

## MF<sub>n</sub>1, MF<sub>n</sub>2 and OPA1 gene expression of cardiac tissue after high intensity interval training and resveratrol injection in NAFLD rats

Roeleh Shahini<sup>1</sup>, Ahmad Abdi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MSc student, Department of Exercise Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

<sup>2</sup>Associate Professor, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

### Abstract

**Background:** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with an increased risk of cardiovascular disease. The aim of the present study was to examine the effect high intensity interval training (HIIT) with resveratrol supplementation on Cardiomyocytes expression of MF<sub>n</sub>1, MF<sub>n</sub>2 and OPA1 in NAFLD rats.

**Materials and methods:** In this experimental study, forty-eight Wistar male rats were classified into two groups NAFLD (CN, n=40) and control-normal (n=8). NAFLD was induced in rats with high fat diet and then subdivided into five subgroups NAFLD, SHAM, TRNAF, SUPNAF and TRSUPNAF. Training groups have 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; then 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 significance was accepted at  $p \leq 0.05$ .

**Results:** Induction of fatty liver reduced expression of MF<sub>n</sub>1 ( $p=0.009$ ), MF<sub>n</sub>2 ( $p=0.003$ ) and OPA1 ( $p=0.002$ ). Also, in TRNAF, SUPNAF and RSUPNAF groups, MF<sub>n</sub>1 ( $p=0.010$ ,  $p=0.048$  and  $p=0.004$  respectively), MF<sub>n</sub>2 ( $p=0.028$ ,  $p=0.007$  and  $p=0.011$  respectively) and OPA1 ( $p=0.019$ ,  $p=0.003$  and  $p=0.006$  respectively) increased significantly compared to the NAFLD group.

**Conclusion:** It seems that exercise training and resveratrol protects cardiomyocytes mitochondria against fatty liver disease, by reactivation fusion.

**Keywords:** Interval training, Resveratrol, Mitochondrial fusion, Fatty liver.

**Cited as:** Shahini R, Abdi A. MF<sub>n</sub>1, MF<sub>n</sub>2 and OPA1 gene expression of cardiac tissue after high intensity interval training and resveratrol injection in NAFLD rats. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 32(2): 149-156.

**Correspondence to:** Ahmad Abdi

**Tel:** +98 9113001960

**E-mail:** a.abdi58@gmail.com

**ORCID ID:** 0000-0002-7734-7518

**Received:** 6 Jul 2021; **Accepted:** 2 Feb 2022

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی

دوره ۳۲، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱، صفحات ۱۴۹ تا ۱۵۶

## بیان ژن MFn1، MFn2 و OPA1 بافت قلب به دنبال تمرین تناوبی شدید و تزریق رزوراترول در موش‌های صحرایی مدل NAFLD

رعله شاهینی<sup>۱</sup>، احمد عبدی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>دانشجوی کارشناسی ارشد گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران  
<sup>۲</sup>دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD) با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی همراه است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تمرین تناوبی شدید (HIIT) همراه با مکمل رزوراترول بر بیان MFn1، MFn2 و OPA1 سلول‌های قلب موش‌های صحرایی مبتلا به NAFLD بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۴۸ سر موش‌های صحرایی نر به دو گروه NAFLD ( $n=40$ ) و کنترل-سالم (CN,  $n=8$ ) 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 دوییدن را روی تردمیل انجام دادند. به گروه‌های SUPNAF و TRSUPNAF (۲۰ میلی‌گرم/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 سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری شاخص‌ها نگهداری شد. برای تحلیل آماری از تحلیل واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری  $p \leq 0.05$  استفاده شد.

**یافته‌ها:** القای کبد چرب باعث کاهش بیان MFn1 ( $p=0.009$ )، MFn2 ( $p=0.003$ ) و OPA1 ( $p=0.002$ ) شد. همچنین در گروه‌های TRNAF، SUPNAF و RSUPNAF نسبت به گروه NAFLD میزان MFn1 (به ترتیب  $p=0.010$ ،  $p=0.040$  و  $p=0.048$ )، MFn2 (به ترتیب  $p=0.028$ ،  $p=0.007$  و  $p=0.011$ ) و OPA1 (به ترتیب  $p=0.019$ ،  $p=0.003$  و  $p=0.006$ ) افزایش معنی‌داری داشت.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرین ورزشی و رزوراترول با فعال‌سازی مجدد هم‌جوشی، میتوکندری‌های سلول‌های قلب را در برابر آسیب کبد چرب محافظت می‌کند.

