



# The Effect Of High Intensity Aerobic Training On Mitochondrial DNA Copy Number In Visceral Adipose Tissue Of Ovariectomized Rats Fed With High-Fat Diet

Shokoufeh Kheradmand<sup>1</sup> | Elahe Talebi-Garakani<sup>2</sup> | Khadijeh Nasiri<sup>3</sup>

1. PhD. Student in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
2. Associate Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.
3. Assistant Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.



CrossMark

corresponding author: Elahe Talebi-Garakani; [e.talebi@umz.ac.ir](mailto:e.talebi@umz.ac.ir)

## ARTICLE INFO

### Article type:

Research Article

### Article history:

Received: 06 June 2023

Revised: 27 April 2023

Accepted: 07 September 2023

### Keywords:

Ovariectomized, Visceral Adipose Tissue, Intense Aerobic Exercise Training, mtDNAcn, Tfam

### How to Cite:

**Kheradmand, S. Talebi-Garakani, E. Nasiri, K.** The Effect Of High Intensity Aerobic Training On Mitochondrial DNA Copy Number In Visceral Adipose Tissue Of Ovariectomized Rats Fed With High-Fat Diet. *Research In Sport Medicine and Technology*, 2023; 13(26): 18-29.

The prevalence of obesity in postmenopausal women is higher compared to men. A decrease in estrogen with menopause leads to dysfunction in mitochondria. The purpose of this study is to investigate the effect of high intensity aerobic training(HIT) on the copy number of mitochondrial genome (mtDNAcn) and mitochondrial transcription factor A(Tfam) in visceral adipose tissue(VAT) in ovariectomized(OVX) rats fed with high-fat diet(HFD). 40 rats (8 weeks, 200±20 gr) were divided into 5 groups:1) normal diet (ND), 2) ND+OVX, 3) HFD, 4) HFD+OVX, and 5) HFD+OVX+HIT. HIT performed aerobic training (80-85% of maximum oxygen consumption) for 8 weeks/5 sessions/42 minutes.48 hours after the last training session, VAT samples were taken to evaluate mtDNAcn and Tfam gene expression by qRT-PCR method. ANOVA and LSD tests were used to compare the differences between groups. OVX and HFD didn't lead to a significant change in Tfam gene expression, but caused a significant decrease in the mtDNAcn compared to the control group. HIT caused a significant increase in Tfam gene expression compared to the control group and Tfam gene expression and mtDNAcn compared to the HFD+OVX. Hence, HIT improves mitochondrial function through mtDNAcn and Tfam gene expression in VAT in OVX rats fed by HFD.



Published by Kharazmi University, Tehran, Iran. Copyright(c) The author(s) This is an open access article under e: CC BY-NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)



## تأثیر تمرین هوازی شدید بر تعداد کپی DNA میتوکندری بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی فاقد تخمدان و تغذیه شده با غذای پرچرب

شکوفه خردمند<sup>۱</sup> | الهه طالبی گرکانی<sup>۲\*</sup> | خدیجه نصیری<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
  ۲. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
  ۳. استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
- نویسنده مسئول: الهه طالبی گرکانی [e.talebi@umz.ac.ir](mailto:e.talebi@umz.ac.ir)

### چکیده

شیوع چاقی در زنان یائسه نسبت به مردان بیشتر است. کاهش استروژن هنگام یائسگی موجب اختلال در عملکرد میتوکندری می‌شود. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی شدید (HIT) بر تعداد کپی‌های ژنوم میتوکندری (mtDNA) و فاکتور رونویسی میتوکندری (Tfam) در بافت چربی احشایی (VAT) موش‌های صحرایی اورکتومی (OVX) و تغذیه شده با غذای پرچرب (HFD) بود. ۴۰ سر موش (۸ هفته‌ای،  $20 \pm 20$  گرم) به ۵ گروه (۱: غذای نرمال (2) ND+OVX 3) HFD 4) HFD+ OVX5) غذای نرمال (HFD+OVX+HIT، تقسیم شدند. HIT به مدت ۸ هفته/۵ جلسه در هفته/۴۲ دقیقه تمرین هوازی (۸۵-۸۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) اجرا شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین از VAT برای ارزیابی mtDNA و بیان ژن Tfam به روش qRT-PCR، نمونه‌برداری شد. از آزمون ANOVA و LSD جهت مقایسه تفاوت‌های بین گروهی استفاده شد. OVX و HFD منجر به تغییر معنادار بیان ژن Tfam نشد اما موجب کاهش معنادار mtDNA نسبت به گروه کنترل شد. HIT موجب افزایش معنادار بیان ژن Tfam نسبت به گروه کنترل و بیان ژن Tfam و mtDNA نسبت به گروه HFD+ OVX گردید؛ بنابراین HIT با افزایش mtDNA و بیان ژن Tfam موجب بهبود عملکرد میتوکندریایی در VAT موش‌های صحرایی OVX و تغذیه شده با HFD می‌شود.

