



Research Article

## The Effect of Moderate Intensity Continuous Training on Skeletal Muscle Autophagy Biomarkers in Elderly Male Rats

Saghar Delshad <sup>1</sup>, Ali Yaghoubi <sup>2,\*</sup> , Najme Rezaeian <sup>2</sup>

<sup>1</sup> PhD Student in Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Science, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor in Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Science, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran

\* **Corresponding author:** Ali Yaghoubi, Assistant Professor in Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Science, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran. E-mail: [yaghoubiali65@gmail.com](mailto:yaghoubiali65@gmail.com)

DOI: [10.29252/nkjmd-120413](https://doi.org/10.29252/nkjmd-120413)

### How to Cite this Article:

Delshad S, Yaghoubi A, Rezaeian N. The Effect of Moderate Intensity Continuous Training on Skeletal Muscle Autophagy Biomarkers in Elderly Male Rats. *J North Khorasan Univ Med Sci.* 2021;**12**(4):94-99. DOI: 10.29252/nkjms-120413

Received: 20 Dec 2020

Accepted: 12 Jan 2021

### Keywords:

Exercise Training  
Autophagy  
Sestrins 2  
Aging

### Abstract

**Introduction:** Aging is associated with muscle atrophy or sarcopenia. Autophagy is a process that reduces muscle atrophy; however, the efficiency of this process decreases with age. Exercise improves sarcopenia and the process of autophagy by activating signaling pathways. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of moderate-intensity continuous training (MICT) on protein levels of ULK1, beclin1, Sestrins2, and AMPK phosphorylation in skeletal muscle of elderly male rats.

**Methods:** Twenty elderly male Wistar rats (18 months years old) were randomly divided into two groups of 1) MCIT 2) control (10 ones in each). MICT protocol included eight weeks of running on treadmill at intensity of 65-70 percentage of Vo2max with speed of 18-29 meter per minute for 25-40 minutes per sessions and five sessions per week. Muscle tissue samples were taken from gastrocnemius muscle at 48 hours after the last training session. Independent t-test was used to analyze the data and P value <0.05 considered significant.

**Results:** Beclin1 protein levels were significantly increased in the MICT group compared to the control group (P = 0.001). However, the protein levels of ULK1, Sestrins2 and p-AMPK in the MICT group did not change significantly compared to the control group (P > 0.05).

**Conclusions:** It seems that MICT is not a suitable training method to activate autophagic pathways and subsequently improve the effects of aging in the skeletal muscles of elderly rats.



## اثر تمرین تداومی با شدت متوسط بر شاخص‌های اتوفازی عضله اسکلتی در رت‌های نر سالمند نژاد ویستار

ساغر دلشاد<sup>۱</sup>، علی یعقوبی<sup>۲\*</sup> , نجمه رضائیان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گرایش عصب و عضله، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واجد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران

<sup>۲</sup> استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران

\* نویسنده مسئول: علی یعقوبی، استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بجنورد،

بجنورد، ایران. ایمیل: yaghoubiali65@gmail.com

DOI: 10.29252/nkjs-120413

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <p><b>چکیده</b></p> <p><b>مقدمه:</b> سالمندی با آتروفی عضلانی و یا سارکوپنیا همراه است. اتوفازی فرآیندی است که موجب کاهش آتروفی عضلانی می‌شود با این حال، کارایی این فرآیند با افزایش سن کاهش می‌یابد. فعالیت ورزشی با فعال سازی مسیرهای سیگنالینگ موجب بهبود سارکوپنیا و روند اتوفازی می‌شود. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین تداومی با شدت متوسط (MICT) بر سطوح ULK1، beclin1، سیسترتین ۲ و فسفوریلاسیون AMPK در عضله اسکلتی رت‌های نر سالمند بود.</p> <p><b>روش کار:</b> ۲۰ سر رت سالمند نژاد ویستار (۱۸ ماهه) به دو گروه (۱) MCIT و (۲) کنترل (۱۰ نفر در هر گروه) تقسیم شدند. پروتکل MCIT شامل هشت هفته تمرینات دویدن روی تردمیل با شدت ۶۵-۷۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه با سرعت ۱۸-۲۰ متر بر دقیقه برای ۴۰-۲۵ دقیقه در هر جلسه و پنج جلسه در هفته بود. نمونه برداری از بافت عضله دوقلو ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تی مستقل در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ انجام شد.</p> <p><b>یافته‌ها:</b> مقادیر پروتئینی beclin1 در گروه MICT نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت (<math>P &lt; 0/05</math>). اما، مقادیر پروتئینی ULK1، سیسترتین ۲ و p-AMPK در گروه MICT نسبت به گروه کنترل تغییرات معنی داری نداشت (<math>P &gt; 0/05</math>).</p> <p><b>نتیجه‌گیری:</b> به نظر می‌رسد، احتمالاً MICT شیوه تمرینی مناسبی به منظور فعال سازی مسیرهای اتوفازی و متعاقباً بهبود عوارض ناشی از افزایش سن از جمله سارکوپنیا در عضلات اسکلتی رت‌های سالمند نمی‌باشد.</p> | <p>تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۳۰</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۳</p> |
| <p><b>واژگان کلیدی:</b></p> <p>تمرین تداومی</p> <p>اتوفازی</p> <p>سیسترتین ۲</p> <p>سالمندی</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                |

