

The Interaction Effect of Aerobic Exercise and Atorvastatin Consumption on the expression level of MFN1/2 and DRP1 in Hepatocytes of the Rat Liver with Type 2 Diabetes

Zolfali Pourfar M¹, Rahmaninia F^{*2}, Farzangi P³

1. Department of Sports Physiology, University Campus 2, University of Guilan, Rasht, Iran

2. Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

* **Corresponding author.** Tel: +981333690260, Fax: +986753690133, E-mail: frahmani2001@yahoo.com

Received: Jun 12, 2022

Accepted: Aug 3, 2022

ABSTRACT

Background & objectives: Dynamic disorders of mitochondria cause the pathogenesis of many diseases, such as type 2 diabetes. Therefore, the aim of this study was to investigate the interactive effect of aerobic exercises and atorvastatin consumption on the expression of MFN1/2 and DRP1 in hepatocytes of rat liver with type 2 diabetes.

Methods: In this experimental study, 25 male rats were divided into 5 equal groups: diabetes, healthy control, persistence+diabetes, atorvastatin+diabetes, persistence+atorvastatin+diabetes. Type 2 diabetes was induced by streptozotocin (STZ) in mice. The training groups performed the running program on the treadmill for eight weeks. Atorvastatin and atorvastatin-exercise groups received atorvastatin (10 mg/kg) by gavage. 48 hours after the last training session, the rats were dissected; their liver tissue was removed and immediately frozen in liquid nitrogen solution at a temperature of minus 80 ° C to measure MFN1/2 and DRP1. One-way analysis of variance and Tukey post hoc test were used for statistical analysis at a significance level of $p < 0.05$.

Results: The results showed that induction of type 2 diabetes decreased the expression of MFN1/2 and increased DRP1 compared to the healthy group. After eight weeks of intervention, a significant increase was observed in the expression level of MFN1 ($p < 0.05$), but this increase was not significant in MFN2 and there was no significant difference in the expression of factors between the groups. Also, after eight weeks, a significant decrease in DRP1 gene expression was observed ($p < 0.05$). This decrease was significant in comparison with the combined groups compared to the patient group.

Conclusion: It is possible that a combination of aerobic exercises and atorvastatin may positively regulate the expression of genes related to mitochondrial dynamics in diabetes.

Keywords: Aerobic Exercises; Atorvastatin; Mitochondrial Dynamics; Diabetes

تأثیر تعاملی تمرین هوازی و مصرف آتورواستاتین بر بیان MFN1/2 و DRP1 هپاتوسیت‌های کبد رت مبتلا به دیابت نوع دو

مریم زلفعلی پورفر^۱، فرهاد رحمانی نیا^{۲*}، پروین فرزانی^۳

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، پردیس دانشگاهی دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۱۳۳۳۱۷۳۴۴۰ فاکس: ۰۶۷۵۳۶۹۰۱۳۳ پست الکترونیک: frahmani2001@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: اختلالات دینامیکی میتوکنندری در پاتوژنز برخی از بیماری‌ها از قبیل دیابت نوع دو نقش دارد. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر تعاملی تمرین هوازی و مصرف آتورواستاتین بر بیان MFN1/2 و DRP1 هپاتوسیت‌های کبد رت مبتلا به دیابت نوع ۲ انجام شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی ۲۵ سر رت نر با میانگین وزنی ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم بطور تصادفی به ۵ گروه مساوی: دیابت (D)، کنترل سالم (C)، تمرین تداومی (T)، آتورواستاتین (A)، تداومی-آتورواستاتین (TA) تقسیم شدند. دیابت نوع دو با استرپتوزوتوسین (STZ) در رت‌ها القا شد. گروه‌های تمرینی به مدت هشت هفته برنامه تمرینی دویدن را روی تردمیل انجام دادند. به گروه‌های (A) و (TA) (۱۰ mg/kg) آتورواستاتین بصورت گاواژ خوراندند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، رت‌های صحرایی تشریح شدند؛ بافت کبد آن‌ها برداشته شد و بلافاصله در محلول نیتروژن مایع منجمد و در دمای منهای ۸۰ درجه برای اندازه‌گیری MFN1/2 و DRP1 نگهداری شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد القای دیابت نوع دو باعث کاهش بیان MFN1/2 و افزایش DRP1 نسبت به گروه C شد. بعد از هشت هفته مداخله افزایش معناداری در MFN1 مشاهده شد ($p < 0.05$) اما این افزایش در معنی‌داری MFN2 نبود و نیز در بیان فاکتورها بین گروه‌ها تفاوت معناداری مشاهده نشد. همچنین بعد از هشت هفته کاهش معناداری در بیان ژن DRP1 مشاهده شد ($p < 0.05$). این کاهش در مقایسه گروه TA نسبت به گروه D معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: احتمالاً ترکیبی از تمرین هوازی و آتورواستاتین ممکن است بیان ژن‌های مربوط به پویایی میتوکندریایی را در بیماری دیابت به طور مثبتی تنظیم کند.

واژه‌های کلیدی: تمرین هوازی، آتورواستاتین، پویایی میتوکندریایی، دیابت

دریافت: ۱۴۰۱/۳/۲۲ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۱۲

مقدمه

پویایی میتوکندریایی در عملکرد میتوکنندری‌ها و متابولیسم سلولی نقش بسزایی دارد که با فرایندهای مستمر هم‌جوشی و شکافت و به واسطه چندین

GTPase تنظیم می‌شود [۱،۲]. پروتئین میتوفیوژن ۱ و ۲ (به ترتیب MFN1 و MFN2)^۱ در همجوشی میتوکنندری‌ها دخیل‌اند و از سوی دیگر، پروتئین

