



The effect of high intensity interval training on FOXO3, PI3K and AKT proteins content in heart muscle of type two diabetic rats

Mohammad Rami^{1*}, Samane Rahdar², Maryam Azimpour³, Kayvan Khoramipour⁴

1. Assistant Professor at Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. PhD Student in Comparative Histology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3. PhD in Exercise Physiology, Department of Physical Education & Sport sciences, Faculty of Literature and Human Sciences, Lorestan University, Iran.
4. Assistant Professor at Department of Physiology and Pharmacology, Afzalipour Medical Faculty, Physiology Research Center and Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

Abstract

Background and Aim: Diabetes can causes disturbances in glucose homeostasis and negative changes in the heart muscle. Since physical activity in people with diabetes may affect the heart tissue, the aim of this study was to investigate the effect of high intensity interval training (HIIT) on content of FOXO3, PI3K and AKT proteins in the heart tissue of Wistar rats with type two diabetes. **Materials and Methods:** In the present study, 36 male Wistar rats were divided into four groups: diabetes - control, diabetes - exercise, control – healthy, and exercise - healthy. After two months of high-fat diet and induction of diabetes by Streptozotocin (35 mg/kg) in diabetes-control and diabetes-exercise groups, the animals in diabetes-exercise and exercise-healthy groups performed the HIIT protocol based on a percentage of Vmax achieved, that it was with two-minutes intervals and increasing number of intervals for eight weeks and five sessions per week. 48 hours after the last training session, cardiac tissue was extracted and the content of FOXO3, PI3K and AKT proteins were assessed using Western blotting. In addition, a histological study was performed at the tissue level using hematoxylin and Eosin staining. To analyze the data one-way analysis of variance and Tukey tests were used at a significance level of $p < 0.05$. **Results:** The content of FOXO3 protein in diabetic groups significantly increased compared to healthy groups ($p = 0.001$). In addition, the content of PI3K and AKT proteins in diabetes-control group also significantly decreased compared to healthy groups ($p = 0.001$ and $p = 0.009$, respectively), while the content of these two proteins significantly increased after training ($p = 0.01$ and $p = 0.001$, respectively). Moreover, at the tissue level of heart, the thickness and length of cardiac myocytes significantly increased due to diabetes ($p = 0.001$); while after HIIT, this pathological hypertrophy reduced ($p = 0.02$ and $p = 0.01$, respectively). **Conclusion:** Finally, it can be stated that although the use of this training method did not show a change in the amount of FOXO3 protein, but it was able to increase the amount of PI3K and AKT proteins and improve the pathological hypertrophy caused by diabetes.

Keywords: High intensity interval training, Type two diabetes, FOXO3, PI3K and AKT proteins.

Cite this article:

Rami, M., Rahdar, S., Azimpour, M., & Khoramipou, K. (2023). The effect of high intensity interval training on FOXO3, PI3K and AKT proteins content in heart muscle of type two diabetic rats. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport*, 11(27), 8-21.

*Corresponding Author, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
Email: m.rami@scu.ac.ir





اثر تمرینات تناوبی با شدت بالا بر محتوای پروتئین های FOXO3، PI3K و AKT در عضله قلب رت های مدل دیابتی نوع دو

محمد رمی^{۱*}، سمانه راهدار^۲، مریم عظیم پور^۳، کیوان خرمی پور^۴

۱. استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲. دانشجوی دکتری بافت شناسی مقایسه ای، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۳. دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
۴. استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی افضلی پور، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و علوم اعصاب، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: بیماری دیابت موجب اختلال در هموستاز گلوکز و تغییرات منفی در عضله قلب می شود. از آنجا که فعالیت ورزشی ممکن است بافت قلبی افراد دیابتی را تحت تاثیر قرار دهد، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) بر محتوای پروتئین های FOXO3، PI3K و AKT در بافت قلبی موش های صحرایی نژاد ویستار مبتلا به دیابت نوع دو به اجرا درآمد. **روش تحقیق:** تعداد ۳۶ سر موش صحرایی به چهار گروه شامل دیابت - کنترل، دیابت - تمرین، کنترل - سالم، و تمرین - سالم؛ تقسیم شدند. پس از دو ماه استفاده از رژیم غذایی پرچرب و القاء دیابت با استریتوزوتوسین (۳۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) در گروه های دیابت - کنترل و دیابت - تمرین؛ حیوانات در گروه های کنترل - سالم و تمرین - سالم پروتکل HIIT را بر اساس درصدی از Vmax به دست آمده و با تناوب های دو دقیقه ای و تعداد تناوب های فزاینده، به مدت هشت هفته با تکرار پنج جلسه در هفته، به اجرا درآوردند. زمان ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، بافت قلب استخراج شد و بررسی پروتئین ها با استفاده از روش وسترن بلات انجام گرفت. همچنین مطالعه هیستولوژیک در سطح بافتی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین انجام شد. از آزمون تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی داری $p < 0.05$ برای تجزیه و تحلیل داده ها استفاده شد. **یافته ها:** محتوای پروتئین FOXO3 در گروه های دیابتی به صورت معنی دار نسبت به گروه های سالم، افزایش یافت ($p = 0.001$). همچنین محتوای پروتئین های PI3K و AKT در گروه دیابت - کنترل نسبت به گروه کنترل - سالم، به صورت معنی دار کاهش یافت (به ترتیب با $p = 0.001$ و $p = 0.009$)، در حالی که محتوای این دو پروتئین، پس از تمرین افزایش معنی دار پیدا کرد (به ترتیب با $p = 0.001$ و $p = 0.001$). در سطح بافت قلبی، ضخامت و طول میوسیت های قلبی بر اثر دیابت افزایش معنی دار نشان داد ($p = 0.001$)؛ اما پس از HIIT، هایپرتروفی پاتولوژیک ایجاد شده به صورت معنی دار کاهش پیدا کرد (به ترتیب با $p = 0.002$ و $p = 0.001$). **نتیجه گیری:** هر چند اجرای HIIT تغییری مبنی بر کاهش محتوای پروتئین FOXO3 ایجاد نکرد، توانست محتوای پروتئین های PI3K و AKT را افزایش داده و به طور مطلوب، هایپرتروفی پاتولوژیک ایجاد شده بر اثر دیابت را کنترل کند.

