

The effect of short endurance training on the expression level of PINK-1, Parkin and PGC-1 α in the heart of nicotine-sensitized rats

Amir Abbas Lashgari¹, Mohammad Ali Azarbayjani¹, Maghsoud Peeri¹, Mohammad Nasehi²

¹ Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Cognitive and Neuroscience Research Center (CNRC), Amir-Almomenin Hospital, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Nicotine alters the expression of various genes in the heart. PINK-1 (PTEN-induced kinase1) is the major regulator of cellular mitophagy. Moreover, Parkin is a protein that plays a key role in the process of ubiquitination. Also, PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) is the main regulator of mitochondrial biogenesis. On the other hand, exercise has many positive physiological effects on patients suffering from heart failure. In this study, we aimed to investigate the effect of short endurance training on the expression of parkin, PINK1 and PGC-1 α genes in the heart of nicotine-sensitive rats.

Materials and methods: in this study, male Wistar rats weighing approximately 180 to 200 gr were used. The animals received nicotine at dose of 0.21 mg/kg intraperitoneally. Real time PCR technique was used to evaluate the expression of genes.

Results: The results showed that nicotine decreased the expression of PGC-1 α gene ($p < 0.05$) and had no effect on other genes ($p > 0.05$). Short-term endurance training slightly increased the expression of all genes that was not statistically significant.

Conclusion: It seems that short-term exercise can reduce the pro-apoptotic and stimulant effects of oxidative stress induced by nicotine. In addition, long-term exercise may potentially induce a significant positive effect on mitophagy-related genes.

Keywords: Nicotine, Exercise, Heart, Parkin, PINK-1, PGC-1 α

Cited as: Lashgari AA, Azarbayjani MA, Peeri M, Nasehi M. The effect of short endurance training on the expression level of PINK-1, Parkin and PGC-1 α in the heart of nicotine-sensitized rats. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2022; 32(3): 281-292.

Correspondence to: Mohammad Ali Azarbayjani

Tel: +98 9123172908

E-mail: m_azarbayjani@iauctb.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-3502-7487

Received: 10 Oct 2020; **Accepted:** 4 Sep 2022

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱، صفحات ۲۸۱ تا ۲۹۲

اثر ورزش استقامتی کوتاه مدت بر بیان ژن های *PINK-1*, *Parkin* و *PGC-1α* در قلب موش های حساس شده به نیکوتین

امیر عباس لشگری^۱، محمد علی آذربایجانی^۱، مقصود پیری^۱، محمد ناصحی^۲

^۱ گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ مرکز علوم اعصاب و شناخت (CNRC)، بیمارستان امیرالمومنین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: نیکوتین در قلب بیان ژن های مختلفی را تحت تاثیر قرار می دهد. پروتئین *PINK-1* (*PTEN-induced kinase 1*) تنظیم کننده اصلی میتوفاژی سلولی است. از طرف دیگر، *Parkin* پروتئینی است که در روند بیوبیکتیناسیون نقشی اساسی دارد و باعث القای مسیرهای نجات سلولی می گردد. همچنین، *PGC-1α* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) تنظیم کننده اصلی بیوژنز میتوکنندری است. از سوی دیگر، ورزش اثرات مثبت فیزیولوژیک بسیاری بر بیماری های دارد که از نارسایی قلبی رنج می برند. بنابراین هدف از این پژوهش تاثیر تمرین ورزش کوتاه مدت استقامتی بر بیان ژن های *Parkin*، *PINK-1* و *PGC-1α* در قلب موش های حساس شده به نیکوتین بود.

روش بررسی: در این پژوهش از موش های نر نژاد ویستار، با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوان ها نیکوتین را در مقدار ۰/۲۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش به صورت درون صفاقی دریافت کردند. برای بررسی بیان ژن های مورد مطالعه، در هر گروه بررسی بافت ها با تکنیک *Real Time PCR* انجام شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که نیکوتین بیان ژن *PGC-1α* را کاهش داد ($P < 0/05$) و بر دیگر ژن ها تاثیری نداشت ($P > 0/05$). همچنین، ورزش کوتاه مدت استقامتی بیان تمام ژن ها را تا حدی کم افزایش داد که از نظر آماری معنی دار نبود ($P > 0/05$).

نتیجه گیری: به نظر می رسد ورزش کوتاه مدت استقامتی می تواند تاثیرات پرو-آپوپتوتیک و تحریک کننده استرس اکسیداتیو ناشی از نیکوتین را کاهش دهد. علاوه بر این، تمرین ورزشی طولانی مدت احتمالاً بتواند بر ژن های موثر بر میتوفاژی تاثیر معنی دار و مثبت بگذارد.

واژگان کلیدی: نیکوتین، ورزش، قلب، *Parkin*، *PINK-1*، *PGC-1α*

مقدمه

نیکوتین آلکالوئید پاراسمپاتومیمتیک قدرتمند و ترکیب اصلی روانگردان موجود در تنباکو است که باعث تقویت اعتیاد به تنباکو و شیوع بالای عود در افرادی می شود که مصرف تنباکو را ترک کرده اند (۱). نیکوتین به گیرنده های کولینرژیک

نیکوتینی متصل می شود (۲). وقتی نیکوتین به این گیرنده ها متصل می شود، کانال های یونی این گیرنده ها باز می شوند و کاتیون های سدیم و کلسیم از آن عبور می کنند (۲). مصرف نیکوتین باعث افزایش ضربان قلب نیز می گردد که به دلیل تحریک پایدار سیستم سمپاتیک است. نیکوتین همچنین باعث نقص عملکرد سلول های اندوتلیال و مقاومت به انسولین می گردد (۲). مصرف تنباکو خطر انواع بیماری های قلبی-عروقی از جمله سکته قلبی، ایست ناگهانی قلب و آنفارکتوس حاد میوکارد را بالا می برد (۳). کشیدن سیگار باعث بروز اثرات مخربی بر عملکرد اندوتلیال عروق می گردد (۴). نیکوتین

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، گروه فیزیولوژی ورزشی،

امیر علی آذربایجانی @azarbajani@iauctb.ac.ir (email: m_azarbajani@iauctb.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-3502-7487

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۷/۱۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۶/۱۳

ممکن است مستقیماً با بروز بیماری‌های قلبی-عروقی مرتبط باشد (۵). در مدل‌های حیوانی، نوزادانی که از ابتدا در معرض نیکوتین قرار می‌گیرند در هفته‌ها و ماه‌های بعد با عملکرد نامناسب دستگاه قلب و عروق مواجه می‌شوند (۶). البته این نکته شایان ذکر است که اثر مخرب نیکوتین بر دستگاه قلب و عروق به دوز نیکوتین، مدت زمان در معرض گرفتن نیکوتین و نحوه در معرض قرار گرفتن آن وابسته است (۷). نیکوتین بر سیستم نوروترانسمیتری سروتونرژیک و کولینرژیک تأثیر منفی می‌گذارد (۸). هر دوی این سیستم‌های نوروترانسمیتری در عمل سیستم قلب و عروق و تنفس تأثیر به‌سزایی دارند (۹). از سوی دیگر، تحقیقات بسیاری تأثیر نیکوتین بر بیان ژن‌های مختلف در ارگان‌های مختلف را به اثبات رسانیده‌اند (۱۰). نیکوتین در قلب نیز بیان ژن‌های مختلفی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نیکوتین با افزایش بیان ژن‌های آنژیوپونتین-۱ و EGF باعث القا التهاب و فیبروز در قلب و کلیه می‌شود (۱۱). همچنین، نیکوتین باعث کاهش شدید بیان ژن PKCε در قلب می‌شود؛ این ژن در تنظیم هایپرتروفی بافت قلب و حفاظت از قلب در شرایط ایسکمی نقش بسیار مهمی دارد (۱۲). تأثیر نیکوتین بر ژن‌های موردنظر این پژوهش به درستی مشخص نشده است، اما شواهدی وجود دارد که نیکوتین بر میزان بیان ژن‌هایی نظیر PINK-1 تأثیر می‌گذارد (۱۳).