### مقدمه

دارد [۱]. هدف راپاماسین در پستانداران (mTOR) می‌تواند ULK1 را در ریشه سرین ۷۵۷ فسفوریله کرده و از آغاز اتوفازی جلوگیری کند. کمپلکس ۱-mTOR (mTORC1) مهم‌ترین تنظیم‌گر اتوفازی در عضلات اسکلتی است [۵]. زمانی که سطوح انرژی کاهش می‌یابد، پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین منوفسفات (AMPK) می‌تواند مستقیماً Raptor را در ریشه‌های سرین ۷۲۲ و ۷۹۲ فسفوریله و سیگنالینگ mTOR را مهار کند و به دنبال آن فسفوریلاسیون ULK1 را نیز غیرفعال سازد، در نتیجه اتوفازی را فعال می‌کند [۲]. علاوه بر این، سیستم‌های مارکرهای مهمی هستند که در تعامل با ULK1 و Beclin1 عملکرد اتوفازی را تقویت می‌نمایند [۶]. سیستم‌های خانواده‌ای از پروتئین‌های پاسخگو به استرس با خواص آنتی اکسیدانی اند [۷] و دارای سه ایزوفرم ۱، ۲ و ۳ می‌باشند [۸] و به وضوح در تنظیم مسیر سیگنالینگ mTOR، AMPK درگیر می‌باشند [۷] و فرآیند پیری را کنترل و نقش ضد پیری دارند [۹].

سالمندی با عدم تعادل بین نرخ سنتز و تخریب پروتئین و سارکوپنیا، همراه است و موجب آتروفی تدریجی عضلات اسکلتی می‌شود [۱]. اتوفازی در کنترل توده عضلات اسکلتی در شرایط کاتابولیک نقش اساسی داشته و موجب حفظ هموستاز و یکپارچگی عضلات اسکلتی می‌شود [۲]. تنظیم اتوفازی فرآیند پیچیده‌ای است که با اقدامات هماهنگ ژن‌های اتوفازی صورت می‌گیرد [۳]. افزایش سن با اختلال در عملکردهای خاص برخی از سلول‌ها و بافت‌ها موجب اختلال در عملکرد سیستم‌های اتوفازی می‌شود [۳] و متعاقباً کارایی سیستم اتوفازی در تخریب سلولی کاهش می‌یابد [۱]. حضور چندین کمپلکس در آغاز اتوفازی ضروری است که از میان آن‌ها می‌توان به کیناز فعال‌کننده اتوفازی-۱ شبه ۵۲ Unc- (ULK1) و beclin1 اشاره کرد [۳]. عملکرد ULK1 بسته به جایگاه فسفوریلاسیون آن متفاوت است [۴]. فسفوریلاسیون ULK1 در زیرواحد سرین ۵۵۵ محرک مهم اتوفازی می‌باشد، این در حالی است که فسفوریلاسیون آن در زیرواحد سرین ۷۵۷ تأثیر مهاری بر اتوفازی

دویدن روی نوار گردان شرکت کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و پس از ناشتایی شبانه، تمامی موش‌های صحرایی نر سالمند بی‌هوش شده و بافت‌برداری (عضله دوقلو) صورت گرفت. لازم به ذکر است که تمامی موش‌های صحرایی در طول مداخله رژیم غذایی استاندارد را مصرف کردند. تمامی مداخلات حیوانی مطابق با دستورالعمل‌های اخلاقی مؤسسات ملی برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد بجنورد (با کد ۱۳۹۸، ۰۱۰ IR.IAU.BOJNOURD.REC.) انجام شد.

### پروتکل تمرین

پروتکل MICT به مدت هشت هفته و ۵ جلسه در هفته بر روی نوارگردان (شیب صفر درجه) اجرا شد. این پروتکل با شدت ۶۵ تا ۷۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه بود. سرعت نوارگردان از ۱۸ متر بر دقیقه به ۲۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین نیز از ۲۵ دقیقه به ۴۰ دقیقه رسید. همچنین، ۱۰ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن با (دویدن با شدت ۵۰-۴۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) در ابتدا و انتهای هر جلسه تمرینی اجرا شد (۱۸). برای برآورد اکسیژن مصرفی بیشینه از آزمون حداکثر سرعت دویدن با استفاده از نوارگردان به روش غیرمستقیم انجام شد. بر این اساس، بعد از ۱۰ دقیقه گرم کردن با شدت پایین، آزمون دویدن موش‌های صحرایی شروع و سرعت نوارگردان هر ۲ دقیقه یک‌بار به میزان ۰/۳ متر بر ثانیه (۱/۸ تا ۲ متر بر دقیقه) افزایش یافت، تا جایی که حیوانات دیگر قادر به دویدن نباشند. سرعتی که در آن اکسیژن مصرفی بیشینه بدست می‌آید به‌عنوان سرعت ماکزیمم تعریف شد.