### اطلاعات مقاله:

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۱۶

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۴/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۱

### واژه‌های کلیدی:

اورکتومی، بافت چربی احشایی،

فعالیت ورزشی هوازی شدید،

Tfam، mtDNA

### ارجاع:

شکوفه خردمند، الهه طالبی گرکانی، خدیجه نصیری. تأثیر تمرین هوازی شدید بر تعداد کپی DNA میتوکندری بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی فاقد تخمدان و تغذیه شده با غذای پرچرب. پژوهش در طب ورزشی و فناوری. ۱۴۰۲: ۱۳(۲۶): ۲۹-۱۸

## مقدمه

یائسگی به عنوان پایان خود به خودی قاعدگی است که با از دست دادن فعالیت فولیکولی تخمدان (۱) و توقف تولید هورمون‌های آن به ویژه استروژن (۲) مشخص می‌گردد. کاهش استروژن به عنوان یک عامل مهم آغازگر چاقی شناخته شده است (۳). به علاوه کاهش استرادیول (E2)<sup>۱</sup> با افزایش خطر برخی اختلالات متابولیکی همراه است (۴)؛ بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که زنان پس از یائسگی با تغییرات نامطلوبی در ترکیب بدن (۵)، چاقی و اختلالات مرتبط با آن (۲) از جمله افزایش چربی کل بدن (۶)، رسوب چربی مرکزی در شکم (۵، ۷) و بافت چربی احشایی (VAT)<sup>۲</sup> مواجه شوند (۶). بیشتر بزرگ سالان به‌طور فزاینده‌ای دچار اضافه‌وزن می‌شوند و شیوع اضافه‌وزن در زنان یائسه با سرعت بیشتری در حال رشد است. به هر حال هنوز روشن نیست که آیا گذار یائسگی به خودی خود منجر به افزایش وزن می‌شود یا خیر، اما روشن است که نقص فیزیولوژیکی در استروژن تغییراتی در توزیع چربی ایجاد می‌کند که خطر ابتلا به سندرم متابولیک، دیابت و بیماری قلبی عروقی را افزایش می‌دهد (۸). اختلال در عملکرد میتوکندری به عنوان یکی از مهم‌ترین تغییرات مرتبط با چاقی و بیماری‌های مرتبط با آن شناخته شده است که کمبود استروژن نیز به شدت با اختلال در میتوکندری مرتبط است (۷). از این رو، عملکرد میتوکندری می‌تواند به عنوان هدف درمانی برای اختلالات متابولیکی به ویژه با یائسگی باشد.

میتوکندری یک اندامک درون سلولی است که در آن فسفوریلاسیون اکسیداتیو و واکنش‌های شیمیایی نظیر چرخه‌ی اسیدسیتریک رخ می‌دهد. میتوکندری برخلاف سایر اندامک‌ها، DNA ویژه‌ی خود را دارد. DNA میتوکندری (mtDNA)<sup>۳</sup> تعداد ۱۳ ژن را کدگذاری می‌کند که برای فسفوریلاسیون اکسیداتیو ضروری هستند. mtDNA نیمه عمر کوتاه‌تر و سرعت جهش‌پذیری بالاتری نسبت به DNA هسته‌ای دارد، زیرا به راحتی در معرض رادیکال‌های آزاد، محصولات جانبی فسفوریلاسیون اکسیداتیو، قرار گرفته و توسط آن‌ها آسیب می‌بیند (۹). یکی از عوامل رونویسی که به احتمال زیاد در هماهنگی و تنظیم پروتئین‌های میتوکندری نقش دارد فاکتور رونویسی میتوکندری (Tfam) A<sup>۴</sup> است. Tfam یک پروتئین ۲۵ کیلو دالتونی با رمزگذاری هسته‌ای متصل به DNA است که قادر به انتقال به میتوکندری است و همراه با RNA پلیمراز به پروموتورهای میتوکندری متصل می‌شود (۱۰). تعداد کپی mtDNA (mtDNAcn) در سلول‌های چربی فراوان است و با افزایش سن اندکی کاهش می‌یابد (۱۱). کمبود استروژن تعداد کپی mtDNA را در موش‌های تخمدان برداشته شده (OVX)<sup>۵</sup> کاهش می‌دهد (۷). OVX یا همان خروج تخمدان‌ها از بدن، به عنوان مدلی از یائسگی انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد. OVX در موش‌ها موجب افزایش توده‌ی بدنی تام و توده بافت چربی تام

1. Estradiol
2. Visceral adipose tissue
3. Mitochondrial DNA
4. Mitochondrial transcription factor A
5. Ovariectomy

می شود که تا حدودی می تواند به دلیل افزایش انرژی مصرفی باشد که حاکی از آن است که احتمالاً تغییر در متابولیسم انرژی در جانورانی که دچار نقص E2 شده اند رخ می دهد (۴).

تمرینات ورزشی منظم یکی از راهبردهای درمانی غیردارویی برای اختلالات متابولیکی است که می تواند برای بهبود عملکرد میتوکندری نیز مؤثر باشد (۱۲). با این حال، سازگاری ناشی از تمرینات ورزشی وابسته به مؤلفه های تمرین ورزشی بستگی دارد و به میزان چشمگیری بین افراد متفاوت است (۱۳). در همین راستا، نشان داده شده است که در موش های صحرایی نر پس از ۳ هفته تمرین ورزشی تناوبی با شدت بالا روی نوار گردان مقادیر TFAM در مغز افزایش یافته است (۱۲). ۲۰ هفته شنا کردن نیز با شدت متوسط توانست تعداد mtDNAcn را در عضله اسکلتی موش افزایش دهد (۱۴). همچنین افزایش در محتوی میتوکندری بافت چربی سفید و همچنین بیان پروتئین اصلی مرتبط با آن یعنی PGC-1 $\alpha$  در رت های تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب گزارش شده است (۱۵). در مجموع، با وجود آثار مفید تمرینات ورزشی با شدت بالا بر محتوی میتوکندری، این تغییرات در دوران یائسگی کمتر بررسی شده است. از این رو، هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر فعالیت ورزشی هوازی با شدت بالا بر تعداد mtDNAcn و بیان ژن Tfam در بافت چربی احشایی موش های فاقد تخمدان و تغذیه شده با غذای پرچرب بود. فرض بر آن است که تمرین ورزشی هوازی شدید بتواند بر تعداد کپی های mtDNA و بیان ژن Tfam در بافت چربی احشایی موش های صحرایی فاقد تخمدان و تغذیه شده با غذای پرچرب اثر بگذارد.