**واژگان کلیدی:** تمرین اینتروال، رزوراترول، هم‌جوشی میتوکندری، کبد چرب.

### مقدمه

بیماری کبد چرب غیر الکلی (NAFLD: Non-alcoholic Fatty liver disease) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن کبدی بوده و عامل اصلی پیوند کبد تا سال ۲۰۳۰ خواهد بود (۱).

کبد چرب منجر به ایجاد سندروم متابولیکی و دیس لیپیدمی شده و این اختلالات متابولیکی می‌تواند بر پویایی میتوکندری (Mitochondrial Dynamic) تاثیر داشته باشد (۲). تعامل بین شکاف (Fission) و هم‌جوشی (Fusion) در میتوکندری بقا، رشد و تقسیم سلولی و همچنین توزیع میتوکندری را طی تمایز کنترل می‌کند. مطالعات نشان داده که به دنبال بیماری کبد چرب میزان پروتئین‌های هم‌جوشی می‌یابد (۳). مهم‌ترین پروتئین‌های هم‌جوشی MFn1 (Mito Fusion 1)، MFn2 (Mito Fusion 2) و OPA1 (Optic Atrophy

آدرس نویسنده مسئول: آمل، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، احمد

عبدی (email: a.abdi58@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-7734-7518

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۴/۱۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۱۳

اثر تمرین تناوبی با شدت بالا همراه با مکمل رزوراترول بر بیان MFN1، MFN2 و OPA1 بافت قلبی در موش‌های صحرایی مدل حیوانی NAFLD بود.

## مواد و روشها

### نمونه‌ها

در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر هشت هفته‌ای از نژاد ویستار به عنوان نمونه انتخاب و به مرکز پژوهش منتقل شدند. حجم نمونه مطالعه حاضر بر اساس نتایج تحقیقات پیشین، در سطح معنی‌داری ۵ درصد (خطای نوع اول) و توان آماری ۸۰٪ (خطای نوع دوم) و با استفاده از نرم افزار Medcalc 18.2.1 (۸ سر موش در هر گروه) تعیین شد. معیار ورود به مطالعه حاضر شامل نر بودن موش‌ها، سلامت کامل موش‌ها و عدم استفاده از هرگونه دارو بود. معیار خروج از مطالعه عدم اجرای پروتکل تمرینی و مصرف نکردن مکمل، مونث بودن و آسیب حین اجرا تمرین بود. حیوانات در شرایط استاندارد نگهداری شدند. در تمام مدت آب و غذا (به صورت پلت) به اندازه کافی و آزادانه دریافت کردند. موازین اخلاقی کار با حیوانات مطابق کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت رعایت و تایید شد. پس از انتقال موش‌های صحرایی به آزمایشگاه، القای کبد چرب غیر الکلی و آشنایی با فعالیت ورزشی روی تردمیل مخصوص جوندگان، به طور تصادفی به دو گروه بیمار NAFLD و کنترل-سالم (CN) تقسیم شدند. موش‌های صحرایی 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٪ چربی، ۵۰٪ کربوهیدرات، ۲۴٪ پروتئین و ۴٪ سایر موارد) قرار گرفتند (۱۴). موش‌های صحرایی گروه بیمار مجدداً به ۵ زیر گروه تجربی شامل: بیمار (NAFLD)، شام (SHAM)، تمرین-بیمار (TRNAF)، مکمل-بیمار (SUPNAF) و تمرین-مکمل-بیمار (TRSUPNAF) تقسیم شدند. موش‌های صحرایی گروه تمرین، یک برنامه هشت هفته‌ای (۵ روز هفته) تمرین تناوبی شدید را اجرا کردند، در حالی که دیگر موش‌های صحرایی در هیچ برنامه تمرینی شرکت داده نشدند.

### پروتکل تمرین

جدول ۱ پروتکل تمرین تناوبی را برای موش‌های صحرایی مبتلا به NAFLD نشان داده است. قبل از شروع تمرین اصلی و به منظور آشنایی با چگونگی فعالیت توسط تردمیل، موش‌های