از روش وسترن بلات برای اندازه‌گیری مقادیر پروتئینی beclin1، ULK1، p-AMPK و سیستترین ۲ از روش وسترن بلات استفاده شد. برای استخراج پروتئین‌های عضله دوقلو از بافر RIPA حاوی ۰/۰۵ میلی مولار بافر تریس (pH برابر ۸)، ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد EGTA، یک درصد SDS به اضافه ۰/۱ درصد آنتی پروتئاز کوکتیل (ROCHE) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی گرم بافت در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر حاوی آنتی پروتئاز توسط یک هموژنایزر دستی هموژن شد و نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد گذاشته شدند و سپس در یک سانتریفوژ یخچال دار (rfroil14bo, sw) در دور ۱۲۰۰۰ و ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری شده و غلظت پروتئین آن با کیت تعیین کننده پروتئین (Bio-Rad) اندازه‌گیری گردید (در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد). در نهایت در ۲۰ درجه زیر صفر درجه فریزر نگهداری شد. سپس هموژن به دست آمده به نسبت ۱:۱ با نمونه لودینگ بافر (۵۰mM تریس-کلرید هیدروژن، ۲ درصد سدیم دو دیسیل سولفات، ۱۰ درصد گلیسرول، ۵ درصد بتا-مرکاپتواتانول و ۰/۰۵ درصد برموفنول آبی) مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد تا تمام پروتئین‌ها کاملاً دناتوره شوند. پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل SDS-polyacrylamide جدا شده و به غشای نیترو سلولز منتقل شدند. غشا به مدت ۱ ساعت در ۵ درصد BSA در Tris-Buffered Saline و ۰/۱ درصد Tween 20 (TBST) مسدود شد و در آنتی‌بادی اولیه (۱:۵۰۰) انکوبه شد.

فعالیت ورزشی منظم بهترین روش درمانی موجود در کاهش توسعه سارکوپنیا ناشی از افزایش سن است [۲]. با وجود آنکه ارتباطی بین اتوفازی و فعالیت بدنی منظم گزارش شده است اما همچنان در خصوص سازوکارهای اساسی مولکولی مرتبط با آن بررسی‌های بسیاری در حال انجام می‌باشد. به منظور حفظ هموستاز انرژی سلولی و همچنین نوسازی کافی پروتئین‌ها و اندامک‌ها به دنبال فعالیت ورزشی، فعال سازی اتوفازی در عضلات اسکلتی در هنگام انقباض عضلات اهمیت دارد [۳]. تنظیم افزایشی نشانگرهای زیستی اتوفازی در عضلات اسکلتی پس از دویدن فوق استقامتی [۱۰] یا دوچرخه سواری با شدت بالا [۱۱] و فعالیت ورزشی مقاومتی [۱۲] گزارش شده است. علاوه بر این، تمرینات هوازی تداومی و اینتروال موجب بهبود اتوفازی در لنفوسیت‌های CD4 (۱۳) می‌شوند. اثرات ضد التهابی فعالیت ورزشی به طور بالقوه می‌تواند با تغییرات در ظرفیت اتوفازی در افراد سالخورده مرتبط باشد [۳]. به علاوه فعالیت ورزشی طولانی مدت به طور قابل توجهی بیان پروتئین سیستترین ۲ و ۳ را افزایش می‌دهد. تعامل بین AMPK ناشی از فعالیت ورزشی و سیستترین می‌تواند در فعال سازی اتوفازی ناشی از اثرات متابولیک فعالیت ورزشی دخیل باشد [۷]. اخیراً مطالعات نشان داده‌اند که فعال سازی روند اتوفازی در عضله اسکلتی بستگی به شدت و مدت فعالیت ورزشی دارد [۱۳]. با این وجود نتایج متناقضی در خصوص تأثیر فعالیت ورزشی مبنی بر افزایش [۱] اختلالات مرتبط با سن در سیستم اتوفازی و یا کاهش آن مشاهده می‌شود. پس از ۸ هفته تمرین هوازی بیان ULK1 فسفوریله شده در زیرواحد سرین ۷۵۷ در پژوهش مجیاس و همکاران کاهش [۳] یافت و در پژوهش وایت و همکاران (۲۰۱۶) [۱۴] عدم وجود تنظیم ULK1 در سرین ۷۵۷ مشاهده شد. بنابراین احتمالاً بسته به نوع فعالیت ورزشی پاسخ‌های اتوفازی متفاوتی در عضلات اسکلتی رخ می‌دهد [۲]. به علاوه مکانیسم‌های سلولی دقیق مؤثر در کاهش روند پاتولوژیک سارکوپنی به طور کامل مشخص نشده است. بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین تداومی با شدت متوسط بر بیومارکرهای اتوفازی عضله اسکلتی در رت‌های نر سالمند بود.

