



## تأثیر تمرین تداومی و تناوبی با مصرف مکمل اترواستاتین بر بیان p62 mRNA در رت‌های سالمند دیابتی نوع ۲

فرناز زنگانه: دانشجوی دکتری، گروه تربیت بدنی، واحد علی آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی آباد کتول، ایران

ID پروین فرزانهگی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران (\* نویسنده مسئول) Parvin.farzanegi@gmail.com

حبیب اصغر پور: استادیار، گروه تربیت بدنی، واحد علی آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی آباد کتول، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

تمرین تداومی،  
تمرین تناوبی،  
اتوفاژی،  
دیابت نوع ۲،  
مکمل اترواستاتین

**زمینه و هدف:** اتوفاژی مسیر اصلی گردش پروتئین است که توسط آن اجزای سلولی برای تخریب و بازیافت به لیزوزومها منتقل می‌شوند. هدف پژوهش حاضر تاثیر هشت هفته تمرین تداومی و تناوبی همراه با مصرف مکمل اترواستاتین روی بیان p62 mRNA در رت‌های سالمند دیابتی نوع ۲ بود.

**روش کار:** تعداد ۶۳ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار مسن (میانگین وزنی بین ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم) در هشت گروه (۱ گروه کنترل سالم، ۲ گروه کنترل دیابتی، ۳ گروه دیابتی+تمرین تداومی، ۴ گروه دیابتی+تمرین تناوبی، ۵ گروه دیابتی+مکمل، ۶ گروه دیابتی+تمرین تداومی+مکمل، ۷ گروه دیابتی+ تمرین تناوبی+مکمل و ۸ گروه سالیین قرار گرفتند. القای دیابت با تزریق ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم استریتوزوتو سین صورت گرفت. برنامه تمرین تداومی و تناوبی شامل دویدن با سرعت ۱۵ تا ۲۹ متر بر دقیقه برای مدت زمان ۵ تا ۲۲ دقیقه برای تمرین تداومی شش ست ۲/۵ دقیقه ای با چهار دقیقه استراحت بین هر ست برای گروه تمرین تناوبی انجام شد. روزانه مکمل اترواستاتین با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی تزریق شد. از آزمون آماری آنوای یک‌طرفه برای مقایسه بین گروه‌ها در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ ≤ استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که بیان mRNA P62 در تمام گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل سالم و بیمار بطور معنی‌داری کاهش یافته است (P<۰/۰۰۱). اما بین گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرین تداومی و تناوبی با مصرف مکمل اترواستاتین می‌تواند منجر به کاهش mRNA P62 در رت‌های سالمند دیابتی نوع ۲ گردد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Zanganeh F, Farzanegi P, Asgharpour H. The Effect of Continuous Aerobic and Interval Exercise with Atroastetin Supplementation on p62 mRNA Expression in Elderly Rats with Type 2 Diabetes. Razi J Med Sci. 2023;30(2):1-9.

\*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

## The Effect of Continuous Aerobic and Interval Exercise with Atroastetin Supplementation on p62 mRNA Expression in Elderly Rats with Type 2 Diabetes

**Farnaz Zanganeh:** Phd Student, Department of Physical Education, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran

**Parvin Farzanegi:** Associate Professor, Department of Physical Education, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran (\* Corresponding author) [Parvin.farzanegi@gmail.com](mailto:Parvin.farzanegi@gmail.com)

**Habib Asgharpour:** Assistant Professor, Department of Physical Education, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** Aging indicates physiological and biological changes in humans that are associated with a decrease in physical strength and cause changes in the anatomy and physiology of the body. It has been reported that at a rate of one percent per year, muscle mass decreases from the age of 30 to 60 and increases from the age of 60 onwards. The incidence of diseases such as type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease, as well as chronic diseases of the musculoskeletal system and cancer are increasing, all of which can be affected by a decrease in muscle mass (1).

Autophagic activity has been shown to decrease with age and may contribute to the accumulation of damaged macromolecules and organs during aging. Failure in the autophagy process exacerbates age-related diseases such as nerve damage or cancer (5). p62, a classical autophagy receptor, is a multifunctional protein located throughout the cell and involved in many signal transduction pathways, including the Keap1-Nrf2 pathway (7). p62 is an autophagy substrate used to report autophagic activity. Recently, p62 has been shown to deliver ubiquitinated proteins, including tau, to the proteasome for degradation. In addition, it can be a shuttle between the nucleus and the cytoplasm to facilitate and control the quality of cytosolic proteins (6).

It has been well established that regular exercise improves physical function and brings important health benefits that inhibit many pathological diseases such as cancer as well as cardiovascular, metabolic and neurodegenerative diseases (8). Exercise promotes phenotypic adaptation in skeletal muscle, which includes mitochondrial biogenesis, angiogenesis, fiber deformation, and improved insulin sensitivity (9, 10). Regarding the effect of exercise on changes in autophagy, it has been reported that aerobic and resistance training leads to changes in autophagy indices (11, 12). Atroastetin is a type of statin that has a reducing effect on cholesterol production, as well as antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic and tissue protective effects in some pathological conditions (15-17).