واژه های کلیدی: تمرین تناوبی با شدت بالا، دیابت نوع دو، پروتئین FOXO3، PI3K و AKT.

مقدمه

بیماری دیابت نوع دو یکی از رایج ترین اختلالات متابولیکی عصر حاضر می باشد (فالکائو-پیرس^۱ و دیگران، ۲۰۱۱). شیوع جهانی دیابت در افراد ۲۰ تا ۷۹ ساله در سال ۲۰۲۱، ۵۳۶ میلیون نفر تخمین زده شده و انتظار می رود که تا سال ۲۰۴۵، به ۷۸۳ میلیون نفر برسد (سان^۲ و دیگران، ۲۰۲۲). در مطالعات گذشته اشاره شده است که یکی از عوارض اصلی بالا بودن قند خون در بیماران دیابتی، ایجاد ناهنجاری در سطح میوسیت قلب است که در نهایت منجر به ناهنجاری های ساختاری و عملکردی تحت عنوان کاردیومیوپاتی دیابتی^۳ (DCM) می شود (دلاس هراس و لاهرا^۴، ۲۰۲۱). در سطح بافتی، رشد فیزیولوژیکی قلب یا هایپرتروفی، که از بدو تولد رخ می دهد و می تواند توسط ورزش ایجاد شود، با ساختار قلبی طبیعی و بیان ژن هایی مانند عامل رشد شبه انسولین-۱^۵ (IGF-1) مشخص می شود. در مقابل، هایپرتروفی پاتولوژیک با فیبروز، اختلال تارچه عضلانی، کاهش برون ده قلبی و در نهایت، نارسایی قلبی مشخص می گردد (مک مولن^۶ و دیگران، ۲۰۰۷). مکانیسم دقیق بروز DCM به طور کامل شناخته نشده است؛ با این وجود، مکانیسم هایی نظیر اختلال در بیان پروتئین های مسیره های پیام دهی درون سلولی، ناهنجاری های میوسیت ها و نقص در متابولیسم انسولین؛ در بروز این بیماری دخیل هستند (باوا^۷ و دیگران، ۲۰۱۴؛ دلاس هراس و لاهرا، ۲۰۲۱). تغییرات در گیرنده انسولین، می تواند سبب فعال سازی فسفاتیدیل اینوزیتول تری کیناز^۸ (PI3K) و به کارگیری و فعال سازی پروتئین کیناز B^۹ (AKT) در غشای پلاسمایی شود (لیو^{۱۰}، ۲۰۲۱). اعمالی نظیر رشد، تمایز، تکثیر، سنتز پروتئین و فعل و انفعالات درون سلولی؛ از جمله کارکردهای متعدد PI3K هستند (باوا و دیگران، ۲۰۱۴؛ ما^{۱۱} و دیگران، ۲۰۱۳). یکی از عوامل پایین دستی مسیر PI3K/AKT، عامل رونویسی خانواده پروتئین جعبه سرچنگالی^{۱۲} (FOXO3) است که در فعالیت های متنوعی از جمله پاسخ به استرس اکسیداتیو، تنظیم متابولیسم و آپوپتوزیس نقش دارد (کارائی و دیگران، ۲۰۱۸). در واقع، خانواده پروتئین FOXO3 از مهم ترین پروتئین هایی می باشند که به عنوان تنظیم کننده بیان ژن های اتوفازی و لیزوزوم ها شناخته شده اند (واینشتین و هود^{۱۳}، ۲۰۱۶). عوامل رونویسی FOXO3 همراه با پیام دهی PI3K و AKT، به عنوان عوامل تعیین کننده مهم در هموستاز میوسیت های قلبی شناخته

شده اند (لیو و دیگران، ۲۰۲۱). تحقیقات نشان داده است که مهار PI3K و AKT توسط مهارکننده های اختصاصی در مسیر PI3K/AKT/FOXO3، سبب کاهش محتوای پروتئین FOXO3 و کنترل فرآیند آپوپتوزیس در موش های صحرایی مدل کاردیومیوپاتی دیابتی می شود (وو^{۱۴} و دیگران، ۲۰۱۷). زمانی که مسیر PI3K/AKT بر اثر عواملی همچون قند خون بالای ناشی از بیماری دیابت غیرفعال شود، آتروفی عضلانی ناشی از فعال شدن پروتئین FOXO3 رخ می دهد. در هنگام بروز محرک رشدی همچون افزایش IGF-1 ناشی از فعالیت ورزشی، پروتئین AKT سبب فسفریله شدن یکی از عوامل مرتبط با آتروفی مانند FOXO گردیده و این عامل در سیتوزول باقی می ماند (باوا و دیگران، ۲۰۱۴). بر عکس، هنگامی که محرک رشدی مانند IGF-1 بر اثر عوارض ناشی از بیماری دیابت حذف شود، مسیر پیام دهی PI3K/AKT غیر فعال می شود، FOXO3 دفسفریله شده و از سیتوزول به درون هسته منتقل می گردد. این فعل و انفعالات، سبب فعال شدن عوامل درگیر در مهار سیکل سلولی و متابولیسم شده و مرگ سلولی را تسریع می کند (کاوازیس^{۱۵} و دیگران، ۲۰۱۴).