(Protein-1) هستند (۴). شکاف و هم‌جوشی غیرطبیعی عملکرد میتوکندری را مختل می‌کند و منجر به افزایش فشار به میتوکندری، تولید بیشتر رادیکال‌های آزاد، تغییر در فعالیت آنزیم‌های میتوکندری و کاهش تولید ATP می‌شود. اخیراً نشان داده شده که اختلال در پویایی میتوکندری با بی‌نظمی‌های مختلفی از جمله نارسایی قلبی، دیابت و پیری همراه است (۵). مطالعات جمعیت شناختی و کلینیکی نقش NAFLD را در ایجاد نشانه‌های بیماری قلبی عروقی مانند اختلال در عملکرد بطن چپ، آترواسکلروز، ناهنجاری سیستم هدایتی قلب و سکتة مغزی نشان می‌دهد (۶). جلوگیری از هم‌جوشی میتوکندری در بیماری‌های کبد چرب منجر به کاهش تنفس میتوکندری میوسیت‌های قلبی و افزایش حساسیت به استرس اکسیداتیو می‌شود (۷). رژیم‌های غذایی با کیفیت پایین و مصرف مواد غذایی حاوی چربی اشباع عوامل ایجاد NAFLD و اختلال متابولیسمی، و همچنین مرگ و میر ناشی از بیماری قلبی عروقی (۸) است، که تاکید می‌کند بین رژیم غذایی، متابولیسم، بیماری‌های کبدی و سیستم قلبی عروقی ارتباط وجود دارد. در مقابل سبک زندگی مناسب، رژیم غذایی سالم همراه با فعالیت ورزشی و مصرف میوه و سبزیجات با کاهش خطر ابتلا به NAFLD همراه است. تمرینات ورزشی اثرات محافظتی مختلفی در برابر انواع بیماری‌ها داشته، و تاثیر بر عملکرد، پویایی و میتوفاژی میتوکندری از مکانیزم‌های بالقوه آن بر بیماری‌ها می‌باشد. برخی از مطالعات تغییرات عملکردی میتوکندری، پویایی میتوکندری (۹) و میتوفاژی (۱۰) را در عضلات با توجه به انواع شدت و نوع فعالیت ورزشی بررسی کرده‌اند. همچنین گزارش شده است که عصاره انگور و رزوراترول هم با توجه به داشتن ترکیبات پلی‌فنول می‌تواند باعث کاهش آسیب‌پذیری کبد چرب و پویایی میتوکندری در میوسیت‌های قلبی شود (۱۱). رزوراترول با کاهش ROS و مهار سیکلواکسیژناز (COX: Cyclooxygenase) و فعال کردن مسیرهای ضد التهابی (۱۲) به NAFLD کمک می‌کند. در این پژوهش سعی شده که به طور همزمان اثر تمرین تناوبی شدید همراه با رزوراترول بر بیان پروتئین‌های هم‌جوشی بافت قلب مورد بررسی قرار گیرد. مطالعات نشان داده که تمرین با شدت بالا در مقایسه با تمرین با شدت پایین در بهبود سیستم قلبی تنفسی و سلامت قلب و عروق موثرتر است (۱۳). همچنین فرض ما این است که تمرین با شدت بالا همراه با رزوراترول تاثیر بیشتری بر بیان پروتئین‌های هم‌جوشی بافت قلب در موش‌های صحرایی NAFLD داشته باشد. بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی

نیترژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد. برای جلوگیری از تاثیر آهنگ شبانه روزی، نمونه‌گیری از ساعت ۸ آغاز و ۱۱:۳۰ به اتمام رسید. برای بررسی بیان MFn1 و MFn2 در هر گروه از تکنیک Real Time PCR 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 MFn1، MFn2 و OPA1

طراحی، آماده سازی پرایمر: جدول ۲ الگوی پرایمر را نمایش می‌دهد.

**استخراج RNA:** RNA با استفاده از کیت کبازن (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.

#### تجزیه و تحلیل آماری

پس از تأیید توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون لون، برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ انجام

صحرائی گروه‌های تمرین و گروه مکمل-تمرین در یک هفته طی پنج جلسه، به مدت پنج دقیقه با سرعت ۸-۱۰ متر بر دقیقه به شیب صفر فعالیت داشتند. برنامه تمرین اصلی با اقتباس از پژوهش دانیل و همکاران (۲۰۱۷) (۱۵) بدین صورت انجام شد که در هفته اول ۱۰ ست فعالیت ۱ دقیقه‌ای و ۲ دقیقه استراحت بین ست‌ها بود، که در هفته آخر به ۱۵ ست رسید. سرعت فعالیت با ۱۴ متر در دقیقه در هفته اول شروع شده و هر هفته ۲ متر در دقیقه بر سرعت افزوده شد تا در هفته هشتم به ۲۸ متر در دقیقه رسید.

