ($p=۰/۰۰۱$) نسبت به CN شد. همچنین در گروه‌های SUPNAFLD و TRSUPNAF نسبت به گروه NAFLD میزان OPA1 (به ترتیب $p=۰/۰۱۴$ و $p=۰/۰۰۱$) افزایش معنی‌داری و میزان DRP1 (به ترتیب $p=۰/۰۴۳$ و $p=۰/۰۰۷$) کاهش مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرین ورزشی و رزوراترول به تنهایی و یا به صورت ترکیبی از طریق افزایش OPA1 و کاهش DRP1 میوسیت‌ها، آسیب‌های قلبی را در بیماران NAFLD تعدیل می‌کند. **واژه‌های کلیدی:** فعالیت هوازی، رزوراترول، OPA1، DRP1، کبد چرب

پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۳۰

دریافت: ۱۳۹۸/۳/۳۰

مقدمه

کبد از مهم‌ترین اندام‌های بدن است که نقش مهمی در بسیاری از اعمال متابولیکی بدن، از جمله سنتز و متابولیسم پروتئین‌های پلاسمایی، همئوستاز گلوکز و سم‌زدایی دارد [۱، ۲]. یکی از شایع‌ترین بیماری

متابولیکی، بیماری کبد چرب غیرالکلی^۱ (NAFLD) است و شیوع بالای آن در افراد چاق و دیابتی بیشتر بوده و به حدود ۷۰ درصد می‌رسد [۳]. این بیماری شامل طیف وسیعی از اختلالات است، که با رسوب

^۱ Non-alcoholic Fatty Liver Disease

چربی در هپاتوسیت‌ها ارتباط دارد و از یک استئاتوز کبدی ساده تا استئوهپاتیت^۱ غیرالکلی (NASH) سیروز می‌تواند متغیر باشد [۴]. بافت کبد نقش مهمی در کنترل سوخت و ساز بدن داشته و کبد چرب منجر به ایجاد سندروم متابولیکی و دیس‌لیپیدمی می‌گردد [۴]. این اختلالات متابولیکی می‌تواند بر پویایی میتوکندری^۲ تأثیر داشته باشد [۵]. اختلال در عملکرد میتوکندری ممکن است نه تنها باعث تجمع چربی شود، بلکه ROS^۳ و سایتوکاین‌ها را که باعث پیشرفت NAFLD و فیروز کبدی می‌شود، افزایش دهد [۶]. تجمع چربی در سلول‌های کبدی باعث ظرفیت ناکافی میتوکندری برای بتا‌اکسیداسیون، آسیب میتوکندری، افزایش استرس اکسیداتیو و فرآیندهای التهابی، آپوپتوز و فیروز، ناهنجاری‌های میتوکندریایی، بر هم خوردن تنظیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کاهش گلوکاتایون (GSH) و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های وابسته به GSH، انباشت لکوسیت‌ها و التهاب کبدی می‌شود، که منابع اصلی تولید بیش از حد ROS در کبد چرب غیرالکلی هستند [۲]. مطالعات اخیر نشان داد که افزایش سطح اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد به عنوان یکی از مکانیسم‌های می‌باشد که با افزایش مرگ سلولی و کاهش سطح اکسیدان‌های داخلی سلول، سبب پیشرفت بیماری NAFLD شده، و ممکن است رابط بین NAFLD و مشکلات قلبی باشد [۵،۷]. یکی از شایع‌ترین عوارض متابولیکی کبد چرب، ناهنجاری‌های میتوکندری است [۲]. میتوکندری اندامک‌های درون سلولی هستند که مهمترین منبع تولید انرژی سلولی بوده، که به طور پیوسته تقسیم و مجدداً با هم ترکیب می‌شوند، که این فرآیندهای پویا را شکافت^۴ و هم‌جوشی^۵ می‌نامند.