^۱ Mitofusin-1/2

DRP1^۱ از پروتئین‌های مرتبط با شکافت میتوکندری‌ها، می‌باشد [۳]. فرایندهای هم‌جوشی و شکافت در شرایط فیزیولوژیک متعادل هستند. میتوکندری‌ها در هم‌وئستاز اهمیت زیادی دارند [۴] و عملکردهای پایه سلولی مانند: پتانسیل غشا، هم‌وئستاز کلسیم، تولید ATP و گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر را تنظیم و در ریخت‌شناسی میتوکندریایی، توالی چرخه سلولی، آپوپتوز و میتوفاژی نقش مهمی را ایفا می‌کنند [۴،۵]. پروتئین‌های درگیر در هم‌جوشی و شکافت دارای کدگذاری هسته‌ای هستند که خاموشی یا افزایش بیان ژن‌های آن‌ها به عدم تعادل در این دو فرایند منجر می‌شود [۶]. عدم تعادل در این دو فرایند سبب به هم ریختگی ساختاری میتوکندری‌ها، اختلالات متابولسمی، تجزیه میتوکندری‌ها و آپوپتوز می‌شود. اختلالات پویایی میتوکندری در بسیاری از بیماری‌های سرطانی، قلبی عروقی، تحلیل اعصاب و متابولیکی دیده شده است که دیابت نوع دو یکی از این بیماری‌هاست [۷]. برای پیشگیری از پیشرفت دیابت بررسی عوارض ناشی از اختلال عملکرد و ناهنجاری‌های میتوکندری در سلول‌های اندوتلیال، عضله اسکلتی، کاردیومیوسیت‌ها، و نورون‌ها پیشنهاد شده است [۳]. اعتقاد بر این است که تغییرات در ریخت‌شناسی (مورفولوژی) میتوکندری‌ها بواسطه افزایش توده میتوکندری، از طریق هم‌جوشی و شکافت، به‌طور قابل توجهی با توسعه بیماری‌های مرتبط با سوخت و ساز در ارتباط است [۲]. مطالعات نشان داده‌اند فعالیت پروتئین‌های MFN1 و MFN2 به‌طور معنی‌داری در سطوح خاصی از بافت بیماران دیابتی کاهش می‌یابد [۳]. کمبود MFN2 باعث اختلال در سیگنالینگ انسولین در کبد و عضله‌ها می‌شود که با چاقی و دیابت نوع ۲ همراه است [۸].

در دیابت نوع ۲ بیان PGC1- α (که فعال کننده رونویسی MFN2 است) و ژن‌هایی که آنزیم‌های

اساسی را در متابولیسم اکسیداتیو کدگذاری می‌کنند، کمتر است [۹،۱۰]. از آنجا که واسطه‌های هم‌جوشی علاوه بر اتصالات میتوکندری‌ها، متابولیسم میتوکندریایی را نیز تنظیم می‌کنند، کاهش تنظیمی آن‌ها معمولاً با کاهش ظرفیت اکسیداتیو میتوکندری‌ها همراه است که ممکن است در مقاومت انسولینی نقش داشته باشد [۱۱،۱۲]. کاهش بیان MFN2 تولید گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر را افزایش می‌دهد، سیگنالینگ انسولین را دچار اختلال می‌کند و به عدم تحمل گلوکز منجر می‌شود [۱۳،۱۴]. در رت‌هایی که با مهار کننده DRP1 بررسی شدند، درصد میتوکندری‌های توبولی، پتانسیل غشاء و استرس اکسیداتیو به مقادیر پایه بازگشت و برداشت گلوکز ناشی از انسولین آن‌ها افزایش یافت [۱۴].

مسیرهای سیگنالینگ که با استرس اکسیداتیو فعال می‌شوند نقش اساسی در بیماری‌زایی دیابت دارند [۱۵]. از این رو دستکاری شاخص‌های پویایی میتوکندریایی از طریق بهبود مکانیسم‌های مولکولی و راه‌های سیگنالینگ از طرق مختلف مثل فعالیت ورزشی ممکن است آثار سودمندی به همراه داشته باشد. به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی می‌تواند هم‌جوشی و شکافت را تنظیم کند. به‌طور مثال هفت جلسه تمرین پر شدت تناوبی زیربخش‌های ATP سنتتاز (۳۹٪)، MFN1 (۳۵٪) و FIS1 (بیش از دو برابر) را افزایش داد، اما تأثیری بر MFN2 نداشت [۱۶]. اما در مطالعه‌ای سانتوس-آلوز^۲ و همکاران (۲۰۱۹) برای اولین بار نشان می‌دهند که تمرینات ورزشی، به ویژه تمرینات استقامتی، عملکرد میتوکندری را بهبود می‌بخشد، آسیب اکسیداتیو را کاهش می‌دهد و بیان بیومارکرهای مربوط به پویایی میتوکندری را تعدیل می‌کند [۱۷]. همچنین جورج و همکارانش نشان دادند که بیان MFN2 قلب با القای دیابت در رت صحرایی کاهش می‌یابد و هشت هفته

² Santos-Alves

¹ Dynamin Related Protein 1

تمرین استقامتی بر روی تردمیل MFN2 را به سطح نرمال می‌رساند [۱۸]. دینگ و همکاران به نتایجی غیرهمسو با دیگر تحقیقات دست یافتند که بیان ژن و سطوح پروتئین‌های MFN1/2 در پاسخ به یک وهله فعالیت ورزشی طولانی مدت نوار گردان کاهش می‌یابد [۱۹]. تاناکا^۱ و همکاران نشان دادند که ورزش با بهبود متابولیسم میتو کندری، کنترل کیفیت مانع پیشرفت اختلال عملکرد میتو کندری می‌شود. ورزش عملکردهای پروتئین‌های تنظیم کننده پویایی میتو کندری را از طریق مکانیسم‌های اصلاح پس از ترجمه تعدیل می‌کند [۸]. این داده‌ها نشان می‌دهد که تمرین هوازی می‌تواند عملکرد میتو کندریایی را از طریق مهار تغییرات پاتولوژیک پویایی میتو کندریایی بازایی کند با این حال، ساز و کارهای خاص در تنظیم این فرآیندها در طول ورزش هنوز تا حد زیادی ناشناخته است [۸]. درمان ترکیبی روشی فراگیر در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند دیابت، بدخیمی‌ها و بسیاری از بیماری‌های دیگر می‌باشد [۲۰، ۲۱].

از ترکیب‌های دارویی که تأثیر آنها بر دیابت بررسی شده، استاتین‌ها هستند. استاتین‌ها بطور رایج در دنیا به عنوان داروهای کاهنده چربی، مؤثر توصیف شده‌اند که خطرات مرتبط با بیماری‌های متابولیک از جمله بیماری‌های قلبی عروقی و دیابت را کاهش می‌دهند. شایع‌ترین اثرات جانبی استاتین‌ها شامل کرامپ عضلانی، خستگی، درد، ضعف و در مواردی نادر آتروزی و شکستگی‌هایی می‌باشد که منجر به مرگ می‌گردد. با این وجود با تجویز تمرینات ورزشی می‌توان از این اثرات جانبی جلوگیری کرد. آتورواستاتین به لحاظ دسته دارویی جزو گروه استاتین‌ها به حساب می‌آید. این دارو از جمله داروهای کم کننده لیپیدهای سرمی، دسته آنالوگ‌های ساختمانی هستند که آنزیم ۳ هیدروکسی ۳- متیل گلو تاریل - کو آنزیم A ردوکتاز را به صورت رقابتی مهار می‌کنند که نسبت به دیگر اعضای این خانواده

