

**The effect of aerobic training and MitoQ supplementation on the gene expression of OPA1 and FIS1 in myocardial mitochondrial dynamic pathway in old male rats**

**Sadollah Salarmohammadi 1, Elham FarhadFar 2\*, Zahra Sarlak 3**

1. PhD. Student at Department of Sport Physiology, CT. C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Assistant professor at Department of Physical Education and sport Science, Dez. C., Islamic Azad University, Dezful, Iran.
3. Assistant professor at Department of Physical Education and Sport Sciences, Khod.C., Islamic Azad University, Khodabandeh, Iran.

\* Corresponding author: Elham Farhad Far, Department of Physical Education and Sports Sciences, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran, Email: elhamfarhadfar@gmail.com, phone number: 09122579849

**Abstract:**

**Background and Aim:** One of the problems in most countries of the world is the aging of the population and its consequences are in the occurrence of cardiac diseases. The aim of this study is to investigate the effect of endurance training and MitoQ supplementation on the mitochondrial dynamic signaling pathway (OPA1 and FIS1) in the heart tissue of old male rats. **Materials and Methods:** In this experimental study, 28 old male Wistar rats were randomly divided into 4 groups of seven rats: control, endurance training, MitoQ supplement and endurance training + MitoQ supplement. After acquainting the animals with the environment for 8 weeks, they performed endurance training for eight weeks (5 days a week) with 70% Vmax. Also, MitoQ supplementation was done at the rate of 250  $\mu\text{M}$  in drinking water for 8 weeks. Real-time PCR method was used to evaluate the variables. The statistical analysis of the data was performed using two-way ANOVA test with a significance level of less than 0.05. **Results:** Endurance training significantly reduced FIS1 gene expression in myocardial tissue ( $P = 0.006$ ). MitoQ increased the expression of OPA1 gene in the heart tissue of old rats ( $P = 0.04$ ), but it has no effect on the FIS1 gene expression ( $p = 0.006$ ). In addition, the combination of MitoQ and exercise training significantly decreased the gene expression of FIS1 and OPA1 compared to the MitoQ group ( $P=0.02$ ). **Conclusion:** MitoQ supplement as an advanced antioxidant can probably play a positive role in the mitochondrial dynamics of the aged cardiac muscle and affect the gene expression of the fusion process. However, the combination of endurance training and MitoQ can modulate the process of mitochondrial fusion and fission.

**Keywords:** Aerobic training, MitoQ supplement, myocardial tissue, mitochondrial biogenesis



اثر تمرین هوازی و مکمل‌دهی مایتوکویو (MitoQ) بر بیان ژن‌های OPA1 و FIS1 در گریز در مسیر

دینامیک میتوکندریایی بافت میوکارد رت‌های نر پیر

سعد الله سالارمحمدی<sup>۱</sup>، الهام فرهاد فر<sup>۲\*</sup>، زهرا سرلک<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

۳. استادیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد خدابنده، دانشگاه آزاد اسلامی، خدابنده، ایران.

#### چکیده:

زمینه و هدف: یکی از مشکلات در بیشتر کشورهای جهان، مسئله پیری جمعیت و پیامدهای ناشی از آن در بروز بیماری‌های قلبی است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر تمرین هوازی و مکمل‌دهی مایتوکویو بر عوامل درگیر در مسیر سیگنالینگ دینامیک میتوکندریایی شامل آتروفی ایتیک-1 (OPA1) و پروتئین فیژن میتوکندریایی (FIS1) در بافت قلب موش‌های پیر نر است. روش تحقیق: در مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۲۸ سر موش صحرایی نر پیر نژاد ویستار به صورت تصادفی در چهار گروه هفت‌تایی شامل کنترل، تمرین هوازی، مکمل مایتوکویو، و تمرین هوازی+مکمل مایتوکویو تقسیم شدند. حیوانات پس از آشناسازی با محیط به مدت هشت هفته (پنج روز در هفته) تمرین هوازی با شدت ۷۰ درصد سرعت بیشینه را انجام دادند. مکمل‌دهی مایتوکویو به مدت هشت هفته به صورت محلول در آب خوراکی با غلظت ۲۵۰ میکرومولار انجام شد. برای ارزیابی متغیرها در بافت قلب از روش Real-time PCR استفاده گردید. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از آزمون آنوای دو راهه و آزمون تعقیبی توکی و سطح معنی داری  $p < 0.05$  انجام گردید. یافته‌ها: تمرین هوازی به طور معنی داری میزان بیان ژن FIS1 را در بافت میوکارد کاهش داد ( $p = 0.006$ ). مایتوکویو میزان بیان ژن OPA1 را در بافت قلب موش‌های پیر را افزایش داد ( $p = 0.004$ ) اما بر بیان ژن FIS1 تاثیر معنی داری نداشت ( $p = 0.06$ ) و از طرفی، ترکیب مایتوکویو و تمرین، بیان ژن دو متغیر FIS1 و OPA1 را نسبت به گروه مایتوکویو به طور معنی داری کاهش داد ( $p = 0.02$ ). نتیجه‌گیری: مکمل مایتوکویو در نقش یک آنتی‌اکسیدان پیشرفته احتمالی می‌تواند در دینامیک میتوکندریایی عضله قلبی پیر نقش داشته باشد و بیان ژن فرآیند همجوشی را بهبود می‌بخشد. با این حال، ترکیب تمرین هوازی و مایتوکویو می‌تواند فرآیند همجوشی و شکافت میتوکندریایی را تعدیل کند.

واژه‌های کلیدی: تمرین هوازی، مکمل مایتوکویو، بافت میوکارد، بیوژنز میتوکندری

\* نویسنده مسئول مقاله: دکتر الهام فرهادفر، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران -



## مقدمه

پیری در انسان یک فرآیند پیچیده است که با کاهش عملکرد وابسته به زمان همراه است و در نتیجه منجر به کاهش کیفیت زندگی می‌شود (۱). سالمندی یک بار اجتماعی-اقتصادی جهانی و یک چالش مهم مراقبت‌های بهداشتی خواهد بود (۲). از طرفی، بیماری‌های قلبی-عروقی و نرخ مرگ و میر ناشی از آن در جمعیت سالخورده بیشتر است و پیری یکی از عوامل خطر اصلی در بروز بیماری‌های قلبی-عروقی است. با افزایش سن، هایپرتروفی پاتولوژیک، افزایش فیبروز بطن چپ و کاهش ظرفیت تمرینی رخ می‌دهد که متعاقباً میزان نرخ بیماری‌های قلبی-عروقی را افزایش می‌دهند (۳-۶).