مهمترین پروتئین‌ها در فرآیند شکافت، DRP1^۶ و FIS1^۷ [۸] و هم‌جوشی، Mfn1,2^۸ و OPA1^۹ [۹] می‌باشند. این پروتئین‌ها نقش مهمی در اندازه، بازسازی، ترمیم و توزیع میتوکندری دارند [۸]. همچنین حذف OPA1 موجب تکه‌تکه شدن و حذف DRP1 موجب طویل شدن میتوکندری می‌شود [۹]. از طرف دیگر، حذف این پروتئین‌ها در سلول‌ها منجر به کاهش میزان ATP^{۱۰} تولید شده در میتوکندری شده و تولید گونه‌های اکسیژن در میتوکندری‌های آسیب دیده، افزایش می‌یابد. مطالعات نشان داده است که تغییر شکل ساختار میتوکندری در بیماران NAFLD وجود دارد [۱۰]. پویایی و مورفولوژی میتوکندری، به طور فزاینده‌ای، توسط گونه اکسیژن واکنشی (ROS)، (RNS)^{۱۱} تنظیم می‌شود [۱۱]. مطالعات نشان دادند که فعالیت ورزشی، عملکرد میتوکندری را بهبود می‌بخشد. فعالیت ورزشی نه تنها، تعداد این اندامک‌ها را افزایش می‌دهد بلکه کیفیت میتوکندری را نیز بهبود می‌بخشد [۱۲]. این بهبود عملکرد، با افزایش سطوح بیورنژ^{۱۲} میتوکندری و حذف میتوکندری آسیب دیده به دست می‌آید. به طور کلی با توجه تحقیقات انجام شده گزارش شده است که فعالیت‌های هوازی منظم می‌تواند، باعث کاهش چربی کبد شده و آسیب‌پذیری و التهاب را در NAFLD کاهش دهد. فعالیت‌های ورزشی منظم، سبب کاهش واسطه‌های التهابی و افزایش ظرفیت یا فعالیت آنتی‌اکسیدان‌تی در بدن می‌گردد [۱۳]. همچنین با توجه به تحقیقات انجام شده گزارش شده است که عصاره انگور، رزوراترول^{۱۳} هم با توجه به داشتن ترکیبات پلی‌فنول، می‌تواند باعث کاهش

^۶ Dynamin-related Protein 1

^۷ Fission Protein 1

^۸ Mitofusion 1,2

^۹ Optic Atrophy Protein-1

^{۱۰} Adenosine Triphosphate

^{۱۱} Reactive Nitric Species

^{۱۲} BLogenes

^{۱۳} Resveratrol

^۱ Steatohepatitis

^۲ Mitochondrial Dynamic

^۳ Reactive Oxygen Species

^۴ Fission

^۵ Fusion

استرس اکسیداتیو و التهاب در بیماری‌های پاتولوژیک قلبی و عروقی شده و با محافظت از قلب باعث بهبود عملکرد آن شود [۱۴، ۱۵]. از طرف دیگر، رزوراترول باعث مهار سیگنالینگ پاتولوژیک و کاهش آپوپتوز از طریق مسیرهای درون سلولی می‌شود [۱۶]. تحقیقات اخیر نشان دادند که رزوراترول یک ترکیب با خاصیت آنتی‌اکسیدان بالا می‌باشد که با تنظیم مسیرهای متابولیکی سبب افزایش مصرف چربی و مانع از تجمع یا رسوب آن در بافت‌های بدن می‌گردد [۱۷]. مطالعات نشان داده است که رزوراترول، باعث ایجاد اثرات مثبت زیادی مانند کاهش التهاب [۱۸]، کاهش استرس اکسیداتیو [۱۹]، بهبود عملکرد دیاستولیک، بازسازی قلبی، بهبود انرژی میوکارد، بهبود عملکرد عروقی، کاهش فیبروز قلبی و کاهش فشار خون می‌شود [۲۰]. در پژوهشی نشان داده شد که تزریق رزوراترول به طور مستقیم ضعف قلب را کاهش می‌دهد [۱۵]. چاکر بورتی، در یک پژوهشی گزارش داد که رزوراترول، قادر به کاهش انفارکتوس و سطح نکرز میوکارد می‌شود و سطح آنتی‌اکسیدان میوکارد را بهبود می‌بخشد [۱۴]. اگر چه ارتباط بین کبد چرب غیرالکلی و بیماری قلبی عروقی در تحقیقات بررسی شده است، اما مکانیسم آن بخوبی روشن نشده است. در پژوهشی لیو^۱ و همکاران بیان کردند که بیماران کبد چرب غیرالکلی، در معرض افزایش بیماری‌های قلبی و عروقی هستند و ارتباط تنگاتنگی بین بیماری کبد چرب غیرالکلی و مشکلات قلبی وجود دارد [۲۱]. در بیماری کبد چرب افزایش استرس اکسیداتیو، باعث عدم تعادل در پروتئین‌های هم جوشی و شکافت شده، و باعث به هم ریختگی ساختاری میتوکندری و تجزیه میتوکندری‌ها و حتی مرگ سلولی می‌شود [۲۲]. آرچر^۲ و همکاران بیان کردند که تغییرات پروتئین‌های هم جوشی و شکافت در بیماری قلبی رخ می‌دهد [۲۳]. با توجه به ارتباط

دو طرفه قوی بین بیماری کبد چرب و بیماری‌های قلبی - عروقی [۲۴] و استفاده از روش غیردارویی مناسب برای درمان این بیماری، این پژوهش با هدف بررسی تاثیر فعالیت ورزشی هوازی و مصرف عصاره رزوراترول بر برخی شاخص‌های پویایی میتوکندریایی میوسیت‌های قلبی در مدل حیوانی NAFLD انجام گرفت.