PINK-1 (PTEN-induced kinase 1) تنظیم‌کننده اصلی میتوفاژی سلولی است (۱۴). این پروتئین در از میان بردن میتوکندری‌های آسیب‌دیده نیز نقش مهمی دارد (۱۵). کاهش میزان PINK-1 به دلیل کاهش میتوفاژی سلولی باعث افزایش و تجمع میتوکندری‌های آسیب‌دیده می‌شود (۱۶). در کل، این پروتئین در شناسایی میتوکندری‌های از کار افتاده و نابود کردن آن‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند. PINK-1 با تحریک Parkin باعث می‌شود تا این پروتئین به میتوکندری بچسبد و پروسه اتوفاژی میتوکندری را اجرا کند (۱۷). بدون حضور PINK-1، Parkin نمی‌تواند به میتوکندری آسیب‌دیده متصل شود؛ در حالی که از سوی دیگر، بیان بیش از حد ژن PINK-1 باعث می‌شود تا Parkin حتی به میتوکندری‌های سالم هم متصل گردد (۱۸). از طرف دیگر، Parkin پروتئینی است که در روند یوبیکیتیناسیون نقش اساسی دارد (۱۹). یوبیکیتیناسیون روندی است که در آن مولکول‌ها با یوبیکیتین نشان‌دار می‌گردند و برای از میان رفتن به لیزوزوم‌ها یا پروتازوم‌ها منتقل می‌گردند (۲۰). این پروتئین با مهار آپوپتوز وابسته به میتوکندری و آپوپتوز غیروابسته به میتوکندری باعث القا مسیرهای نجات سلولی می‌گردد (۲۱).

در کل می‌توان گفت که PINK-1 و Parkin با یکدیگر همکاری می‌کنند تا از طریق القا اتوفاژی میتوکندری‌های آسیب‌دیده، شبکه میتوکندریایی سالمی را در سلول‌های بدن ایجاد کنند (۲۲). تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند که عدم تنظیم میتوفاژی منجر به نارسایی‌های قلبی و مرگ و آسیب کاردیومیوسیت‌ها می‌شود (۲۳). AMPK پروتئینی است که میزان انرژی سلولی را رصد و وضعیت متابولیسمی سلول را تغییر می‌دهد (۲۴). فعالیت این پروتئین که به فسفریلاسیون بسیاری از پروتئین‌ها منجر می‌شود در نارسایی‌های قلبی، ایسکمی قلب و هایپرتروفی پاتولوژیک قلب مشاهده می‌شود (۲۵، ۲۶). پژوهش گذشته نشان داده است که در نارسایی قلبی AMPKα2 با فسفریله کردن PINK-1 باعث تضعیف نارسایی می‌گردد، از طریق تحریک میتوفاژی قلب (۲۴). از سوی دیگر، در هایپرتروفی قلب ناشی از آنژیوتانسین-۲، Parkin با تحریک اتوفاژی باعث تضعیف هایپرتروفی می‌گردد (۲۷). نقش PINK-1 در درمان آسیب ایسکمیک میوکارد نیز به اثبات رسیده است (۲۸). PINK-1 و Parkin در شرایط آسیب و نارسایی‌های قلبی به همراه یکدیگر برای کنترل عملکرد طبیعی میتوکندری سلول‌ها وارد عمل می‌شوند (۲۹). PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) تنظیم‌کننده اصلی بیوژنز میتوکندری است (۳۰). PGC-1α یک فعال‌کننده رونویسی است که بر بسیاری از ژن‌های دخیل در تنظیم کردن متابولیسم و انرژی تأثیر می‌گذارد (۳۱). همچنین، این پروتئین یک رابطه مستقیم بین تحریک فیزیولوژیک خارجی و تنظیم بیوژنز میتوکندری ایجاد می‌کند (۳۲). تحقیقات بسیاری نشان داده است که PGC-1α بر دستگاه قلب و عروق تأثیر می‌گذارد. PGC-1α در بافت‌هایی همچون بافت میوکارد، که نیاز به انرژی زیادی دارند یافت می‌شود و بر عملکرد آن‌ها تأثیر می‌گذارد (۳۳). این پروتئین نقشی منفی در تنظیم سیکل پیری سلول‌های عروق دارد (۳۴). سطوح PGC-1α تفاوت بسیار زیادی بین افراد عادی و افرادی که از نارسایی قلبی رنج می‌برند دارد (۳۵). سطوح PGC-1α در موش‌های مبتلا به انفارکتوس قلب به همراه پارگی قلب بیشتر از سطوح آن در موش‌های مبتلا به انفارکتوس قلب بدون پارگی قلب است، خصوصاً در مناطق بطنی و مناطقی که محدوده‌ی انفارکتوس هستند (۳۴). فعالیت تنظیمی‌ای که PGC-1α بر بیوژنز میتوکندری و عادی‌سازی متابولیسم در بافت‌های مختلف دارد در ماهیچه‌های قلبی به میزان زیادی مشاهده می‌شود (۳۶، ۳۷). کاهش بیان ژن PGC-1α در پاتوژنز

بنابراین، ما در این پژوهش قصد داشتیم تا تاثیر تمرین ورزشی کوتاه مدت استقامتی را بر بیان ژن های Parkin، PINK-1 و PGC-1 α در قلب موش های معمولی و موش های حساس شده به نیکوتین بررسی کنیم.

مواد و روشها

حیوان ها

در این پژوهش از موش های نر نژاد ویستار، با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی استاندارد در دمای 22 ± 3 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. همچنین، چرخه روشنایی و تاریکی به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی برقرار شد. هر موش فقط یک بار مورد آزمایش قرار گرفت و هر گروه شامل چهار موش بود.

گروه های مورد مطالعه

در کل ۲۴ موش صحرایی نر در ۶ گروه بررسی شدند: گروه ۱ یا "کنترل (سالمین)": موش های این گروه تزریق داخل صفاقی سالمین (۱ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم) را برای چهار روز متوالی دریافت کردند.