Study of mechanisms affecting the process of autophagy following exercise, including continuous and intermittent exercise with atroastetin supplementation can improve this process (22). Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of eight continuous and interval exercises with atroastetin supplementation on mRNA p62 expression in elderly rats with type 2 diabetes.

**Methods:** This is a semi-experimental study. 63 old male Wistar rats (mean weight 300 to 350 g) categorized into eight groups that included; 1) healthy control group, 2) diabetic control group, 3) diabetic group + continuous exercise, 4) diabetic group + interval exercise, 5) diabetic group + supplement, 6) diabetic group + continuous exercise + supplement, 7) diabetic group + interval exercise + supplement, and 8) saline group. Diabetes was induced by injection of 50 mg/kg streptozotocin. continuous and interval exercise program was performed, which included running at a speed of 15 to 29 meters per minute for 5 to 22 minutes for continuous aerobic exercise and six 2.5-minute sets with four minutes of rest between each set for interval exercise. Atherostatin supplementation with dose of 20 mg per kg body weight was injected

### Keywords

Continuous aerobic exercise,  
Interval exercise,  
Atophagy,  
Type 2 diabetes,  
Atroastetin supplement

Received: 04/03/2023

Published: 06/05/2023

intraperitoneally daily. One-way ANOVA was used for comparison between groups at the  $p < 0.05$ .

**Results:** The results showed that P62 mRNA expression was significantly reduced in all groups compared to the healthy and diabetic control group ( $p < 0.001$ ), but there was no significant difference between the other groups ( $p < 0.05$ ). (fig. 1).

**Conclusion:** The results of the present study showed that despite the decrease in P62 mRNA expression in the experimental groups compared to the control and patient groups, no significant difference was observed between the other experimental groups. It seems that taking atroastetin supplementation, despite its anti-inflammatory and anti-oxidant effect, has no effect on the process of autophagy, which can be due to the amount used during the training period or the short-term use of atherostatin. Exercise has been reported to induce autophagy in skeletal muscle. Key autophagy proteins, including p62 and LC3-II, change significantly after exercise. These changes are consistent with an increase in autophagy after exercise. Tarawan et al. (2019) reported that exercise significantly reduced P62 in the muscles, which is more pronounced at moderate intensities. The researchers argued that at moderate intensities relative to high and low intensities, autophagic activity decreased after exercise and recommended moderate-intensity exercise (25). Exercise by phosphorylating Akt can inactivate the autophagy pathway through the PI3K-Akt-MTOR mediated pathway. Due to its unique properties, muscle fibers seem to play a significant role in the activity of autophagy and proteins involved in this process (26). Mejías et al. In the study showed that eight weeks of aerobic and resistance training in elderly men and women significantly increased LC3II / I, Atg16-12 and Bcl-2, but p62 expression decreased significantly (11, 12). Therefore, it is thought that exercise play a decisive role in inhibiting autophagy. Jamart et al. (2013) concluded that low-intensity exercise after fasting increases the activity of autophagy in skeletal muscle, which is due to a decrease in Akt pathway activity compared to satiety (27). The results of the present study showed that compared to the control and disease groups, P62 mRNA expression was significantly reduced; However, this decrease was not significant between the training groups and the training groups with supplementation. These results appear to be influenced by research methodology that the duration of the training period was insufficient or that the dose of atroastetin was low. continuous and interval exercise with atroastetin supplementation with anti-inflammatory and anti-oxidant effects on muscle cells is thought to reduce autophagy activity, resulting in a significant decrease in P62 mRNA expression compared with the patient group. In fact, exercise reduces the onset of autophagy in the skeletal muscle of diabetic rats by improving the antioxidant system and reducing the release of cytochrome c. However, the amount of reactive oxygen species has been reported to be high in animal and human species with type 2 diabetes (28). Therefore, continuous and interval exercise with atroastetin supplementation has been able to reduce autophagy markers, including P62 mRNA. There were some limitations in the present study, such as the lack of measurement of other autophagic indices such as LC3-II. It can also be noted that PI3K-Akt-MTOR autophagy pathway indices are not measured. Therefore, a study measuring these indicators in elderly samples with type 2 diabetes is recommended. According to the results, it seems that continuous and interval exercise with atherostatin supplementation can reduce P62 mRNA in elderly type 2 diabetic rats.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Zanganeh F, Farzanegi P, Asgharpour H. The Effect of Continuous Aerobic and Interval Exercise with Atroastetin Supplementation on p62 mRNA Expression in Elderly Rats with Type 2 Diabetes. Razi J Med Sci. 2023;30(2):1-9.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