روش کار

حیوانات و گروه‌بندی

روش پژوهش از نوع تجربی بود. در تعیین حجم نمونه، با توجه به فرمول حجم نمونه برای نمره‌های پیوسته، در صورتی که تفاوت‌های مورد انتظار برابر با ۱/۵ باشد، با توان آزمون ۸۰٪ در سطح معنی‌داری $\alpha = 0.05$ ، تعداد آزمودنی‌های هر گروه برابر ۸ برآورد شد [۲۵]. در این پژوهش تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر هشت هفته‌ای از نژاد ویستار با میانگین وزن $20 \pm 298/89$ گرم به عنوان نمونه انتخاب و به مرکز پژوهش منتقل شدند. حیوانات در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 55 ± 5 درصد و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. در تمام مدت آب و غذا (به صورت پلت، شرکت بهرور) به اندازه کافی و آزادانه دریافت کردند. موازین اخلاقی کار با حیوانات مطابق کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت (کد IR.IAU.M.REC.1398.014 رعایت و تایید شد. پس از انتقال موش‌ها به آزمایشگاه، القای کبد چرب غیرالکلی و آشنایی با فعالیت ورزشی روی تردمیل مخصوص جوندگان، به طور تصادفی به دو گروه بیمار NAFLD و کنترل تقسیم شدند. موش‌ها در گروه کنترل به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی استاندارد (شامل ۱۲٪ چربی، ۵۷٪ کربوهیدرات، ۲۸٪ پروتئین و ۳٪ سایر موارد) قرار گرفتند، در حالی که جهت القاء NAFLD در موش‌ها، حیوانات به مدت ۶ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب (شامل ۲۲٪

¹ Liu

² Archer

چربی، ۵۰٪ کربوهیدرات، ۲۴٪ پروتئین و ۴٪ سایر (موارد) قرار گرفتند (جدول ۱). همچنین، القاء کبد چرب با استفاده از بررسی‌های هیستولوژی مورد تایید قرار گرفت که نتایج آن در مطالعات گزارش شده است [۲۶]. موش‌های گروه بیمار مجدداً به ۵ زیر گروه تجربی شامل: بیمار (NAFLD)، شام (SHAM)، تمرین-بیمار (TRNAF)، مکمل-بیمار (SUPNAF) و تمرین-مکمل (TRSUPNAF) تقسیم شدند. موش‌های گروه تمرین، یک برنامه هشت هفته‌ای (۵ روز هفته) تمرین هوازی را اجرا کردند، در حالی که دیگر موش‌ها در هیچ برنامه تمرینی شرکت داده نشدند.

پروتکل تمرین

قبل از شروع تمرین اصلی و به منظور آشنایی با چگونگی فعالیت توسط تردمیل، موش‌های گروه‌های تمرین و گروه مکمل-تمرین در یک هفته طی پنج جلسه، به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰-۸ متر بر

دقیقه با شیب صفر فعالیت داشتند. برنامه تمرین اصلی به مدت هشت هفته بود، بدین صورت انجام شد که در هفته آغازین با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه، زمان ۵ دقیقه شروع و هر هفته به سرعت، ۲-۱ متر بر دقیقه و به زمان نیز ۲-۱ دقیقه افزوده شد به طوری که در هفته چهارم سرعت به ۲۰ متر بر دقیقه و زمان به ۶۰ دقیقه رسید. شدت و زمان تمرین تا هفته آخر ثابت ماند [۲۷]. همچنین پنج دقیقه قبل و بعد از تمرین برای گرم و سرد کردن حیوانات در نظر گرفته شد (جدول ۲).

جدول ۱. ترکیبات سازنده رژیم غذایی پرچرب و رژیم استاندارد

گروه	رژیم استاندارد	رژیم پرچرب
متغیر	(درصد)	(درصد)
چربی	۱۲	۲۲
کربوهیدرات	۵۷	۵۰
پروتئین	۲۸	۲۴
سایر مواد	۳	۴

جدول ۲. پروتکل تمرینی هوازی برای موش‌های صحرایی مبتلا به کبد چرب غیرالکلی

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
مدت (دقیقه)	۵	۲۰	۴۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
شدت (متر بر دقیقه)	۱۵	۱۷	۱۹	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰

نحوه مصرف رزوراترول

میزان یک گرم پودر رزوراترول (شرکت نوترابیو آمریکا، با درجه فارماکولوژی و خلوص ۹۹/۸۷٪) با غلظت ۱۰ mg/ml به عنوان استوک ساخته شد. برای هر بار تجویز رزوراترول، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷٪ یا DMSO^۱ ۱۰٪ در آب به ازای هر موش تهیه و رزوراترول را در آن معلق نموده و تجویز شد. برای کاهش درصد خطا برای کلیه آزمودنی‌ها محلول به صورت یک جا تهیه شد و در گروه‌های SUPNAF و TRSUPNAF با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (راس ساعت ۹ صبح) به صورت درون صفاقی به مدت ۸ هفته تزریق شد [۲۶].