گروه ۲ یا "سالمین-شم": موش های این گروه تزریق داخل صفاقی سالمین (۱ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم) را برای چهار روز متوالی دریافت کردند. سپس، تمام موش ها به مدت چهارده روز متوالی روی دستگاه تردمیل قرار گرفتند، در حالی که دستگاه خاموش بود.

گروه ۳ یا "سالمین-ورزش": موش های این گروه تزریق داخل صفاقی سالمین (۱ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم) را برای چهار روز متوالی دریافت کردند. سپس، تمام موش ها به مدت چهارده روز متوالی روی دستگاه تردمیل قرار گرفتند، در حالی که دستگاه روشن بود.

گروه ۴ یا "نیکوتین": موش های این گروه تزریق داخل صفاقی نیکوتین (۰,۲۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) را برای چهار روز متوالی دریافت کردند.

گروه ۵ یا "نیکوتین-شم": موش های این گروه تزریق داخل صفاقی نیکوتین (۰,۲۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) را برای چهار روز متوالی دریافت کردند. سپس، تمام موش ها به مدت چهارده روز متوالی روی دستگاه تردمیل قرار گرفتند، در حالی که دستگاه خاموش بود.

گروه ۶ یا "نیکوتین-ورزش": موش های این گروه تزریق داخل صفاقی نیکوتین (۰,۲۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) را برای

بسیاری از اختلالات قلبی مشاهده شده است که باعث جایگزینی گلیکولیز به جای متابولیسم اکسیداتیو می گردد (۳۸). مطالعات نشان داده اند که افزایش میزان بیان PGC-1 α توسط افزایش برداشت کلسیم به رتیکولوم سارکوپلاسم، باعث بهبود عملکرد کاردیومیوسیت ها و مهار اوورلود کلسیم سلولی در قلب می گردد (۳۹).

ورزش اثرات مثبت فیزیولوژیک و سایکولوژیک بسیاری بر بیماری های دارد که از نارسایی قلبی رنج می برند (۴۰). ورزش به عنوان یک روش درمانی غیردارویی، باعث تعادل سیستم سمپاتوواگال، تنظیم بیومارکرهای سیستم سمپاتیک در پلاسما و تنظیم سطوح کاتکولامین ها می گردد (۴۱). ورزش می تواند برای توانبخشی قلب پس از جراحی دریچه قلب موثر باشد (۴۲). همچنین، ورزش ایروبیک به همراه تمرین استقامتی باعث بهبود عملکرد ماهیچه های و کاهش ریسک ابتلا به بیماری های قلبی و عروقی می شود (۴۳). ورزش استقامتی پس از جراحی پیوند قلب می تواند باعث بالابردن بقای قلب پیوندی در فرد گیرنده گردد (۴۴). همچنین، تحقیق اخیر نشان داده است که ورزش با شدت متوسط عملکرد قلبی موش هایی با فشار خون بالا را بهبود می بخشد (۴۵). اثر مثبت ورزش استقامتی بر عملکرد قلب در پژوهشی دیگر نیز به ثبت رسیده است (۴۶). ورزش باعث بهبود انعطاف پذیری سلول های میوکاردا نیز می گردد (۴۷). از طرف دیگر، ورزش بهترین راه برای بالابردن بیویژن و متابولیسم میتوکندری در سلول های ماهیچه ای است (۴۸، ۴۹). ورزش تعداد میتوکندری ها را افزایش می دهد و از بافت میوکاردا از طریق بهبود عملکرد آنتی اکسیدانی محافظت می کند (۵۰، ۵۱). پژوهش گذشته نشان داده است که ورزش استقامتی با کاهش وزن موش ها و تمرین بالارفتن از نردبان بدون ارتباط با کم کردن وزن موش ها، باعث محافظت از عملکرد موثر ماهیچه های قلبی موش های چاق می گردد (۵۲). بسیاری از پژوهش ها اثر افزایشی ورزش بر بیان ژن PGC-1 α را به اثبات رسانیده اند (۵۳، ۵۴). ورزش میزان سطوح پروتئین PGC-1 α را در ماهیچه های قلبی و اسکلتی بالا می برد (۵۵). در پژوهش های دیگر، ورزش بیان ژن PGC-1 α را در قلب ۱،۵ تا ۲ برابر افزایش داده است (۵۶). پژوهش گذشته نشان داده است که ورزش کوتاه مدت اثر سرکوب کننده ای انفارکتوس میوکاردا بر بیان ژن های Parkin و PINK-1 را مهار می کند (۵۷). Parkin با اثر بر میتوفاژی، تاثیر مثبت و حفاظتی ورزش بر بافت قلب را واسطه گری می کند (۵۸).

واکنش زنجیره پلی مراز

در ادامه، پرایمرها به صورت لیوفیلیزه در دسترس قرار گرفتند. برای آماده سازی پرایمرها حجم مشخص آب مقطر استریل به هر تیوب حاوی پرایمر لیوفیلیزه (بر اساس اطلاعات مربوط به هر پرایمر) اضافه شد و این محلول به عنوان استوک در ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. به این ترتیب جهت انجام کار برای هر بار تست، مواد زیر به نسبت های گفته شده در داخل ظروف ۴۸ خانه ریخته و با یکدیگر ترکیب شدند.

از تکنیک RT-qPCR جهت تایید بیان ژن های مورد مطالعه به صورت کمی استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کیزول، RNA کل سلول ها طبق پروتکل سیناژن استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase I Fermentas قرار گرفت. سپس کیفیت RNA های استخراج شده با دستگاه اسپکترومتری (DPI-1, Kiagen) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تهیه cDNA تک رشته ای از پرایمر Oligo dt MWG-Biotech, Germany و آنزیم نسخه برداری معکوس Fermentas و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. هر واکنش PCR با استفاده از PCR master مربوطه انجام شد و SYBER Green و mix Applied Biosystems در دستگاه ABI Step One Applied Biosystems, Sequences Detection Systems Foster City, CA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه ی Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نمودار Melting جهت بررسی صحت واکنش های PCR انجام شده و به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت.

نسبت بیان ژن های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده ها در فرمول زیر:

$$R = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$$

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}})_{\text{Time X}} - (CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}})_{\text{Time 0}}$$

منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن با استفاده از حداقل ۵ غلظت لگاریتمی به ترتیب رقیق شونده از کنترل مثبت هر ژن رسم گردید. میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شده و بیان ژن های گروه سالم به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

چهار روز متوالی دریافت کردند. سپس، تمام موش ها به مدت چهارده روز متوالی روی دستگاه تردمیل قرار گرفتند، در حالی که دستگاه روشن بود.