### روش کار

روش پژوهش حاضر از نوع تجربی با طرح پس آزمون به همراه گروه کنترل بود. مطالعه حاضر در دانشگاه علوم پزشکی بجنورد در پاییز- زمستان سال ۱۳۹۸ انجام شده است. برای این منظور، ۲۰ سر موش صحرایی سالمند نر نژاد ویستار [۱۵] ماهه [۱۶] از آزمایشگاه حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت خریداری شده و مطابق با خط‌مشی انجمن ایرانیان حمایت از حیوانات آزمایشگاهی در قفس‌های ۴ تایی تحت شرایط استاندارد (چرخه ۱۲ ساعته روشنایی- تاریکی، دمای ۲۵±۲ درجه سانتی گراد) با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. پس از یک هفته آشنایی و سازگاری با محیط جدید، موش‌های صحرایی نر سالمند به‌طور تصادفی (به روش تصادفی ساده) به دو گروه تجربی و کنترل با تعداد برابر در هر گروه (۱۰ سر) تقسیم شدند. در ادامه، موش‌های صحرایی نر سالمند در گروه تجربی با راه رفتن و دویدن بر روی نوار گردان آشنا شدند. پس از یک هفته آشنا سازی، حداکثر سرعت دویدن با استفاده از آزمون عملکرد ورزشی مدرج برآورد شد. آن گاه، موش‌های گروه تجربی در هشت هفته تمرینات تداومی شدید

## روش آماری

از آزمون شاپیرو-ویلک جهت بررسی توزیع طبیعی داده‌ها استفاده شد. برای مقایسه گروه‌های تحقیق، از آزمون تی مستقل استفاده گردید. اطلاعات موردنیاز پس از جمع‌آوری، توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ در سطح معنی داری  $P \leq 0.05$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

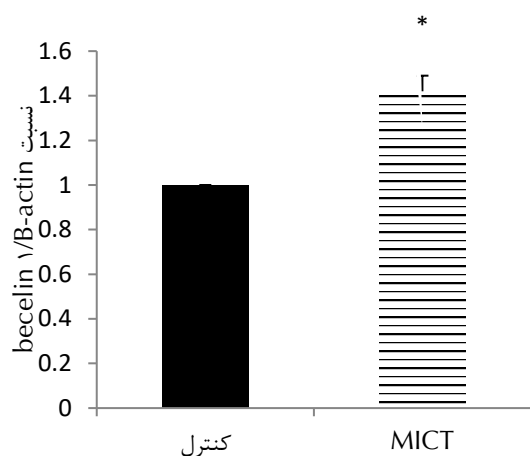
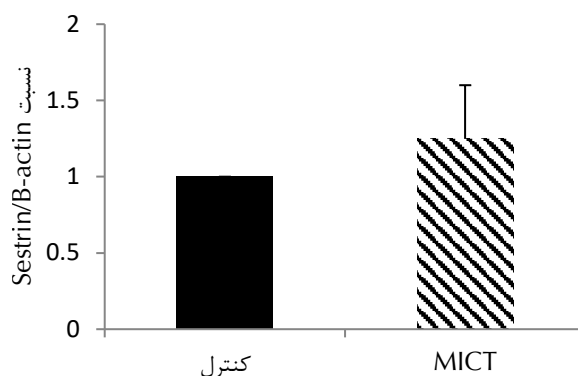
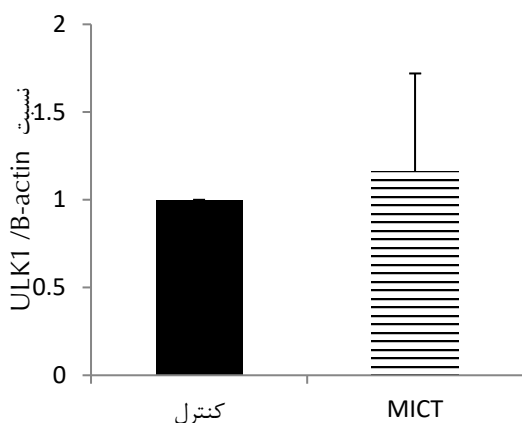
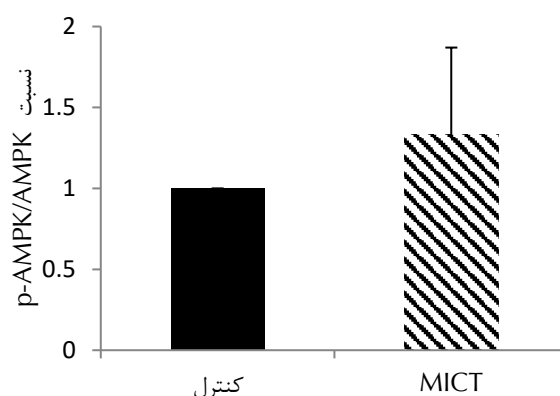
## یافته‌ها

در جدول ۱ مقایسه میانگین و انحراف معیار و همچنین یافته‌های آزمون آماری در خصوص اثر MICT بر فاکتورهای p-AMPK، سیسترن ۱، beclin ۱ و ULK ۱ در گروه‌های پژوهش ارائه شده است.