## روش تحقیق

۴۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار ۸ هفته ای با دامنه ی وزنی  $20 \pm 200$  گرم از موسسه سرم سازی رازی کرج خریداری شد. حیوانات در محیط آزمایشگاه با دمای  $22 \pm 2^\circ \text{C}$  و چرخه ی تاریکی روشنایی ۱۲:۱۲ قرار داده شدند و دسترسی آزاد به غذا و آب داشتند. پس از یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه حیوانات به ۵ گروه تقسیم شدند. (۱) غذای نر مال، (۲) غذای نر مال + اوارکتومی، (۳) غذای پرچرب، (۴) غذای پرچرب + اوارکتومی، (۵) غذای پرچرب + اوارکتومی + تمرین شدید.

برای انجام اوارکتومی (پس از یک هفته سازگاری با محیط) حیوانات با مخلوطی از کتامین (۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بی هوش شدند. حیوانات ابتدا به حالت استراحت روی سطح کناری بدن قرار داده می شدند به نحوی که سطح شکمی در امتداد دم به سمت جراح قرار گیرد. سپس موهای محل جراحی تراشیده و استریل شد. برای رسیدن به حفره شکمی ابتدا برشی یک سانتیمتری در انتهای قفسه سینه زده و بافت چربی و عضلات این ناحیه کنار زده شد. سپس تخمدان و شاخ های رحمی از حفره شکمی خارج شده و شریان بند استریل (لیگاتور) در ابتدای لوله های فالوپ قرار داده شد. سپس با برشی کوچک در نزدیکی تخمدان، تخمدان و بخشی از لوله های فالوپ برداشته شد. پس از اطمینان از عدم خونریزی، لیگاتور برداشته شده و عضلات و پوست ناحیه برش، بخیه زده شد (۱۶). به منظور

اطمینان از یائسگی، سطوح استروژن سرم به روش ELISA اندازه‌گیری شد (میانگین مقادیر استروژن در گروه نرمال و اورکتومی به ترتیب  $317 \pm 83$  و  $91 \pm 17$  pg/dl بود).

غذای پرچرب (۴۰٪ کیلوکالری از چربی، ۲۰٪ کیلوکالری از پروتئین و ۴۰٪ کیلوکالری از کربوهیدرات) به صورت آماده از استیتو رازی خریداری و مورد استفاده قرار گرفت. مصرف غذای پرچرب با شروع هفته دوم آغاز و تا پایان پژوهش ادامه یافت.

حیوانات گروه تمرین پس از یک هفته آشنایی با نوار گردان (پنج جلسه در هفته، هر جلسه ۱۰ دقیقه) پروتکل تمرین را شروع کردند. تمرین هوازی با شدت بالا شامل دویدن بر روی نوارگردان ویژه جوندگان با سرعت ۳۰ متر در دقیقه، معادل ۸۵-۸۰ درصد حداکثر اکسیژن بود (۱۶، ۱۷). هر جلسه شامل ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بدون شیب بود. تمرینات ۵ روز در هفته و به مدت ۸ هفته انجام شد. تمرینات روی نوارگردان دارای شوک الکتریکی اجرا شد و تا حد امکان از شوک دادن خودداری گردید.

نمونه‌گیری ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی و پس از ۸ تا ۱۲ ساعت ناشتایی انجام شد. پس از بیهوش کردن حیوانات با تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین بافت چرب احشایی پری‌رنال سریعاً جدا، وزن‌کشی و پس از شستشو با سرم فیزیولوژیک برای انجام مراحل بعدی تحقیق در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری سطوح نسبی بیان ژن Tfam و تعداد کپی‌های DNA میتوکندریایی توسط روش qRT-PCR انجام شد. به این منظور RNA کل از نمونه‌ها استخراج شد. برای استخراج RNA کل ۵۰ میلی‌گرم بافت چربی احشایی با استفاده از کیت استخراج RNA (دنازیست آسیا، مشهد) انجام گرفت. به منظور از بین بردن آلودگی‌های DNA، RNA‌های استخراجی با استفاده از آنزیم DNase- RNase-free تیمار شدند. RNA‌های تیمار شده با آنزیم DNase برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. سنتز cDNA با استفاده از کیت یکتا تجهیزآزما (ایران) و با توجه به دستور عمل شرکت صورت گرفت. تعیین کمیت نسبی در Real time PCR به وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع نور فلورسنس، در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین انجام گرفت. طی این مرحله، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای نمونه‌های cDNA برای ژن Tfam و ژن رفرنس  $\beta$ -Actin با استفاده از کیت سایبرگرین شرکت امپلیکون (دانمارک) در دستگاه Rotor gene Corbett ۱۰۰۰ انجام شد.

نسبت mtDNA به DNA هسته‌ای (nDNA) برای تعیین تعداد کپی‌های میتوکندری در بافت چربی احشایی اندازه‌گیری شد. برای این منظور DNA کل سلولی از بافت چربی احشایی با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت حیوانی (دنا زیست آسیا، مشهد) استخراج شد. سطوح نسبی mtDNA و nDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن mt-ND1 و ژن هسته‌ای nDNA-bglobin اندازه‌گیری شد.