#### نحوه مصرف رزوراترول

یک گرم پودر رزوراترول (شرکت Nutrabio آمریکا، با درجه فارماکولوژی و خلوص ۹۹/۸۷ درصد) با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به عنوان استوک ساخته شد. برای هر بار تجویز رزوراترول، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷ درصد یا DMSO ۱۰ درصد در آب به ازای هر موش صحرائی تهیه و رزوراترول را در آن معلق نموده و تجویز شد. این محلول در گروه‌های SUPNAF و TRSUPNAF با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن (راس ساعت ۹ صبح) به صورت درون صفاقی به مدت ۸ هفته تزریق شد (۱۶).

#### روش نمونه‌گیری از بافت قلب و اندازه‌گیری متغیرها

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین (۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) موش‌ها بی‌هوش شدند. بافت مورد نظر بلافاصله پس از جداسازی و شست و شو با سالین فوراً در تیوب‌های حاوی RNA later جهت جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شده و به

جدول ۱. پروتکل تمرینی هوایی برای موش‌های صحرائی NAFLD

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
ست (تکرار)	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۳	۱۴	۱۴	۱۵
سرعت (متر بر دقیقه)	۱۴	۱۶	۱۸	۲۰	۲۲	۲۴	۲۶	۲۸
مدت استراحت (دقیقه)	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲

جدول ۲. الگوی پرایمر MFn1، MFn2 و OPA1

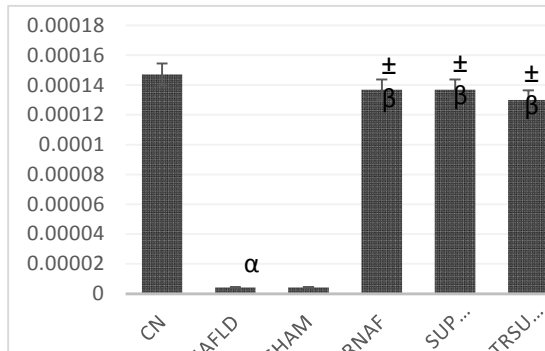
Genes	Sequence (5' → 3')
F MFn1	CTC CTG TAA TCT TGC CTG
R MFn1	ATC GGA TCT TTT TTG TTT CAG C
F MFn2	ATG TCT GTG TGT CAC TTC C
R MFn2	CAA TGA CCC ACT GTG AGA TGA
F OPA1	GGATCTGCTGTTGGAGGTGG
R OPA1	GTCTTCTGAACTGGGAAGGG
F GAPDH	AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G
R GAPDH	CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C

شد و سطح معنی‌داری آزمون‌ها  $p \leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

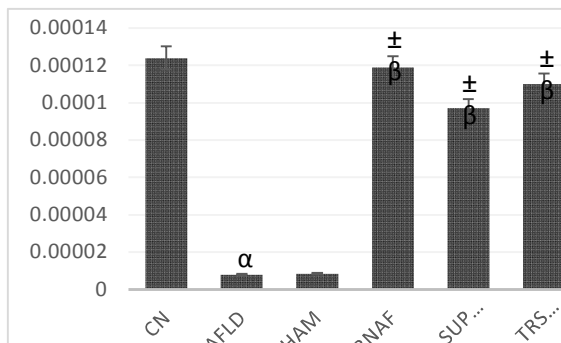
## یافته‌ها

تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان MFn1 بافت قلب بین گروه‌های مختلف وجود داشت ( $p < 0/0001$ )،  $F=7/680$  (جدول ۳). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد میزان بیان MFn1 در گروه‌های NAFLD ( $p=0/009$ ) و SHAM ( $p=0/008$ ) نسبت به گروه CN کاهش معنی‌داری داشت. همچنین بیان MFn1 در گروه‌های SUPNAF (به ترتیب  $p=0/048$  و  $p=0/044$ )، TRNAF (به ترتیب  $p=0/10$  و  $p=0/009$ ) و TRSUPNAF (به ترتیب  $p=0/004$  و  $p=0/004$ ) نسبت به گروه SHAM و NAFLD افزایش معنی‌داری داشت (نمودار ۱).

نسبت به گروه CN کاهش معنی‌داری داشت. همچنین بیان MFn2 در گروه‌های SUPNAF (به ترتیب  $p=0/007$  و  $p=0/007$ )، TRNAF (به ترتیب  $p=0/028$  و  $p=0/028$ ) و TRSUPNAF (به ترتیب  $p=0/011$  و  $p=0/011$ ) نسبت به گروه SHAM و NAFLD افزایش معنی‌داری داشت (نمودار ۲).



**نمودار ۲.** تغییرات بیان MFn2 بافت قلب در گروه‌های مختلف  $\alpha$ : تفاوت با کنترل-سالم (CN)،  $\beta$ : تفاوت با بیمار (NAFLD)،  $\pm$ : تفاوت با شام (SHAM) در سطح  $p \leq 0/05$ .