میان عوامل مختلف ایجاد کننده پیری، مهمترین آنها استرس اکسیداتیو و التهاب است. در این راستا، میتوکندری‌ها منبع مهمی از گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در داخل سلول‌ها هستند. ROS نه تنها باعث ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری می‌شود، بلکه به ماکرومولکول‌های سلولی مانند لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک نیز حمله می‌کند. تجمع متعاقب تغییرات مضر در سلول‌ها و بافت‌ها باعث ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی مرتبط با سن می‌شود (۷، ۸). افزایش استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیری قلب ایفا می‌کند و تولید ROS مکانسیم بسیار مهمی در حفظ فرآیندهای فیزیولوژیکی است. با این حال، عدم تعادل بین تولید ROS و دفاع آنتی اکسیدانی می‌تواند منجر به انباشت رادیکال‌های آزاد شود و به دنبال آن مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با هایپرتروفی قلبی، فیبروز و التهاب شود.

در این بین، فرآیندهای درگیر در پویایی میتوکندری، از جمله شکافت و همجوشی، برای حفظ عملکرد میتوکندری ضروری است. دینامیک میتوکندری، از جمله شکافت (فیژن) و همجوشی (فیوژن) میتوکندری، توسط گوانوزین تری فسفاتازها (GTPase) در خانواده داینامین تنظیم می‌شود (۹-۱۱). پروتئین‌های موجود در غشای خارجی میتوکندری، Mitofusin 1/2 (Mfn1/2)، و غشای میتوکندری داخلی، آتروفی اپتیک-۱ (Opa<sup>1</sup>)، همجوشی میتوکندری را تسهیل می‌کنند، در حالی که پروتئین مرتبط با Dynamin 1 (Drp1) به پروتئین‌های گیرنده خود متصل می‌شود. غشای خارجی میتوکندری، از جمله پروتئین شکافت میتوکندری ۱ (MTFP1)<sup>۱</sup>، (MFF)<sup>۲</sup> و (Fis1) شامل می‌شود (۱۲).

مکمل مایتوکیو (MitoQ) یک مکمل آنتی اکسیدانی پیشرفته است که از یک تری فنیل فسفونیوم (TPP<sup>+</sup>) و کوآنزیم Q10 تشکیل شده است و میزان انباشت آن در داخل میتوکندری ۷۰۰ تا ۸۰۰ برابر بیشتر از مکمل Q10 است. MitoQ به دلیل ظرفیت

1 Reactive Oxygen Species

2 fission 1

3 Fusion

4 Guanosine triphosphate

5 Optic atrophy

6 Dynamin-related protein

7 Mitochondrial fission process protein 1

8 Mitochondrial fission factor

9 Ubiquinone mesylate



آنتی اکسیدانی بالای خود (۱۳)، نقش محافظتی در بیماری های مختلف مانند بیماری های عصبی، بیماری کلیوی دیابتی ایفا می کند (۱۴). مطالعات نشان می دهد که MitoQ عملکرد میتوکندری و تولید ROS را تغییر می دهد (۱۵). همچنین برای این مکمل نقش های ضد پیری نیز تعریف شده است. بنابراین، تعیین اینکه آیا مکمل آنتی اکسیدانی هدفمند میتوکندری می تواند عملکرد میتوکندری بافت و سطوح ROS را تغییر دهد، مهم است. قبلاً نشان داده شده است که مکمل MitoQ باعث کاهش افزایش آسیب محتوای DNA میتوکندری (mtDNA<sup>1</sup>) ناشی از ورزش در عضله اسکلتی انسان می شود (۱۶).

با افزایش سن و پیشی گرفتن تولید ROS در عضله قلبی نسبت به ظرفیت آنتی اکسیدانی، اختلال در سنتز پروتئین ها و متعاقباً کاهش کیفیت میتوکندریایی رخ می دهد و می تواند منجر به کاهش توده عضله اسکلتی و قلبی شود که می تواند ناشی از عدم انجام فعالیت ورزشی باشد (۱۷). فعالیت بدنی از دیرباز نقش مهمی در پیشگیری از بیماری های قلبی-عروقی و همچنین حفظ سلامتی و ارتقا کیفیت زندگی در افراد مسن داشته است (۱۸). پژوهش ها نشان می دهد که حتی یک تا دو جلسه تمرین ورزشی در هفته می تواند طول عمر افراد را افزایش دهد و مشخص شده است سالمندانی که در طول زندگی خود از نظر فیزیکی فعال بوده اند، در مقایسه با افراد مسن غیرفعال، دارای سطوح بالاتری از سلامت متابولیک هستند (۱۹). تمرینات ورزشی منظم در سطح متوسط، ظرفیت آنتی اکسیدانی را تقویت کرده و در پیشگیری از آسیب اکسیداتیو به طور معنی داری مؤثر است (۲۰). در آخرین و تنها تحقیق انجام شده در زمینه اثر مکمل مایتوکیو و تمرین هوازی بر بافت قلب، محققان نشان دادند که تمرین هوازی و مکمل مایتوکیو می توانند اثرات مثبتی بر بهبود بیان AMPK<sup>2</sup> به عنوان سنسور انرژی سلول قلب و سسترین-۲<sup>3</sup> به عنوان یک فاکتور ضد پیری داشته باشند و همچنین مکمل مایتوکیو می تواند میزان فعالیت آنزیمی گلووتاتیون پروکسیداز (GPX<sup>4</sup>) را عنوان یک شاخص آنتی اکسیدانی بهبود ببخشد (۱۷).