طرز تهیه محلول دارویی

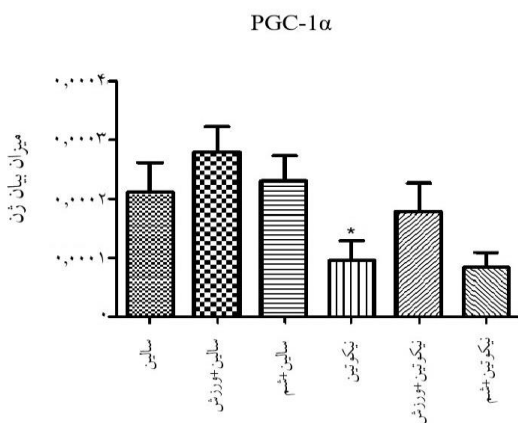
پیش از تزریق ها، نیکوتین در سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد استریل (نرمال سالین) حل می شد و PH محلول به ۷/۲ رسانده می شد. از محلول به دست آمده جهت تزریق به گروه های نیکوتین، نیکوتین-شم و نیکوتین-ورزش استفاده شد. دوز نیکوتین ۰/۲۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش مورد استفاده قرار گرفت (۵۹).

تزریق دارو

برای تزریق ها از سرنگ انسولین استفاده شد و برای گروه هایی که نیکوتین دریافت کردند به ازای هر کیلوگرم وزن موش، میزان یک میلی لیتر دارو به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۶۰). پیش از تزریق، موش ها ابتدا به مدت یک دقیقه مورد نوازش قرار گرفتند تا از میزان استرس وارد شده به آن ها کاسته شود. همچنین، برای در دست گرفتن موش ها در هنگام تزریق از یک پارچه یا حوله ی نرم استفاده شد. تمامی تزریق ها روزانه به مدت ۴ روز انجام گرفت. مطالعات نشان می دهند که این مقدار دارو و با این مدت زمان تزریق قادر به ایجاد وابستگی به نیکوتین است (۵۹).

برنامه تمرین تردمیل

با توجه به مطالعات قبلی که نشان داده اند ۱۴ روز بعد از آخرین تزریق نیکوتین، خاموشی اثرات نیکوتین بوجود می آید و با یک مقدار کمی از دارو امکان برگشت فرد به مصرف نیکوتین وجود دارد، تمرین ورزشی در طول ۱۴ روز بعد از آخرین تزریق نیکوتین انجام گرفت. تمرین استقامتی بر روی تردمیل انجام شد. تمرین استقامتی به دو قسمت تقسیم شد که شش روز اول که به نام عادت کردن (سازگاری) معروف است به این ترتیب بود که در روز اول موش ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه بر روی تردمیل دویدند و در روزهای بعدی، هر روز ۱۰ دقیقه به زمان دویدن آن ها اضافه شد تا مدت زمان دویدن به ۱ ساعت رسید (روز دوم: ۲۰ دقیقه، روز سوم: ۳۰ دقیقه... روز ششم: ۶۰ دقیقه). مرحله دوم، مرحله ی تمرین کردن بود که موش ها هشت روز به طور منظم به مدت ۱ ساعت با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه بر روی تردمیل دویدند. در تمام قسمت ها شیب دستگاه تردمیل صفر قرار داده شده است و به منظور اجبار تمرین و حرکت موش از شک در انتهای تردمیل استفاده شد (۰/۱ میلی آمپر)



شکل ۱

شکل ۱. بررسی اثر ورزش کوتاه مدت استقامتی بر کاهش بیان ژن PGC-1α ناشی از نیکوتین. حیوان‌ها در ۶ گروه جداگانه سالین (۱ میلی لیتر بر کیلوگرم)، نیکوتین (۰/۲۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم)، ورزش و یا ترکیب آنها را دریافت کردند. $P < 0.05$ * در مقایسه با گروه سالین.

بیان ژن Parkin متعاقب تزریق نیکوتین و تمرین کوتاه مدت استقامتی

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک آزمون ANOVA تک راهه $[F(5, 18)=2.05, P>0.05]$ نشان داد، تزریق نیکوتین یا تمرین با تردمیل تاثیری معنی‌دار بر میزان بیان ژن Parkin در قلب موش‌های صحرایی ندارد؛ اما نیکوتین تا اندازه‌ای بر میزان بیان این ژن اثر کاهشی نشان داد و تمرین کوتاه مدت استقامتی نیز تا حدی باعث بالابردن بیان این ژن شد (شکل ۲). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که احتمال دارد نیکوتین در دوزهای بالاتر اثری سو بر این ژن بگذارد و از این طریق بر میتوفاژی تأثیر بگذارد. این اثر می‌تواند به ناکارآمدی سیستم عملکردی میتوکندری‌ها در سلول‌های بافت قلب منجر گردد. همچنین، تمرین ورزشی کوتاه مدت استقامتی‌توانایی بالقوه را دارد که اثر نیکوتین بر بیان Parkin را کاهش دهد و سیستم عملکردی میتوکندری‌های سلول‌های بافت قلب را تقویت کند.

بیان ژن PINK-1 متعاقب تزریق نیکوتین و تمرین کوتاه مدت استقامتی

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک آزمون ANOVA تک راهه $[F(5, 18)=1.64, P>0.05]$ نشان داد، تزریق نیکوتین یا تمرین کوتاه مدت استقامتی تاثیری معنی‌دار بر میزان بیان ژن PINK-1 در قلب موش‌های صحرایی ندارد؛ اما نیکوتین تا اندازه‌ای بر میزان بیان این ژن اثر کاهشی نشان داد و تمرین کوتاه مدت استقامتی نیز تا حدی باعث بالابردن بیان این ژن

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CT}_{\text{target}}}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta\text{CT}_{\text{reference}}}}$$

$$(\Delta\text{CT}_{\text{reference}} = \text{Ct}_{\text{control}} - \text{Ct}_{\text{treatment}}, \Delta\text{CT}_{\text{target}} = \text{Ct}_{\text{control}} - \text{Ct}_{\text{treatment}})$$

در فرمول فوق E معرف Efficiency است و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای ژن به دست می‌آید. تحلیل آماری داده‌ها با آزمون t-test جهت بررسی و معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

در این مطالعه تمام قوانین مرتبط با حقوق حیوان‌ها رعایت شد و تضمین مراقبت‌های انسانی از حیواناتی که برای اهداف آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند داده شد. از جمله این موارد، به حداقل رساندن تعداد حیوانات مورد استفاده در تحقیقات، تضمین توجه مداوم به رفاه حیوانات، اجتناب از ایجاد درد و سختی برای حیوانات مورد استفاده در فعالیت‌های آزمایشگاهی و اطمینان از موجه بودن به کارگیری حیوانات بود. کد شناسه اخلاق در پژوهش به شماره IR.IAU.PS.REC.1398.192 مورخ ۱۳۹۸/۰۷/۱۶ در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران دریافت شد.

یافته‌ها

بیان ژن PGC-1α متعاقب تزریق نیکوتین و تمرین کوتاه مدت استقامتی

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک آزمون ANOVA تک راهه $[F(5, 18)=3.54, P<0.05]$ و به دنبال آن آزمون متعاقب توکی نشان داد، تزریق نیکوتین میزان بیان PGC-1α را در قلب موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد. تمرین کوتاه مدت استقامتی در موش‌های گروه کنترل (سالین) و موش‌های گروه نیکوتین تاثیری معنی‌دار بر بیان این ژن نداشت، اگرچه در هر دو گروه بیان این ژن را تا حدی افزایش داد (شکل ۱). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که نیکوتین اثری منفی بر عملکرد میتوکندری‌ها در سلول دارد و می‌تواند باعث ایجاد اثرات مضر استرس اکسیداتیو گردد و بر کارایی قلب اثری سو بگذارد. از آن سو، تمرین ورزشی با دستگاه تردمیل احتمالاً توانایی این را دارد که تأثیر منفی نیکوتین را کاهش دهد، اگرچه نه به اندازه‌ای که از نظر آماری معنادار باشد. بنابراین، می‌توان پیشنهاد داد که تمرین ورزشی با دستگاه تردمیل می‌تواند عملکرد میتوکندری‌های سلول‌های قلب را، از طریق افزایش نسبی عملکرد ژن PGC-1α، تا میزان زیادی بهبود ببخشد.