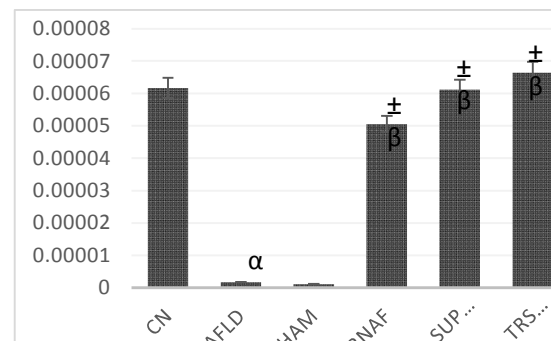
**نمودار ۳.** تغییرات بیان OPA1 بافت قلب در گروه‌های مختلف  $\alpha$ : تفاوت با کنترل-سالم (CN)،  $\beta$ : تفاوت با بیمار (NAFLD)،  $\pm$ : تفاوت با شام (SHAM) در سطح  $p \leq 0/05$ .

علاوه بر این نتایج پژوهش حاضر، تفاوت معنی‌داری را در میزان تغییرات بیان OPA1 بافت قلب گروه‌های مختلف نشان داد ( $F=9/312$ ,  $p < 0/0001$ ) (جدول ۳). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد میزان بیان OPA1 در گروه‌های NAFLD ( $p=0/002$ ) و SHAM ( $p=0/002$ ) نسبت به گروه CN کاهش معنی‌داری داشت. همچنین بیان OPA1 در گروه‌های SUPNAF (به ترتیب  $p=0/003$  و  $p=0/003$ )، TRNAF (به ترتیب  $p=0/019$  و  $p=0/019$ ) و TRSUPNAF (به ترتیب  $p=0/006$  و  $p=0/006$ ) نسبت به گروه SHAM و NAFLD افزایش معنی‌داری داشت (نمودار ۳).

**جدول ۳.** مقایسه متغیرها در پس‌آزمون بین گروه‌ها

متغیر	نسبت F	df	Sig
MFn1	7/680	5	<0/0001*
بین گروه‌ها			
درون گروه		47	
MFn2	7/955	5	<0/0001*
بین گروه‌ها			
درون گروه		47	
OPA1	9/312	5	<0/0001*
بین گروه‌ها			
درون گروه		47	

\* معنی‌داری آماری در آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه



**نمودار ۱.** تغییرات بیان MFn1 بافت قلب در گروه‌های مختلف  $\alpha$ : تفاوت با کنترل-سالم (CN)،  $\beta$ : تفاوت با بیمار (NAFLD)،  $\pm$ : تفاوت با شام (SHAM) در سطح  $p \leq 0/05$ .

از دیگر نتایج پژوهش حاضر، تفاوت معنی‌دار در میزان تغییرات بیان MFn2 بافت قلب بین گروه‌های مختلف وجود داشت ( $F=7/955$ ,  $p < 0/0001$ ) (جدول ۳). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد میزان بیان MFn2 در گروه‌های NAFLD ( $p=0/003$ ) و SHAM ( $p=0/003$ ) نسبت به گروه SHAM و NAFLD افزایش معنی‌داری داشت (نمودار ۳).

## بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان MFn1، MFn2 و OPA1 در موش‌های NAFLD نسبت به CN کاهش معنی‌داری داشت. گزارش شده که رژیم غذایی پرچرب باعث کاهش پتانسیل غشای میتوکندری برای مهار نشت پروتون‌ها شده و در نتیجه باعث افزایش ROS می‌شود (۱۷). از آن‌جای که قلب یک بافت بسیار هوازی بوده و متابولیسم آن به عملکرد میتوکندری بستگی دارد، افزایش هیپرانسولینی و هیپرلیپیدمی ناشی از NAFLD، می‌تواند باعث افزایش ROS شده در نتیجه باعث کاهش پروتئین‌های هم‌جوشی شود. در این راستا دلروز و همکارانش (۱۳۹۹) (۱۸) و لیو (Liu) و همکارانش (۲۰۱۴) (۱۹) نشان دادند که میزان پروتئین MFn1 و MFn2 در موش‌های صحرایی NAFLD کاهش می‌یابد. علاوه بر این، مطالعات دیگری نشان داد که رژیم غذایی پرچرب باعث کاهش OPA1 در موش‌های NAFLD می‌شود (۲۰). همبستگی معکوس بین MFn2 و پیشرفت بیماری NAFLD، نشان می‌دهد بین هم‌جوشی میتوکندری با پاتوفیزیولوژی اختلال کبد چرب ارتباط وجود دارد (۲۱). هال (Hall) و همکارانش (۲۰۱۴) بیان کردند که حذف MFn2 در قلب موش‌ها باعث اختلال در متابولیسم چربی و کاهش تنفس میتوکندری می‌شود (۲۲). همچنین در پژوهش هال بیان شد که حذف MFn1 و MFn2 در قلب موش‌های بزرگسال منجر به تکه‌تکه شدن میتوکندری، اختلال در تنفس میتوکندری و در نهایت منجر به کاردیومیوپاتی کشنده می‌شود که این‌ها نشان می‌دهد میتوفیوژن‌ها برای عملکرد طبیعی میتوکندری قلب ضروری هستند (۲۲).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان پروتئین‌های هم‌جوشی MFn1، MFn2 و OPA1 در گروه TRNAF نسبت به گروه NAFLD و SHAM افزایش معنی‌داری داشت. شواهد نشان می‌دهد که ورزش با اثرات پلی‌تروپیک خود باعث حفظ هومئوستاز سیستمیک از طریق میتوکندری می‌شود (۲۳). فعالیت ورزشی با بهبود در متابولیسم میتوکندری، بیوژنز و افزایش کیفیت میتوکندری مانع از پیشرفت و اختلال در عملکرد میتوکندری می‌شود (۲۳). هم‌راستا با پژوهش حاضر نو (No) و همکارانش (۲۰۲۰) نشان دادند که تمرین ورزشی باعث افزایش پروتئین هم‌جوشی میتوکندری (OPA1) و کاهش پروتئین‌های شکاف (Fis1 و Drp1) می‌شود (۲۴). علاوه بر این لی (Li) و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که هر دو نوع تمرین HIIT و MICT با افزایش سطوح MFN1،

MFN2 و OPA1 و کاهش سطح DRP1 و FIS1 در هیپوکامپ باعث بهبود ناهنجاری میتوکندری می‌شود (۲۵). بوسکوات (Busquets) و همکارانش (۲۰۱۷) نیز نشان دادند، بیان MFN عضلات اسکلتی هم در سطح پروتئین و هم در سطح mRNA بعد از فعالیت ورزشی افزایش می‌یابد (۲۶). فعالیت ورزشی با بهبود بیان MFn1، MFn2 و OPA1 باعث بهبود هم‌جوشی میتوکندری شده و به حفظ هموستاز میتوکندری در موش‌هایی با رژیم غذایی پرچرب کمک می‌کند (۲۷). این نتایج نشان می‌دهد که طبیعی شدن فرآیند هم‌جوشی در بافت قلب می‌تواند عملکرد قلب را در رژیم غذایی پرچرب حفظ کند. فعالیت ورزشی نقش مهمی در تنظیم هم‌جوشی میتوکندری از مسیر استرس اکسیداتیو دارد. فعالیت ورزشی منظم سبب کاهش شاخص‌های التهابی و افزایش ظرفیت یا فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو می‌گردد (۳). کاهش غلظت شاخص‌های استرس اکسیداتیو با افزایش بیان ژن‌های MFn1، MFn2 همراه است که باعث افزایش فعالیت هم‌جوشی میتوکندری می‌شود (۲۸). با این وجود، برخی پژوهش‌ها بیان کردند که فعالیت ورزشی تأثیری بر شاخص‌های هم‌جوشی میتوکندری ندارد (۲۹، ۳۰). شاید تفاوت در نوع آزمودنی‌ها، شدت، مدت، و بافت اندازه‌گیری متغیرها، علت تفاوت در نتیجه پژوهش‌های بیان شده با تحقیق حاضر باشد.

از دیگر نتایج پژوهش حاضر افزایش بیان پروتئین‌های MFn1، MFn2 و OPA1 در گروه SUPNAF و TRSUPNAF بود. با این وجود تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تجربی مشاهده نشد. مطالعات اندکی به بررسی هم‌زمان تمرین ورزشی و مکمل رزورترول بر پویایی میتوکندری پرداخته‌اند. در محدود مطالعه انجام شده، دلروز و همکارانش (۱۳۹۸) بیان کردند که ترکیبی از تمرین هوازی و رزورترول می‌تواند از طریق افزایش در بیان شاخص‌های هم‌جوشی میتوکندری، شاخص‌های آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو را در بیماران NAFLD تعدیل کند (۱۸). این محققین بیان کردند که انجام فعالیت ورزشی هوازی در کنار مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله رزورترول کمک زیادی در مهار تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو در سلول‌های بافت قلبی بیماران NAFLD دارد و از این طریق باعث افزایش بیان ژن‌های هم‌جوشی MFn1 و MFn2 می‌شود. پژوهش‌های قبلی نشان می‌دهد، رزورترول با فعال کردن AMPK (-AMP) و (activated protein kinase) و فاکتورهای رونویسی میتوکندری، باعث ایجاد بیوژنز میتوکندری می‌شود (۳۱). به