## 6. Nuclear DNA

پس از بررسی مقادیر مربوط به سیکل آستانه (Ct) حاصل از تکرارهای بیولوژی و تکنیکی هر تیمار، میانگین Ct برای تکرارهای تکنیکی ژن Tfam و ژن رفرنس  $\beta$ -Actin محاسبه شد و در ادامه بیان داده‌ها توسط نسبت بیان هریک از ژن‌های اختصاصی فوق به ژن  $\beta$ -Actin (ژن رفرنس) محاسبه شد. میزان بیان ژن‌های موردنظر با روش لیواک ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) محاسبه شد. برای محاسبه تعداد کپی DNA میتوکندری در بافت چربی احشایی از معادله بیان‌شده در مطالعه Quiros و همکاران (۲۰۱۸) (۱۷) استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

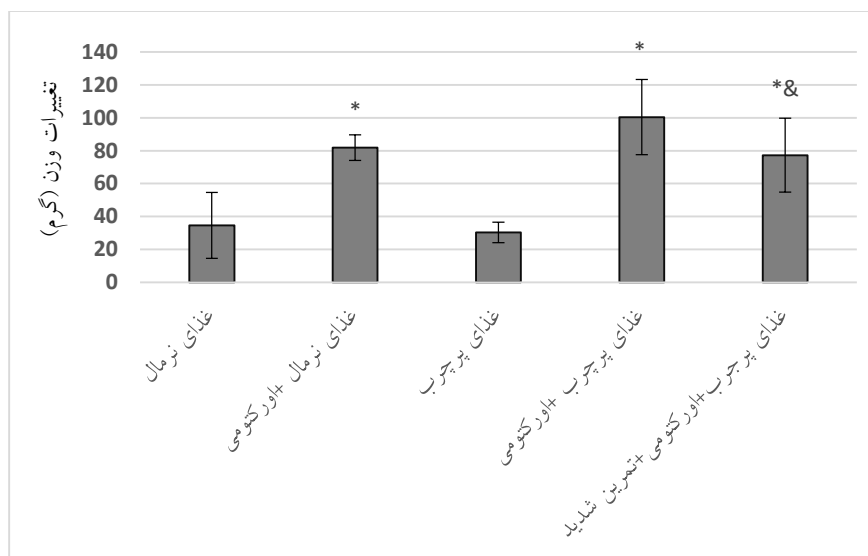
| ژن               | توالی آغازگر رفت<br>(۵'-...-۳') | توالی آغازگر برگشت<br>(۵'-...-۳') |
|------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Tfam             | AAACGCCTAAAGAAGAAAG<br>CAC      | GCTGACTCATCCTTAGCCT<br>CC         |
| $\beta$ -Actin   | GTGTGACGTTGACATCCGT<br>AAAGAC   | TGCTAGGAGCCAGGGCAG<br>TAAT        |
| mtDNA-ND1        | GGCTACATACAACACTACGCA<br>AAGG   | ATATTGAGGTGGTTAGGGG<br>GC         |
| nDNA-<br>bglobin | TGATGCTGAGAAGGCTACT<br>GTTA     | GGAGCTACCTTGTAACCTG<br>GATA       |

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. پس از تأیید نرمال بودن داده‌ها (آزمون شاپیرو-ویلک) و بررسی همگنی واریانس‌ها (آزمون لون)، از آزمون تحلیل واریانس یک سویه با آزمون تعقیبی LSD جهت مقایسه تفاوت‌های بین گروهی استفاده شد. همچنین،  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

این پژوهش در کمیته تخصصی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه مازندران تأیید و با کد اخلاق (IR.UMZ.REC.1400.026) به تصویب رسیده است.

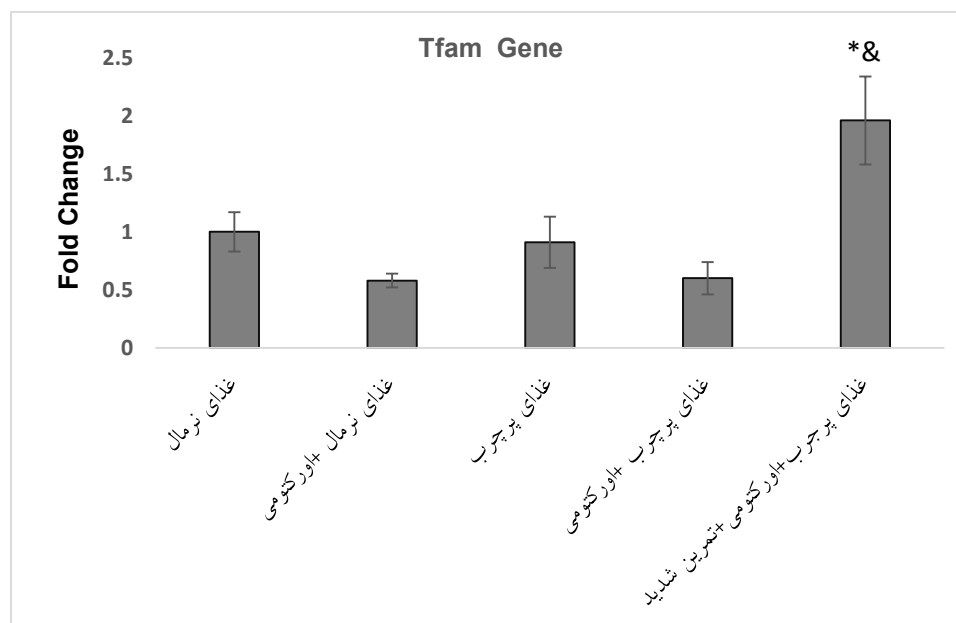
## یافته‌ها

تغییرات وزن (وزن پایانی-وزن اولیه) گروه‌های مختلف پژوهش در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج تحلیل داده‌ها نشان داد در گروه‌هایی که غذای نرمال و یا غذای پرچرب استفاده نموده بودند اورکتومی اکتساب وزن بیشتری را موجب شده است ( $p \leq 0.01$ ). تمرین شدید موجب اکتساب وزن کمتری نسبت به گروه غذای پرچرب + اورکتومی گردید ( $p = 0.02$ ).