با این حال درک بیشتر از مسیر های سیگنالینگ مرتبط با میتوکندری در عضله قلبی به عنوان یک هدف درمانی برای کاهش آسیب بافت قلب به دنبال افزایش سن ضروری است و مطالعات بیشتری برای بررسی نقش عوامل درگیر در دینامیک میتوکندریایی که منجر به پاسخ محافظتی قلب می شوند لازم است. از طرفی، تمرینات هوازی می توانند اثرات مثبتی بر بیان ژن های درگیر در فرآیند فیژن-فیوژن میتوکندریایی داشته باشند و همچنین مکمل مایتوکیو به عنوان یک مکمل ضد پیری معرفی شده است که می تواند یکی از آنتی اکسیدان های مؤثر بر جلوگیری از پیشروی فرآیند پیری باشد. از آنجایی که تاکنون پژوهشی در مورد اثر تمرین هوازی و مکمل مایتوکیو بر دینامیک میتوکندریایی در عضله قلبی موش های پیر انجام نشده است. در تحقیق حاضر به دنبال، بررسی اثر ۸ هفته تمرین هوازی و مصرف مکمل آنتی اکسیدانی مایتوکیو بر فرآیند دینامیک میتوکندریایی در بافت قلب موش های نر پیر هستیم و همچنین به بررسی هم زمان اثر تمرینات هوازی و مصرف مکمل بر عوامل درگیر می پردازیم.

<sup>1</sup> Mitochondrial DNA

<sup>2</sup> Adenosine monophosphate-activated protein kinase

<sup>3</sup> Sestrin-2

<sup>4</sup> Glutathione peroxidase



## روش تحقیق

نمونه‌ها و محیط پژوهش: در مطالعه تجربی حاضر، ۲۸ سر موش صحرایی پیر نر نژاد ویستار (۲۲±۱ ماه؛ ۴۰±۱۵ گرم) از مرکز تحقیقات فیزیولوژی کرمان خریداری و در دمای ۲۲±۲ درجه سانتی گراد و در چرخه نور تاریک ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند و وزن موش‌ها سه روز در هفته ثبت گردید. پس از یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، حیوانات به طور تصادفی در چهار گروه (هر گروه هفت سر موش) کنترل، تمرین هوازی، مکمل مایتوکسیو و تمرین هوازی + مکمل مایتوکسیو تقسیم شدند. طرح حاضر دارای کد اخلاق به شماره IR-KHU.KRC.1000.250 از کمیته اخلاق پژوهشکده علوم حرکتی است.

نحوه اجرای برنامه تمرینی: در طی مرحله آشنایی، موش‌ها به مدت دو هفته روی نوارگردان با سرعت ۱۵ متر در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه دویدند. برای محاسبه حداکثر اکسیژن مصرفی ( $VO_{2max}$ )،  $V_{max}$  را اندازه گیری شد. در ابتدا، از موش‌ها یک آزمون فزاینده برای به دست آوردن  $V_{max}$  گرفته شد. آزمون فزاینده با گرم کردن ۱۰ متر در دقیقه آغاز شد که به تدریج (سه متر در دقیقه) تا زمان خستگی افزایش یافت. پس از پایان آزمون، سطوح لاکتات با استفاده از لاکتومتر اندازه گیری شد (شرکت لاکتات اسکات، کد ۳۷، ساخت آلمان) و مقادیر بالای شش میلی مول بر لیتر، شدت بالا در نظر گرفته شد. سپس  $VO_{2max}$  محاسبه شد. تمرین هوازی بر اساس جدول ۱ انجام شد و با توجه به رابطه بین حداکثر اکسیژن مصرفی محاسبه شده و سرعت نوارگردان، شدت متناسب با برنامه تمرینی با تنظیم سرعت نوارگردان تنظیم شد. گروه‌های کنترل و مکمل مایتوکسیو در طول پروتکل تمرین نکردند و هر جلسه برای القای استرس روی نوارگردان قرار گرفتند (۱۷).

جدول ۱. جزئیات برنامه تمرینی اجرا شده

پروتکل تمرینی	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم
شدت تمرین (درصد سرعت بیشینه)	۳۰	۴۰	۴۵	۵۰	۶۰	۷۰	۷۰	۷۰
زمان (دقیقه)	۱۰	۱۵	۱۸	۲۰	۲۲	۲۵	۳۰	۳۰

<sup>1</sup> Maximum Velocity

<sup>2</sup> Lactate Scout Company/Code: 37, Germany



**نحوه مکمل دهی ماتیوکیو:** مکمل مایتوکیو با خلوص بالای ۹۹ درصد از شرکت مایتوکیو در کشور نیوزلند خریداری شد (B18050، آوکلند، نیوزلند) و سپس از طریق شرکت بوتیا طب کریمان وارد ایران شد. این مکمل طبق دستور العمل شرکت سازنده با دوز ۲۵۰ میکرومولار به صورت محلول در آب خوراکی (آب خوری) به مدت ۸ هفته به موش‌ها داده شد (۱۷).

**نحوه استخراج بافت:** ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، نمونه‌های بافت قلب استخراج شد. برای جمع‌آوری نمونه‌ها، ابتدا حیوانات با زایل‌زین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و کتامین (۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند و عضله قلب برداشته شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و برای اندازه‌گیری‌های بیشتر به فریزر ۸۰- منتقل گردید (۱۷).

**روش سنجش بیان ژن:** استخراج RNA تام توسط کیت ستونی<sup>۲</sup> طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (سیناپپور، شماره کیت: ۶۰۳۱). ابتدا، ۲۰ میلی‌گرم از بافت قلب برای استخراج RNA هموزن و طبق دستورالعمل کیت RNA تام استخراج شد. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول حاصل در دور ۱۲۰۰۰ جی به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با بافر کیت مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ جی سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا گردید. بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با بافر شست و شو مخلوط و سپس سانتریفیوژ شد. نیوب جاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰ لاند آب مقطر حل گردید. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانودارپ سنجیده و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به‌عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از یک میکروگرم از RNA و با استفاده از پرایمر تصادفی هگزامر<sup>۳</sup> و آنزیم ترانسکریپتاز برگشتی<sup>۴</sup> انجام گرفت. برای سنتز cDNA، از ۱۰۰ نانوگرم RNA تام و کیت سنتز cDNA شرکت پارس توس (پارس توس، شماره کیت: ۱۰۱۱۶۱) استفاده شد. Real-time PCR توسط مسترمیکس‌های راکس انجام شد (امپلیکون، دانمارک<sup>۵</sup>) و واکنش PCR همچنین حاوی پرایمرهای فوروارد و معکوس، آب استریل و ۱۰۰ نانوگرم cDNA بود. Real-time PCR با دستگاه استپ وان پلاس شرکت ABI آمریکا انجام شد. واکنش حرارتی به شرح زیر بود: مرحله ۱: دناتوراسیون، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله ۲: ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و در نهایت، آنالیز منحنی مذاب انجام شد. از ۶۰ درجه سانتی‌گراد شروع شد و ۰,۳ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. پرایمرها از شرکت متابوین (Metabion، آلمان) خریداری شد (جدول ۲). در نهایت، سطح بیان ژن با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  تعیین شد و 18S به عنوان ژن مرجع استفاده شد (۱۷).