## مقدمه

سالمندی بیانگر تغییرات فیزیولوژیک و بیولوژیکی در انسان است که با کاهش نیروی جسمانی همراه می‌باشد و باعث تغییرات در آناتومی و فیزیولوژی بدن می‌گردد. گزارش شده است که به میزان یک درصد در هر یکسال، توده عضلانی از سن ۳۰ تا ۶۰ سالگی کاهش می‌یابد و از ۶۰ سالگی به بعد این روند بیشتر می‌شود. بروز بیماری‌های مانند دیابت نوع ۲ (Diabetes Type 2)، سندروم متابولیک (Syndrome Metabolic) و بیماری قلبی-عروقی (Disease Cardiovascular)، همچنین بیماری‌های مزمن ساختار اسکلتی-عضلانی و سرطان افزایش می‌یابد که همگی این‌ها می‌تواند تحت تاثیر کاهش توده عضلانی باشد (۱). با توجه به رشد جمعیت سالمندان در سراسر دنیا، گزارش شده است که شیوع دیابت نوع ۲ در این دوران بیشتر بوده و اوج آن در سن ۶۰ تا ۷۴ سالگی آشکار می‌گردد (۲). تنظیم پروتئین عضلانی تحت تاثیر عوامل سنتزی و تجزیه ای است. تجزیه یا پروتئولیز سلول‌های عضلانی تنظیم شده است و به سیستم‌های لیزوزومی، سیستم فعال شده  $Ca^{2+}$  سیتوزول و ATP-ubiquitin وابسته به مسیر پروتئولیتیک مرتبط است (۳). در سنین بالا، شاهد کاهش هورمون‌های آنابولیکی مانند تستوسترون، استروژن، هورمون رشد و هورمون رشد شبه انسولینی می‌باشد که همگی در تنظیم سنتز پروتئین عضلانی نقش مهم دارند. از سویی دیگر افزایش واکنش‌های التهابی (IL-6 و TNF- $\alpha$ )، تعامل پیچیده آپوپتوز سلولی، زیاد شدن رادیکال‌های آزاد تولیدی نقش تعیین کننده دارند (۴).

اتوفاژی یک مسیر عمده گردش پروتئین است که توسط آن اجزای سلولی برای تخریب و بازیافت به لیزوزوم‌ها منتقل می‌شود. این فرآیند درون سلولی قادر است هومو ستاز سلولی را تحت شرایط استرس حفظ کند و بی نظمی آن می‌تواند منجر به ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی شود. مشخص شده است که فعالیت اتوفاژی با افزایش سن کاهش می‌یابد و احتمالاً به تجمع ماکرومولکول‌ها و اندامک‌های آسیب دیده در طی پیری کمک می‌کند. عدم موفقیت در روند اتوفاژی باعث بدتر شدن بیماری‌های مرتبط با پیری مانند تخریب عصب یا سرطان می‌شود (۵). مشخص شده

است که سیستم یوبی کویتین-پروتئازوم و اتوفاژی دو سیستم پروتئولیتیک متمایز و متقابل هستند. آنها در شرایط طبیعی و در هنگام استرس نقش مهمی در زنده ماندن سلول دارند (۶). p62، یک گیرنده کلاسیک اتوفاژی، یک پروتئین چند منظوره است که در سراسر سلول واقع شده و در بسیاری از مسیرهای انتقال سیگنال، از جمله مسیر Keap1-Nrf2 نقش دارد (۷). p62 یک سوپسترای اتوفاژی است که به عنوان گزارش دهنده فعالیت اتوفاژی استفاده می‌شود. اخیراً نشان داده شده است که p62 پروتئین‌های یوبیکوئیتینه شده را از جمله tau را برای تخریب به پروتئازوم تحویل می‌دهد. علاوه بر این، می‌تواند شاتلی بین هسته و سیتوپلاسم برای تسهیل و کنترل کیفیت پروتئین سیتوزولی باشد (۶).

بخوبی مشخص شده است که فعالیت ورزش منظم عملکرد بدنی را بهبود می‌بخشد و فواید مهمی برای سلامتی به همراه می‌آورد که بسیاری از بیماری‌های پاتولوژیک مانند سرطان و همچنین بیماری‌های قلبی عروقی، متابولیکی و تخریب عصبی را مهار می‌کند. در واقع، آمادگی جسمانی پیش‌بینی کننده مرگ و میر ناشی از همه علت‌ها و معیار سنجش کیفیت زندگی است. عضله اسکلتی انسان نمایانگر ۴۰-۴۵ درصد از وزن بدن است و دارای توانایی باورنکردنی برای انطباق پذیری است، که آن را به یک تعیین کننده مهم در عملکرد عملکردی کل بدن و وضعیت متابولیسم تبدیل می‌کند (۸). انجام فعالیت‌های ورزشی باعث سازگاری فنوتیپی در عضله اسکلتی می‌شود که شامل بیوزنز میتوکندری، رگ زایی، تغییر شکل نوع تار و بهبود حساسیت به انسولین است (۹، ۱۰).