¹ Tanaka

عوارض جانبی کمتر و اثر بخشی بیشتری دارد [۲۲]. پژوهش‌های اخیر علاوه بر ورزش، اثرات بسیار سودمندی از داروهای گروه استاتین‌ها بر کاهش میزان کلسترول خون، طیفی از آثار ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوزی را گزارش کرده‌اند [۲۲]. آتورواستاتین می‌تواند عملکرد سلول‌های بتا را با تغییر سطح لیپوپروتئین‌های پروپتوتیک و ضد آپوپتوزی تعدیل کند و همچنین می‌تواند در مقاومت به انسولین تأثیر داشته باشد [۲۳]. با توجه به این که پژوهش‌های متفاوتی در زمینه تأثیر فعالیت‌های هوازی و استفاده از داروهای شیمیایی در بیماران دیابتی انجام شده بنابراین با توجه به مغایر و محدود بودن مطالعات در این زمینه، مطالعه حاضر در نظر داشت که تغییرات ناشی تأثیر تعاملی تمرین هوازی و مصرف آتورواستاتین بر بیان MFN1/2 و DRP1 هیپاتوسیت‌های کبد رت مبتلا به دیابت نوع ۲ بررسی کند.

روش کار

نمونه‌های پژوهش

روش پژوهش از نوع تجربی بود. در این پژوهش تعداد ۲۵ سر رت نر مسن با سن ۲۵ هفته و میانگین وزنی بین ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم که تکثیر آن‌ها در مرکز پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انجام شد، به عنوان نمونه انتخاب و به مرکز پژوهش منتقل شدند. حجم نمونه مطالعه حاضر بر اساس نتایج تحقیقات پیشین، در سطح معنی‌داری ۵ درصد (خطای نوع اول) و توان آماری ۹۵ درصد (خطای نوع دوم) و با استفاده از نسخه ۱۸/۲/۱ نرم افزار Medcalc (پنج سر رت در هر گروه) تعیین شد.

پس از انتقال رت‌ها به محیط آزمایشگاه، به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط جدید، به صورت گروه‌های سه و دو تایی در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف به طول ۳۰ عرض و ارتفاع ۳۰ سانتی متر ساخت شرکت رازی راد در دمای ۲۲±۲ درجه

سانتی گراد، رطوبت 55 ± 5 درصد و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. در تمام مدت آب و غذا (به صورت پلت) به اندازه کافی و آزادانه دریافت کردند. کلیه قوانین و نحوه رفتار با حیوانات (آشناسازی، تمرین، بیهوشی و کشتن حیوان) بر اساس انجمن ارزیابی و اعتبار بخشی بین المللی مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی و با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد مروجشت به شماره R.IAU.M.REC.1400.033 انجام شد.

پس از انتقال رت‌ها به آزمایشگاه، القای دیابت نوع ۲ و آشنایی با فعالیت ورزشی روی تردمیل مخصوص جوندگان، به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. به ۴ گروه (گروه کنترل دیابتی (D)، دیابتی-تمرین تداومی (T)، دیابتی-آتورواستین (A)، دیابتی-تمرین تداومی-آتورواستین (AT)) دیابت القا شد. جهت القای دیابت نوع دو از تزریق داخل صفاقی استرپتوزتوسین با دوز ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استفاده و به صورت درون صفاقی به آنان تزریق گردید.

برای اطمینان از دیابتی بودن رت‌ها از گوشه چشم نمونه‌های خونی تهیه گردید و میزان گلوکز سنجش گردید که بالاتر از ۱۲۶ میلی گرم بر دسی‌لیتر به عنوان معیاری برای اطمینان از ابتلای رت‌ها به دیابت نوع دو در نظر گرفته شد [۲۴].

پروتکل تمرین

برنامه تمرینی اصلی به مدت هشت هفته انجام گرفت که شامل پروتکل تمرین تداومی بود. برنامه تمرین تداومی هفته اول با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه برای مدت زمان پنج دقیقه رت‌ها شروع به دویدن روی تردمیل کردند. سپس هر هفته با افزایش سرعت یک تا دو متر بر دقیقه به مدت یک تا دو دقیقه بر زمان دویدن افزوده می‌شود. به طوری که در هفته چهارم سرعت به ۲۰ متر بر دقیقه و زمان دویدن به ۱۳ تا ۱۴ دقیقه می‌رسید و در هفته هشتم سرعت دویدن به ۲۸ تا ۲۹ متر بر دقیقه و مدت زمان ۲۱ تا ۲۲ بود. تعداد جلسات تمرین تداومی پنج مرتبه در هر هفته مطابق جدول ۱ انجام می‌شد [۲۵].

جدول ۱. برنامه تمرین تداومی

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
مدت (دقیقه)	۵	۹-۷	۱۲-۱۰	۱۴-۱۳	۱۶-۱۵	۱۸-۱۷	۲۰-۱۹	۲۲-۲۱
سرعت (متر بر دقیقه)	۱۵	۱۷-۱۶	۱۹-۱۸	۲۱-۲۰	۲۳-۲۲	۲۵-۲۴	۲۷-۲۶	۲۹-۲۸

نحوه مصرف آتورواستاتین

آتورواستاتین ۱۰ میلی گرم تهیه شده از شرکت دارو سازی سبحان دارو در گروه های A و TA، بصورت روزانه با دوز ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت بصورت گاواژ خورنده شد [۲۶].

روش گیری نمونه از بافت کبد و اندازه گیری متغیرها
پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی با ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه با تزریق درون صفاقی کتامین (۶۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۵ میلی گرم/کیلوگرم وزن

بدن) رت‌ها بی‌هوش شده و نمونه گیری‌های بافتی انجام گرفت. بدین ترتیب بافت کامل کبد آنها جدا بلافاصله پس از جداسازی و شست و شو با سالیین فوراً در تیوب‌های حاوی RNA Later جهت جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شد و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی گراد تا زمان اندازه گیری نگهداری شد. برای جلوگیری از تأثیر آهنگ شبانه روزی، نمونه گیری از ساعت ۸ آغاز و ۱۱:۳۰ به اتمام رسید. برای بررسی بیان MFN1/2 و DRP1 در هر گروه از تکنیک Real time PCR استفاده شد و به cDNA

تبدیل شد. سپس به روش cDNA تکثیر شد و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری بیان ژن MFN1/2 و DRP1

جدول ۲. الگوی پرایمر MFN1/2 و DRP1

Genes		Primer Sequences
MFN1	Forward	CTC CTG TAA TCT TGC CTG
MFN1	Reverse	ATC GGA TCT TTT TTG TTT CAG C
MFN2	Forward	CACATGGAGCGTTGTACCAG
MFN2	Reverse	TTGAGCACCTCCTTAGCAGAC
DRP1	Forward	AGC AAC TAC AGC ACA CAG GAAC
DRP1	Reverse	CCA CAG GCA TCA GCA AAG TC

استخراج RNA
RNA با استفاده از کیت Thermo Fisher (آمریکا) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد.