روش نمونه‌گیری از بافت قلب و اندازه‌گیری متغیرها

پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین^۲ (۶۰ mg/kg) و زایلازین^۳ (۵ mg/kg) بی‌هوش شدند. بافت قلب بلافاصله پس از جداسازی و شست‌وشو با سالین فوراً در تیوب‌های حاوی RNA Later جهت جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شده و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد. برای جلوگیری از تأثیر آهنگ شبانه روزی، نمونه‌گیری از

^۲ Ketamine

^۳ Xylazine

^۱ Dimethyl Sulfoxide

جدول ۴. نتایج نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک

متغیر	گروه	df	sig
OPA1	CN	۵	۰/۳۶۵
	NAFLD	۵	۰/۷۱۵
	SHAM	۵	۰/۳۴۹
	TRNAF	۵	۰/۲۶۲
	SUPNAF	۵	۰/۴۴۰
	TRSUPNAF	۵	۰/۷۰۶
DRP1	CN	۵	۰/۴۳۰
	NAFLD	۵	۰/۸۰۰
	SHAM	۵	۰/۱۳۱
	TRNAF	۵	۰/۲۱۷
	SUPNAF	۵	۰/۱۴۲
	TRSUPNAF	۵	۰/۱۱۲

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان OPA1 کاردیومیوسیت‌ها بین گروه‌های مختلف وجود داشت ($p=۰/۰۰۱$) (جدول ۵). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد میزان بیان OPA1 در گروه‌های NAFLD ($p=۰/۰۰۱$)، SHAM ($p=۰/۰۰۱$) و TRNAF ($p=۰/۰۱۰$) نسبت به گروه CN کاهش معنی‌داری داشت. همچنین بیان OPA1 در گروه‌های SUPNAF ($p=۰/۰۱۴$) و TRSUPNAF ($p=۰/۰۰۱$) نسبت به گروه NAFLD و در گروه‌های SUPNAF ($p=۰/۰۱۵$) و TRSUPNAF ($p=۰/۰۰۱$) نسبت به گروه SHAM افزایش معنی‌داری داشت (نمودار ۱).

جدول ۵. مقایسه متغیرها در پس‌آزمون بین گروه‌ها

متغیر	df	نسبت F	Sig
OPA1	۵	۱۲/۸۷۹	۰/۰۰۱*
	۲۴		
DRP1	۵	۳/۸۱۵	۰/۰۱۱*
	۲۴		

* معنی‌داری آماری در آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه

ساعت ۸ آغاز و ۱۱:۳۰ به اتمام رسید. برای بررسی بیان OPA1 و DRP1 در هر گروه از تکنیک PCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده، مورد بررسی قرار گرفت.

روش اندازه‌گیری بیان OPA1 و DRP1

طراحی، آماده سازی پرایمر: جدول ۳ الگوی پرایمر را نمایش می‌دهد.

جدول ۳. الگوی پرایمر OPA1 و DRP1

Genes	Sequence (5' → 3')
F OPA1	GGATCTGCTGTTGGAGGTGG
R OPA1	GTCTTCTGAAGTGGGAAGGG
F DRP1	TGGATGTATTGATGGGAAGGGT
R DRP1	TTTCTGTTGGGCAGAGATGGGT

استخراج RNA

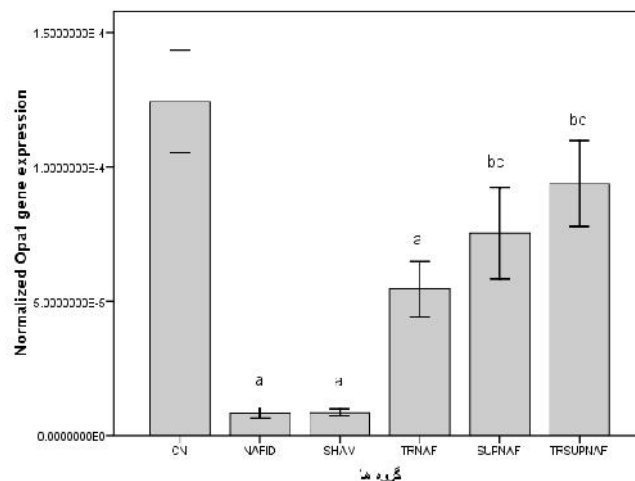
RNA با استفاده از کیت کیاژن (آلمان) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد.

انجام Real Time-PCR

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کلیه پرایمرهای طراحی شده مربوط به تمامی ژن‌ها، مورد بررسی قرار گرفت و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام گرفت.