در زمینه اثر فعالیت‌های ورزشی روی تغییرات اتوفاژی گزارش شده است که تمرین هوازی و مقاومتی منجر به تغییر شاخص‌های اتوفاژی می‌گردد (۱۱، ۱۲). بندت و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که محتوی پروتئینی p62 در عضله اسکلتی موش بدون تغییر است. در مطالعه ای دیگر توسط لیرا و همکارانش نشان داده شده که تغییرات p62 تحت تاثیر نوع تار عضلانی است (۱۳).

نقش مصرف مکمل در فعالیت‌های ضد التهابی و ضد اکسایشی قابل مشاهده است. آتورواستاتین نوعی

دیابتی، ۳) گروه دیابتی + تمرین تناوبی، ۴) گروه دیابتی + تمرین تناوبی، ۵) گروه دیابتی + مکمل، ۶) گروه دیابتی + تمرین تناوبی + مکمل، ۷) گروه دیابتی + تمرین تناوبی + مکمل و ۸) گروه سالیین بصورت تصادفی تقسیم بندی شدند. کد اخلاق زیستی از کمیته اخلاق کار با حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری با شماره IR.IAU.SARI.REC.1398.54 گرفته شد.

**نحوه دیابتی کردن رت ها:** برای دیابتی کردن رت ها از داروی استرپتوزوتوسین با دوز ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استفاده گردید که بصورت درون صفاقی تزریق گردید. برای اطمینان از دیابتی شدن، گلوکز خون از گوشه چشم رت ها اندازه گیری شد (میزان گلوکز خون باید بالاتر از ۱۲۶ میلی گرم بر دسی لیتر باشد) (۲۹).

**روش تمرین ورزشی:** جهت آشناسازی رت ها برای دویدن روی تردمیل، از سرعت ۸ تا ۱۰ متر بر دقیقه با شیب صفر در صد به مدت یک هفته با تواتر پنج جلسه در هفته استفاده شد. پس از آن برنامه تمرین تناوبی و تناوبی به مدت هشت هفته با تواتر پنج جلسه دنبال شد. برنامه تمرین تناوبی شامل دویدن با سرعت ۱۵ متر در دقیقه (مدت زمان دویدن ۵ دقیقه) در هفته اول بود. به دنبال آن سرعت دویدن ۱ تا ۲ متر در دقیقه هر هفته افزوده می شد (افزایش زمان دویدن ۱ تا ۲ دقیقه در هر هفته). در هفته چهارم سرعت دویدن به ۲۰ متر در دقیقه و زمان رسیدن به ۱۳ تا ۱۴ دقیقه و همچنین در پایان هفته هشتم سرعت دویدن به ۲۸ تا ۲۹ متر در دقیقه و مدت زمان ۲۱ تا ۲۲ دقیقه رسید. در مقابل برنامه تمرین تناوبی شامل ۶ ست ۲/۵ دقیقه ای بود که با استراحت های چهار دقیقه ای مجاز می شد (۳۰). لازم بذکر است که گروه کنترل، هیچ گونه فعالیت ورزشی نداشتند و همچنین گروه شم تردمیل تنها به مدت ۵ دقیقه و ۵ روز در هفته روی تردمیل خاموش قرار گرفتند. در گروه سالیین؛ به میزان ۰/۱ میلی لیتر سالیین به وسیله دستگاه تزریق می شد.

**نحوه مصرف مکمل آترواستاتین:** میزان مصرف مکمل آترواستاتین بصورت روزانه و با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بود که به صورت درون

استاتین می باشد که اثر کاهنده در ساخت کلسترول دارد، همچنین اثرات آنتی اکسیدانتی، ضد التهابی و ضد آپوپتوزی و محافظتی بافتی در برخی شرایط پاتولوژیکی گزارش شده است (۱۷-۱۵). در واقع استاتین ها با تحریک سلول های لانگرهانس سبب ترشح انسولین می شوند و به کاهش سطح گلوکز خون کمک می نماید. با این حال برخی دیگر اثر تحرکی را رد کرده اند (۱۸). با این حال گزارش شده است که مصرف داروی استاتین سبب کاهش قند خون و افزایش انسولین می شود (۱۹). در واقع مصرف ۴۰ میلی گرم در روز آترواستاتین به بهبود کاهش شاخص های التهابی در بیماران دیابتی منجر می گردد (۲۰). با این وجود؛ اثرات سوء مصرف استاتین روی عضله اسکلتی گزارش شده است (گرفتگی، درد عضلانی، ضعف و تسریع کردن روند تجزیه عضله اسکلتی) (۲۱).