انجام Real Time-PCR

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (ترموفیشر آمریکا) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کلیه پرایمرهای طراحی شده مربوط به تمامی ژن‌ها، مورد بررسی قرار گرفت و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام گرفت.

تحلیل آماری

توصیف کمی داده‌ها به صورت میانگین و انحراف استاندارد انجام شد. برای بررسی تغییرات معنی‌داری هر یک از تغییرهای تحقیق، بین گروه‌های مختلف، از روش آنالیز واریانس یک‌راهه و در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار آماری جهت تعیین محل ANOVA از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری

یافته‌ها

نتایج تغییرات وزن، گلوکز، میانگین و انحراف استاندارد در گروه‌های مختلف در جداول ۳ و ۴ نمایش داده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد تفاوت معنی‌دار در میزان تغییرات بیان MFN1 هپاتوسیت‌ها بین گروه‌های مختلف وجود دارد ($F=2/698$ ؛ $p=0/034$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد میزان بیان هپاتوسیت‌ها گروه‌های A ($p=0/317$)، T، TA ($p=1/000$) نسبت به گروه D افزایش معنی‌داری نداشت. همچنین بیان MFN1 در گروه‌های T ($p=0/508$) و TA ($p=0/333$) نسبت به گروه A و بین گروه‌های تمرینی و ترکیبی نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۱).

جدول ۳. نتایج گلوکز و وزن در گروه‌های مختلف

گروه					متغیر
AT	A	T	D	C	
۱۰±۲۲۴	۱۱±۲۴۴	۱۴±۲۳۴	۱۲/۵±۲۳۹	۱۲±۹۰	گلوکز
۳۳۴/۱±۳۷/۸	۳۳۲±۳۷/۹	۳۳۷±۲۴/۰۹	۳۳۲/۷۵±۴۸/۴۶	۳۴۵/۵۰±۳۳/۱۹	وزن (گرم) پیش آزمون
۳۱۴/۳۷±۳۹/۲	۳۲۵±۳۸/۹	۳۱۸±۲۱/۶۲	۳۱۲/۸۷±۴۹/۵۶	۳۴۴/۸۷±۲۳/۹	وزن (گرم) پس از هشت هفته

جدول ۴. میانگین و انحراف استاندارد

AT	A	T	D	C	گروه	
					متغیر	
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۱۸	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۲۳	میانگین	MFN1
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۱۴	انحراف استاندارد	
۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۳	میانگین	MFN2
۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۸	انحراف استاندارد	
۰/۶۲۳	۰/۴۰۱۳	۰/۳۲۰۴	۰/۶۴۰۶	۰/۰۲۳۴	میانگین	DRP1
۰/۰۲۶۶	۰/۰۹۸۴۰	۰/۰۱۵۷	۰/۱۵۸۷	۰/۰۱۰۱	انحراف استاندارد	

جدول ۵. مقایسه متغیرها در پس آزمون بین گروه‌ها

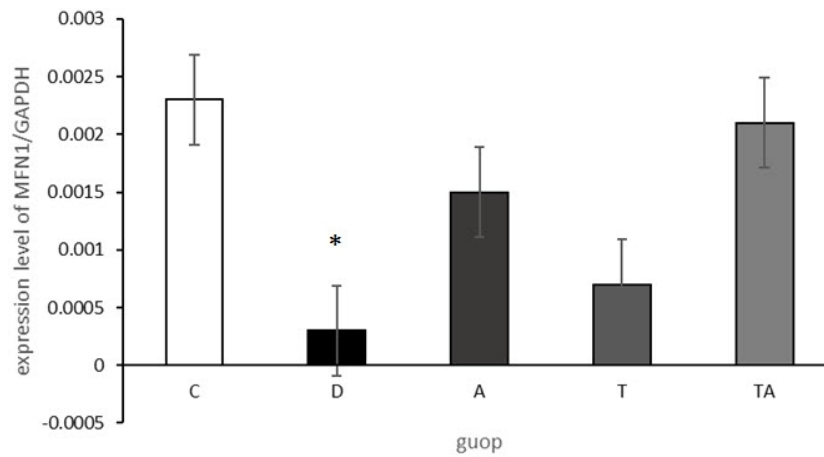
Sig	F	df	متغیر	
۰/۰۳۴*	۲/۶۹۸	۴	بین گروه‌ها	MFN1
		۲۰	درون گروه‌ها	
۰/۰۹۹	۲/۰۰۴	۴	بین گروه‌ها	MFN2
		۲۰	درون گروه‌ها	
۰/۰۰۰*	۵/۹۰۵	۴	بین گروه‌ها	DRP1
		۲۰	درون گروه‌ها	

* معنی‌داری آماری در آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه $p < ۰/۰۵$

گروه‌های مختلف بود ($F=۵/۹۰۵$ ، $p=۰/۰۰۰$) (جدول ۵). یافته‌ها نشان داد در مقایسه با گروه سالم، افزایش معناداری در گروه D مشاهده شد ($p=۰/۰۰۱$). از سوی دیگر، کاهش معناداری در گروه‌های A ($p=۰/۵۵۸$)، T ($p=۰/۲۳۲$) در مقایسه با گروه D مشاهده نشد. اما در گروه TA ($p=۰/۰۰۲$)، در مقایسه با گروه D کاهش معناداری مشاهده شد. آنالیز داده‌ها نشان داد در بین گروه‌های D، بین گروه A و گروه ترکیبی TA ($p=۰/۱۳۲$)، اختلاف معناداری وجود نداشت، همچنین بین گروه‌های تمرینی و ترکیبی نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۳).