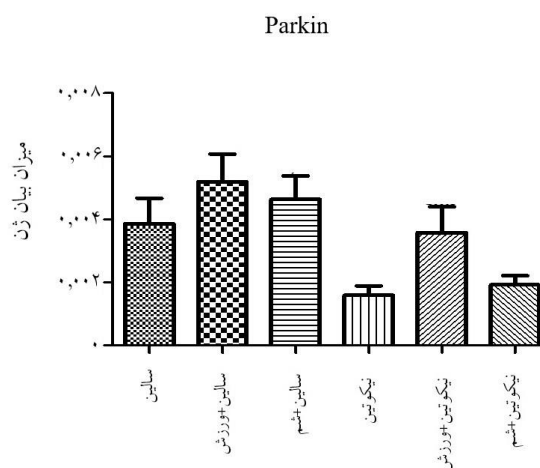
بحث

هدف از انجام این پژوهش ارزیابی تاثیر نیکوتین بر بیان ژن موثر بر بیویژن میتوکندری و استرس اکسیداتیو (PGC-1 α) و ژن‌های موثر بر میتوفاژی و پاکسازی سلول از میتوکندری‌های آسیب‌دیده و از کار افتاده (Parkin و PINK-1) بود. همچنین، در این پژوهش تاثیر تمرین کوتاه مدت استقامتی بر بیان ژن‌های مورد نظر و بر تغییرات بیان ژن ناشی از تزریق نیکوتین ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که نیکوتین باعث کاهش بیان ژن PGC-1 α می‌شود. تمرین کوتاه مدت استقامتی اثر نیکوتین بر PGC-1 α را به میزان اندکی که از نظر آماری معنی‌دار نبود، افزایش داد. همچنین، نیکوتین بیان ژن‌های دخیل در میتوفاژی، Parkin و PINK-1 را به میزان اندکی که از نظر آماری معنی‌دار نبود، کاهش داد. علاوه بر این، تمرین کوتاه مدت استقامتی اثر نیکوتین را بر این دو ژن به میزان اندکی که از نظر آماری معنی‌دار نبود، کاهش داد.

تاثیر نیکوتین بر بیان ژن PGC-1 α

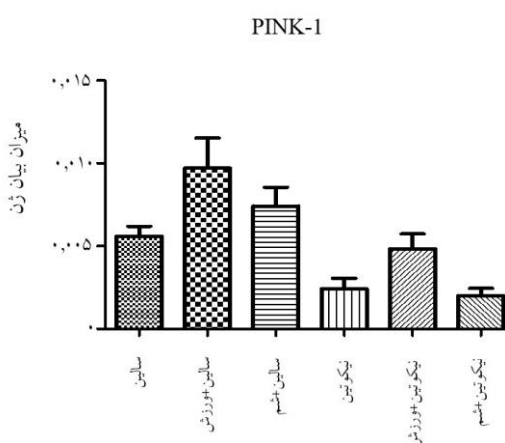
همان‌طور که گفتیم، PGC-1 α تنظیم‌کننده اصلی بیویژن میتوکندری است (۳۰). PGC-1 α یک فعال‌کننده رونویسی است که بر بسیاری از ژن‌های دخیل در تنظیم‌کردن متابولیسم و انرژی تاثیر می‌گذارد (۳۱). همچنین، این پروتئین یک رابطه مستقیم بین تحریک فیزیولوژیک خارجی و تنظیم بیویژن میتوکندری ایجاد می‌کند (۳۲). PGC-1 α توانایی تحریک فعالیت NRF-1 را دارد، که این اثر به نوبه خود، باعث تحریک فعالیت TFAM و ایجاد اثر آنتی‌اکسیدان می‌گردد (۶۱). این پروتئین بر فعالیت NRF-2 نیز تاثیر می‌گذارد، که این پروتئین هم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی موثر است (۶۲). تحریک PGC-1 α تجمع ROS در میتوکندری‌های کاردیوموسیت‌ها را کاهش می‌دهد و از این طریق باعث بهبود متابولیسم میتوکندری‌ها می‌شود (۶۳). در مدل نارسایی قلبی در موش‌های صحرایی، بیان ژن PGC-1 α کاهش می‌یابد، که این موضوع نشان‌دهنده آن است که تخریب بیویژن میتوکندری در کاردیوموسیت‌ها می‌تواند منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و در نهایت، نارسایی قلبی شود (۶۴). PGC-1 α در بافت‌هایی که همچون بافت میوکارد نیاز به انرژی زیادی دارند، یافت می‌شود و بر عملکرد آن‌ها تاثیر می‌گذارد (۳۳). این پروتئین نقشی منفی در تنظیم سیکل پیری سلول‌های قلب و عروق دارد (۳۴). بنابراین، به نظر می‌رسد نیکوتین با ایجاد اثری پرو-آپوپتوتیک، توسط سرکوب بیان ژن PGC-1 α منجر به تحریک استرس اکسیداتیو می‌گردد.

شد (شکل ۳). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که احتمال دارد نیکوتین در دوزهای بالاتر اثری سو بر این ژن بگذارد و از این طریق بر میتوفاژی تاثیر بگذارد. این اثر می‌تواند به ناکارآمدی سیستم عملکردی میتوکندری‌ها در سلول‌های بافت قلب منجر گردد. همچنین، تمرین کوتاه مدت استقامتی این توانایی بالقوه را دارد که اثر نیکوتین بر بیان PINK-1 را کاهش دهد و سیستم عملکردی میتوکندری‌های سلول‌های بافت قلب را تقویت کند.



شکل ۲

شکل ۲. بررسی اثر ورزش کوتاه مدت استقامتی بر بیان ژن Parkin ناشی از نیکوتین. حیوانات در ۶ گروه جداگانه سالیان (۱ میلی لیتر بر کیلوگرم)، نیکوتین (۰/۲۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم)، ورزش و یا ترکیب آنها را دریافت کردند.



شکل ۳

شکل ۳. بررسی اثر ورزش کوتاه مدت استقامتی بر بیان ژن PINK-1 ناشی از نیکوتین. حیوانات در ۶ گروه جداگانه سالیان (۱ میلی لیتر بر کیلوگرم)، نیکوتین (۰/۲۱ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم)، ورزش و یا ترکیب آنها را دریافت کردند.