بنابراین در افراد دیابتی سالمند تغییرات فیزیولوژیکی سبب مختل کردن فعالیت های عملکردی می شود که در نهایت به مرگ ختم می شود. فعالیت زیاد سیتسم تخریب سلولی می تواند خطر بروز بیماری های مختلف را تشدید نماید. مطالعه مکانیزم های اثر گذار بر روند اتوفاژی به دنبال تمرین های ورزشی از جمله تناوبی و تناوبی با مصرف مکمل آترواستاتین می تواند بر بهبود این فرایند اثر گذار باشد (۲۲). بنابراین هدف اصلی این پژوهش بررسی اثر یک دوره تمرین تناوبی و تناوبی همراه با مصرف داروی استاتین روی بیان mRNA p62 در رت های سالمند دارای دیابتی نوع ۲ بود.

## روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود که تعداد ۶۳ سرت صحرایی نر نژاد ویستار مسن (میانگین وزن ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم) انتخاب شدند که همگی در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری نگهداری می شدند. شیوه نگهداری رت ها در قفسه های پلی کربنات شفاف در محیطی با دمای  $\pm 2$  درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی  $\pm 5$  تا ۵۰ درصد و چرخه خواب و روشنایی ۱۲ : ۱۲ بود. سپس کلیه رت ها در هشت گروه (۱) گروه کنترل سالم، (۲) گروه کنترل

Cts مربوط به واکنش‌ها توسط نرم افزار دتسگه RT-PCR استخراج و در نهایت CT Mean سه مرتبه ثبت شد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول آورده شده است. کمی سازی مقادیر بیان ژن هدف مورد نظر از فرمول ۲ به توان منفی  $\Delta\Delta CT$  استفاده شد.

**آنالیز آماری:** پس از تأیید شدن توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک از میانگین و انحراف استاندارد برای توصیف آماری داده‌ها استفاده شد و از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. در صورت معنی داری از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه جفت گروه‌ها استفاده شد. سطح معناداری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد و تمام محاسبات، تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار SPSS شماره ۲۰ انجام شد.

### یافته‌ها

جدول شماره یک نتایج آمار توصیفی میانگین و انحراف استاندارد و همچنین نتایج آزمون واریانس یک طرفه برای تغییرات p62 آورده شده است. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که بین گروه‌ها در p62 اختلاف معنی دار است ( $p < 0/01$ ). بنابراین برای مقایسه جفت گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. کلیه نتایج آزمون تعقیبی توکی در جدول شماره دو نشان داده شده است. یافته‌ها نشان داد در مقایسه با گروه سالم، در همه گروه‌های بیمار سطوح mRNA P62 بطور معنی داری کاهش یافته است ( $p = 0/01$ ). همچنین آنالیز داده‌ها نشان داد در بین تمام گروه‌های بیمار، اختلاف معناداری وجود نداشت. به عبارت دقیق‌تر در گروه‌های بیمار، و در مقایسه با گروه بیمار، تغییرات مشاهده شده در mRNA P62 با مصرف مکمل آترواستاتین، تمرین تداومی، تمرین تناوبی، تمرین تداومی به همراه مکمل آترواستاتین، تمرین تناوبی به همراه مکمل آترواستاتین معنادار نبود.

### بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر یک دوره تمرین تداومی و تناوبی با مصرف آترواستاتین بر روی تغییرات

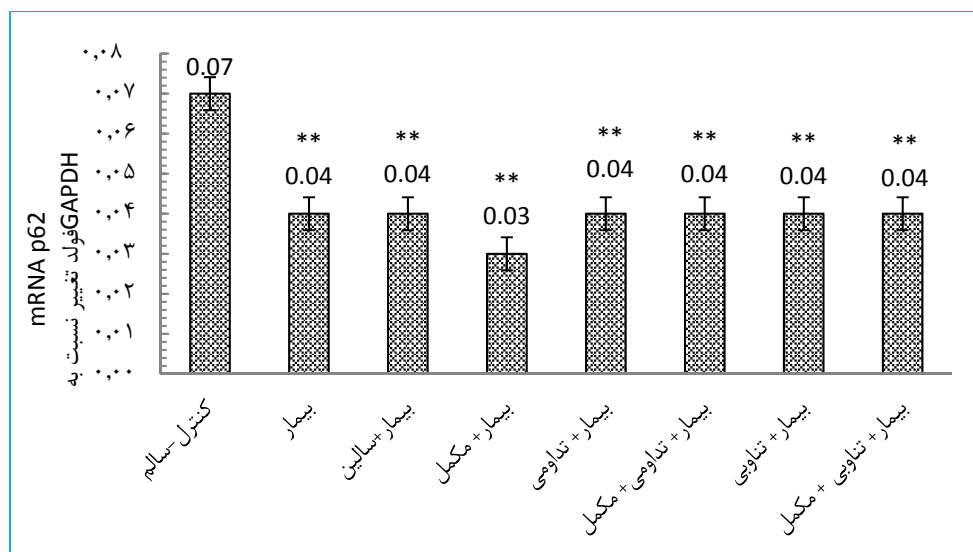
صفاقی به آنان تزریق گردید (۳۱).