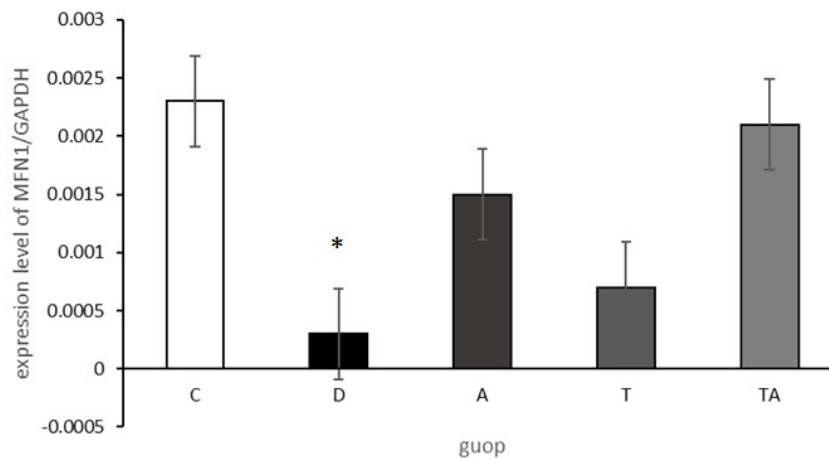
از دیگر نتایج پژوهش حاضر، عدم تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان MFN2 هپاتوسیت‌ها بین گروه‌های مختلف بود ($F=۲/۰۰۴$ ، $p=۰/۰۹۹$) (جدول ۵). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد میزان بیان هپاتوسیت‌ها گروه‌های A ($p=۰/۷۳۸$)، T و TA ($p=۰/۲۵۵$) در مقایسه با گروه D مشاهده نشد. آنالیز داده‌ها نشان داد در مقایسه گروه A با گروه T ($p=۰/۹۱۳$) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. آنالیز داده‌ها نشان داد در مقایسه گروه A با تمرین TA ($p=۰/۹۷۸$) اختلاف معناداری وجود نداشت. همچنین بین گروه‌های تمرینی و ترکیبی نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۲).

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد تفاوت معنی‌داری در میزان تغییرات بیان DRP1 هپاتوسیت‌ها بین



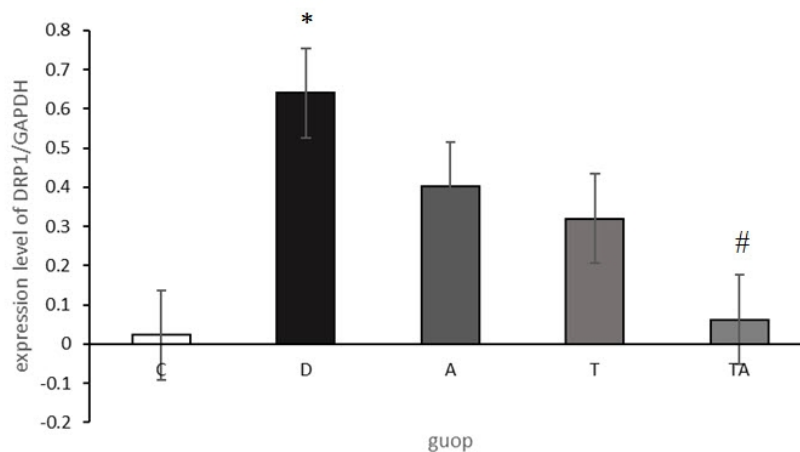
نمودار ۱. مقایسه میانگین بیان ژن mRNA MFN1 در بین گروه‌ها (داده‌ها بر اساس فولد تغییر نسبت به GAPDH)

*: اختلاف معنادار نسبت به گروه C، #: اختلاف معنادار نسبت به گروه D و α: اختلاف معنادار نسبت به گروه A



نمودار ۲. مقایسه میانگین بیان ژن mRNA MFN2 در بین گروه‌ها (داده‌ها بر اساس فولد تغییر نسبت به GAPDH)

*: اختلاف معنادار نسبت به گروه C، #: اختلاف معنادار نسبت به گروه D و α: اختلاف معنادار نسبت به گروه A



نمودار ۳. مقایسه میانگین بیان ژن mRNA DRP1 در بین گروه‌ها (داده‌ها بر اساس فولد تغییر نسبت به GAPDH)

*: اختلاف معنادار نسبت به گروه C، #: اختلاف معنادار نسبت به گروه D و α: اختلاف معنادار نسبت به گروه A

بحث

با توجه به اهمیت ژن MFN1، MFN2 و DRP1 در مسیر پویایی میتو کندری و کدگذاری پروتئین‌هایی که نقش کلیدی را در رابطه با دیابت نوع دو ایفا می‌کنند، این مطالعه در درجه اول اثرات تعاملی تمرین تداومی و مصرف آنورواستاتین را بر روی بدن مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن‌های ذکر شده در بالا، نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌تواند یک روش جدید برای درمان رت‌های دیابتی ارائه دهد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد بیان MFN1، MFN2 در گروه رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو نسبت به گروه سالم کاهش داشت و DRP1 نسبت به گروه سالم افزایش معنی‌داری داشت. علت کاهش و افزایش این شاخص‌ها در بیماران دیابتی با گروه سالم ممکن است به دلیل عدم تعادل پروتئین هم‌جوشی و شکافت در گروه بیمار باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد بعد از هشت هفته تمرین تداومی و مصرف آنورواستاتین مقدار بیان MFN1/2 نسبت به گروه بیمار به طور چشمگیری افزایش یافته است که این افزایش در بیان MFN1 معنی‌دار بود ($p=0/034$)، اما در بیان MFN2 با وجود افزایش معنی‌دار نبود ($p=0/099$). بین تأثیر تمرین و مصرف آنورواستاتین بر بیان MFN1/2 تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد بعد از هشت هفته تمرین تداومی و مصرف آنورواستاتین مقدار بیان DRP1 نسبت به گروه بیمار به طور معنی‌دار کاهش یافته است ($p=0/001$). این کاهش در گروه ترکیبی نیز مشاهده شد. همسو با نتایج این تحقیق یان^۱ و همکاران به بررسی تأثیر تمرینات بر روی تردمیل بر فیوژن میتو کندری پرداختند. نتایج نشان داد ورزش اختلال میتو کندری را کاهش می‌دهد که نشان‌دهنده کاهش قابل توجه در تورم میتو کندری و واکوئل‌ها و افزایش کریستاهای