انکوباسیون در آنتی‌بادی ثانویه روز بعد به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق در ۴ درصد TBST انجام شد. پروتئین‌ها با یک واکنش شیمیایی لومینسانس (ECL) و با تجزیه و تحلیل densitometry با نرم افزار Image J اندازه‌گیری شدند. آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه sc-۳۹۰۹۰۴: ULK1 (F-۴) (D-۶) sc-۷۴۴۶۱: BECN1 (E-۸) sc-۴۸۳۴۱: AMPKα1/2 (p-AMPKα 1/2 (Thr 172) sc-۳۳۵۲۴: β-Actin(c4) sc-۱۰۱۲۴۹: SESN2 (41-K) sc-۴۷۷۷۸: mouse anti- m-IgGkBP-HRP sc-۵۱۶۱۰۲ و sc-۲۳۵۷: rabbit IgG-HRP Santa Cruz Biotechnology, Inc شرکت از شرکت استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱. میانگین  $\pm$  انحراف معیار و نتایج آزمون تی مستقل برای متغیرهای وابسته در گروه‌های پژوهش

| شاخص     | MICT            | کنترل | ارزش t | ارزش P    |
|----------|-----------------|-------|--------|-----------|
| p-AMPK   | ۱/۳۳ $\pm$ ۰/۵۴ | ۱     | ۱/۴۹   | ۰/۱۹      |
| سیسترن ۲ | ۱/۲۵ $\pm$ ۰/۳۵ | ۱     | ۱/۷۲   | ۰/۱۴      |
| beclin ۱ | ۱/۴۲ $\pm$ ۰/۰۷ | ۱     | ۱۳/۱۳  | * ۰/۰۰۱ < |
| ULK ۱    | ۱/۱۶ $\pm$ ۰/۵۶ | ۱     | ۰/۷۰   | ۰/۵۱      |

نمودار ۳. میانگین  $\pm$  انحراف معیار مقادیر پروتئینی beclin ۱: MICT: تمرین تناوبی با شدت متوسط \* معنی داری نسبت به گروه کنترل ( $P < 0.05$ )نمودار ۱. میانگین  $\pm$  انحراف معیار مقادیر پروتئینی سیسترن ۲: MICT: تمرین تناوبی با شدت متوسطنمودار ۴. میانگین  $\pm$  انحراف معیار مقادیر پروتئینی ULK ۱: MICT: تمرین تناوبی با شدت متوسطنمودار ۲. میانگین  $\pm$  انحراف معیار مقادیر پروتئینی فسفریله AMPK: MICT: تمرین تناوبی با شدت متوسط

بنابر نتایج به دست آمده از آزمون تی مستقل، انجام هشت هفته MICT موجب افزایش سطوح beclin ۱، ULK ۱، سیسترن ۲ و

فسفوریلایسون AMPK نسبت به گروه کنترل شد، هرچند که این افزایش تنها در سطوح beclin1 ( $P=0.01$ ) نسبت به گروه کنترل معنی دار بود (جدول ۱). نمودارهای ۱ تا ۴ به میانگین  $\pm$  انحراف معیار متغیرهای مورد بررسی تحقیق در دو گروه تجربی و کنترل اشاره دارد.