شکل ۱. تغییرات وزن (میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد) گروه‌های پژوهش. \* تفاوت معنادار نسبت به گروه غذای نرمال، & تفاوت معنادار نسبت به گروه غذای پرچرب + اورکتومی.  $p \leq 0.05$  به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شده است.

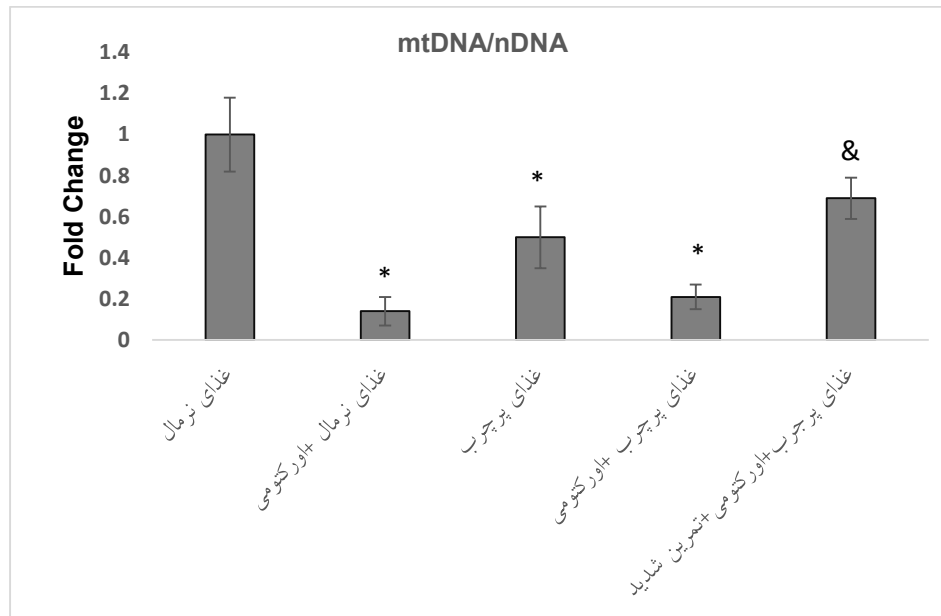
نتایج حاصل از تحلیل داده‌ها نشان داد اورکتومی و مصرف غذای پرچرب به تنهایی و اجرای هم‌زمان هر دو مداخله منجر به تغییرات معنادار بیان ژن **Tfam** نشده است؛ اما تمرین شدید موجب افزایش معنادار سطوح بیان این ژن نسبت به گروه کنترل ( $p = 0.006$ ) و گروه غذای پرچرب + اورکتومی ( $p \leq 0.001$ ) شده است (شکل ۲).



شکل ۲. بیان نسبی ژن **Tfam** (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) در گروه‌های پژوهش. \* تفاوت معنادار نسبت به گروه غذای نرمال، & تفاوت معنادار نسبت به گروه غذای پرچرب + اورکتومی.  $p \leq 0.05$  به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شده است.



تعداد کپی DNA میتوکندریایی با مصرف غذای پرچرب، اورکتومی و اجرای هم‌زمان هر دو مداخله به‌طور معناداری کاهش‌یافته بود ( $p \leq 0.05$ ). تمرین هوازی شدید اثر معناداری بر تعداد کپی DNA میتوکندریایی بافت چربی احشایی داشت و موجب افزایش آن نسبت به گروه غذای پرچرب + اورکتومی شد ( $p = 0.037$ ).



شکل ۳: تعداد کپی DNA میتوکندریایی (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) در گروه‌های پژوهش. \*تفاوت معنادار نسبت به گروه غذای نرمال، & تفاوت معنادار نسبت به گروه غذای پرچرب + اورکتومی.  $p \leq 0.05$  به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شده است.

## بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر تمرین هوازی با شدت بالا بر تعداد کپی DNA میتوکندری بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی فاقد تخمدان و تغذیه شده با غذای پرچرب انجام شد. یافته‌ی اصلی مطالعه حاضر نشان داد که تمرین هوازی با شدت بالا موجب افزایش بیان ژن *Tfam*، افزایش تعداد کپی‌های mtDNA و اکتساب وزن کمتر نسبت به گروه کنترل (غذای پرچرب + اورکتومی) شده است.