تأثیر نیکوتین بر بیان ژن های PINK-1 و Parkin

علاوه بر این، به این نکته اشاره کردیم که PINK-1 تنظیم کننده اصلی میتوفاژی سلولی است (۱۴). این پروتئین در از میان بردن میتوکندری های آسیب دیده نیز نقش مهمی دارد (۱۵). کاهش میزان PINK-1 به دلیل کاهش میتوفاژی سلولی باعث افزایش و تجمع میتوکندری های آسیب دیده می شود (۱۶). PINK-1 با تحریک Parkin باعث می شود تا این پروتئین به میتوکندری بچسبد و پروسه میتوفاژی را اجرا کند (۱۷). Parkin پروتئینی است که در روند یوبیکیتیناسیون نقش دارد (۱۹). یوبیکیتیناسیون روندی است که در آن مولکول ها با یوبیکیتین نشان دار می گردند و برای از میان رفتن به لیزوزومها یا پروتئازومها منتقل می گردند (۲۰). این پروتئین با مهار آپوپتوز وابسته به میتوکندری و آپوپتوز غیروابسته به میتوکندری باعث القا مسیرهای نجات سلولی می گردد (۲۱). بنابراین، می توان گفت که PINK-1 و Parkin با یکدیگر همکاری می کنند تا از طریق القا اتوفاژی میتوکندری های آسیب دیده، شبکه میتوکندریایی سالمی را در سلول های بدن ایجاد کنند (۲۲). از سوی دیگر، تضعیف یا تخریب میتوفاژی در اختلالات و نارسایی های قلبی دیده می شود (۶۵، ۶۶). نقش PINK-1 در درمان آسیب ایسکمیک میوکاردا نیز به اثبات رسیده است (۲۸). PINK-1 نقش یک کیناز محافظت کننده قلب را بازی می کند (۶۷). پژوهشی دیگر نشان داده است که میتوفاژی ناشی از فعالیت Parkin عملکرد تخریب شده میوکاردا ناشی از اندوتوکسین را بهبود می بخشد (۶۸). PINK-1 آسیب قلبی ناشی از آنژیوتانسین-۲ را توسط کاهش نقص عملکرد میتوکندری بهبود می بخشد (۶۹). پژوهشی دیگر نشان داده است که عملکرد ناکافی Parkin باعث تقویت آسیب قلبی در موش ها می گردد و شانس زنده ماندن آن ها را به دنبال انفارکتوس میوکاردا کاهش می دهد (۷۰).

نتایج ما تأثیر معنی دار نیکوتین را نشان نداد، اما نیکوتین تا حدودی بر هر دو ژن اثری کاهشی داشت. به نظر می رسد نیکوتین در دوزهای بالاتر، بتواند کاملاً بیان این دو ژن را مهار کند. تاکنون تحقیقاتی در خصوص اثر نیکوتین بر این دو ژن مسئول در میتوفاژی و پاکسازی میتوکندری های آسیب دیده صورت نگرفته است، و نتایج پژوهش ما نیز تأییدی معنی دار را به اثبات نرسانیده است. اما می توان پیشنهاد داد که نیکوتین در دوزهای کمی بالاتر بتواند اثری منفی بر میتوفاژی بگذارد. همچنین، نیکوتین احتمالاً توانایی بر هم زدن سیستم پاکسازی میتوکندری های آسیب دیده در سلول ها را دارد.

در مورد اثرات تمرین کوتاه مدت استقامتی بر بیان ژن های مورد مطالعه همان طور که گفته شد، ورزش اثرات مثبت فیزیولوژیک و سایکولوژیک بسیاری بر بیمارانی دارد که از نارسایی قلبی رنج می برند (۷۱، ۷۲). ایروبیکیک به همراه تمرین استقامتی باعث بهبود عملکرد ماهیچه ای و کاهش ریسک ابتلا به بیماری های قلبی و عروقی می شود (۴۳). تمرین استقامتی پس از جراحی پیوند قلب می تواند باعث بالابردن بقای قلب پیوندی در فرد گیرنده گردد (۴۴). همچنین، ورزش با شدت متوسط عملکرد قلبی موش هایی با فشار خون بالا را بهبود می بخشد (۴۵). ورزش باعث بهبود انعطاف پذیری سلول های میوکاردا نیز می گردد (۴۷). ورزش باعث بالابردن بیوژنز و متابولیسم میتوکندری در ماهیچه ها می شود (۷۳، ۷۴). ورزش تعداد میتوکندری ها را افزایش می دهد و از بافت میوکاردا محافظت می کند (۵۰). ورزش باعث تعدیل پاسخ سلول های ماهیچه ای اسکلتی و قلبی به استرس اکسیداتیو می گردد (۴۵). همچنین، ورزش از طریق کاهش آسیب میتوکندری ها، از قلب در برابر ایسکمی میوکاردا محافظت می کند (۷۵). پژوهش گذشته نیز نشان داده است که هشت هفته تمرین ورزشی طیف وسیعی از میتوکندری های سالم را در بافت قلب پس از انفارکتوس ایجاد می کند (۷۶).

نتایج ما نشان داد که ورزش بیان ژن ها را تا حدی کم افزایش می دهد، هر چند از نظر آماری معنی دار نبود. به نظر می رسد تمرین استقامتی می تواند تأثیرات پرو-آپوپتوتیک و تحریک کننده ای استرس اکسیداتیو ناشی از نیکوتین را کاهش دهد. علاوه بر این، تمرین ورزشی طولانی مدت احتمالاً بتواند بر ژن های موثر بر میتوفاژی تأثیری معنی دار و مثبت بگذارد. به نظر می رسد نیکوتین با کاهش بیان ژن PGC-1 α و اخلاص در بیوژنز میتوکندری و متابولیسم اکسیداتیو، می تواند نقشی اساسی در بوجود آمدن اختلالات و نارسایی های قلبی داشته باشد. همچنین، احتمال این می رود که نیکوتین در دوزهای بالاتر با تأثیر منفی بر Parkin و PINK-1 مستقیماً بر میتوفاژی تأثیر بگذارد. از آن سو، ورزش می تواند آثار منفی نیکوتین را مهار کند و در بهبود متابولیسم سلول های ماهیچه ای قلب موثر باشد. همچنین، پیشنهاد می شود که تمرین سنگین تر و درازمدت، بتواند اثری معنادار و فزاینده بر بیان تمام ژن های موثر بر میتوفاژی و بیوژنز میتوکندری ایجاد کند و با تأثیرات مخرب نیکوتین بر سلول های بافت قلب مقابله کند.