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد اجرای هشت هفته تمرین تداومی با شدت متوسط موجب افزایش معنی دار پروتئین beclin1 و افزایش غیرمعنی دار پروتئین‌های سیسترتین ۲، AMPK و ULK1 در عضله دوقلوی رت های نر سالمند شد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد اجرای هشت هفته تمرین تداومی با شدت متوسط با افزایش معنی داری در مقادیر پروتئینی beclin1 همراه بود. یافته‌های این پژوهش با یافته‌های مجیاس و همکاران (۲۰۱۶) [۳]، لیرا و همکاران (۲۰۱۳) [۱۷]، کیم و همکاران (۲۰۱۳) [۱] و ونگ و همکاران (۲۰۱۳) [۱۸] در خصوص افزایش معنی دار سطوح beclin1، همسو و با یافته‌های چو و همکاران (۲۰۱۷) [۱۹] ناهمسو می‌باشد. چو و همکاران به بررسی چگونگی اثرگذاری ۱۰ هفته تمرین استقامتی بر روی رت‌هایی پرداختند که ۳۵ هفته رژیم غذایی پرچرب مصرف کرده بودند و نمونه‌های خونی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. این پژوهشگران عدم تغییر معنادار در سطوح beclin1 را گزارش کردند. احتمالاً عدم تغییر beclin1 حاکی از آن است که رژیم غذایی پرچرب تأثیری بر آغاز روند اتوفژی ندارد [۱۹]. به علاوه یافته‌های به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد پس از هشت هفته تمرین تداومی با شدت متوسط تغییر معناداری در مقادیر پروتئینی ULK1 در عضله اسکلتی مشاهده نشد که این نتایج با یافته‌های وایت و همکاران (۲۰۱۶) [۱۴] همسو و با یافته‌های مجیاس و همکاران (۲۰۱۶) [۳] و کاوون و همکاران (۲۰۱۸) [۲۰] ناهمسو است. وایت و همکاران با بررسی ۳۴ هفته فعالیت ورزشی دوچرخه مقاومتی داوطلبانه در موش‌های میانسال نشان دادند در مقادیر ULK1 تغییری ایجاد نشد. این پژوهشگران عدم تغییر در مقادیر ULK1 سرین ۷۵۷ را نشان دادند. باتوجه به آنکه فسفوریلایسون سرین ۷۵۷ توسط mTORC1 صورت می‌پذیرد بنابراین عدم تغییر در آن با افزایش سن نشان از عدم تغییر در فعالیت mTORC1 می‌باشد [۱۴]. مجیاس و همکاران نیز نشان دادند هشت هفته تمرین هوازی موجب کاهش فسفوریلایسون ULK1 در آمینواسید سرین ۷۵۷ می‌شود که نقش مهمی در اتوفژی دارد. این امر حاکی از نقش فعالیت ورزشی هوازی در تحریک اتوفژی است [۳]. همچنین نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر تغییر معناداری در سطوح پروتئینی سیسترتین ۲ نشان داد که با یافته‌های مطالعه لوسیانو و همکاران (۲۰۱۷) [۲۱] و لئو و همکاران (۲۰۱۵) [۷] ناهمسو می‌باشد. سیسترتین‌ها فعال سازی AMPK را افزایش می‌دهند [۷]. لنه‌اره و همکاران بیان داشتند مقادیر پروتئینی سیسترتین ۲، پس از فعالیت هوازی حاد (۲ جلسه یک ساعته شنا کردن با ۲۰ دقیقه استراحت مابین آنها) در موش‌های مسن افزایش یافت. فعالیت ورزشی حاد با القاء استرس اکسیداتیو به عنوان محرکی اساسی در تجمع سیسترتین موجب افزایش سیسترتین در ۸ ساعت پس از اتمام فعالیت در مطالعه این پژوهشگران شده است [۲۲]. از آنجا که مطالعه حاضر به بررسی تأثیر فعالیت هوازی مزمن بر بیومارکرهای اتوفژی پرداخته است پس به نظر می‌رسد سازگاری‌های ایجاد شده در طی ۸ هفته تمرین موجب کاهش

اثر استرس اکسیداتیو، کاهش تحریک و عدم تغییر در مقادیر سیسترتین ۲ شده باشد. لوسیانو و همکاران کاهش سطوح سیسترتین ۲ را پس از ۱۲ هفته فعالیت ورزشی مقاومتی نشان دادند به طوریکه متناسب با افزایش شدت تمرین کاهش در سطوح سیسترتین ۲ نیز بیشتر می‌شد [۲۱]. از دلایل این کاهش می‌توان به تفاوت در شدت و نوع فعالیت ورزشی در مقابل پژوهش حاضر اشاره کرد. با افزایش شدت تمرینات مقاومتی mTOR فعال شده و ممکن است با مهار فسفوریلایسون AMPK، که در فعالیت‌های استقامتی با شدت پایین فعال می‌شود، موجب کاهش مقادیر سیسترتین ۲ شده باشد. لئو و همکاران نشان دادند میزان سیسترتین ۲ پس از یک جلسه فعالیت ورزشی حاد و طولانی مدت ۶ هفته‌ای در موش‌های نر چاق افزایش یافت [۷]. با توجه به اینکه سیسترتین‌ها پروتئین‌هایی هستند که در شرایط استرس بیان می‌شوند [۲۳] و چاقی خود عاملی بر تحریک استرس اکسیداتیو است به نظر می‌رسد در این نمونه‌ها محرک تولید سیسترتین ۲ بیشتر از پژوهش حاضر بوده است.