در سال های اخیر، توجه به برنامه های تمرینی مستمر و پایدار، به عنوان یک راهکار فیزیولوژیک و غیردارویی، برای مقابله با اختلالات قلبی - عروقی ناشی از بیماری دیابت، گسترش یافته است (جوکار و شرافت مقدم، ۲۰۲۰). با وجود این، مکانیسم های مولکولی فعالیت بدنی که از طریق آن ها اثرات مثبت اعمال می شوند، هنوز به خوبی شناخته نشده است. یکی از انواع تمرینات مورد توجه، تمرین تناوبی با شدت بالا^{۱۶} (HIIT) است که می تواند به شکل هوازی با شدت زیاد همراه با دوره های استراحت فعال یا غیرفعال، با چرخه های متناوب در قالب مراحل تمرینی شدید یا دراز مدت، به اجرا درآید (ما و دیگران، ۲۰۱۳). مشاهده شده است که HIIT می تواند منجر به بهبود عملکرد قلبی - عروقی و ظرفیت هوازی شود (اسدی و دیگران، ۲۰۲۱)؛ با این حال، سازگاری متابولیک سلولی و مولکولی اساسی ناشی از آن در بافت قلب، بخوبی شناخته نشده است. تحقیقات بررسی کننده مسیرهای پیام دهی مرتبط با هایپرتروفی بافت قلب، نظیر مسیر PI3K/AKT، و تغییرات متأثر از تمرین (با شدت های مختلف) در این عوامل، نتایج ناهمسوایی را گزارش داده اند (معینی و دیگران، ۲۰۲۰؛ ما و دیگران، ۲۰۱۳؛ یو^{۱۷} و دیگران، ۲۰۱۰). بیان

1. Fal cao-Pires

2. Sun

3. Diabetic cardiomyopathy

4. de Las Heras & Lahera

5. Insulin-like growth factor-1

6. McMullen

7. Bao

8. Phosphoinositide 3-kinase

9. Protein kinase B

10. Liu

11. Ma

12. Forkhead box

13. Vainshtein & Hood

14. Wu

15. Kavazis

16. High intensity interval training

17. YU

شده است که احتمالاً بهبود در عملکرد قلبی پس از HIIT، نتیجه نهایی بهبود عملکرد انقباضی بافت قلب است و با افزایش بیان PI3K قابل توجیه می‌باشد؛ چرا که مسیر PI3K/AKT در حالت مقاومت به انسولین، دچار اختلال می‌گردد (معینی و دیگران، ۲۰۲۰). معینی و دیگران (۲۰۲۰) در مطالعه خود گزارش کرده اند که با اجرای پروتکل HIIT، مقاومت به انسولین کاهش می‌یابد و سبب افزایش بیان PI3K و ژن‌های پایین دست آن، مانند AKT می‌شود. بیگلری و دیگران (۲۰۲۰) در تحقیق خود بیان کرده اند که هشت هفته HIIT با شدت ۸۰ تا ۹۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی، محتوای پروتئین FOXO3 و AKT را به ترتیب کاهش و افزایش می‌دهد. برخی مطالعات پیشین در خصوص مزایای ناشی از شدت تمرین، مدت زمان و نوع آن؛ نتایج متفاوتی را گزارش نموده‌اند (کوناپکا و دیگران، ۲۰۱۴؛ لی^۱ و دیگران، ۲۰۱۵؛ خاکدان و دیگران، ۲۰۲۰)؛ با این حال، تمرینات HIIT ممکن است در بهبود کنترل گلوکز خون و سایر نشانگرهای مرتبط با سلامتی؛ بر سایر تمرینات برتری داشته باشند (آلوارز^۲ و دیگران، ۲۰۱۶). این در حالی است که در تحقیقی دیگر عنوان شده است که احتمالاً تمرینات با شدت کم و متوسط برای بیماران دیابتی نوع دو، از HIIT مفیدتر است (هانسن^۴ و دیگران، ۲۰۰۹).

بر اساس دانش ما، مطالعاتی که اثر HIIT را بر مسیر پیام دهی PI3K/AKT/FOXO3 در بافت قلب مورد بررسی قرار داده باشد، اندک هستند. لذا بررسی بیشتر در این خصوص ضرورت دارد. بنابراین، تحقیق حاضر با هدف بررسی تغییرات هایپرتروفی ناشی از دیابت و HIIT در مقطع بافتی قلب موش‌های صحرایی و پاسخ به این سوال که آیا این تمرینات در موش‌های دیابتی می‌تواند هایپرتروفی پاتولوژیک ناشی از دیابت را کنترل کند؛ به اجرا درآمد. نتایج تحقیق حاضر احتمالاً نقش تنظیم یا تعدیل‌کنندگی HIIT بر مسیر پیام دهی PI3K/AKT/FOXO3 را در نمونه‌های دیابتی و به عنوان یک راهبرد غیردارویی، مشخص خواهد کرد.

روش تحقیق

حیوانات و شرایط آزمایشگاهی: در مطالعه حاضر ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۸ هفته و با میانگین وزنی $188/14 \pm 1/9$ گرم در دمای $22 \pm 4/1$ درجه سانتی‌گراد، در رطوبت ۵۰ درصد، با رعایت چرخه روشنایی (۱۲ ساعت) و تاریکی (۱۲ ساعت) در قفس‌های مخصوص

با جنس پلاکسی گلاس نگهداری شدند و به صورت آزادانه، به آب و غذای مخصوص موش‌های صحرایی (پلت) دسترسی داشتند. به منظور القاء دیابت نوع دو، ابتدا تعداد ۲۰ سر موش صحرایی به مدت دو ماه با رژیم غذایی پرچرب^۵ (HFD) تغذیه شدند. پس از تزریق استرپتوزوتوسین (STZ)، تعداد چهار سر موش صحرایی به دلیل عدم ابتلا به دیابت، از پروتکل تحقیق حذف گردیدند. ۱۶ سر موش صحرایی باقی مانده که در گروه‌های سالم تقسیم‌بندی شده بودند، در طول اجرای پروتکل با رژیم غذایی استاندارد تغذیه شدند. در نهایت، ۳۲ سر موش صحرایی در گروه‌های سالم و دیابتی شده، بعد از آشنایی با شرایط آزمایشگاه، به چهار گروه شامل گروه دیابت-کنترل، دیابت-تمرین، کنترل-سالم و تمرین-سالم تقسیم شدند. هر گروه شامل هشت سر موش صحرایی بود، به گونه‌ای که پنج نمونه برای ارزیابی‌های سلولی و مولکولی و سه نمونه برای بررسی‌های هیستولوژیکی، مورد استفاده قرار گرفت. تمامی مراحل تحقیق حاضر به تصویب کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شهید چمران اهواز رسید و با شناسه EE/1400.2.24.32884/scu.ac.ir ثبت گردید.