REFERENCES

1. Goniewicz ML, Delijewski M. Nicotine vaccines to treat tobacco dependence. *Hum Vaccin Immunother* 2013; 9: 13-25.
2. Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009; 49: 57-71.
3. Korhonen T, Goodwin A, Miesmaa P, Dupuis EA, Kinnunen T. Smoking cessation program with exercise improves cardiovascular disease biomarkers in sedentary women. *J Womens Health (Larchmt)* 2011; 20: 1051-64.
4. Rigotti NA, Clair C. Managing tobacco use: the neglected cardiovascular disease risk factor. *Eur Heart J* 2013; 34: 3259-67.
5. Slotkin TA. Fetal nicotine or cocaine exposure: which one is worse? *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 931-45.
6. Xiao D, Xu Z, Huang X, Longo LD, Yang S, Zhang L. Prenatal gender-related nicotine exposure increases blood pressure response to angiotensin II in adult offspring. *Hypertension* 2008; 51: 1239-47.
7. D'Alessandro A, Boeckelmann I, Hammwhoner M, Goette A. Nicotine, cigarette smoking and cardiac arrhythmia: an overview. *Eur J Prev Cardiol* 2012; 19: 297-305.
8. Slotkin TA, Skavicus S, Card J, Stadler A, Levin ED, Seidler FJ. Developmental Neurotoxicity of Tobacco Smoke Directed Toward Cholinergic and Serotonergic Systems: More Than Just Nicotine. *Toxicol Sci* 2015; 147: 178-89.
9. Lee SY, Sirieix CM, Nattie E, Li A. Pre- and early postnatal nicotine exposure exacerbates autoresuscitation failure in serotonin-deficient rat neonates. *J Physiol* 2018; 596: 5977-91.
10. Bozkurt SB, Hakki SS. Nicotine suppresses proliferation and mineralized tissue-associated gene expressions of the cementoblasts. *J Periodontol* 2019; 91: 800-808.
11. Crotty Alexander LE, Drummond CA, Hepokoski M, Mathew D, Moshensky A, Willeford A, et al. Chronic inhalation of e-cigarette vapor containing nicotine disrupts airway barrier function and induces systemic inflammation and multiorgan fibrosis in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2018; 314: R834-47.
12. Xiao D, Wang L, Huang X, Li Y, Dasgupta C, Zhang L. Protective Effect of Antenatal Antioxidant on Nicotine-Induced Heart Ischemia-Sensitive Phenotype in Rat Offspring. *PLoS One* 2016; 11: e0150557.
13. Smith MA Jr, Zhang Y, Polli JR, Wu H, Zhang B, Xiao P, et al. Impacts of chronic low-level nicotine exposure on *Caenorhabditis elegans* reproduction: identification of novel gene targets. *Reprod Toxicol* 2013; 40: 69-75.
14. Walsh TG, van den Bosch MTJ, Lewis KE, Williams CM, Poole AW. Loss of the mitochondrial kinase PINK1 does not alter platelet function. *Sci Rep* 2018; 8: 14377.
15. Koehler CL, Perkins GA, Ellisman MH, Jones DL. Pink1 and Parkin regulate *Drosophila* intestinal stem cell proliferation during stress and aging. *J Cell Biol* 2017; 216: 2315-2327.
16. Zhan M, Brooks C, Liu F, Sun L, Dong Z. Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology. *Kidney Int* 2013; 83: 568-81.
17. Springer W, Kahle PJ. Regulation of PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Autophagy* 2011; 7: 266-78.
18. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 378-83.
19. Toyofuku T, Okamoto Y, Ishikawa T, Sasawatari S, Kumanogoh A. LRRK2 regulates endoplasmic reticulum-mitochondrial tethering through the PERK-mediated ubiquitination pathway. *EMBO J* 2019; e100875.
20. Passmore LA, Barford D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J* 2004; 379: 513-25.
21. Seirafi M, Kozlov G, Gehring K. Parkin structure and function. *FEBS J* 2015; 282: 2076-88.
22. Sekine S, Youle RJ. PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol. *BMC Biol* 2018; 16: 2.
23. Cahill TJ, Leo V, Kelly M, Stockenhuber A, Kennedy NW, Bao L, et al. Resistance of dynamin-related protein 1 oligomers to disassembly impairs mitophagy, resulting in myocardial inflammation and heart failure. *J Biol Chem* 2016; 291: 25762.
24. Wang B, Nie J, Wu L, Hu Y, Wen Z, Dong L, et al. AMPKalpha2 Protects Against the Development of Heart Failure by Enhancing Mitophagy via PINK1 Phosphorylation. *Circ Res* 2018; 122: 712-729.

25. Zhang P, Hu X, Xu X, Fassett J, Zhu G, Viollet B, et al. AMP activated protein kinase-alpha2 deficiency exacerbates pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *Hypertension* 2008; 52: 918-24.
26. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Autophagy in ischemic heart disease. *Circ Res* 2009; 104: 150-58.
27. Fan G, Chen MJ, Wei J. Involvement of phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1/Parkin-mediated autophagy in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in C57BL/6 mice. *J Int Med Res* 2020; 48: 300060519896143>
28. Chen J, Yu W, Ruan Z, Wang S. TUG1/miR-421/PINK1: A potential mechanism for treating myocardial ischemia-reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2019; 292: 197.
29. Zha Z, Wang J, Wang X, Lu M, Guo Y. Involvement of PINK1/Parkin-mediated mitophagy in AGE-induced cardiomyocyte aging. *Int J Cardiol* 2017; 227: 201-208.
30. Valero, T. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 5507-509.
31. Dorn GW 2nd, Vega RB, Kelly DP. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. *Genes Dev* 2015; 29: 51-91.
32. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 2002; 418: 797-801.
33. Ciszewski A, Sosnowski C, Beckowski M, Karwowski J. Occlusion of the left anterior descending coronary artery following a negative fractional flow reserve study. Failure or limit of a "gold standard" method? *Kardiologia Pol* 2016; 74: 83.
34. Hua J, Liu Z, Liu Z, An D, Lai W, Zhan Q, et al. Metformin Increases Cardiac Rupture After Myocardial Infarction via the AMPK-MTOR/PGC-1alpha Signaling Pathway in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Med Sci Monit* 2018; 24: 6989-7000.
35. Chang JS, Fernand V, Zhang Y, Shin J, Jun HJ, Joshi Y, et al. NT-PGC-1alpha protein is sufficient to link beta3-adrenergic receptor activation to transcriptional and physiological components of adaptive thermogenesis. *J Biol Chem* 2012; 287: 9100-11.
36. Kupr B, Handschin C. Complex Coordination of Cell Plasticity by a PGC-1alpha-controlled Transcriptional Network in Skeletal Muscle. *Front Physiol* 2015; 6: 325.
37. Schnyder S, Kupr B, Handschin C. Coregulator-mediated control of skeletal muscle plasticity - A mini-review. *Biochimie* 2017; 136: 49-54.
38. Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 615-22.
39. Chen M, Wang Y, Qu A. PGC-1 alpha accelerates cytosolic Ca²⁺ clearance without disturbing Ca²⁺ homeostasis in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 894-900.
40. Negrao CE, Middlekauff HR, Gomes-Santos IL, Antunes-Correa LM. Effects of exercise training on neurovascular control and skeletal myopathy in systolic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 308: H792-802.
41. Besnier F, Labrunee M, Pathak A, Pavy-Le Traon A, Gales C, Senard JM, et al. Exercise training-induced modification in autonomic nervous system: An update for cardiac patients. *Ann Phys Rehabil Med* 2017; 60: 27-35.
42. Sibilitz KL, Berg SK, Tang LH, Risom SS, Gluud C, Lindschou J, et al. Exercise-based cardiac rehabilitation for adults after heart valve surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 3: CD010876.
43. Balducci S, Leonetti F, Di Mario U, Fallucca F. Is a long-term aerobic plus resistance training program feasible for and effective on metabolic profiles in type 2 diabetic patients? *Diabetes Care* 2004; 27: 841-2.
44. Uchiyama M, Jin X, Yin E, Shimokawa T, Niimi M. Treadmill exercise induces murine cardiac allograft survival and generates regulatory T cell. *Transpl Int* 2015; 28: 352-62.
45. Mi C, Qin X, Hou Z, Gao F. Moderate-intensity exercise allows enhanced protection against oxidative stress-induced cardiac dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 2019; 52: e8009.
46. Cobb, D.B. and Gold, M.R. Treadmill exercise is good for the heart but not to prevent shocks. *Heart Rhythm* 2017; 14: 1440-41.
47. Hassaan PS, Nassar SZ, Issa Y, Zahran N. Irisin vs. Treadmill Exercise in Post Myocardial Infarction Cardiac Rehabilitation in Rats. *Arch Med Res* 2019; 50: 44-54.