جدول ۲. توالی پرایمرها

ژن	پرایمر رفت	پرایمر برگشت
----	------------	--------------

<sup>1</sup> Auckland, New Zealand

<sup>2</sup> tRNA Mini-Preps Super Kit

<sup>3</sup> Random hexamer primer

<sup>4</sup> Reverse transcriptase

<sup>5</sup> Amligon, Denmark



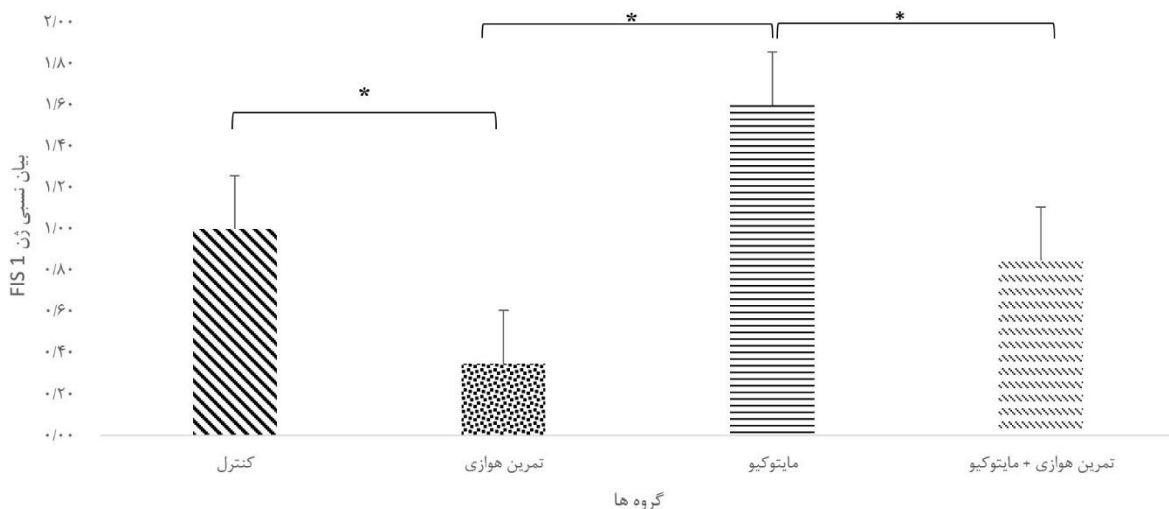


FIS1	TGAAGCCAGAGAACGTGTTG	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT
OPA1	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT	TGAAGCCAGAGAACGTGTTG
18S	GAGGTGAAATTCTTGGACCGG	CGAACCTCCGACTTTCGTTCT

**روش های تحلیل آماری:** در پژوهش حاضر داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد گزارش شدند و بعد از بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنف، از آنالیز آماری واریانس دو راهه و آزمون تعقیبی توکی جهت مقایسه بیان ژن‌ها در گروه‌های پژوهش استفاده شد. برای آنالیزها داده‌ها از نرم افزار گراف پد پریزم و در سطح معنی داری  $p$  کمتر از ۵ صدم استفاده شد.

### یافته‌ها

شکل ۱ نشان دهنده بیان ژن FIS1 در بافت قلب موش‌های نر پیر است. نتایج تحلیل واریانس دوطرفه نشان می‌دهد که تعامل متقابل معنی داری بین تمرین هوازی و مکمل وجود ندارد ( $F[۱,۲۴]=۰/۰۰۱$ ،  $p=۰/۰۹$ ) اما اثر معنی داری برای تمرین هوازی ( $F[۱,۲۴]=۲۶/۲۹$ ،  $p<۰/۰۰۰۱$ ) و اثر معنی دار برای مکمل مایتوکیو ( $F[۱,۲۴]=۱۲/۷۴$ ،  $p=۰/۰۰۱$ ) در مورد بیان ژن FIS1 مشاهده شد. نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که تمرین هوازی به طور معنی داری میزان بیان ژن FIS1 را در عضله قلبی نسبت به گروه کنترل کاهش داد ( $p=۰/۰۰۶$ ). همچنین ترکیب تمرین هوازی و مکمل مایتوکیو منجر به کاهش معنی دار بیان ژن هدف در عضله قلبی نسبت به گروه کنترل مایتوکیو شد ( $p=۰/۰۰۷$ ) ترکیب مایتوکیو و تمرین، بیان ژن دو متغیر FIS1 و OPA1 را نسبت به گروه مایتوکیو به طور معنی داری کاهش داد ( $p=۰/۰۲$ ).