همچنین مطالعه حاضر تغییر معناداری در سطوح AMPK نشان نداد که با یافته‌های کیم و همکاران (۲۰۱۳) [۱]، وانگ و همکاران (۲۰۱۸) [۲۴] کاوون و همکاران (۲۰۱۸) [۲۰] ناهمسو می‌باشد. گزارشات موجود از نقش AMPK در تنظیم اتوفژی در طی سالمندی سخن به میان آورده‌اند [۲۵]. AMPK با فسفوریلایسون ULK1 در ریشه‌های سرین ۵۵۵ [۲۵] و ۳۱۷ [۴] و همچنین با افزایش بیان ژنی سیسترتین ۲ [۲۴] نقش مهمی در اتوفژی ایفا می‌کند. کیم و همکاران افزایش فسفوریلایسون و بیان AMPK را پس از هشت هفته تمرین استقامتی دوییدن بر روی تردمیل در موش‌های مسن گزارش کردند [۱]. راجی و هه (۲۰۱۷) در یک مقاله مروری نشان دادند برخی از مطالعات که بلافاصله پس از فعالیت ورزشی به بررسی بیومارکرهای اتوفژی پرداختند اذعان داشتند که شدت فعالیت ورزشی، و نه مدت، تعیین کننده اصلی در میزان القای اتوفژی باشد، درحالی که روشن نیست که آیا این تغییرات در حین مرحله ریکاوری هم دیده می‌شود یا خیر [۲۶]. به نظر می‌رسد شدت فعالیت مورد بررسی در پژوهش حاضر به اندازه کافی نبوده و نتوانسته موجب افزایش فعالیت AMPK به میزان مورد نیاز شود. احتمالاً عدم تغییر معنی دار در فسفوریلایسون AMPK به عنوان فاکتور بالادست در افزایش سیسترتین ۲، عاملی بر عدم تغییر در مقادیر سیسترتین ۲ در پژوهش حاضر باشد.

## نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد تمرینات تداومی با شدت متوسط تنها توانست منجر به افزایش فاکتور beclin1 در عضله اسکلتی شود و سایر مارکر های درگیر در اتوفژی را تحت تأثیر قرار نداد. در مجموع، با توجه به عدم تأثیر گذاری این شیوه تمرینی بر سایر فاکتورهای اساسی دخیل در مسیر اتوفژی و از طرفی اهمیت شدت تمرین در فعال سازی این فاکتورها، به نظر می‌رسد تمرین تداومی با شدت متوسط تأثیر چشمگیری بر بهبودی عوامل دخیل در پیشبرد سارکوپنی ناشی از سالمندی نداشته باشد.

## ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر مورد تأیید کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد بجنورد با کد IR.IAU.BOJNOURD.REC.۱۳۹۸،۰۱۰ می‌باشد.

## حامی مالی

مقاله حاضر مستخرج از رساله دکتری تخصصی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد بجنورد می باشد.

## مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش مقاله حاضر مشارکت داشتند.

## سپاس گزاری

بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی را از خانم دکتر پوران کریمی برای همکاری در اجرای مراحل آزمایشگاهی اعلام می داریم.

## تضاد منافع

هیچ نوع تضاد منافی وجود ندارد.