همان‌گونه که در نتایج ملاحظه گردید مصرف غذای پرچرب + اورکتومی کاهش معنادار تعداد کپی‌های mtDNA و کاهش غیر معنادار بیان ژن *Tfam* بافت چربی و اکتساب وزن بیشتری را نیز به دنبال داشت. هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر افزایش وزن و توده چربی پس از اورکتومی و یا همراه با مصرف غذای پرچرب از سوی دیگر پژوهشگران گزارش شده است (۱۸-۲۰). افزایش توده چربی در زنان یائسه نسبت به زنان غیر یائسه نیز گزارش شده است (۲۱). این موضوع می‌تواند به دلیل کاهش اثر لیپولیتیکی استروژن باشد (۱۸). درواقع استروژن می‌تواند ظرفیت اکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد را صرف‌نظر از طول زنجیره‌ی آن، از طریق افزایش فعالیت آنزیم کلیدی دخیل در فرآیند



بتااکسیداسیون سیون نظیر کارنتین پالمیتوئیل ترانسفراز ۱ (CPT1)<sup>۷</sup> و بتاهیدروکسی آ سیل-کوآ دهیدروژناز (β-HAD)<sup>۸</sup>، افزایش دهد (۲۲). کاهش بیان ژن Tfam در عضله اسکلتی (۴) و عضله قلب (۲۳) و کاهش تعداد کپی های mtDNA عضله دوقلو (۷) به دنبال اورکتومی در رت ها گزارش شده است؛ زیرا نشان داده شده است استروژن فعالیت میتوکندریایی را از طریق تنظیم فرآیند بیوژنز میتوکندریایی تعدیل می نماید. PGC-1α تنظیم کننده اصلی فرآیند بیوژنز میتوکندریایی است. PGC-1α می تواند فاکتورهای رونویسی متفاوتی نظیر فاکتورهای تنفسی هسته ای (NFR)<sup>۹</sup> که یک فاکتور حیاتی در رونویسی و تکثیر mtDNA است را فعال نماید (۲۴). همچنین نقش استروژن در تنظیم بیوانرژتیک میتوکندریایی و مسیرهای سیگنالینگ که توسط استروژن تنظیم می شود و بر میتوکندری تأثیر می گذارد نشان داده شده است. فعال سازی NFR و Tfam تأثیر استروژن بر میتوکندری را تعدیل می نمایند (۴). درواقع استروژن جنبه های مختلف عملکرد میتوکندری را از جمله تولید ATP، تولید پتانسیل غشای میتوکندری، بیوژنز میتوکندری و تنظیم غلظت کلاسیم تعدیل می نماید (۲۵). اثرات استروژن در میتوکندری از طریق رونویسی تنظیم شده توسط گیرنده استروژن (ER)<sup>۱۰</sup> انجام می شود (۲۶). عناصر پاسخ استروژن (ERE)<sup>۱۱</sup> در mtDNA وجود دارند و اجازه اتصال گیرنده های استروئیدی را می دهند. در واقع ER می تواند به ERE واقع در mtDNA متصل شود. این ارتباط در بهبود بیان ژن های کدگذاری شده با میتوکندری و فعالیت ETC شناخته شده است (۲۷). علاوه بر این، نشان داده شده است که اتصال استروژن به ERα بیان NRF-1 را از طریق برهمکنش مستقیم با DNA موجود در هسته القا می کند که منجر به افزایش رونویسی TFAM می شود (۲۶). در همین راستا نشان داده شده است که سطوح استرادیول و فعالیت ورزشی در محافظت در برابر اختلال عملکرد میتوکندری که در عضله اسکلتی موش های اورکتومی ایجاد شده است، نقش مهمی ایفا می کند (۲۸).

در این پژوهش تمرین هوازی با شدت بالا موجب افزایش بیان ژن Tfam، افزایش تعداد کپی های mtDNA و اکتساب وزن کمتر نسبت به گروه کنترل (غذای پرچرب + اورکتومی) شد. هم راستا با این نتایج، افزایش بیان ژن Tfam در بافت چربی اینگوئینال (۲۹)، عضله اسکلتی (۳۰) و عضله قلبی (۳۱) موش های صحرایی نر سالمند پس از تمرینات ورزشی نسبت به گروه کنترل نشان داده شده است (۲۹). همچنین ۱۲ هفته تمرین مقاومتی در رت های اورکتومی شده موجب افزایش بیان ژن Tfam عضله اسکلتی، در مقایسه با گروه غیرفعال شد (۴). در خصوص تعداد کپی های mtDNA نتایج پژوهش های موجود نشان می دهد تمرینات ورزشی موجب افزایش این متغیر در مغز و عضله اسکلتی رت ها (۳۰، ۳۲) و در لکوسیت های زنان یائسه (۳۳) شده است. یکی از مکانیسم های اصلی درگیر در چگونگی اثربخشی تمرین ورزشی بر عملکرد میتوکندری وابسته به تغییرات سنسورهای انرژی درون سلولی است. چندین آنزیم

7. Carnitine palmitoyl transferase I
8. β-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase
9. Nuclear respiratory factors
10. Estrogen receptor
11. Estrogen response elements