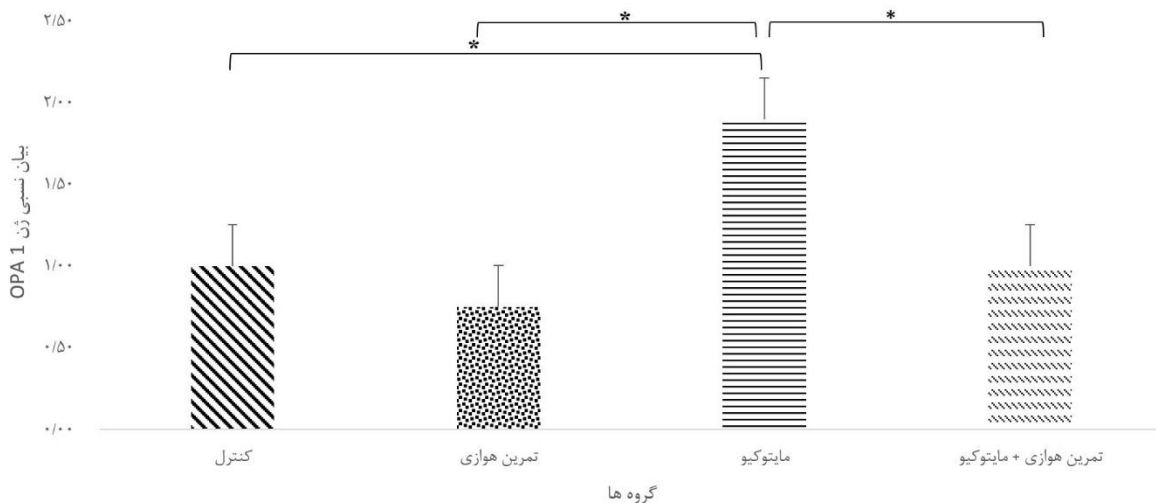
<sup>1</sup> Kolmogrov-Smirnov

<sup>2</sup> Tukey



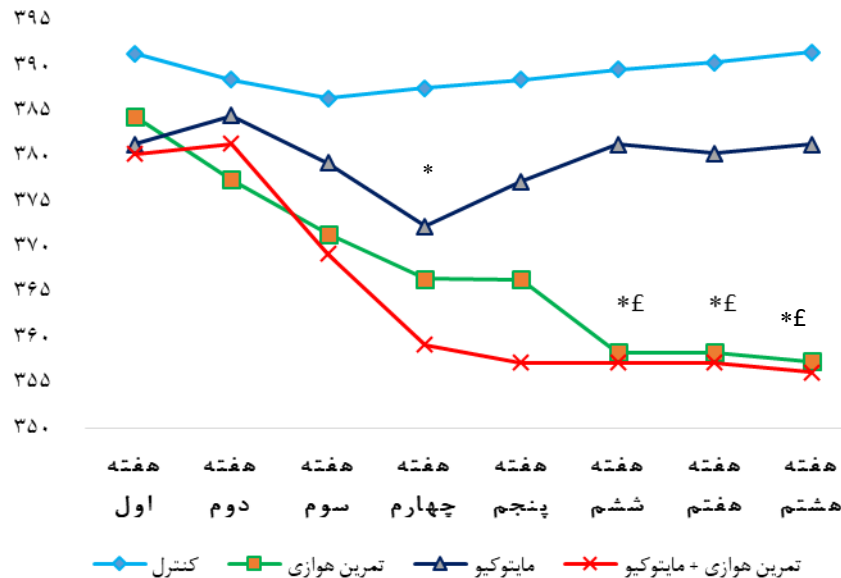
شکل ۱. مقایسه اثر تمرین هوازی و مکمل دهی مایتوکیو بر بیان نسبی ژن FIS1 در عضله قلب موش های مسن. FIS1: Fission 1. \* نشانه تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل، † نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه تمرین هوازی، ‡ نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه مایتوکیو؛ سطح معنی داری  $P \leq 0.05$ .

شکل ۲ نشان دهنده میزان بیان ژن OPA1 در عضله قلبی موش های نر پیر است. نتایج تحلیل واریانس دوطرفه نشان می دهد که تعامل متقابل معنی داری بین تمرین هوازی و مکمل وجود ندارد ( $F[1,24]=1/29, p=0/26$ ) اما اثر معنی داری بین تمرین هوازی ( $F[1,24]=9/87, p=0/004$ ) و مکمل مایتوکیو ( $F[1,24]=1/67, p=0/008$ ) در بیان ژن FIS1 وجود دارد. نتایج نشان می دهد که مکمل مایتوکیو به طور معنی داری میزان بیان ژن OPA1 را در عضله قلبی نسبت به گروه کنترل افزایش داد ( $p=0/04$ ). همچنین ترکیب تمرین هوازی و مکمل مایتوکیو منجر به کاهش معنی دار بیان ژن هدف در عضله قلبی نسبت به گروه کنترل مایتوکیو شد ( $p=0/02$ ).



شکل ۲. مقایسه اثر تمرین هوازی و مکمل دهی مایتوکیو بر بیان نسبی ژن OPA1 در عضله قلب موش های مسن. OPA1: Optic atrophy 1. \* نشانه تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل، † نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه تمرین هوازی، ‡ نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه مایتوکیو؛ سطح معنی داری  $P \leq 0.05$ .





شکل ۳. مقایسه تأثیر تمرینات هوازی و مکمل دهی مایتوکیو بر وزن موش‌های مسن در طول هشت هفته. \* نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل،  $\mathcal{F}$  نشانه تفاوت معنی‌دار نسبت به هفته اول؛ سطح معنی داری  $P \leq 0/05$ .

شکل ۳ نشان دهنده وزن موش‌ها طی ۸ هفته است. وزن موش‌ها پس از هفته ششم در پاسخ به تمرین هوازی به تنهایی و همراه با مکمل مایتوکیو به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P < 0/001$ ). همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، بیشترین کاهش وزن در گروه‌های تمرین هوازی و تمرین هوازی + مایتوکیو در هفته‌های ششم، هفتم و هشتم رخ داد ( $P < 0/05$ ).

### بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که بعد از هشت هفته مکمل دهی مایتوکیو، بیان ژن OPA1 که در فرآیند فیوژن درگیر است در بافت قلب موش‌های پیر به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت اما بیان ژن FIS1 با توجه به ترند افزایشی، تفاوت معنی‌داری را از نظر آماری نشان نداد. پدیده همجوشی و شکافت به فرآیندهای کنترل کیفیت میتوکندری، از جمله بیوژنز میتوکندری و میتوفاژی کمک می‌کنند (۲۱). فرآیند شکافت، میتوکندری‌های آسیب دیده را برای میتوفاژی آماده می‌کند و سپس میتوکندری‌ها با میتوکندری‌های جدید جایگزین می‌شوند. Drp1، عضوی از خانواده بزرگ GTPase و آداپتورهای مربوط به آن در میتوکندری، اجزای اصلی شکافت میتوکندری هستند. پس از تغییرات پس از ترجمه در Drp1، از سیتوزول به غشای خارجی میتوکندری منتقل می‌شود، جایی که به پروتئین آداپتور شکافت میتوکندری (FIS1) متصل می‌شود و سپس، فرآیند شکافت میتوکندری آغاز می‌شود. پروتئین‌ها اجزای آسیب دیده میتوکندری که توسط شکافت از هم جدا شده‌اند در نهایت با میتوفاژی از بین می‌روند (۲۲). افزایش سن به طور قابل توجهی اثر بخشی مداخلات حفاظتی قلبی را کاهش می‌دهد، که به تغییرات درون سلولی منفی متعدد نسبت داده می‌شود. در این بین، تجویز ترکیبی از آنتی‌اکسیدان‌ها که به طور خاص میتوکندری را هدف قرار می‌دهد بسیار توصیه می‌شود (۲۳، ۲۴). از این رو، افزایش قدرت مداخله‌های درمانی در شرایط پیری