1. Konopka
2. Lee
3. Alvarez

4. Hansen
5. High fat diet
6. Roche Diagnostics K.K., Japan

7. Fast blood glucose
8. Sugimoto

در گروه‌های تمرین - سالم و کنترل - سالم در تمام طول پژوهش (مطابق جدول ۱)، از رژیم غذایی استاندارد استفاده کردند (کاگاری^۳ و دیگران، ۲۰۱۸). وزن موش‌های صحرایی در تمام گروه‌ها و در مراحل مختلف تمرین، با استفاده از ترازوی مخصوص سنجش وزن حیوانات آزمایشگاهی با دقت ۰/۱ گرم (شرکت کیمیا کهربای مبین، ایران) سنجیده شد.

منیزیم، کلسیم و فسفر)، سه گرم ویتامین (شامل ویتامین‌های محلول در چربی، گروه ویتامین های B) و ۰/۵ گرم رنگ بود (سیدیکوئی^۱ و دیگران، ۲۰۱۰؛ کاکولسکی^۲ و دیگران، ۲۰۱۱). رژیم غذایی استاندارد مشابه با ترکیب بیان شده، برای رژیم پرچرب بود، با این تفاوت که مقادیر کربوهیدرات آن ۷۰ درصد و چربی آن ۱۰ درصد بود. موش‌های صحرایی

جدول ۱. ترکیب رژیم غذایی معمولی و پرچرب موش ها

ویتامین	مواد معدنی	فیبر	پروتئین	کربوهیدرات	چربی	نوع رژیم غذایی
۳ گرم	۵۰ گرم	۵۰ گرم	۲۰ درصد	۷۰ درصد	۱۰ درصد	رژیم غذایی استاندارد (۱۰ درصد کیلوکالری از چربی، بدون ساکاروز)
۳ گرم	۵۰ گرم	۵۰ گرم	۲۰ درصد	۲۰ درصد	۶۰ درصد	رژیم غذایی پرچرب (۶۰ درصد کیلوکالری از چربی)

متر بر دقیقه بود. در نهایت، پروتکل تمرینی به مدت هشت هفته، با تکرار پنج بار در هفته اجرا شد (توماس^۴ و دیگران، ۲۰۰۷). در دو هفته اول تمرین، شوکر دستگاه روشن بود؛ پس از آن و با شرطی شدن حیوانات به دویدن بر روی دستگاه، شوکر خاموش گردید. برنامه تمرین و زمان های گرم و سرد کردن (مدت پنج دقیقه با شدت ۴۰-۵۰ درصد V_{max}) و همچنین زمان استراحت فعال بین تناوب‌ها در هر هفته در حافظه دستگاه ذخیره شد و پس از قرار دادن موش ها درون کانال ها، فرمان شروع به دستگاه داده می‌شد و پروتکل به صورت خودکار اجرا می گردید. جزئیات پروتکل تمرین در جدول دو آورده شده است. لازم به ذکر است که V_{max} موش ها در ابتدای هر هفته مجددا اندازه گیری شد تا تمرین با رعایت اساس اصل اضافه بار اجرا گردد.

نحوه اجرای پروتکل HIIT: ابتدا موش های صحرایی در گروه های دیابت - تمرین و تمرین - سالم به مدت ۱۰ دقیقه و دو بار در روز به مدت پنج روز، با سرعتی معادل هشت متر بر دقیقه، با شیب صفر بر روی دستگاه نوارگردان (مدل TR105، شرکت دانش سالار ایرانیان) راه رفتند. سپس برای به دست آوردن حداکثر سرعت (V_{max}) موش های گروه های تمرین، یک آزمون فزاینده پلکانی به اجرا در آمد. طبق این آزمون، ابتدا موش‌ها به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه اقدام به دویدن کردند و هر دو دقیقه یکبار، سه متر بر دقیقه بر سرعت دستگاه افزوده شد. این کار تا زمانی ادامه یافت تا حیوان دیگر قادر به ادامه فعالیت با سرعت افزوده شده نباشد. سرعت در این لحظه به عنوان V_{max} حیوان در نظر گرفته شد. سرعت میانگین حاصل شده در شرایط واماندگی 41 ± 3

جدول ۲. جزئیات پروتکل تمرین تناوبی شدید (اقتباس از توماس و دیگران، ۲۰۰۷).

زمان کل تمرین (دقیقه)	سرعت در تناوب استراحت (درصد V_{max})	زمان هر تناوب استراحت (دقیقه)	سرعت در تناوب شدید (درصد V_{max})	زمان هر تناوب شدید (دقیقه)	تعداد تناوب	تعداد جلسات در هفته	شیب	هفته ها
۱۲	۵۰	۱	۸۰	۲	۴	۵	۰	۱
۱۲	۵۰	۱	۸۰	۲	۴	۵	۰	۲
۱۸	۵۰	۱	۸۵	۲	۶	۵	۰	۳
۲۱	۵۰	۱	۸۵	۲	۶	۵	۰	۴
۲۴	۵۰	۱	۹۰	۲	۸	۵	۰	۵
۲۴	۵۰	۱	۹۰	۲	۸	۵	۰	۶
۳۰	۵۰	۱	۹۵	۲	۱۰	۵	۰	۷
۳۰	۵۰	۱	۹۵	۲	۱۰	۵	۰	۸

1. Siddiqui
2. Kukulski

3. Calegari
4. Thomas

به این منظور از لامل و چسب کانادا بالزام استفاده گردید (بانکرافت و گمبل^۲، ۲۰۰۸).