**نحوه جداسازی نمونه‌های بافتی:** با پایان یافتن دوره تمرین هشت هفته‌ای، به رت‌ها مدت زمان ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی استراحت داده شد. پس از ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه از محلول ترکیبی کتامین و زایلازین بصورت تزریق درون صفاقی برای بی‌هوش کردن رت‌ها استفاده گردید و به دنبال آن نمونه‌گیری‌های خونی گرفته شد و بافت برداری انجام شد. عضله نعلی و دوقلوی رت‌ها جدا گردید و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند و برای اندازه‌گیری p62 به آزمایشگاه منتقل شدند.

برای هموزن کردن بافت از یک میلی‌مول محلول تریزول لیز استفاده شد و سپس با دستگاه همگن‌کننده بافت، فرایند هموزن کردن بافت تکمیل شد. سپس برای جداسازی از فاز آبی از ۰/۲۵ میلی لیتر کلروفرم استفاده شد و به دنبال آن RNA استخراج شده با یک میلی لیتر اتانول سرد ۷۰ درصد شستشو و خشک گردید. از دستگاه بیوفتومر با طول موج ۲۶۰ نانومتر برای سنجش کمی RNA استخراج شده استفاده گردید. استخراج cDNA برای نمونه در سه مرحله انجام گرفت. ابتدا ۸ میکروگرم از RNA استخراج شده را با ۰/۸ میکرولیتر از آنزیم Dnase I و ۲ میکرولیتر از بافر  $10 \times$  آن و آب DEPC خورده مخلوط می‌شود و حجم نمونه به ۲۰ میکرولیتر می‌رسد و محصول ایجاد شده را بدون ورتکس کردن می‌بایست به آرامی مخلوط کرد و سپس انکوبه کرد. پس از اتمام مراحل ترموسایکلر ۲۸۰ میکرولیتر آب تزریقی اضافه شد و برای استفاده در QPCR در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگه‌داری شد. برای هر نمونه cDNA نیز، یک نمونه کنترل مثبت با پرایمر b2m به عنوان کنترل داخلی، برای آزمون حضور cDNA تهیه شد. نمونه‌ها به آرامی و بدون ورتکس مخلوط شده و در دستگاه RT-PCR با برنامه ریز شد.

۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، واکنش از مرحله دوم به بعد، برای ۴۰ سیکل تکرار شد.





\*\* اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل سالم  
**نمودار ۱- مقایسه میانگین P62 بین گروه‌های تجربی**

حاصل تخریب می شود و مونومرهای تازه تولید شده برای استفاده مجدد در سیتوزول آزاد می شوند (۲۳)، (۲۴).

گزارش شده است که تمرین منجر به القای اتوفاژی در عضله اسکلتی می شود. پروتئین های اتوفاژی کلیدی از جمله p62 و LC3-II بطور معنی داری پس از تمرین تغییر می کنند. این تغییرات مطابق با افزایش اتوفاگوزوم پس از فعالیت ورزشی است. تاواران و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که تمرین بطور معنی داری سبب کاهش P62 در عضله دو قلو و نعلی می شود که در شدت های متوسط بارز تر است. این محققین استدلال کردند که در شدت های متوسط نسبت به شدت های بالا و پایین فعالیت اتوفاژی پس از تمرین کاهش می یابد و توصیه کردند فعالیت های ورزشی با شدت متوسط انجام گردد (۲۵). فعالیت ورزشی با فسفوریله کردن Akt می تواند به غیرفعال سازی مسیر اتوفاژی از طریق مسیر میانجی PI3K- و ویژگی های منحصر بفردش نقش قابل توجهی در فعالیت اتوفاژی و پروتئین های درگیر در این فرایند دارد (۲۶). مجیس و همکاران در مطالعه انجام گرفته نشان دادند که هشت هفته تمرین هوازی و مقاومتی بر روی زنان و

mRNA P62 بر روی رت های سالمند دیابت نوع ۲ انجام گرفت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که علیرغم کاهش بیان mRNA P62 در گروه های تجربی در مقایسه با گروه کنترل و بیمار، اختلاف معنی داری بین دیگر گروه های تجربی مشاهده نگردید. بنظر می رسد که مصرف مکمل اترواستاتین برخلاف اثر ضد التهابی و ضد اکسایشی تأثیری بر روند اتوفاژی ندارد که می تواند ناشی از میزان مصرف در طول دوره تمرینی و یا کوتاه مدت بودن مصرف اترواستاتین باشد. اتوفاژی یکی دیگر از مسیرهای تجزیه کننده است که در تمام سلول های یوکاریوتی رخ می دهد و سیستم اصلی برای تخریب اجزای سیتوپلاسمی در سلول است. اتوفاژی برای هموستاز در سلول بسیار مهم است، زیرا پروتئین ها و اندامک ها را بازیافت می کند. علاوه بر این، اتوفاژی با جلوگیری از تجمع پروتئین های سمی و فعالیت در جنبه های مختلف ایمنی، از جمله از بین بردن میکروب های مهاجم و مشارکت آن در ارائه آنتی ژن، نقشی اساسی در محافظت از سلولی دارد. ماکرو اتوفاژی بهترین نوع مشخصه اتوفاژی است. در این حالت سلول یک محفظه جدا کننده غشای دوگانه به نام فاگوسوم تشکیل می دهد که به یک اتوفاگوزوم تبدیل می شود. پس از همجوشی با لیزوزوم ها، محتوای اتولیزوزوم