میتو کندری است، همچنین ورزش هم‌جوشی و شکافت به عنوان نشان‌دهنده تراز میتو کندری، را تقویت می‌کند و موجب کاهش قابل توجه DRP1 و افزایش سطوح MFN1، MFN2 و Opa1 شد [۲۷]. مطالعه‌ای دیگر به بررسی اثر یک جلسه فعالیت ورزشی ۱۵۰ دقیقه‌ای حاد بر بیان ژن پروتئین‌های درگیر در هم‌جوشی و شکافت عضلات اسکلتی رت‌های اسپراگ داوولی^۲ پرداخته است. نتایج این پژوهش حاکی از این بود که محتوای پروتئین‌های درگیر در هم‌جوشی (MFN2، MFN1) به شدت کاهش پیدا کرده است و این کاهش در سطوح پروتئین MFN1 نیز صدق می‌کند [۲۸]. به تازگی یک مطالعه نشان داد که تمرینات ورزشی عدم تعادل بین شکافت میتو کندری و هم‌جوشی ناشی از چاقی را از طریق افزایش سطوح بیان MFN2 و OPA1 به‌منظور افزایش روند هم‌جوشی میتو کندری و کاهش یا حفظ سطوح بیان شکافت میتو کندری بهبود می‌بخشد [۲۹]. در پژوهش حاضر فعالیت ورزشی موجب کاهش بیان پروتئین‌های شکافت و افزایش بیان پروتئین‌های درگیر در هم‌جوشی میتو کندری شده است. در اینجا عدم تغییر معنی‌دار بیان MFN2 نشان‌دهنده کاهش قدرت سلول برای حفظ محتوای میتو کندری و فرآیند ادغام است که می‌تواند به‌عنوان یک فرآیند مکمل دفاعی در سلول عمل کند. در مقابل تغییر معنی‌دار بیان MFN1 و DRP1 که نشان از سیستم دفاعی سلول برای از بین بردن نواحی آسیب دیده میتو کندریایی است.

مطالعات دیگر نیز نشان داده است که ورزش می‌تواند بیان DRP1 را کاهش داده و بیان MFN1 و MFN2 را افزایش دهد [۳۰]. علاوه بر این، اخیراً نشان داده شده است که ورزش از کاهش نسبت MFN2/DRP1 در بافت قلب رت‌های db/db جلوگیری می‌کند و همچنین نشت سیتوکروم c را

² Sprague-Dawley¹ Yan

کاهش می‌دهد [۳۱]. عدم تعادل در پروتئین‌های هم‌جوشی و شکافت منجر به هم‌ریختگی ساختاری میتو‌کندری، اختلالات متابولیکی تجزیه میتو‌کندری‌ها، آپوپتوز و حتی مرگ سلولی می‌شود [۳۲]. تمرینات ورزشی تعادل بین هم‌جوشی و شکافت میتو‌کندری را حفظ و نگهداری می‌کند. در یک پژوهش نشان داده شد که تأثیر تمرینات ورزشی روی رت‌ها باعث کاهش پروتئین DRP1 شد [۳۳].

همچنین فیلی و همکاران در پژوهشی گزارش کردند که تمرین ورزشی باعث کاهش فعالیت پروتئین DRP1 در عضلات اسکلتی می‌شود [۳۱]. برخلاف یافته‌های این پژوهش در یک پژوهش روی انسان نشان داده شد که میزان DRP1 تغییر معنی‌داری نداشت [۳۰]. مطالعه روی رت‌ها نیز نشان داد که تمرین طولانی مدت مقاومتی تأثیری بر DRP1 ندارد [۳۴]. به‌طور کلی، کاهش DRP1 در نتیجه فعالیت ورزشی ممکن است برای حفظ پتانسیل غشاء میتو‌کندری میوسیت‌های قلبی باشد. یکی از خواص DRP1 آپوپتوز در میتو‌کندری می‌باشد، بنابراین فعالیت‌های ورزشی می‌تواند از طریق کاهش پراکسیدهای چربی و فعال‌سازی دفاع آنتی‌اکسیدانی، بافت را در برابر استرس اکسیداتیو محافظت [۳۵] و میزان DRP1 را کاهش دهد. کاهش DRP1 شکافت و آپوپتوز را در سلول‌ها کاهش می‌دهد [۳۶] و نشانگرهای وابسته به آپوپتوز را بهبود می‌بخشد [۳۷]. کاهش DRP1 برای توسعه و نگهداری عملکرد مناسب میوسیت‌های میتو‌کندری ضروری است و بقای سلول‌های عضلانی را با کاهش استرس اکسیداتیو بهبود می‌بخشد [۳۸]. تاکنون، مطالعات مختلفی در این زمینه و تأثیر تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف بر پویایی میتو‌کندری انجام شده است. به این نتیجه می‌رسد که تمرینات هوازی احتمالاً می‌تواند فرآیندهای هم‌جوشی و شکافت میتو‌کندری در رت‌های صحرایی دیابتی نوع دو را تنظیم کند [۳۹]. در مطالعه‌ای، تأثیر ورزش حاد بر عملکرد، پویایی و

میتوفاژی میتو‌کندری در ماهیچه اسکلتی و قلبی رت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. گزارش شد که تمرینات هوازی با شدت بالا عملکرد میتو‌کندریایی مانند تنفس اکسیژن و توانایی حفظ کلسیم را بهبود می‌بخشد، اما هیچ تأثیری بر تغییر پویایی و میتوفاژ میتو‌کندری نداشت [۴۰]. علاوه بر این، در یک مطالعه اخیراً، تأثیر شدت تمرینات ورزشی بر پویایی و میتوفاژی میتو‌کندری در رت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. گزارش شده است که سطح پروتئین‌های MFN2 و PGC-1 در گروه تمرینات تناوبی با شدت متوسط به‌طور قابل توجهی بیشتر از گروه سکنه قلبی کم تحرک بوده، در حالی که سطح پروتئین DRP1 به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. نتیجه گرفته شد که تمرینات تناوبی با شدت متوسط شکستگی میتو‌کندری و پروتئین‌های هم‌جوشی را در رت‌های سکنه قلبی بهبود می‌بخشد. علاوه بر این، آنها دریافتند که تمرینات با شدت کم و زیاد (LIIT، HIIT) پروتئین‌های MFN2 و PGC-1 را افزایش داده و پروتئین DRP1 را کاهش می‌دهد، اما این تأثیر معنی‌دار نبود [۴۱]. از جمله دلایل ناسازگاری این نتایج و تفاوت در اثربخشی تمرینات در مطالعات ذکر شده با نتایج مطالعه حاضر، ممکن است ناشی از تفاوت پروتکل‌های تمرینی، شدت و مدت زمان تمرین، حجم نمونه، جنسیت، نوع موضوعات و روش‌ها و تکنیک‌های مختلف آزمایشگاهی و نوع بافت تشریح شده باشد.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، می‌توان گفت که تمرین مداومی در مقایسه با تمرین تناوبی منجر به سازگاری‌های مشابه در بهبود پویایی میتو‌کندری در رت‌های دیابتی می‌شود. به ترتیب تمرینات ورزشی با بهبود متابولیسم میتو‌کندری، بیوژنز، میتوفاژی، پویایی میتو‌کندری، سیگنالینگ آنتی‌آپوپتوز و کنترل کیفیت میتو‌کندری، مانع و تاخیر در ایجاد اختلال عملکرد میتو‌کندری می‌شود. در مورد عدم وجود تفاوت معنادار بین تمرین مداومی با تناوبی، می‌توان گفت که

روش‌های مختلف تمرینی نمی‌تواند تفاوت قابل توجهی در متغیرهای مطالعه ایجاد کند. در واقع، نتایج ما نشان داد که تأثیر تمرینات وابسته به شدت تمرین نیست و بیشتر به حجم و طول تمرین بستگی دارد.