روش وسترن بلات^۳: برای بررسی بیان پروتئین های FOXO3، PI3K و AKT از روش وسترن بلات استفاده گردید. نخست به ازای هر ۲۰۰ میلی گرم بافت، ۱۰۰ میکرو لیتر بافر لیز کننده^۴ سرد شامل تریس پایه^۵ (۰/۳ گرم، ۵۰ میلی مول در لیتر)، تریتون X-100 (۰/۰۲ گرم، ۰/۱ درصد)، سدیم داوکسی کولات^۶ (۰/۰۵ گرم، ۰/۲۵ درصد)، کلرید سدیم (۰/۴۳ گرم، ۱۵۰ میلی مول در لیتر)، سدیم داوکسی سولفات^۷ (۰/۰۲ گرم، ۰/۱ درصد)، اسید اتیلن دی آمین تتراستیک^۸ (EDTA، ۵/۸۴ گرم) که در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر با pH=۷/۴ مخلوط شده بود؛ به نمونه های بافت قلبی افزوده شد و با سرعت ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه، با دستگاه هموژنایزر هموژن شدند (اسپید مایل پلاس ساخت آلمان^۹). در مرحله بعد، پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدن نمونه ها با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و انتقال مایع رویی به میکروتیوپ جدید، از یک قرص مهار کننده پروتئاز به ازای هر ۱۰ میلی لیتر (10X) استفاده شد. سپس با استفاده از کیت براد فورد^{۱۱} غلظت سوپرناتان^{۱۲} به دست آمده، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه ها با نسبت یک به یک (بر اساس برآورد غلظت با روش برادفورد) با بافر نمونه^{۱۳} 2X مخلوط و پنج دقیقه جوشانده شدند تا ساختارهای مولکولی پروتئینی ها دناتوره^{۱۴} شده و حالت خطی پیدا کند. بخارات ایجاد شده در این حالت با پنج ثانیه ورتکس سریع و قرار دادن نمونه در یخ، از بین می رود. در این مرحله، نمونه ها در چاهک های الکتروفورز حاوی ژل SDS-PAGE ریخته شدند و فرآیند الکتروفورز با ولتاژ ۶۰ ولت، به مدت ۱۵ دقیقه و در ادامه، با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت. سپس در فرآیند انتقال پروتئین ها به مدت ۱۰۵ دقیقه با ولتاژ ۶۰ ولت، و در درون بافر انتقال، بر روی کاغذ نیترو - سلولز منتقل شدند. پس از سه مرحله پنج دقیقه ای شستشوی کاغذ نیترو - سلولز در محلول سالین بافر فسفات^{۱۵} (PBS)، عمل مسدود سازی توسط بافر مسدود کننده به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتی گراد انجام شد. پس از شستشوی مجدد با PBS، کاغذ نیترو - سلولز با آنتی بادی های اولیه مخصوص رت؛ PI3K^{۱۶}، AKT^{۱۷} و FOXO3^{۱۸} و GAP-DH^{۱۹} به مدت یک ساعت در دمای محیط بر روی شیکر با

نحوه استخراج بافت قلب: چهل و هشت ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، حیوانات با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. پس از استخراج بافت قلب، تعداد پنج نمونه از هر گروه به منظور ارزیابی محتوای پروتئین ها بلافاصله به فریزر -۷۰- منتقل شد. سه نمونه دیگر به منظور رنگ آمیزی بافتی و بررسی های بافت شناسی در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محلول فرمالین تعویض و بافت قلب رون محلول تازه فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. بر اساس روش متداول بافت شناسی، از نمونه های بافتی یک هفته پس از تثبیت شدن در فرمالین، لام تهیه شد.

رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آئوزین^۱: ابتدا بافت قلب به وسیله اتانول آب زدایی شد (۷۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت، ۹۰ درصد به مدت یک ساعت و ۱۰۰ درصد به مدت یک ساعت) و سپس توسط گزیلول (زایلنول^۲) پاک سازی گردید و در پارافین جاسازی شد. در مرحله بعد، نمونه ها توسط دستگاه میکروتوم Leica RM2025 ساخت کشور آلمان با ضخامت پنج میکرون برش داده شد. پس از طی مراحل متداول تثبیت بافتی، برش های نمونه بافت قلبی بر روی اسلاید شیشه ای تثبیت شدند. در این رنگ آمیزی، ابتدا مقاطع بافتی در ظرف حاوی گزیلول به مدت پنج دقیقه قرار گرفتند، سپس در غلظت های نزولی الکل، در هر ظرف به مدت دو دقیقه، قرار داده شدند. پس از آن دو دقیقه در آب مقطر غوطه ور گردیدند. در این مرحله، نمونه ها در رنگ هماتوکسیلین به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند و سپس به مدت پنج دقیقه با آب جاری شستشو داده شدند. در مرحله بعد، نمونه ها در آئوزین به مدت چهار دقیقه قرار گرفته و سپس شستشو به مدت پنج دقیقه انجام شد. نهایتاً مقاطع بافتی در این مرحله وارد ظروف حاوی الکل اتیلیک با غلظت های صعودی، به ترتیب با ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۰۰ درصد (هر کدام به مدت دو دقیقه) شدند و در آخر، نمونه ها در دو ظرف حاوی گزیلول، هر کدام به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. به منظور حفظ برش و ثابت ماندن آن روی لام، پس از انجام رنگ آمیزی، روی آن ها با لامل پوشانده شد.