نتایج این مطالعه نشان داد که سطح Mfn1، Mfn2 و OPA1 به دنبال القای NAFLD در عضله قلب کاهش یافته که نشان می‌دهد سطح هم‌جوشی میتوکندری در این بافت مهار شد. همچنین ما دریافتیم که فعالیت ورزشی تناوبی شدید و همچنین مصرف رزوراترول باعث افزایش سطح Mfn1، Mfn2 و OPA1 در موش‌های صحرایی NAFLD شد، که نشان می‌دهد این نوع تمرین و رزوراترول روند هم‌جوشی میتوکندری را افزایش می‌دهد. با این وجود، ترکیب تمرین و رزوراترول تاثیر هم‌افزایی نداشت. به نظر برای درک بهتر اثر تمرین ورزشی و مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل رزوراترول بر پروتئین‌های هم‌جوشی میتوکندری قلب نیاز به پژوهش‌های بیشتری است.

### تشکر و قدر دانی

این تحقیق در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی انجام شده و در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت با کد IR.IAU.M.REC.1398.014 تایید گردید. بدین‌وسیله، نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحدهای دانشگاهی اعلام می‌دارند.

نظر می‌رسد مصرف رزوراترول از طریق کاهش واسطه‌های التهابی و استرس‌اکسیداتیو و از طرفی با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، سبب بهبود بیماری NAFLD شده (۱۶) و میزان پروتئین‌های هم‌جوشی را افزایش داد. در خصوص نقش آنتی‌اکسیدان‌ها بر پروتئین‌های هم‌جوشی نشان داده شد که اسید سالیانولیک B به عنوان یک آنتی‌اکسیدان با تقویت هم‌جوشی میتوکندری و افزایش MFN2 منجر به کاهش مرگ و میر سلول‌ها با تقویت میتوکندری می‌شود (۳۲). همچنین خیار تلخ باعث افزایش بیان MFN1، افزایش SOD و بهبود عملکرد تنفس میتوکندریایی شده و باعث کاهش فعالیت مسیر SREBP-1/FAS می‌شود (۳۳). از محدودیت‌های پژوهش حاضر، اندازه‌گیری شاخص‌های استرس‌اکسیداتیو و التهابی در بافت قلب بود، که می‌توانست درک بهتری از اثر فعالیت ورزشی و رزوراترول بر پویایی میتوکندری میوسیت‌های قلبی ارائه دهد. از آنجایی که بیماری NAFLD به صورت دراز مدت تاثیرات 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.

### REFERENCES

- Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* 2011;141:1249-53.
- 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;482:179-185.
- Yan Z, Lira VA, Greene NP. Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. *Exerc Sport Sci Rev* 2012;40:159.
- Yu T, Wang L, Yoon Y. Morphological control of mitochondrial bioenergetics. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2015;20:229.
- Marín-García J, Akhmedov AT, Moe GW. Mitochondria in heart failure: the emerging role of mitochondrial dynamics. *Heart Fail Rev* 2013;18:439-56.
- Ma J, Hwang S-J, Pedley A, Massaro JM, Hoffmann U, Chung RT, et al. Bi-directional analysis between fatty liver and cardiovascular disease risk factors. *J Hepatol* 2017;66:390-7.
- Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 2003;278:17190-7.
- Seidemann SB, Claggett B, Cheng S, Henglin M, Shah A, Steffen LM, et al. Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis. *Lancet Public Health* 2018;3:e419-e28.
- 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;69:371-8.
- Tarpey MD, Davy KP, McMillan RP, Bowser SM, Halliday TM, Boutagy NE, et al. Skeletal muscle autophagy and mitophagy in endurance-trained runners before and after a high-fat meal. *Mol Metab* 2017;6:1597-609.
- Wang H, Jiang T, Li W, Gao N, Zhang T. Resveratrol attenuates oxidative damage through activating mitophagy in an in vitro model of Alzheimer's disease. *Toxicol Lett* 2018;282:100-8.