روش‌های آماری

پس از تأیید توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک (جدول ۴)، برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تمامی داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 انجام شد و سطح معنی‌داری آزمون‌ها $p \leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

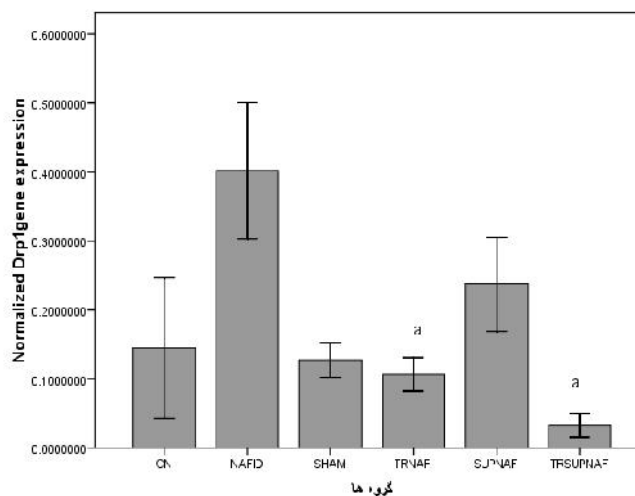


نمودار ۱. تغییرات بیان OPA1 کاردیومیوسیت‌ها در گروه‌های مختلف

a تفاوت با گروه کنترل سالم (CN)، b تفاوت با گروه کبد چرب غیرالکلی (NAFLD)، c تفاوت با گروه شام (SHAM) - در سطح $p \leq 0.05$

تعقیبی توکی نشان داد بیان DRP1 در گروه‌های TRAF (p=0.043) و TRSUPNAF (p=0.007) نسبت به گروه NAFLD کاهش معنی‌داری داشت (نمودار ۲).

از دیگر نتایج پژوهش حاضر با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، تفاوت معنی‌دار در میزان تغییرات بیان DRP1 کاردیومیوسیت‌ها بین گروه‌های مختلف بود (p=0.011) (جدول ۵). نتایج آزمون



نمودار ۲. تغییرات بیان DrP1 کاردیومیوسیت‌ها در گروه‌های مختلف

a تفاوت با گروه کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) - در سطح $p \leq 0.05$

بحث

سیتوکرم C برای ایجاد آپوپتوز محافظت می‌کند. کاهش تعادل بین پروتئین‌های هم‌جوشی در بیماری کبد چرب به دلیل افزایش چربی بوده که موجب اختلال در عملکرد میتوکندری، و از دست دادن پتانسیل غشاء و افزایش تولید ROS می‌شود [۱۳].

نتایج پژوهش حاضر نشان داد میزان OPA1 کاردیومیوسیت‌ها در موش‌های NAFLD، نسبت به گروه CN کاهش معنی‌داری داشت. OPA1 روی غشاء داخلی میتوکندری قرا گرفته و از آزاد شدن

عدم تعادل در پروتئین‌های هم جوشی، شکافت منجر به هم ریختگی ساختاری میتو‌کندری، اختلالات متابولیکی تجزیه میتو‌کندری‌ها، آپوپتوز و حتی مرگ سلولی می‌شود [۲۸]. همسو با پژوهش حاضر، اقبال^۱ و همکاران در یک پژوهش گزارش کردند که فعالیت‌های بدنی طولانی مدت با تحریکات الکتریکی به مدت ۷ روز و هر روز ۳ ساعت باعث افزایش OPA1 (۳۶٪) شد [۲۹]. همچنین کیتی اوکا و همکاران در یک پژوهش گزارش کردند که فعالیت‌های ورزشی مقاومتی باعث افزایش OPA1 می‌شود [۳۰]. برخلاف یافته‌های این پژوهش، لیو و همکاران در یک پژوهش بر روی موش‌های صحرایی نر مدل کبد چرب گزارش کردند که میزان پروتئین OPA1 تغییری نیافت [۲۱]. همچنین ژنگ^۲ و همکاران در پژوهشی روی موش‌های صحرایی چاق تحت رژیم غذایی با چربی بالا در مقایسه با موش‌های نابالغ گزارش کردند که میزان پروتئین هم‌جوشی OPA1 بدون تغییر بود [۳۱]. به‌نظر می‌رسد در این پژوهش پایین‌بودن OPA1 در بیماران کبد چرب نسبت به گروه سالم، به دلیل افزایش چربی در دسترس سلول‌های قلبی و استرس اکسیداتیو ناشی از این بیماری بوده و موجب اختلال در عملکرد میتو‌کندری و هم‌جوشی آن شده است.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد میزان OPA1، در گروه SUPNAF و TRSUPNAF نسبت به گروه NAFLD و SHAM افزایش معنی‌داری داشت. اقبال و همکاران در یک پژوهش گزارشی کردند که فعالیت ورزشی طولانی مدت باعث افزایش مقدار پروتئین OPA1 (۳۶٪) می‌شود [۲۹]. همچنین در پژوهشی دیگر روی انسان گزارش شد، تمرین ورزشی طولانی مدت مقدار OPA1 را افزایش می‌دهد [۳۲]. کیتاوکا^۳ و همکاران [۳۰] و کونوپکا^۴ و همکاران [۳۳] نیز گزارش