ضروری می شود (۲۵). علاوه بر این، مایتوکسیو از آسیب فرآیند دینامیک میتوکندری جلوگیری می کند، گردش میتوکندری را با افزایش اتوفاژی (میتوفاژی) و بیوژنز میتوکندری افزایش می دهد (۲۶، ۲۷)، که در تحقیق حاضر نیز نتایج مشابه به دست آمد و مکمل مایتوکسیو منجر به افزایش بیان ژن درگیر در فرآیند فیوژن میتوکندریایی شده است که نشان دهنده همراستا بودن تحقیق حاضر با سایر تحقیقات بوده است، با این تفاوت که در بافت قلب پیر منجر به این اثر بخشی شده است. همچنین، در مدل موش با فشار خون بالا، مایتوکسیو عملکرد انقباضی قلب و یکپارچگی شبکه میتوکندری را بهبود بخشید (۲۸). در مدل حیوانی ایسکمی-ریپرفیوژن، مایتوکسیو عملکرد میتوکندری و قلب را با کاهش ROS حفظ کرد (۲۹). مطالعه ای همچنین نشان داد که مایتوکسیو عملکرد قلب را بهبود می بخشد و فیبروز، آسیب قلبی و التهاب را احتمالاً با بهبود تغییرات در سطوح MFN2، Fis-1 و PINK-1 کاهش می دهد (۳۰). نشان داده شده است که تعادل بین شکافت و همجوشی یک جنبه حیاتی برای حفظ عملکرد قلب است (۳۱). با این حال، نتایج مطالعات مختلف مشابه نیستند. تحقیقات در زمینه کشت سلول نشان می دهند که مایتوکسیو هیچ اثری بر عملکرد میتوکندری مانند تولید ATP، پتانسیل غشا و یا تولید ROS ندارد، اما می تواند از آسیب اکسیداتیو میتوکندری تحت شرایط استرس اکسیداتیو جلوگیری کند که ممکن است به شرایط مختلف فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی و نوع بافت مربوط باشد (۳۲) و باید در این زمینه تحقیقات بیشتری چه در زمینه کشت سلولی و حیوانی انجام شود.

علاوه بر این، روند پیری با افزایش چربی بدن مشخص می شود (۳۳). یک تحقیق نشان داد که مایتوکسیو بر وزن بدن در افراد مبتلا به فشار خون تأثیری نداشته است (۳۴) و به موازات این پژوهش، در تحقیق حاضر نیز کاهش معنی داری در وزن موش‌های مسن در مقایسه با گروه کنترل (به جز در هفته چهارم) مشاهده نشد. علاوه بر این، نشان داده شده است که تمرینات ورزشی هوازی باعث کاهش وزن بدن و توده چربی در موش‌ها با افزایش توانایی آنها در اکسید کردن اسیدهای چرب می‌شود (۳۵). در مطالعه حاضر نیز تمرینات هوازی منجر به کاهش وزن بدن در گروه‌های تمرینی در طول پروتکل شد که احتمالاً به دلیل کاهش توده چربی بوده است. البته باید در نظر داشت که کاهش وزن بدن در موش‌هایی که مکمل مایتوکسیو و تمرین هوازی دریافت کرده بودند با شیب بیشتری در هفته چهارم رخ داده است و در هفته ششم، هفتم و هشتم کاهش در وزن بدن موش‌ها به طور یکسانی اتفاق افتاده است.

در تحقیق حاضر، تمرین هوازی به همراه مکمل مایتوکسیو در مقایسه با گروهی که فقط مکمل مایتوکسیو مصرف کرده بودند، کاهش معنی داری در بیان ژن های FIS1 و OPA1 در بافت قلب را نشان داد که احتمالاً نشان دهنده اثر تعدیلی تمرین هوازی بر دینامیک میتوکندری است و به نحوی تمرین ورزشی سعی در تعدیل کردن اثرات مایتوکسیو بر میتوکندری دارد و همچنین احتمالاً با افزایش سطوح ROS حین انجام تمرینات ورزشی، مقداری از اثرات مکمل مایتوکسیو در جهت تعدیل استرس های اکسیداتیو مصرف می شود و اثرات آن در جهت افزایش فیوژن و فیوژن کاهش می یابد. با این حال، هنوز مکانسیم دقیق برای این اثر گزارش نشده است و به نوعی بررسی هر چه بیشتر استرس های اکسیداتیو به موازات بررسی دو فرآیند فیوژن و فیوژن می تواند دید روشن تری را از فرآیند رخ داده در این قسمت فراهم کند. تحقیقات نشان می دهد که افزودن مایتوکسیو به پروتکل تمرین ورزشی، تأثیر تمرین ورزشی را بر سطوح MFN2، Fis-1 و PINK-1 که در فرآیندهای همجوشی، شکافت و میتوفاژی نقش دارند، تقویت می کند (۳۰). مطالعه دیگری روی نمونه ای انسانی نشان داد که ترکیب تمرین و مایتوکسیو اثرات افزایشی بر شاخص های عملکرد قلب دارد