1. Hematoxylin and Eosin staining

2. Xylenol

3. Bancroft and Gamble

4. Western blot

5. Lysis buffer

6. Tris-Hcl

7. Sodium deoxycholate

8. Sodium dodecyl sulfate

9. Ethylenediaminetetraacetic acid

10. Speed Mill plus, Germany

11. Bradford

12. Supernitan

13. Loading buffer

14. Denature

15. Phosphate-buffered saline

16. Anti-PI 3 kinase catalytic subunit gamma/

PI3Kgamma antibody ab154598, abcam

17. Akt1 (A-11): sc-377457, SANTA CRUZ

18. FKHL1 (D-12) or FOXO3: sc-48348,

SANTA CRUZ

19. Anti-GAPDH antibody (G-9): sc-365062,

SANTA CRUZ

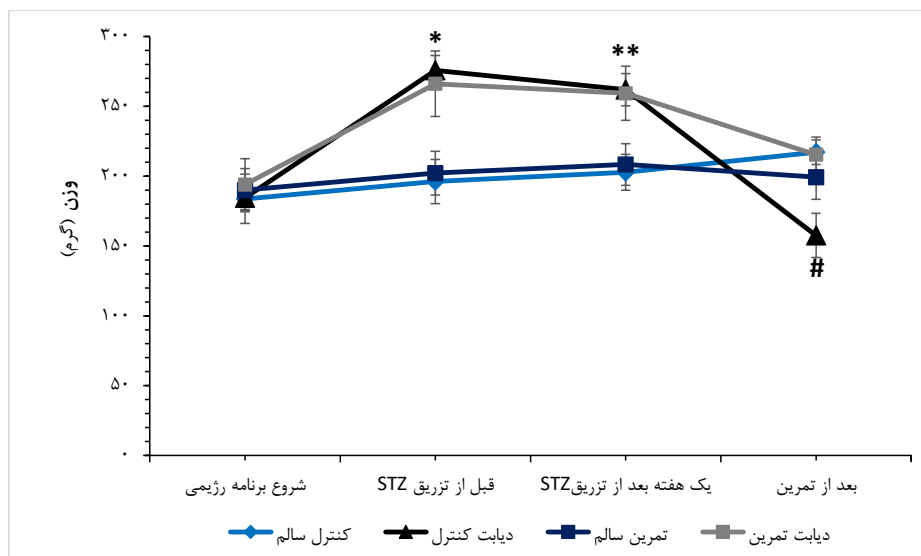
همچنین برای بررسی تغییرات وزن و سطح گلوکز موش‌ها در مراحل و هفته‌های مختلف تمرین، از آزمون تحلیل واریانس مرکب استفاده شد. به علاوه، نسخه ۲۵ نرم افزار SPSS برای تجزیه و تحلیل داده‌ها بکار گرفته شد و در سطح معنی‌داری $p < 0/05$ منظور گردید.

یافته‌ها

در شکل یک تغییرات میانگین وزن موش‌های صحرایی در هفته‌ها و مراحل مختلف پروتکل تمرینی نشان داده شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس مرکب نشان داد که وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های دیابت - کنترل و دیابت - تمرین از زمان آغاز تمرین و استفاده از رژیم غذایی پرچرب، تا مرحله قبل از تزریق STZ؛ به صورت معنی‌دار افزایش ($p = 0/001$)، و در هفته پایانی و انتهای پروتکل تمرینی، به صورت معنی‌دار کاهش ($p = 0/001$) یافته است. پس از پایان تمرین، وزن موش‌های صحرایی در گروه دیابت - کنترل نسبت به تمام گروه‌ها، به صورت معنی‌دار کمتر بود ($p = 0/001$).

۶۵ دور در دقیقه آنکوبه گردیدند (رقت $1/2000$ تا $1/5000$ در بافر PBS). از آنتی‌بادی‌های ثانویه مخصوص رت^۱ نیز با رقت $1/2000$ در بافر PBS به مدت یک ساعت برای اتصال به آنتی‌بادی اولیه استفاده شد. در این مرحله، کاغذها در اتاق تاریک و زیر نور قرمز با دو محلول کیت لومینسانس شیمیایی تقویت شده^۲ (ECL) ساخت کشور آمریکا با شماره سریال ۱۳۳۴۰۸ به مدت یک ساعت آغشته و پس از خشک شدن در محیط، درون کاست محافظ پلاستیکی حاوی فیلم حساس قرار داده شدند و در دستگاه پردازشگر X-RAY (مدل LD-14، چین) فرآیند ظهور باندها انجام شد. در نهایت، کاغذهای حساس به نور با استفاده از دستگاه اسکنر JS 2000 (بونین تک، چین) اسکن شد و دانسیته باندها توسط نرم افزار دستگاه JS 2000 محاسبه گردید.

روش‌های آماری: با استفاده از آزمون شاپیرو - ویلک^۳، طبیعی بودن توزیع داده‌ها تأیید شد. از آزمون لون^۴ برای بررسی همگن بودن واریانس‌ها استفاده گردید و سپس از آزمون تحلیل واریانس یک راهه^۵ (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی^۶ برای مقایسه گروه‌ها بهره برداری گردید.