48. Terada S, Kawanaka K, Goto M, Shimokawa T, Tabata I. Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1alpha protein expression in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2005; 184: 59-65.
49. Little JP, Safdar A, Bishop D, Tarnopolsky MA, Gibala MJ. An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1alpha and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300: R1303-10.
50. Ozturk N, Olgar Y, Er H, Kucuk M, Ozdemir S. Swimming exercise reverses aging-related contractile abnormalities of female heart by improving structural alterations. *Cardiol J* 2017; 24: 85-93.
51. Short KR. Changes of deleted mtDNA after endurance exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003; 90: 223; author reply 224-5.
52. Kim K, Ahn N, Jung S. Comparison of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial biogenesis responses after 12 weeks of treadmill running and ladder climbing exercises in the cardiac muscle of middle-aged obese rats. *Braz J Med Biol Res* 2018; 51: e7508.
53. Tam BT, Pei XM, Yung BY, Yip SP, Chan LW, Wong CS, et al. Autophagic Adaptations to Long-term Habitual Exercise in Cardiac Muscle. *Int J Sports Med* 2015; 36: 526-34.
54. Vettor R, Valerio A, Ragni M, Trevellin E, Granzotto M, Olivieri M, et al. Exercise training boosts eNOS-dependent mitochondrial biogenesis in mouse heart: role in adaptation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; 306: E519-28.
55. Vega RB, Konhilas JP, Kelly DP, Leinwand LA. Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Adaptation to Exercise. *Cell Metab* 2017; 25: 1012-1026.
56. Riehle C, Wende AR, Zhu Y, Oliveira KJ, Pereira RO, Jaishy BP, et al. Insulin receptor substrates are essential for the bioenergetic and hypertrophic response of the heart to exercise training. *Mol Cell Biol* 2014; 34: 3450-60.
57. Zhao D, Sun Y, Tan Y, Zhang Z, Hou Z, Gao C, et al. Short-Duration Swimming Exercise after Myocardial Infarction Attenuates Cardiac Dysfunction and Regulates Mitochondrial Quality Control in Aged Mice. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018:4079041.
58. Yuan Y, Pan SS. Parkin Mediates Mitophagy to Participate in Cardioprotection Induced by Late Exercise Preconditioning but Bnip3 Does Not. *J Cardiovasc Pharmacol* 2018; 71: 303-16.
59. Pascual MM, Pastor V, Bernabeu RO. Nicotine-conditioned place preference induced CREB phosphorylation and Fos expression in the adult rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* 2009; 207: 57-71.
60. Reza Zarrindast M, Eslimi Esfahani D, Oryan S, Nasehi M, Torabi Nami M. Effects of dopamine receptor agonist and antagonists on cholestasis-induced anxiolytic-like behaviors in rats. *Eur J Pharmacol* 2013; 702: 25-31.
61. Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1309-13.
62. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 2005; 1: 361-70.
63. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 2006; 127: 1109-22.
64. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 208-17.
65. Rolle IG, Crivellari I, Caragnano A, Cervellin C, Aleksova A, Cesselli D, et al. Cell Senescence in Cardiac Repair and Failure. *Curr Stem Cell Res Ther* 2020;15:685-695.
66. Durga Devi T, Babu M, Makinen P, Kaikkonen MU, Heinaniemi M, Laakso H, et al. Aggravated Postinfarct Heart Failure in Type 2 Diabetes Is Associated with Impaired Mitophagy and Exaggerated Inflammation. *Am J Pathol* 2017; 187: 2659-2673.
67. Siddall HK, Warrell CE, Davidson SM, Mocanu MM, Yellon DM. Mitochondrial PINK1--a novel cardioprotective kinase? *Cardiovasc Drugs Ther* 2008; 22: 507-8.
68. Essandoh K, Wang X, Huang W, Deng S, Gardner G, Mu X, et al. Tumor susceptibility gene 101 ameliorates endotoxin-induced cardiac dysfunction by enhancing Parkin-mediated mitophagy. *J Biol Chem* 2019; 294: 18057-68.
69. Xiong W, Hua J, Liu Z, Cai W, Bai Y, Zhan Q, et al. PTEN induced putative kinase 1 (PINK1) alleviates angiotensin II-induced cardiac injury by ameliorating mitochondrial dysfunction. *Int J Cardiol* 2018; 266: 198-205.

70. Kubli DA, Zhang X, Lee Y, Hanna RA, Quinsay MN, Nguyen CK, et al. Parkin protein deficiency exacerbates cardiac injury and reduces survival following myocardial infarction. *J Biol Chem* 2013; 288: 915-26.
71. Piepoli MF, Spoletini I, Rosano G. Monitoring functional capacity in heart failure. *Eur Heart J* 2019; 21: M9-12.
72. Tamargo M, Obokata M, Reddy YNV, Pislaru SV, Lin G, Egbe AC, et al. Functional mitral regurgitation and left atrial myopathy in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 2020;22:489-98.
73. Gan Z, Fu T, Kelly DP, Vega RB. Skeletal muscle mitochondrial remodeling in exercise and diseases. *Cell Res* 2018; 28: 969-80.
74. Hwang PS, Machek SB, Cardaci TD, Wilburn DT, Kim CS, Suezaki ES, et al. Effects of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Supplementation on Aerobic Exercise Performance and Indices of Mitochondrial Biogenesis in Untrained Men. *J Am Coll Nutr* 2019: 1-10.
75. Tao L, Bei Y, Lin S, Zhang H, Zhou Y, Jiang J, et al. Exercise Training Protects Against Acute Myocardial Infarction via Improving Myocardial Energy Metabolism and Mitochondrial Biogenesis. *Cell Physiol Biochem* 2015; 37: 162-75.
76. Campos JC, Queliconi BB, Bozi LHM, Bechara LRG, Dourado PMM, Andres AM, et al. Exercise reestablishes autophagic flux and mitochondrial quality control in heart failure. *Autophagy* 2017; 13: 1304-1317.