### نتیجه گیری

با توجه به اینکه اهمیت انجام فعالیت های ورزشی بر گونه های سالمند دارای دیابت نوع دو آشکار شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین تناوبی یا تناوبی در کنار مصرف مکمل آترواستاتین می تواند به کاهش شاخص های اتوفازی منجر گردد.

### تقدیر و تشکر

این تحقیق با تایید کمیته اخلاق در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری با شماره IR.IAU.SARI.REC.1398.54 انجام شد. بدین وسیله از کلیه افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

### References

- Habibi A, Nemadi-Vosoughi M, Habibi S, Mohammadi M. Quality of life and prevalence of chronic illnesses among elderly people: A cross-sectional survey. *J Health*. 2012;3(1):58-66.
- Gong Z, Muzumdar RH. Pancreatic function, type 2 diabetes, and metabolism in aging. *Int J Endocrinol*. 2012;2012.
- Pasiakos SM, Carbone JW. Assessment of skeletal muscle proteolysis and the regulatory response to nutrition and exercise. *IUBMB Life*. 2014;66(7):478-484.
- Pagano AF, Py G, Bernardi H, Candau RB, Sanchez AM. Autophagy and protein turnover signaling in slow-twitch muscle during exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2014;46(7):1314-1325.
- Barbosa MC, Grosso RA, Fader CM. Hallmarks of aging: an autophagic perspective. *Front Endocrinol*. 2019;9:790.
- Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*. 2016;21(1):1-14.
- Moscat J, Diaz-Meco MT, Albert A, Campuzano S. Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Mol Cell*. 2006;23(5):631-640.
- Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, et al. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J*. 2013;27(10):4184-4193.

مردان سالمند سبب افزایش معنی دار LC3II/I، Atg16-12 و Bcl-2 می شود، اما بیان p62 بطور معنی داری کاهش یافته است (۱۱، ۱۲). بنابراین تصور می شود که فعالیت های ورزشی در مهار اتوفازی نقش تعیین کننده دارد. جامارت و همکاران (۲۰۱۳) نتیجه گرفتند که تمرین با شدت پایین پس از ناشتایی سبب افزایش فعالیت اتوفازی در عضله اسکلتی می شود که این افزایش ناشی از کاهش فعالیت مسیر Akt در مقایسه با وضعیت سیری می باشد (۲۷). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل و بیماری، بیان mRNA P62 بطور معنی داری کاهش یافته است؛ اما این کاهش در بین گروه های تمرینی و نیز گروه های تمرینی با مصرف مکمل معنی دار نبود. بنظر می رسد که این نتایج تحت تاثیر روش شناسی پژوهشی است که مدت زمان دوره تمرینی ناکافی بوده است و یا اینکه میزان دوز مصرف آترواستاتین پایین است. تصور می شود که تمرین تناوبی یا تناوبی با مصرف مکمل آترواستاتین با اثرات ضد التهابی و ضد اکسایشی بر سلول عضلانی سبب کاهش فعالیت اتوفازی شده اند که به دنبال آن میزان بیان mRNA P62 در مقایسه با گروه بیمار بطور معنی داری پایین آمده است. در حقیقت فعالیت ورزشی با بهبود سیستم آنتی اکسیدانتی و کاهش رهاش سیتوکروم c شروع فرایند اتوفازی در عضله اسکلتی رت های دیابتی کاهش می دهد. با این حال گزارش شده است که میزان گونه های فعال اکسیژن در گونه های حیوانی و انسانی مبتلا به دیابت نوع ۲ بالا می باشد (۲۸). بنابراین تمرین تناوبی یا تناوبی با مصرف مکمل آترواستاتین توانسته است سبب کاهش شاخص های اتوفازی از جمله mRNA P62 گردد. محدودیت هایی نیز در تحقیق حاضر وجود داشت که از جمله می توان به عدم اندازه گیری دیگر شاخص های اتوفازی همچون LC3-II اشاره کرد. همچنین می توان به عدم اندازه گیری شاخص های مسیر اتوفازی PI3K-Akt-MTOR اشاره نمود. لذا مطالعه ای با اندازه گیری این شاخص ها در نمونه های سالمند دارای دیابت نوع ۲ پیشنهاد می شود.