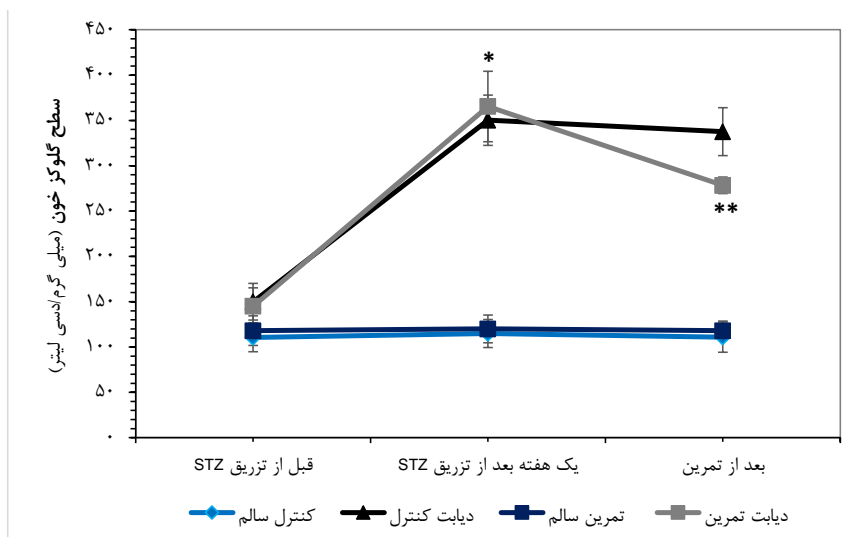
شکل ۱. مقایسه وزن گروه‌های مختلف موش‌های صحرایی شرکت کننده در مراحل مختلف پروتکل تمرینی. *نشانه تفاوت معنی‌دار گروه‌های دیابت - کنترل و دیابت - تمرین با گروه‌های کنترل - سالم و تمرین - سالم در مرحله پیش از تزریق STZ؛ **نشانه تفاوت معنی‌دار گروه‌های دیابت - کنترل و دیابت - تمرین با گروه‌های کنترل - سالم و تمرین - سالم در مرحله یک هفته پس از تزریق STZ؛ # نشانه تفاوت معنی‌دار گروه دیابت - کنترل با سایر گروه‌ها در مرحله پس از پایان تمرین؛ سطح معنی‌داری $p < 0/05$.

یافته است (به ترتیب با $p = 0/001$ و $p = 0/001$)؛ اما در پایان پروتکل تمرینی، در گروه دیابت - تمرین به صورت معنی‌دار نسبت به مرحله قبل، کاهش پیدا کرد ($p = 0/001$). شکل چهار نشان می‌دهد که ضخامت کاردیومیوسیت‌های بافت قلبی در گروه دیابت - کنترل نسبت به سه

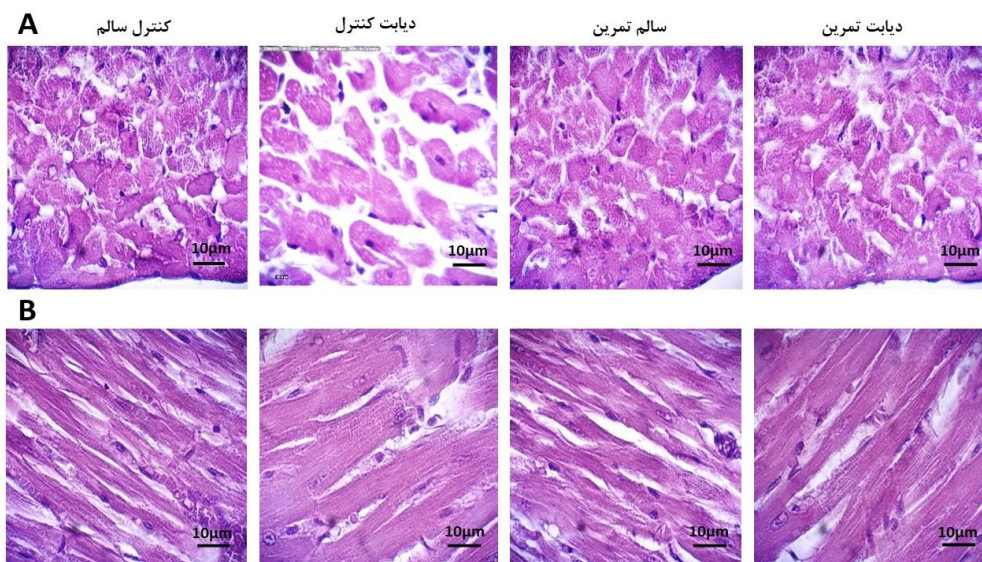
در شکل دو تغییرات میانگین گلوکز خون موش‌های صحرایی در هفته‌ها و مراحل مختلف پروتکل تمرینی نشان داده شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس مرکب نشان داد که گلوکز خون موش‌های صحرایی گروه‌های دیابت - کنترل و دیابت - تمرین یک هفته پس از تزریق STZ به صورت معنی‌دار افزایش

تفاوت معنی داری نداشت ($p=0/26$)، همچنین طول سلول در گروه دیابت - کنترل نسبت به سه گروه دیگر، به صورت معنی دار افزایش یافت (به ترتیب با $p=0/001$ ، $p=0/001$ و $p=0/02$)، و در گروه دیابت - تمرین نسبت به گروه دیابت- کنترل کاهش معنی داری پیدا کرد ($p=0/02$).