12. Wiciński M, Socha M, Walczak M, Wódkiewicz E, Malinowski B, Rewerski S, et al. Beneficial Effects of Resveratrol Administration—Focus on Potential Biochemical Mechanisms in Cardiovascular Conditions. *Nutrients* 2018;10:1813.
13. MacInnis MJ, Gibala MJ. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *J Physiol* 2017;595:2915-30.
14. Efati M, Khorrami M, Zarei Mahmmmodabadi A, Raouf Sarshoori J. Induction of an Animal Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Using a Formulated High-Fat Diet. *JBUMS* 2016;18:57-62.
15. Freitas DA, Rocha-Vieira E, Soares BA, Nonato LF, Fonseca SR, Martins JB, et al. High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. *Physiol Behav* 2018;184:6-11.
16. Hajjghasem 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;125:142-149.
17. Eccleston HB, Andringa KK, Betancourt AM, King AL, Mantena SK, Swain TM, et al. Chronic exposure to a high-fat diet induces hepatic steatosis, impairs nitric oxide bioavailability, and modifies the mitochondrial proteome in mice. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:447-59.
18. Delroz H, Abdi A, Barari A, Farzanegi P. The Effect of Eight Weeks of Aerobic Training Combined With Resveratrol on MFn1 and MFn2 Expression in Cardiac Myocytes in a Non-alcoholic Fatty Liver Animal Model. *CMJA*. 2020;9:3878-89.
19. Liu R, Jin P, Wang Y, Han L, Shi T, Li X. Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle. *PLoS One* 2014;9:e92810.
20. Delroz h, Abdi A, Barari A, Farzanegi P. Protective Effect of Aerobic Training along with Resveratrol on Mitochondrial Dynamics of Cardiac Myocytes in Animal Model of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Ardabil Univ Med Sci* 2019;19:272-83.
21. Li R, Toan S, Zhou H. Role of mitochondrial quality control in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Aging (Albany NY)* 2020;12:6467.
22. Hall A, Burke N, Dongworth R, Hausenloy D. Mitochondrial fusion and fission proteins: novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* 2014;171:1890-906.
23. Tanaka T, Nishimura A, Nishiyama K, Goto T, Numaga-Tomita T, Nishida M. Mitochondrial dynamics in exercise physiology. *Pflugers Arch* 2020;472:137-53.
24. No M-H, Heo J-W, Yoo S-Z, Kim C-J, Park D-H, Kang J-H, et al. Effects of aging and exercise training on mitochondrial function and apoptosis in the rat heart. *Pflugers Arch* 2020;472:179-93.
25. Li B, Liang F, Ding X, Yan Q, Zhao Y, Zhang X, et al. Interval and continuous exercise overcome memory deficits related to  $\beta$ -Amyloid accumulation through modulating mitochondrial dynamics. *B Behav Brain Res* 2019;376:112171.
26. Busquets-Cortés C, Capó X, Martorell M, Tur JA, Sureda A, Pons A. Training and acute exercise modulates mitochondrial dynamics in football players' blood mononuclear cells. *Eur J Appl Physiol* 2017;117:1977-87.
27. Gonçalves IO, Passos E, Diogo CV, Rocha-Rodrigues S, Santos-Alves E, Oliveira PJ, et al. Exercise mitigates mitochondrial permeability transition pore and quality control mechanisms alterations in nonalcoholic steatohepatitis. *Appl Physiol Nutr Metab* 2016;41:298-306.
28. Trewin A, Berry B, Wojtovich A. Exercise and mitochondrial dynamics: keeping in shape with ROS and AMPK. *Antioxidants* 2018;7:7.
29. Wyckelsma VL, Levinger I, McKenna MJ, Formosa LE, Ryan MT, Petersen AC, et al. Preservation of skeletal muscle mitochondrial content in older adults: relationship between mitochondria, fibre type and high-intensity exercise training. *J Physiol* 2017;595:3345-59.
30. Marton O, Koltai E, Takeda M, Koch LG, Britton SL, Davies KJ, et al. Mitochondrial biogenesis-associated factors underlie the magnitude of response to aerobic endurance training in rats. *Pflugers Arch* 2015;467:779-88.
31. Hart N, Sarga L, Csende Z, Koltai E, Koch LG, Britton SL, et al. Resveratrol enhances exercise training responses in rats selectively bred for high running performance. *Food Chem Toxicol* 2013; 61:53-9.
32. Wang Y-C, Kong W-Z, Jin Q-M, Chen J, Dong L. Effects of salvianolic acid B on liver mitochondria of rats with nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2015;21:10104.
33. Xu J, Cao K, Li Y, Zou X, Chen C, Szeto IM-Y, et al. Bitter melon inhibits the development of obesity-associated fatty liver in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *J Nutr* 2014;144:475-83.