و فشار خون را در بیماران مبتلا به فشار خون کاهش می‌دهد (۳۶). یافته‌ها همچنین نشان می‌دهد که تمرین تعادل اکسیدان/آنتی اکسیدان را بهبود می‌بخشد. علاوه بر این، تمرین ورزشی احتمالاً اختلال عملکرد میتوکندری را با کاهش سطح FIS-1 بهبود می‌بخشد و سطوح بالاتر FIS-1 می‌تواند اتوفاژی (۳۷)، آزادسازی سیتوکروم C، آپوپتوز و انتشار  $Ca^{++}$  از ذخایر کلسیم ER را تحریک کند و از همجوشی GTPase، MFN1/2 و Opa1 (۳۸، ۳۹) جلوگیری کند. ورزش باعث کاهش سطح پروتئین FIS1 می‌شود که احتمالاً اثرات ثانویه به بهبود ساختار و عملکرد میتوکندری است. از محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌توان به عدم اندازه‌گیری تعداد بیشتری از ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در فرآیند فیژن و فیوژن اشاره کرد و همزمان بررسی سطوح آنتی اکسیدان‌ها نیز می‌توانست دیدار روشن‌تری از اثرات تمرین و مکمل فراهم کند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مکمل آنتی اکسیدانی مایتوکیو می‌تواند فرآیند فیژن میتوکندریایی را تحت تاثیر قرار دهد و از این طریق، دینامیک میتوکندری را در بافت قلب موش‌های پیر تغییر دهد. در این بین، تمرینات هوازی همراه با مصرف این مکمل می‌توانند اثرات تعدیلی بر این فرآیند داشته باشند که احتمالاً می‌تواند مرتبط با استرس اکسیداتیوی باشد که به دنبال انجام تمرینات ورزشی رخ می‌دهد و به نوعی تمرینات ورزشی می‌توانند تعدیل‌کننده اثرات این مکمل بر فرآیند فیژن و فیوژن میتوکندریایی در بافت قلب باشند. مصرف مکمل مایتوکیو و تمرین هوازی احتمالاً اثرات مثبتی بر دینامیک میتوکندریایی دارد اما باید تحقیقات بیشتری بر مکانیسم اثر مکمل مایتوکیو با هدف سنجش تغییرات دینامیک میتوکندریایی انجام شود تا اثرات احتمالی این مکمل روشن شود.

### تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی در مقاله حاضر وجود ندارد.

### قدردانی و تشکر

از پرسنل مرکز تحقیقات فیزیولوژی کرمان به جهت همکاری بی‌دریغ‌شان در انجام طرح تحقیقاتی حاضر نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

### منابع

1. Leidal AM, Levine B, Debnath J. Autophagy and the cell biology of age-related disease. *Nature cell biology*. 2018;20(12):1338-48. <http://doi.org/10.1038/s41556-018-0235-8>.
2. Scott AJ, Ellison M, Sinclair DA. The economic value of targeting aging. *Nature Aging*. 2021;1(7):616-23. <http://doi.org/10.1038/s43587-021-00080-0>
3. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nature aging*. 2021;1(8):634-50. <http://doi.org/10.1038/s43587-021-00098-4>



4. Bell CG, Lowe R, Adams PD, Baccarelli AA, Beck S, Bell JT, et al. DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations. *Genome biology*. 2019;20:1-24. <http://doi.org/10.1186/s13059-019-1824-y>
5. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, Ortet L, Rodríguez-Ubrea J, Rebollo E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*. 2016;529(7584):37-42. <http://doi.org/10.1038/nature16187>
6. Pouikli A, Parekh S, Maleszewska M, Nikopoulou C, Baghdadi M, Tripodi I, et al. Chromatin remodeling due to degradation of citrate carrier impairs osteogenesis of aged mesenchymal stem cells. *Nature Aging*. 2021;1(9):810-25. <http://doi.org/10.1038/s43587-021-00105-8>
7. Ortiz GG, Moisés FPP, Mireles-Ramírez M, Flores-Alvarado LJ, González-Usigli H, Sánchez-González VJ, et al. Oxidative stress: love and hate history in central nervous system. *Advances in protein chemistry and structural biology*. 2017;108:1-31. <http://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.01.003>
8. Sun J, Zhang L, Zhang J, Ran R, Shao Y, Li J, et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 on splenocytes and thymocytes in an aging rat model induced by d-galactose. *International Immunopharmacology*. 2018;58:94-102. <http://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.017>
9. Li Y, Lin R, Peng X, Wang X, Liu X, Li L, et al. The role of mitochondrial quality control in anthracycline-induced cardiotoxicity: from bench to bedside. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022;2022. <http://doi.org/10.1155/2022/3659278>
10. Tahir FG, Langford D, Amini S, Mohseni Ahooyi T, Khalili K. Mitochondrial quality control in cardiac cells: Mechanisms and role in cardiac cell injury and disease. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(6):8122-33. <http://doi.org/10.1002/jcp.27597>
11. Maneechote C, Palee S, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Roles of mitochondrial dynamics modulators in cardiac ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017;21(11):2643-53. <http://doi.org/10.1111/jcmm.13330>
12. Cao K, Riley JS, Heilig R, Montes-Gómez AE, Vringer E, Berthenet K, et al. Mitochondrial dynamics regulate genome stability via control of caspase-dependent DNA damage. *Developmental cell*. 2022;57(10):1211-25. e6. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.03.019>
13. Sun C, Liu X, Di C, Wang Z, Mi X, Liu Y, et al. MitoQ regulates autophagy by inducing a pseudo-mitochondrial membrane potential. *Autophagy*. 2017;13(4):730-8. <http://doi.org/10.1080/15548627.2017.1280219>
14. Xiao L, Xu X, Zhang F, Wang M, Xu Y, Tang D, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorated tubular injury mediated by mitophagy in diabetic kidney disease via Nrf2/PINK1. *Redox biology*. 2017;11:297-311. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.022>
15. Chun OK, Floegel A, Chung S-J, Chung CE, Song WO, Koo SI. Estimation of antioxidant intakes from diet and supplements in US adults. *The Journal of nutrition*. 2010;140(2):317-24. <http://doi.org/10.3945/jn.109.114413>
16. Williamson J, Hughes CM, Copley JN, Davison GW. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ, attenuates exercise-induced mitochondrial DNA damage. *Redox biology*. 2020;36:101673. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101673>
17. Rouholamini FS, Aminaei M, Aminzadeh S. The effect of eight weeks of endurance training and MitoQ supplementation on antioxidant capacity and the expression of sestrin-2 and AMPK in cardiac tissue of aged rats. *Exp Gerontol*. 2024;196:112572. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2024.112572>