دادند فعالیت ورزشی مقدار OPA1 را افزایش می‌دهد [۳۰]. برخلاف یافته‌های این پژوهش، داستین^۵ و همکاران در یک پژوهش بیان کردند فعالیت ورزشی تأثیری بر OPA1 ندارد [۳۴]. تحقیقات اخیر نشان دادند که فعالیت‌بدنی منظم، نه‌تنها به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن کمک نموده، بلکه سبب کاهش سطح استرس اکسیداتیو می‌گردد، و احتمالاً با کاهش میزان آپوپتوز کمک زیادی به کاهش شدت این بیماری می‌کند [۳۵]. از طرفی فعالیت ورزشی نه‌تنها بیوژنز میتو‌کندری‌ها، بلکه حذف میتو‌کندری‌های ناقص و قدیمی را از طریق پویایی میتو‌کندری و اتوفازی تحریک می‌کند [۱۳]. حاجی‌قاسم و همکاران نشان دادند که مصرف مکمل رزوراترول به‌تنهایی از طریق کاهش واسطه‌های التهابی و استرس اکسیداتیو و از طرفی با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، سبب بهبود بیماری NAFLD می‌گردد [۲۶]. رزوراترول با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی بالای خود، شرایط استرس اکسیداتیو و التهاب را کاهش داده و با مهار آپوپتوز سبب بهبود این بیماری می‌گردد. به‌نظر می‌رسد که مصرف توام رزوراترول و تمرینات ورزشی از طریق کاهش پراکسیدهای چربی و فعال‌سازی دفاع آنتی‌اکسیدانی از قلب در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند [۳۶]. فعالیت ورزشی و رزوراترول با افزایش مقدار اکسیژن مصرفی، افزایش ATP و افزایش پتانسیل غشا، مقدار OPA1 را افزایش داده تا بتواند با مهار آپوپتوز، سبب بهبود NAFLD گردد.

از دیگر نتایج پژوهش حاضر کاهش میزان DRP1 در گروه TRNAF و TRSUPNAF نسبت به گروه NAFLD بود. تمرینات ورزشی تعادل بین هم‌جوشی و شکافت میتو‌کندری را حفظ و نگهداری می‌کند. در یک پژوهش نشان داده شد که تأثیر تمرینات ورزشی روی موش‌ها باعث کاهش پروتئین DRP1 شد [۲۹].

⁵ Dustin

¹ Iqbal

² Jheng

³ Kitaoka

⁴ Konopka

همچنین فیلی^۱ و همکاران در پژوهشی گزارش کردند که تمرین ورزشی باعث کاهش فعالیت پروتئین DRP1 در عضلات اسکلتی می‌شود [۳۲]. برخلاف یافته‌های این پژوهش در یک پژوهش روی انسان نشان داده شد که میزان DRP1 تغییر معنی‌داری نداشت [۳۲]. مطالعه روی موش‌های صحرایی نیز نشان داد که تمرین طولانی مدت مقاومتی تأثیری بر DRP1 ندارد [۳۰]. به طور کلی، کاهش DRP1 در نتیجه فعالیت ورزشی ممکن است برای حفظ پتانسیل غشاء میتوکندری میوسیت‌های قلبی باشد. یکی از خواص DRP1، آپوپتوز در میتوکندری می‌باشد، بنابراین فعالیت‌های ورزشی می‌تواند از طریق کاهش پراکسیدهای چربی و فعال‌سازی دفاع آنتی‌اکسیدانی، قلب را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت [۳۶]، و میزان DRP1 را کاهش دهد. کاهش DRP1، شکافت و آپوپتوز را در سلول‌ها کاهش می‌دهد [۳۷] و نشانگرهای وابسته به آپوپتوز را بهبود می‌بخشد [۳۸]. کاهش DRP1 برای توسعه و نگهداری عملکرد مناسب میوسیت‌های میتوکندری ضروری است و بقای سلول‌های عضلانی را با کاهش استرس اکسیداتیو بهبود می‌بخشد [۳۹].

از دیگر نتایج پژوهش کاهش معنی‌داری بیان DRP1 در اثر تمرین هوازی همراه با مصرف رزوراترول بود. در یک تحقیق تانگ و همکاران نشان دادند که ترکیب رزوراترول و تمرین ورزشی سبب افزایش فعالیت چندین آنتی‌اکسیدان مثل SOD^۲، CAT^۳، گلوکاتایون پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز، گلوکاتایون-S-ترانسفراز، تیوردوکسین ردوکتاز، NADH سیتوکروم B5- ردوکتاز^۴ و پذیرنده NAD(P)H- کوئینون اکسیدوردوکتاز^۵ می‌گردد [۴۰]. با این وجود، اثر

مصرف توام رزوراترول و تمرین ورزشی بر DRP1 بافت قلب بررسی نشده است. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیقات، رزوراترول با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی بالای خود، شرایط استرس اکسیداتیو و التهاب را در انواعی از بیماری‌های سندرم متابولیک نظیر NAFLD کاهش داده و لذا با مهار آسیب میتوکندری سبب بهبود این بیماری‌ها می‌گردد. بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به اثرات مثبت تمرین ورزشی و مکمل رزوراترول به تنهایی و استفاده ترکیبی از هر دو، اثرات درمانی موثرتری بر روی بیماری NAFLD داشته باشد. همچنین نتایج این مطالعه بر بهبود کارایی قلب توسط مطالعات پیشین نیز تأیید شده است [۴۱].