بالادست شناخته شده برای فعال کردن مسیر  $\text{PGC-1}\alpha$  مانند پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن  $\text{p38 MAPK}$  (۱۲)،  $\text{AMPK}$  و سیرتوئین ۱ ( $\text{SIRT1}$ )<sup>۱۳</sup> به ردوکس حساس هستند. گزارش شده است که  $\text{AMPK}$  و  $\text{SIRT1}$  به طور مستقیم بر فعالیت  $\text{PGC-1}\alpha$  از طریق فسفوریلاسیون و داسیتیلایسیون تأثیر می گذارند. انقباض عضلات اسکلتی با شدت بالا باعث افزایش نسبت  $\text{AMP/ATP}$  و جریان  $\text{Ca}^{2+}$  می شود، بنابراین با فعال شدن  $\text{AMPK}$ ، پروتئین کیناز وابسته به کلسیم/کالمودولین ( $\text{CaMK}$ )<sup>۱۴</sup> و کلسینورین  $\text{A}^{15}$  باعث افزایش  $\text{PGC-1}\alpha$  می شود (۳۰). از طرفی فعالیت ورزشی باعث افزایش متناوب کلسیم شبکه سارکوپلاسمی می شود که وضعیت فسفوریلاسیون فاکتورهای رونویسی و هم فعال کننده های مهم از جمله  $\text{CREB}$  را تغییر می دهد و در نتیجه منجر به افزایش بیان پروتئین هایی نظیر  $\text{PGC-1}\alpha$  می شود (۲۸). به طور کلی بسیاری از جنبه های بیوژنز میتوکندریایی با  $\text{AMPK}$ ،  $\text{PGC-1}\alpha$  و  $\text{Tfam}$  کنترل می شود (۳۱). در همین راستا، نشان داده شد افزایش بیان  $\text{PGC-1}\alpha$  منجر به افزایش  $\text{Tfam}$  و تعداد کپی های  $\text{mtDNA}$  در نمونه های سالمند گردیده است (۳۰). سطوح بالاتر تعداد کپی های  $\text{mtDNA}$  به طور مثبت با پتانسیل غشای میتوکندری، عملکرد آنزیم های تنفسی و ذخایر انرژی مرتبط است که نشان می دهد تعداد کپی های  $\text{mtDNA}$  ممکن است نشانگر سلامت و عملکرد میتوکندریایی باشد (۳۴).

همچنین این فرضیه نیز مطرح گردیده است که افزایش تعداد کپی  $\text{mtDNA}$  در اثر تمرینات منظم ورزشی ممکن است به افزایش لیپولیز و تولید اسیدهای چرب آزاد ( $\text{FFAs}$ )<sup>۱۶</sup> ناشی از ورزش مرتبط باشد.  $\text{FFA}$  ها نه تنها یک بستر ضروری برای تولید انرژی هستند، بلکه لیگاندهای مهمی در سیگنال دهی سلولی از طریق کمپلکس ( $\text{PPAR}$ )<sup>۱۷</sup> /  $\text{PGC-1}\alpha$  می باشند (۳۳).  $\text{FA}$  های اگزوژن پس از ورود به سلول فعال می شوند سپس با هدف اکسیداسیون وارد میتوکندری می شوند و یا دوباره استری شده و در قطرات چربی ذخیره می شوند. هیدرولیز ذخایر تری گلیسیرید از طریق آنزیم آدیپوز تری گلیسیرید لیپاز ( $\text{ATGL}$ )<sup>۱۸</sup> به منظور فراهمی لیگاندهایی برای سیگنال دهی عملکردی توسط کمپلکس  $\text{PGC-1}\alpha$  /  $\text{PPAR}$  که بیوژنز میتوکندریایی و فسفوریلاسیون اکسیداتیو را فعال می کند، حیاتی است (۳۵).

## نتیجه گیری

یافته های مطالعه حاضر نشان می دهد تخمدان برداری و مصرف غذای پرچرب موجب کاهش کپی های  $\text{mtDNA}$  در بافت چربی احشایی می گردد. تمرینات هوازی با شدت بالا موجب افزایش تعداد کپی های  $\text{mtDNA}$  می شود و احتمالاً از این طریق نیز در متابولیسم انرژی بافت چربی احشایی اثرگذار است.

12. P38 mitogen-activated protein kinase
13. Sirtuin 1
14. Calcium/calmodulin dependent protein kinase
15. Calcineurin A
16. Free fatty acids
17. Peroxisome proliferator-activated receptor
18. Adipose triglyceride lipase

## تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری است. به این وسیله از زحمات آقای دکتر ابوالفضل اکبری بابت کمک‌های ایشان در انجام امور آزمایشگاهی قدردانی می‌گردد.