18. Healy GN, Wijndaele K, Dunstan DW, Shaw JE, Salmon J, Zimmet PZ, et al. Objectively measured sedentary time, physical activity, and metabolic risk: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study (AusDiab). *Diabetes care*. 2008;31(2):369-71. <http://doi.org/10.2337/dc07-1795>
19. Bangsbo J, Blackwell J, Boraxbekk C-J, Caserotti P, Dela F, Evans AB, et al. Copenhagen consensus statement 2019: physical activity and ageing. *British Journal of Sports Medicine*. 2019;53(14):856-8. <http://doi.org/10.1136/bjsports-2018-100451>
20. Kayacan Y, Çetinkaya A, Yazar H, Makaracı Y. Oxidative stress response to different exercise intensity with an automated assay: thiol/disulphide homeostasis. *Archives of physiology and biochemistry*. 2021;127(6):504-8. <http://doi.org/10.1080/13813455.2019.1651868>
21. Hernandez-Resendiz S, Prunier F, Girao H, Dorn G, Hausenloy DJ, Action ECC. Targeting mitochondrial fusion and fission proteins for cardioprotection. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;24(12):6571-85. <http://doi.org/10.1111/jcmm.15384>
22. Youle RJ, Van Der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012;337(6098):1062-5. <http://doi.org/10.1126/science.1219855>
23. Khalifa EA, Nabil Ahmed A, Hashem KS, Allah AG. Therapeutic effects of the combination of alpha-lipoic acid (ala) and coenzyme Q10 (CoQ10) on cisplatin-induced nephrotoxicity. *International Journal of Inflammation*. 2020;2020(1):5369797. <http://doi.org/10.1155/2020/5369797>
24. Feher J, Nemeth E, Nagy V, Lengyel G. The preventive role of coenzyme Q10 and other antioxidants in injuries caused by oxidative stress. *Archives of Medical Science*. 2007;3(4):305-14. <http://doi.org/10.3390/nu14163265>
25. Hosseini L, Vafaei MS, Badalzadeh R. Melatonin and nicotinamide mononucleotide attenuate myocardial ischemia/reperfusion injury via modulation of mitochondrial function and hemodynamic parameters in aged rats. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2020;25(3):240-50. <http://doi.org/10.1177/1074248419882002>
26. Feillet-Coudray C, Fouret G, Ebabe Elle R, Rieusset J, Bonafos B, Chabi B, et al. The mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ ameliorates metabolic syndrome features in obesogenic diet-fed rats better than Apocynin or Allopurinol. *Free radical research*. 2014;48(10):1232-46. <http://doi.org/10.3109/10715762.2014.945079>
27. Yin X, Manczak M, Reddy PH. Mitochondria-targeted molecules MitoQ and SS31 reduce mutant huntingtin-induced mitochondrial toxicity and synaptic damage in Huntington's disease. *Human molecular genetics*. 2016;25(9):1739-53. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddw045>
28. Goh KY, He L, Song J, Jinno M, Rogers AJ, Sethu P, et al. Mitoquinone ameliorates pressure overload-induced cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in mice. *Redox biology*. 2019;21:101100. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101100>
29. Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal*. 2005;19(9):1088-95. <http://doi.org/10.1096/fj.05-3718com>
30. Rostamzadeh F, Najafipour H, Aminizadeh S, Jafari E. Therapeutic effects of the combination of moderate-intensity endurance training and MitoQ supplementation in rats with isoproterenol-induced myocardial injury: the role of mitochondrial fusion, fission, and mitophagy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024;170:116020. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.116020>



31. Song M, Franco A, Fleischer JA, Zhang L, Dorn GW, 2nd. Abrogating Mitochondrial Dynamics in Mouse Hearts Accelerates Mitochondrial Senescence. *Cell Metab.* 2017;26(6):872-83 e5. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.023>
32. Gioscia-Ryan RA, Battson ML, Cuevas LM, Eng JS, Murphy MP, Seals DR. Mitochondria-targeted antioxidant therapy with MitoQ ameliorates aortic stiffening in old mice. *J Appl Physiol* (1985). 2018;124(5):1194-202. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00670.2017>
33. Ponti F, Santoro A, Mercatelli D, Gasperini C, Conte M, Martucci M, et al. Aging and Imaging Assessment of Body Composition: From Fat to Facts. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:861. <http://doi.org/10.3389/fendo.2019.00861>
34. Masoumi-Ardakani Y, Najafipour H, Nasri HR, Aminizadeh S, Jafari S, Moflehi D. Effect of Combined Endurance Training and MitoQ on Cardiac Function and Serum Level of Antioxidants, NO, miR-126, and miR-27a in Hypertensive Individuals. *Biomed Res Int.* 2022;2022:8720661. <http://doi.org/10.1155/2022/8720661>
35. Benito PJ, Lopez-Plaza B, Bermejo LM, Peinado AB, Cupeiro R, Butragueno J, et al. Strength plus Endurance Training and Individualized Diet Reduce Fat Mass in Overweight Subjects: A Randomized Clinical Trial. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(7). <http://doi.org/10.3390/ijerph17072596>
36. Masoumi-Ardakani Y, Najafipour H, Nasri HR, Aminizadeh S, Jafari S, Moflehi D. Effect of combined endurance training and MitoQ on cardiac function and serum level of antioxidants, NO, miR-126, and miR-27a in hypertensive individuals. *BioMed Research International.* 2022;2022(1):8720661. <http://doi.org/10.1155/2022/8720661>
37. James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou J-C. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(38):36373-9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M303758200>
38. Morciano G, Boncompagni C, Ramaccini D, Pedriali G, Bouhamida E, Tremoli E, et al. Comprehensive analysis of mitochondrial dynamics alterations in heart diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023;24(4):3414. <http://doi.org/10.3390/ijms24043414>
39. Yu R, Jin SB, Lendahl U, Nistér M, Zhao J. Human Fis1 regulates mitochondrial dynamics through inhibition of the fusion machinery. *The EMBO journal.* 2019;38(8):e99748. <http://doi.org/10.15252/emj.201899748>

پیش‌نویس