از محدودیت‌های پژوهش حاضر، عدم نمونه‌برداری همزمان از بافت تمامی موش‌ها و همچنین تزریق اجباری رزوراترول و تمرین اجباری بود. از آنجایی که بیماری NAFLD به صورت درازمدت تأثیرات خود را به جای می‌گذارد، شاید طول دوره پژوهش در تحقیق حاضر از محدودیت‌های مهم دیگر برای بررسی دقیق اثرات تمرین ورزشی و مصرف رزوراترول بر این بیماری باشد. بنابراین توصیه می‌شود در پروتکل‌های بعدی از دوره‌های طولانی‌تر استفاده شود.

نتیجه‌گیری

باتوجه به تأثیر مثبت تمرین هوازی و رزوراترول بر OPA1 و DRP1، به نظر می‌رسد ترکیب تمرین و مکمل دارای اثر هم‌افزایی بوده و تأثیر بیشتری بر بهبود NAFLD از طریق بهبود در شاخص‌های موثر بر پویایی میتوکندری میوسیت‌های قلبی دارد، و از این طریق آسیب‌های قلبی را در بیماران NAFLD تعدیل می‌کند.

¹ Fealy

² Superoxide Dismutase

³ Catalase

⁴ NADH-cytochrome b5 Reductase

⁵ NAD (P) H-COQ Oxidoreductase

تشکر و قدر دانی

IR.IAU.M.REC.1398.014 ناییدگردید.

بدین وسیله، نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحدهای دانشگاهی اعلام می‌دارند.

این تحقیق در قالب رساله دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی انجام شده و در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت با کد

References

- 1- Li T, Chiang JY. Bile acid signaling in liver metabolism and diseases. *J Lipids*. 2011 Oct; 2012: ID 754067. 9 pages
- 2- Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology*. 2008 May;134(6):1641-54.
- 3- Marchesini G, Marzocchi R. Metabolic syndrome and NASH. *Clin Liver Dis*. 2007 Feb;11(1):105-17.
- 4- Hardy T, McPherson S. NAFLD in Asia—clinical associations with advanced disease become clearer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018 Apr;47(7):1035-1036.
- 5- Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012 Feb;482(7384):179-85.
- 6- Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Oct;20(39):14205-18.
- 7- Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999 Dec;30(6):1356-62.
- 8- Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, Mao P. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 2011 Jun;67(1-2):103-18.
- 9- Yu T, Wang L, Yoon Y. Morphological control of mitochondrial bioenergetics. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015 Jan;20:229-46.
- 10- Caldwell SH, de Freitas LAR, Park SH, Moreno MLV, Redick JA, Davis CA, et al. Intramitochondrial crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2009 Jun;49(6):1888-95.
- 11- Sabouny R, Fraunberger E, Geoffrion M, Ng AC-H, Baird SD, Screatton RA, et al. The Keap1-Nrf2 stress response pathway promotes mitochondrial hyperfusion through degradation of the mitochondrial fission protein Drp1. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Dec;27(18):1447-1459.
- 12- Krieger D, Tate C, McMillin-Wood J, Booth F. Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1980 Jan;48(1):23-8.
- 13- Yan Z, Lira VA, Greene NP. Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exerc Sport Sci Rev*. 2012 Jul;40(3):159-64.
- 14- Palfi A, Bartha E, Copf L, Mark L, Gallyas Jr F, Veres B, et al. Alcohol-free red wine inhibits isoproterenol-induced cardiac remodeling in rats by the regulation of Akt1 and protein kinase C α/β II. *J Nutr Biochem*. 2009 Jun;20(6):418-25.
- 15- Dong Q, Wu Z, Li X, Yan J, Zhao L, Yang C, et al. Resveratrol ameliorates cardiac dysfunction induced by pressure overload in rats via structural protection and modulation of Ca²⁺ cycling proteins. *J Transl Med*. 2014 Nov 26;12:323.
- 16- Kanamori H, Takemura G, Goto K, Tsujimoto A, Ogino A, Takeyama T, et al. Resveratrol reverses remodeling in hearts with large, old myocardial infarctions through enhanced autophagy-activating AMP kinase pathway. *Am J Pathol*. 2013 Mar;182(3):701-13.
- 17- Kobayashi Y, Hara N, Sugimoto R, Mifuji-Moroka R, Tanaka H, Eguchi A, et al. The associations between circulating bile acids and the muscle volume in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Intern Med*. 2017;56(7):755-762.
- 18- Xu D, Li Y, Zhang B, Wang Y, Liu Y, Luo Y, et al. Resveratrol alleviate hypoxic pulmonary hypertension via anti-inflammation and anti-oxidant pathways in rats. *Int J Med Sci*. 2016 Nov;13(12):942-954. eCollection 2016.