## References

- Kim YA, Kim YS, Oh SL, Kim HJ, Song W. Autophagic response to exercise training in skeletal muscle with age. *J Physiol Biochem*. 2013;69(4):697-705. doi: 10.1007/s13105-013-0246-7 pmid: 23471597
- Liang J, Zeng Z, Zhang Y, Chen N. Regulatory role of exercise-induced autophagy for sarcopenia. *Exp Gerontol*. 2020;130:110789. doi: 10.1016/j.exger.2019.110789 pmid: 31765742
- Mejias-Pena Y, Rodriguez-Miguel P, Fernandez-Gonzalo R, Martinez-Florez S, Almar M, de Paz JA, et al. Effects of aerobic training on markers of autophagy in the elderly. *Age (Dordr)*. 2016;38(2):33. doi: 10.1007/s11357-016-9897-y pmid: 26940016
- Moller AB, Vendelbo MH, Christensen B, Clasen BF, Bak AM, Jorgensen JO, et al. Physical exercise increases autophagic signaling through ULK1 in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2015;118(8):971-9. doi: 10.1152/jappphysiol.01116.2014 pmid: 25678702
- 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):1314-25. doi: 10.1249/MSS.0000000000000237 pmid: 24389528
- Kumar A, Shaha C. SESN2 facilitates mitophagy by helping Parkin translocation through ULK1 mediated Beclin1 phosphorylation. *Sci Report*. 2018;8(1):1-16. doi: 10.9734/JSRR/2018/41842
- Liu X, Niu Y, Yuan H, Huang J, Fu L. AMPK binds to Sestrins and mediates the effect of exercise to increase insulin-sensitivity through autophagy. *Metabolism*. 2015;64(6):658-65. doi: 10.1016/j.metabol.2015.01.015 pmid: 25672217
- Lee JH, Budanov AV, Karin M. Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging. *Cell Metab*. 2013;18(6):792-801. doi: 10.1016/j.cmet.2013.08.018 pmid: 24055102
- Segales J, Perdiguero E, Serrano AL, Sousa-Victor P, Ortet L, Jordi M, et al. Sestrin prevents atrophy of disused and aging muscles by integrating anabolic and catabolic signals. *Nat Commun*. 2020;11(1):189. doi: 10.1038/s41467-019-13832-9 pmid: 31929511
- Jamart C, Francaux M, Millet GY, Deldicque L, Frere D, Feasson L. Modulation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways during ultra-endurance running. *J Appl Physiol* (1985). 2012;112(9):1529-37. doi: 10.1152/jappphysiol.00952.2011 pmid: 22345427
- Schwalm C, Jamart C, Benoit N, Naslain D, Premont C, Prevot J, et al. Activation of autophagy in human skeletal muscle is dependent on exercise intensity and AMPK activation. *FASEB J*. 2015;29(8):3515-26. doi: 10.1096/fj.14-267187 pmid: 25957282
- Luo L, Lu AM, Wang Y, Hong A, Chen Y, Hu J, et al. Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. *Exp Gerontol*. 2013;48(4):427-36. doi: 10.1016/j.exger.2013.02.009 pmid: 23419688
- Park SS, Seo YK, Kwon KS. Sarcopenia targeting with autophagy mechanism by exercise. *BMB Rep*. 2019;52(1):64-9. pmid: 30526769
- White Z, Terrill J, White RB, McMahon C, Sheard P, Grounds MD, et al. Voluntary resistance wheel exercise from mid-life prevents sarcopenia and increases markers of mitochondrial function and autophagy in muscles of old male and female C57BL/6J mice. *Skelet Muscle*. 2016;6(1):45. doi: 10.1186/s13395-016-0117-3 pmid: 27964759
- Hafstad AD, Lund J, Hadler-Olsen E, Hoper AC, Larsen TS, Aasum E. High- and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. *Diabetes*. 2013;62(7):2287-94. doi: 10.2337/db12-1580 pmid: 23493573
- Ziaaldini MM, Koltai E, Csende Z, Goto S, Boldogh I, Taylor AW, et al. Exercise training increases anabolic and attenuates catabolic and apoptotic processes in aged skeletal muscle of male rats. *Exp Gerontol*. 2015;67:9-14. doi: 10.1016/j.exger.2015.04.008 pmid: 25910622
- 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):4184-93. doi: 10.1096/fj.13-228486 pmid: 23825228
- Weng TP, Huang SC, Chuang YF, Wang JS. Effects of interval and continuous exercise training on CD4 lymphocyte apoptotic and autophagic responses to hypoxic stress in sedentary men. *PLoS One*. 2013;8(11):e80248. doi: 10.1371/journal.pone.0080248 pmid: 24236174
- Cho DK, Choi DH, Cho JY. Effect of treadmill exercise on skeletal muscle autophagy in rats with obesity induced by a high-fat diet. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2017;21(3):26-34. doi: 10.20463/jenb.2017.0013 pmid: 29036763
- Kwon I, Jang Y, Cho JY, Jang YC, Lee Y. Long-term resistance exercise-induced muscular hypertrophy is associated with autophagy modulation in rats. *J Physiol Sci*. 2018;68(3):269-80. doi: 10.1007/s12576-017-0531-2 pmid: 28213823
- Luciano TF, Marques SO, Pieri BL, de Souza DR, Araujo LV, Nesi RT, et al. Responses of skeletal muscle hypertrophy in Wistar rats to different resistance exercise models. *Physiol Res*. 2017;66(2):317-23. doi: 10.33549/physiolres.933256 pmid: 27982685
- Lenhare L, Crisol BM, Silva VRR, Katashima CK, Cordeiro AV, Pereira KD, et al. Physical exercise increases Sestrin 2 protein levels and induces autophagy in the skeletal muscle of old mice. *Exp Gerontol*. 2017;97:17-21. doi: 10.1016/j.exger.2017.07.009 pmid: 28729213
- Budanov AV. Stress-responsive sestrins link p53 with redox regulation and mammalian target of rapamycin signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(6):1679-90. doi: 10.1089/ars.2010.3530 pmid: 20712410
- Wang T, Niu Y, Liu S, Yuan H, Liu X, Fu L. Exercise improves glucose uptake in murine myotubes through the AMPKalpha2-mediated induction of Sestrins. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018;1864(10):3368-77. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.07.023 pmid: 30048751
- Fritzen AM, Frosig C, Jeppesen J, Jensen TE, Lundsgaard AM, Serup AK, et al. Role of AMPK in regulation of LC3 lipidation as a marker of autophagy in skeletal muscle. *Cell Signal*. 2016;28(6):663-74. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.03.005 pmid: 26976209
- Rocchi A, He C. Regulation of Exercise-Induced Autophagy in Skeletal Muscle. *Curr Pathobiol Rep*. 2017;5(2):177-86. doi: 10.1007/s40139-017-0135-9 pmid: 29057166