در مطالعه حاضر، استفاده از آتورواستاتین در دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور قابل توجهی سطوح بیان ژن MFN1، MFN2 و DRP1 را تغییر داد. در نتیجه، آتورواستاتین به ترتیب میزان بیان ژن MFN1، MFN2 و DRP1 را به میزان قابل توجهی افزایش و کاهش داده است.

توانایی آتورواستاتین در تغییر قابل توجه این سطوح ممکن است به دلیل اثرات مفید آن در بهبود پویایی میتوکندری بافت کبد، افزایش حساسیت محیطی به انسولین و افزایش جذب گلوکز توسط سلول‌های مختلف بدن باشد که نشان‌دهنده خواص آنتی‌اکسیدانی قوی آتورواستاتین، که قبلاً در مدل‌های دیگر مورد بحث قرار گرفته بود، می‌تواند این فرضیه را تأیید و پیشنهاد کند آتورواستاتین با خواص آنتی‌اکسیدانی و هیپوگلیسمی می‌تواند در رت‌های دیابتی موثر باشد.

همچنین یافته‌های ما نشان می‌دهد تجویز آتورواستاتین در کنار تمرین ورزشی تأثیر درمانی بیشتری بر افزایش بیان MFN1 و کاهش DRP1 نسبت به تمرین به تنهایی دارد. همچنین آتورواستاتین باعث افزایش و کاهش معنی‌دار در میزان بیان این پروتئین‌ها نسبت به گروه بیمار شد. MFN2 اما افزایش معنی‌داری نداشت. باید توجه داشت که اگرچه مصرف آتورواستاتین همزمان با تمرین باعث بهبود وضعیت دینامیکی میتوکندری می‌شود، اما در مقایسه با تمرین و مصرف آتورواستاتین به تنهایی تأثیر بهتری دارد. این می‌تواند ناشی از این واقعیت باشد آتورواستاتین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی با اکثر اثرات هیپوگلیسمی و ضد دیابت شناخته شده است و شاید عدم هم‌افزایی در مسیرهای سیگنالینگ موثر یکی از دلایل عدم اثرات هم‌افزایی این دو

ترکیب باشد. ممکن است اثرات آتورواستاتین در بیماران مختلف و با نژادهای متفاوت اصولاً متفاوت باشد و همچنین اثرات آن وابسته به دوز و یا مدت زمان مصرف و نیز نوع استاتین مصرف شده متفاوت باشد [۴۲].

بالین وجود، تاکنون اثر مصرف توام آتورواستاتین و تمرین ورزشی بر MFN1، MFN2 و DRP1 بافت کبد بررسی نشده بود با توجه به نتایج حاصل از این تحقیقات، آتورواستاتین با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی و محافظتی در برخی شرایط پاتولوژیک بالای خود، شرایط استرس اکسیداتیو و التهاب را در انواعی از بیماری‌های سندرم متابولیک نظیر دیابت کاهش داده و لذا با مهار آسیب میتوکندری سبب بهبود این بیماری‌ها می‌گردد [۴۳، ۴۴]. بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به اثرات مثبت تمرین ورزشی و آتورواستاتین به تنهایی و استفاده ترکیبی از هر دو، اثرات درمانی موثرتری بر روی بیماری دیابت داشته باشد، همچنین نتایج این مطالعه بر بهبود کار آبی دینامیک میتوکندری توسط مطالعات پیشین نیز تأیید شده است. عدم کنترل کالری در همه گروه‌ها و پاسخ‌های متفاوت به سم STZ در رت‌ها و عدم وجود روش‌های مختلف اندازه‌گیری از محدودیت‌های مطالعه حاضر بود. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که مطالعات آینده دوزهای مختلف آتورواستاتین را در بافت‌های مختلف بررسی کرده و از روش‌های دیگر اندازه‌گیری استفاده کنند.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد تمرینات ورزشی تداومی و مصرف آتورواستاتین می‌تواند از طریق تنظیم مثبت ژن‌های اصلی مربوط به مسیر هم‌جوشی میتوکندری MFN1 و MFN2 و تنظیم مثبت ژن DRP1 مربوط به شکافت میتوکندری، تعادل میتوکندری را تحت تأثیر قرار داده و دیابت را بهبود بخشد. ترکیب همزمان

این دو (تمرین ورزشی و مصرف آتورواستاتین) اثرات تعاملی داشته و یکدیگر را تقویت می کنند.

تعارض منافع
در این پژوهش هیچ گونه تضاد منافی برای نویسندگان وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

گروه نویسندگان مقاله از کلیه افرادی که در انجام این تحقیق کمک کرده اند تقدیر و تشکر می کنند.

References

- 1- Zorzano A, Liesa M, Palacín M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Oct; 41(10):1846–54.
- 2- Archer SL. Mitochondrial dynamics mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med*. 2013 Dec; 369(23):2236–2251.
- 3- Roy Chowdhury S, Djordjevic J, Thomson E, Smith DR, Albensi BC, Fernyhough P. Depressed mitochondrial function and electron transport Complex II-mediated H₂O₂ production in the cortex of type 1 diabetic rodents. *Mol Cell Neurosci*. 2018 May; 90(3):49-59.
- 4- Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012 Aug; 337(6098):1062–1075.
- 5- Bakeeva LE, Chentsov YuS, Skulachev VP. Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1978 Mar; 501(3):349-69.
- 6- Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2016 Feb; 27(2):105–17.
- 7- Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2004 Nov; 15(11):5001–5011.
- 8- Lee H, Song W. Exercise and Mitochondrial Remodeling in Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *J Obes Metab Syndr*. 2018 Sep; 27(3):150-157.
- 9- Tanaka T, Nishimura A, Nishiyama K, Goto T, Numaga-Tomita T, Nishida M. Mitochondrial dynamics in exercise physiology. *Pflugers Arch*. 2020 Feb; 472(2):137-153.
- 10- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. 2003 Jul; 34(3):267–273.
- 11- Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul; 100(14):8466–8471.
- 12- Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, et al. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A Gene, in Human Skeletal Muscle. *Diabetes*. 2005 Sep; 54(9):2685–2693.
- 13- Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism: A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem*. 2003 May; 278(19):17190–17197.
- 14- Sebastián D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, Sorianello E, Muñoz JP, Sala D, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr; 109(14):5523–5528.
- 15- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-Activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes*. 2003 Jan; 52(1):1-8.
- 16- Perry CGR, Lally J, Holloway GP, Heigenhauser GJF, Bonen A, Spriet LL. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2010 Dec; 588(23):4795–4810.