- 19- Kundu JK, Shin YK, Kim SH, Surh Y-J. Resveratrol inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of NF- κ B in mouse skin by blocking I κ B kinase activity. *Carcinogenesis*. 2006 Jul;27(7):1465-74.
- 20- Dyck GJ, Raj P, Zieroth S, Dyck JR, Ezekowitz JA. The effects of resveratrol in patients with cardiovascular disease and heart failure: A narrative review. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb;20(4). pii: E904.
- 21- Liu R, Jin P, Wang Y, Han L, Shi T, Li X. Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle. *PLoS One*. 2014 Mar;9(3):e92810.
- 22- Legros F, Lombès A, Frachon P, Rojo M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4343-54.
- 23- Archer SL. Mitochondrial dynamics—mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med*. 2013 Dec;369(23):2236-51.
- 24- Wang H, Yang Y-J, Qian H-Y, Zhang Q, Xu H, Li J-J. Resveratrol in cardiovascular disease: what is known from current research? *Heart Fail Rev*. 2012 May;17(3):437-48.
- 25- Moher D, Dulberg CS, Wells GA. Statistical power, sample size, and their reporting in randomized controlled trials. *JAMA*. 1994 Jul;272(2):122-4.
- 26- Hajighasem A, Farzanegi P, Mazaheri Z. Effects of combined therapy with resveratrol, continuous and interval exercises on apoptosis, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in the liver of old rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Arch Physiol Biochem*. 2019 May;125(2):142-149.
- 27- Linden MA, Fletcher JA, Morris EM, Meers GM, Laughlin MH, Booth FW, et al. Treating NAFLD in OLETF rats with vigorous-intensity interval exercise training. *Med Sci Sports Exerc*. 2015 Mar;47(3):556-67.
- 28- Wai T, Langer T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2016 Feb;27(2):105-117.
- 29- Iqbal S, Hood DA. Oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and movement in skeletal muscle myoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 Jun;306(12):C1176-83.
- 30- Kitaoka Y, Ogasawara R, Tamura Y, Fujita S, Hatta H. Effect of electrical stimulation-induced resistance exercise on mitochondrial fission and fusion proteins in rat skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015 Nov;40(11):1137-42.
- 31- Jheng H-F, Tsai P-J, Guo S-M, Kuo L-H, Chang C-S, Su I-J, et al. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol*. 2012 Jan;32(2):309-19.
- 32- Fealy CE, Mulya A, Lai N, Kirwan JP. Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2014 Aug;117(3):239-45.
- 33- Konopka AR, Suer MK, Wolff CA, Harber MP. Markers of human skeletal muscle mitochondrial biogenesis and quality control: effects of age and aerobic exercise training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014 Apr;69(4):371-8.
- 34- Slivka DR, Heesch MW, Dumke CL, Cuddy JS, Hailes WS, Ruby BC. Human skeletal muscle mRNA Response to a single hypoxic exercise bout. *Wilderness Environ Med*. 2014 Dec;25(4):462-5.
- 35- Sun S, Zhang M, Yang Q, Shen Z, Chen J, Yu B, et al. Resveratrol suppresses lipoprotein-associated phospholipase A2 expression by reducing oxidative stress in macrophages and animal models. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Oct;61(10).
- 36- Tofighi A, Ebrahimi Kalan A, Jamali Qarakhnlou B. The effect of resveratrol supplementation and aerobic training on cardiac tissue alteration of rats with acute myocardial infarction. *JSSU*. 2017 Dec; 25 (6) :501-511 (Full text in Persian).
- 37- Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul;106(29):11960-5.
- 38- Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Balca M, Rizo-Roca D, Moreira P, Oliveira P, et al. Physical exercise improves brain cortex and cerebellum mitochondrial bioenergetics and alters apoptotic, dynamic and auto (mito) phagy markers. *Neuroscience*. 2015 Aug;301:480-95.

- 39- Fukumitsu K, Hatsukano T, Yoshimura A, Heuser J, Fujishima K, Kengaku M. Mitochondrial fission protein Drp1 regulates mitochondrial transport and dendritic arborization in cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci*. 2016 Mar;71:56-65.
- 40- Tung BT, Rodríguez-Bies E, Talero E, Gamero-Estévez E, Motilva V, Navas P, et al. Anti-inflammatory effect of resveratrol in old mice liver. *Exp Gerontol*. 2015 Apr;64:1-7.
- 41- Das M, Das DK. Resveratrol and cardiovascular health. *Mol Aspects Med*. 2010 Dec;31(6):503-12.