## References

1. Landgren B-M, Collins A, Csemiczky G, Burger HG, Baksheev L, Robertson DM. Menopause transition: annual changes in serum hormonal patterns over the menstrual cycle in women during a nine-year period prior to menopause. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(6):2763-9.
2. Boldarine VT, Pedroso AP, Brandão-Teles C, LoTurco EG, Nascimento CM, Oyama LM, et al. Ovariectomy modifies lipid metabolism of retroperitoneal white fat in rats: a proteomic approach. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2020;319(2):E427-E37.
3. Lizcano F, Guzmán G. Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. *BioMed research international*. 2014;2014.
4. Barbosa M, Shiguemoto G, Tomaz L, Ferreira F, Rodrigues M, Domingues M, et al. Resistance training and ovariectomy: Antagonic effects in mitochondrial biogenesis markers in rat skeletal muscle. *International Journal of Sports Medicine*. 2016;37(11):841-8.
5. Davis SR, Castelo-Branco C, Chedraui P, Lumsden M, Nappi R, Shah D, et al. Understanding weight gain at menopause. *Climacteric*. 2012;15(5):419-29.
6. Lovejoy J, Champagne C, De Jonge L, Xie H, Smith S. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *International journal of obesity*. 2008;32(6):949-58.
7. Li X, Fan L, Zhu M, Jiang H, Bai W, Kang J. Combined intervention of 17 $\beta$ -estradiol and treadmill training ameliorates energy metabolism in skeletal muscle of female ovariectomized mice. *Climacteric*. 2020;23(2):192-200.
8. Dubnov-Raz G, Pines A, Berry E. Diet and lifestyle in managing postmenopausal obesity. *Climacteric*. 2007;10(sup2):38-41.
9. Lim S, Kim SK, Park KS, Kim SY, Cho BY, Yim MJ, et al. Effect of exercise on the mitochondrial DNA content of peripheral blood in healthy women. *European journal of applied physiology*. 2000;82:407-12.
10. Bengtsson J, Gustafsson T, Widegren U, Jansson E, Sundberg C. Mitochondrial transcription factor A and respiratory complex IV increase in response to exercise training in humans. *Pflügers Archiv*. 2001;443:61-6.
11. Kaaman M, Sparks L, Van Harmelen V, Smith S, Sjölin E, Dahlman I, et al. Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia*. 2007;50:2526-33.
12. Sharafi Dehrhm F, Soori R, Abbasian S, Rastegar MM M. The effect of high-intensity exercise training on serum levels and gene expression of Tfam and PGC1 $\alpha$  in hippocampus of male rats. *Sport Physiology & Management Investigations*. 2019;11(2):75-85.
13. Harvey N, Voisin S, Lea R, Yan X, Benton M, Papadimitriou I, et al. Investigating the influence of mtDNA and nuclear encoded mitochondrial variants on high intensity interval training outcomes. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1-11.
14. Cao X, Zhao Z-W, Zhou H-Y, Chen G-Q, Yang H-J. Effects of exercise intensity on copy number and mutations of mitochondrial DNA in gastrocnemius muscles in mice. *Molecular medicine reports*. 2012;6(2):426-8.
15. Khalafi M, Mohebbi H, Symonds ME, Karimi P, Akbari A, Tabari E, et al. The impact of moderate-intensity continuous or high-intensity interval training on adipogenesis and browning of subcutaneous adipose tissue in obese male rats. *Nutrients*. 2020;12(4):925.
16. Khakpay R, Ansari S, Khakpai F. The antinociceptive effect of 17 $\beta$ -estradiol in the paragigantocellularis lateralis nucleus of ovariectomized female rats mediated by estrogen Receptors. *Arak Medical University Journal (AMUJ)*. 2017;20(125):29-38.
17. Quiros PM, Goyal A, Jha P, Auwerx J. Analysis of mtDNA/nDNA ratio in mice. *Current protocols in mouse biology*. 2017;7(1):47-54.

18. Amengual-Cladera E, Lladó I, Gianotti M, Proenza AM. Retroperitoneal white adipose tissue mitochondrial function and adiponectin expression in response to ovariectomy and 17 $\beta$ -estradiol replacement. *Steroids*. 2012;77(6):659-65.
19. Cao JJ, Gregoire BR. A high-fat diet increases body weight and circulating estradiol concentrations but does not improve bone structural properties in ovariectomized mice. *Nutrition research*. 2016;36(4):320-7.
20. Chen Y, Heiman ML. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2001;280(2):E315-E22.
21. Ley CJ, Lees B, Stevenson JC. Sex-and menopause-associated changes in body-fat distribution. *The American journal of clinical nutrition*. 1992;55(5):950-4.
22. Campbell S, Febbraio M. Effect of ovarian hormones on mitochondrial enzyme activity in the fat oxidation pathway of skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2001;281(4):E803-E8.
23. Morra EA, Rodrigues PL, de Jesus ICG, Lima PRDV, Ávila RA, Zanardo TÉC, et al. Endurance training restores spatially distinct cardiac mitochondrial function and myocardial contractility in ovariectomized rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;130:174-88.
24. Nadal-Casellas A, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M. Effects of ovariectomy and 17- $\beta$  estradiol replacement on rat brown adipose tissue mitochondrial function. *Steroids*. 2011;76(10-11):1051-6.
25. Gupte AA ,Pownall HJ, Hamilton DJ. Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function. *Journal of diabetes research*. 2015;2015.
26. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling .*Reproductive medicine and biology*. 2017;16(1):4-20.
27. Lejri I, Grimm A, Eckert A. Mitochondria, estrogen and female brain aging. *Frontiers in aging neuroscience*. 2018;10:124.
28. Barbosa M, Shiguemoto G, Tomaz L, Ferreira F, Rodrigues M, Domingues M, et al. Resistance training and ovariectomy: Antagonic effects in mitochondrial biogenesis markers in rat skeletal muscle. *International Journal of Sports Medicine*. 2016:841-8.
29. Chung N, Park J, Lim K. The effects of exercise and cold exposure on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Journal of exercise nutrition & biochemistry*. 2017;21(2):39.
30. Kang C, Chung E, Diffie G, Ji LL. Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle :role of PGC-1 $\alpha$ . *Experimental gerontology*. 2013;48(11):1343-50.
31. Amoozgar SB, Jahangirfard M, Iman KN, Toutian S. The effect of 8 weeks of interval and resistance training on expression PGC 1 $\alpha$ , AMPK, TFAM Elderly rat heart cells. 2021.
32. Steiner JL ,Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Davis JM. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *Journal of applied physiology*. 2011;111(4):1066-71.
33. Chang YK, Cho SH, Kim J-H. Association between leukocyte mitochondrial DNA copy number and regular exercise in postmenopausal women. *Korean Journal of Family Medicine*. 2016;37(6):334.
34. Yang SY, Mirabal CS, Newcomb CE, Stewart KJ, Arking DE. Mitochondrial DNA copy number, metabolic syndrome, and insulin sensitivity: Insights from the Sugar, Hypertension, and Physical Exercise studies. *Plos one*. 2022;17(7):e0270951.
35. Kratky D, Obrowsky S, Kolb D, Radovic B. Pleiotropic regulation of mitochondrial function by adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis. *Biochimie*. 2014;96:106-12.