- 17- Santos-Alves E, Rizo-Roca D, Marques-Aleixo I, Coxito P, Martins S, Guimarães JT, et al. Physical exercise positively modulates DOX-induced hepatic oxidative stress, mitochondrial dysfunction and quality control signaling. *Mitochondrion*. 2019 Jul;47:103-113 .
- 18- Jorge L, Paulini J, Silva C, Rampaso R, Luiz R, Lima W, et al. Exercise training improves cardiac mitofusin 2 expression in diabetes. *Hypertension*. 2013 Sep; 62(1):613-628.
- 19- Ding H, Jiang N, Liu H, Liu X, Liu D, Zhao F, et al. Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Mar; 1800(3):250–256.
- 20- Mosayebi G, Ghazavi A, Ghasami K, Jand Y, Kokhaei P. Therapeutic effect of vitamin D3 in multiple sclerosis patients. *Immunol Invest*. 2011 May;40(6):627-639.
- 21- Conway D, Cohen JA. Combination therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2010 Mar; 9(3):299-308.
- 22- Li J, Sun YM, Wang LF, Li ZQ, Pan W, Cao HY. Comparison of effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress in patients with coronary heart disease. *Clin Cardiol*. 2010 Apr;33(4):222-227.
- 23- Goyal A, Singh S, Tandon N, Gupta N, Gupta YK. Effect of atorvastatin on pancreatic Beta-cell function and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus patients: a randomized pilot study. *Can J Diabetes*. 2014 Dec; 38(6):466-472.
- 24- Mozafari M, Nekooeian AA, Panjeshahin MR, Zare HR. The effects of resveratrol in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension: a study of antihypertensive mechanisms. *Iran J Med Sci*. 2015 Mar; 40(2):152-160.
- 25- Linden MA, Fletcher JA, Morris EM, Meers GM, Laughlin MH, Booth FW, et al. Treating NAFLD in OLETF rats with vigorous-intensity interval exercise training. *Med Sci Sports Exerc*. 2015 Mar; 47(3):556-567.
- 26- Yang B, Sun J, Yuan Y, Sun Z. Effects of atorvastatin on autophagy in skeletal muscles of diabetic rats. *J Diabetes Investig*. 2018 Jul; 9(4):753-761.
- 27- Yan QW, Zhao N, Xia J, Li BX, Yin LY. Effects of treadmill exercise on mitochondrial fusion and fission in the hippocampus of APP/PS1 mice. *Neurosci Lett*. 2019 May; 701(33):84-91.
- 28- 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 Hyg*. 2012 spring; 3(8): 58-66. [Full text in Persian]
- 29- Greene NP, Lee DE, Brown JL, Rosa ME, Brown LA, Perry RA, et al. Mitochondrial quality control, promoted by PGC-1 α , is dysregulated by Western diet-induced obesity and partially restored by moderate physical activity in mice. *Physiol Rep*. 2015 Jul; 3(7):454- 470.
- 30- Fealy CE, Mulya A, Lai N, Kirwan JP. Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2014 Aug; 117(3):239-245.
- 31- Veeranki S, Givvimani S, Kundu S, Metreveli N, Pushpakumar S, Tyagi SC. Moderate intensity exercise prevents diabetic cardiomyopathy associated contractile dysfunction through restoration of mitochondrial function and connexin 43 levels in db/db mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Mar; 92 (28):163-173.
- 32- Wai T, Langer T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2016 Feb; 27(2):105-117.
- 33- Iqbal S, Hood DA. Oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and movement in skeletal muscle myoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 Jun; 306(12):1176-1183.
- 34- Kitaoka Y, Ogasawara R, Tamura Y, Fujita S, Hatta H. Effect of electrical stimulation-induced resistance exercise on mitochondrial fission and fusion proteins in rat skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2015 Nov; 40(11):1137-1142.
- 35- Tofighi A, Ebrahimi Kalan A, Jamali Qarakhanelou B. The effect of resveratrol supplementation and aerobic training on cardiac tissue alteration of rats with acute myocardial infarction. *Iranian J Physiol pharmacol*. 2017 winter; 1(4):211-221. [Full text in Persian]

- 36- Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul; 106(29):11960-11965.
- 37- Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Balça MM, Rizo-Roca D, Moreira PI, Oliveira PJ, et al. Physical exercise improves brain cortex and cerebellum mitochondrial bioenergetics and alters apoptotic, dynamic and auto (mito) phagy markers. *Neuroscience*. 2015 Aug; 301:480-95.
- 38- Fukumitsu K, Hatsukano T, Yoshimura A, Heuser J, Fujishima K, Kengaku M. Mitochondrial fission protein Drp1 regulates mitochondrial transport and dendritic arborization in cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci*. 2016 Mar; 71:56-65.
- 39- Zafarani S, Soori R. The effect of 12 weeks of high intensity interval training on mitochondrial dynamics in cardiac myocytes of type 2 diabetic rats. *J Sport Biosci*. 2021 spring; 13(1):25-38. [Full text in Persian]
- 40- Koo JH, Kang EB. Effects of treadmill exercise on the regulatory mechanisms of mitochondrial dynamics and oxidative stress in the brains of high-fat diet fed rats. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2019 Mar; 23(1):28-35.
- 41- Ebadi B, Damirchi A. Effect of exercise training intensity on mitochondrial dynamics and mitophagy in post myocardial infarction rats. *IJAEP*. 2018 Jun; 7(2):46-55.
- 42- Tello A, Marín F, Roldán V, García-Herola A, Lorenzo S, Climent VE, et al. Effect of maximum dose of atorvastatin on inflammation, thrombogenesis and fibrinolysis in high-risk patients with ischemic heart disease. *Rev Esp Cardiol*. 2005 Aug; 58(8):934-40.
- 43- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moyer LA, Goldman S, et al. Inflammation, pravastatin and risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *Circulation*. 1998 Sep; 98(9):839-44.
- 44- Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89-118.