9. Yan Z, Okutsu M, Akhtar YN, Lira VA. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2011;110(1):264-274.
10. Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A. PGC-1 $\alpha$  regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(2):E145-E161.
11. Mejías-Peña Y, Rodríguez-Miguel P, Fernandez-Gonzalo R, Martínez-Flórez S, Almar M, de Paz JA, et al. Effects of aerobic training on markers of autophagy in the elderly. *Age*. 2016;38(2):33.
12. Mejías-Peña Y, Estébanez B, Rodríguez-Miguel P, Fernandez-Gonzalo R, Almar M, de Paz JA, et al. Impact of resistance training on the autophagy-inflammation-apoptosis crosstalk in elderly subjects. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(2):408.
13. Brandt N, Nielsen L, Thiellesen Buch B, Gudiksen A, Ringholm S, Hellsten Y, et al. Impact of  $\beta$ -adrenergic signaling in PGC-1 $\alpha$ -mediated adaptations in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2017;314(1):E1-E20.
14. Brandt N, Dethlefsen MM, Bangsbo J, Pilegaard H. PGC-1 $\alpha$  and exercise intensity dependent adaptations in mouse skeletal muscle. *PloS One*. 2017;12(10):e0185993.
15. Yang B, Sun J, Yuan Y, Sun Z. Effects of atorvastatin on autophagy in skeletal muscles of diabetic rats. *J Diabetes Invest*. 2018;9(4):753-761.
16. Zhang N, Huan Y, Huang H, Song GM, Sun SJ, Shen ZF. Atorvastatin improves insulin sensitivity in mice with obesity induced by monosodium glutamate. *Acta Pharmacol Sinica*. 2010;31(1):35.
17. Zhang X, Markovic-Plese S. Statins' immunomodulatory potential against Th17 cell-mediated autoimmune response. *Immunol Res*. 2008;41(3):165-174.
18. Mahdian H, Farzanegi P, Farzaneh-Hessari A. The effect of combined therapy with resveratrol, and continuous and interval exercises on levels of apoptotic biomarkers in heart tissue of male rats with non-alcoholic fatty liver. *Feyz J Kashan Univ Med Sci*. 2018;22(5):469-477.
19. Heidari R. The effect of combined Atorvastatin and zinc sulfate on serum level of insulin, glucose, and histology of pancreas in streptozotocin-induced diabetic rats. *SSU J*. 2018;25(11):865-877.
20. Talaei A, Mahmoudpoor M, Shahdost M, . The Effect of Atorvastatin on Inflammatory Markers in Patients with Type Two Diabetes. *J Arak Univ Med Sci*. 1397;21(4):15.
21. Di Stasi SL, MacLeod TD, Winters JD, Binder-MacLeod SA. Effects of statins on skeletal muscle: a perspective for physical therapists. *Physic Ther*. 2010;90(10):1530-1542.
22. Liu HY, Han J, Cao SY, Hong T, Zhuo D, Shi J, et al. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem*. 2009;284(45):31484-31492.
23. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*. 2014;24(1):24-41.
24. Mulakkal NC, Nagy P, Takats S, Tusco R, Juhász G, Nezis IP. Autophagy in *Drosophila*: from historical studies to current knowledge. *BioMed Res Int*. 2014;2014.
25. Tarawan VM, Gunadi JW, Setiawan RL, Goenawan H, Meilina DE, Sipayung JA, et al. Alteration of autophagy gene expression by different intensity of exercise in gastrocnemius and soleus muscles of Wistar rats. *J Sports Sci Med*. 2019;18(1):146.
26. Spangenburg EE, Le Roith D, Ward CW, Bodine SC. A functional insulin-like growth factor receptor is not necessary for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *J Physiol*. 2008;586(1):283-291.
27. Jamart C, Naslain D, Gilson H, Francaux M. Higher activation of autophagy in skeletal muscle of mice during endurance exercise in the fasted state. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013.
28. Akopova O, Kolchinskaya L, Nosar V, Bouryi V, Mankovska I, Sagach V. Cytochrome C as an amplifier of ROS release in mitochondria. *ЮВІЛЕЙНІ ДАТИ*. 2012.
29. Valizadeh S. Comparison of the effect of two types of endurance and resistance training on the level of angiogenic factors in the heart in diabetic male rats. PhD Thesis in Sports Physiology. Kharazmi University, International Campus. 2015.
30. Ghadmagahi, A. The effect of an aerobic exercise course with and without cinnamon supplementation on some blood lipid parameters in type 2 diabetic men. Master Thesis in Sports Physiology. Mashhad Ferdowsi University 2012.
31. Azamian Jazi A, Haffezi MR, Opera H, Abdi H. The Effect of Endurance Exercise Training and Atorvastatin on VEGF in Rat Following Experimental Myocardial Infarction. *SJIMU*. 2016;24 (4):21-31.