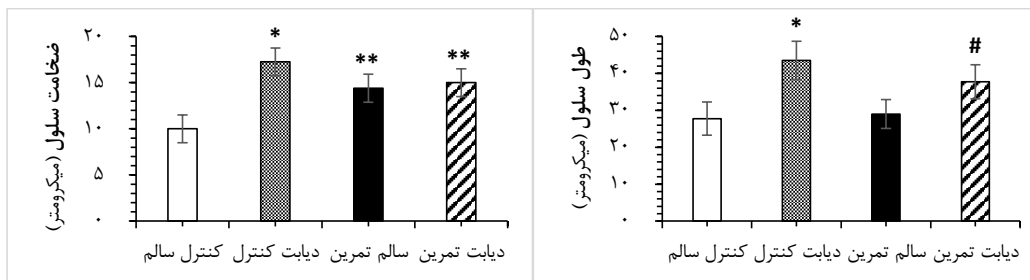
گروه سالم - کنترل، سالم - تمرین و دیابت - تمرین؛ به صورت معنی دار افزایش یافته است (به ترتیب با $p=0/001$ ، $p=0/03$ و $p=0/01$)، همچنین، ضخامت سلول های کاردیومیوسیت های بافت قلبی در گروه سالم - تمرین نسبت به گروه کنترل - سالم افزایش یافت ($p=0/01$)؛ اما در گروه دیابت- تمرین در مقایسه با گروه سالم - تمرین



شکل ۲. مقایسه گلوکز خون گروه های مختلف موش های صحرایی در مراحل مختلف پروتکل تمرینی. *نشانه تفاوت معنی دار گلوکز خون در گروه های دیابت - کنترل و دیابت - تمرین با گروه های کنترل - سالم و تمرین - سالم در مرحله یک هفته پس از تزریق STZ؛ ** نشانه تفاوت معنی دار گروه دیابت - تمرین با سایر گروه ها پس از پایان تمرین؛ سطح معنی داری $p < 0/05$.



شکل ۳. تغییرات هیستولوژیک هایپر تروفی ناشی از دیابت و HIIT در مقطع بافتی قلب موش های صحرایی گروه های مختلف. مقاطع قلب با روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ آمیزی شدند. (A) برش عرضی و (B) برش طولی بافت قلبی در گروه های مختلف. نوار سیاه رنگ ۱۰ میکرومتر را نشان می دهد.

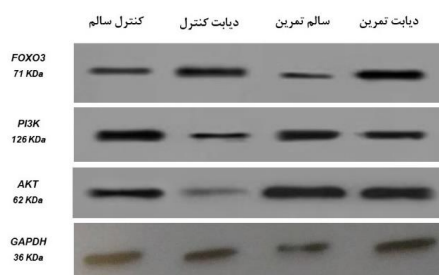


شکل ۴. مقایسه ضخامت (A) و طول (B) سلول‌های کاردیومیوسیت بافت قلبی موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف. *نشانه تفاوت معنی‌دار ضخامت و طول سلول در گروه دیابت - کنترل با سایر گروه‌ها؛ **نشانه تفاوت معنی‌دار ضخامت سلول در گروه‌های دیابت - تمرین و سالم - تمرین با گروه‌های دیابت - کنترل و کنترل - سالم؛ #نشانه تفاوت معنی‌دار طول سلول در گروه دیابت - تمرین با سایر گروه‌ها؛ سطح معنی‌داری $p < 0.05$.

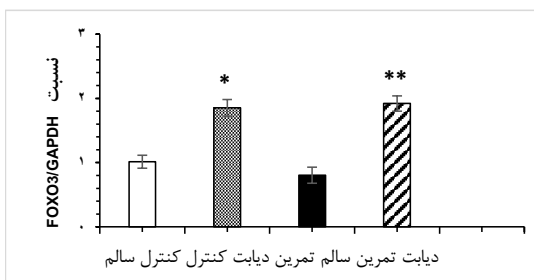
گروه‌های سالم، افزایش یافت ($p = 0.001$)؛ اما محتوای پروتئین‌های PI3K و AKT در گروه دیابت - کنترل نسبت به گروه کنترل - سالم به صورت معنی‌دار کاهش پیدا کرد (به ترتیب با $p = 0.001$ و $p = 0.009$). این در حالی بود که محتوای این پروتئین‌ها در گروه دیابت - تمرین نسبت به گروه دیابت - کنترل، با افزایش معنی‌دار (به ترتیب با $p = 0.01$ و $p = 0.001$) همراه بود (شکل پنج).

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه در مورد مقایسه میانگین مقادیر پروتئین‌های FOXO3، PI3K، و AKT بافت قلب موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف بیانگر تفاوت معنی‌دار در مقادیر این پروتئین‌ها در گروه‌های مختلف بود ($p = 0.001$). بر اساس نتایج آزمون تعقیبی توکی، محتوای پروتئین FOXO3 در گروه‌های دیابت - کنترل و دیابت - تمرین به صورت معنی‌دار نسبت به

A



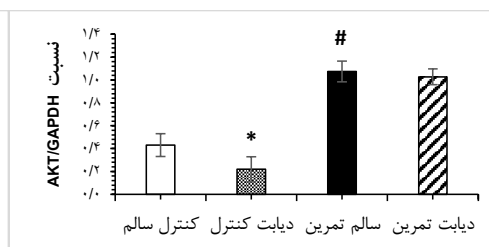
B



C



D



شکل ۵. (A) تعیین محتوای پروتئین‌های FOXO3، PI3K، و AKT در چهار گروه شرکت کننده با استفاده از روش وسترن بلات. (B، C، و D) تجزیه و تحلیل باندهای وسترن بلات پروتئین‌های FOXO3، PI3K، و AKT در گروه‌های مختلف. *نشانه تفاوت معنی‌دار بین گروه دیابت - کنترل با سایر گروه‌ها؛ **نشانه تفاوت معنی‌دار بین گروه دیابت - تمرین با گروه‌های کنترل - سالم و سالم - تمرین؛ # نشانه تفاوت معنی‌دار بین گروه سالم - تمرین با گروه‌های کنترل - سالم و دیابت - کنترل؛ سطح معنی‌داری $p < 0.05$.

هایپرتروفی پاتولوژیک در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت است. دیگر نتایج این مطالعه نشان داد که این هایپرتروفی پاتولوژیک ایجاد شده، پس از اجرای منظم HIIT، به صورت قابل توجهی کنترل شده و حتی در میوسیت‌های قلبی

بحث

نتایج هیستولوژیک نشان داد که طول و ضخامت سلول‌های موسیت قلبی در نمونه‌های دیابتی به صورت معنی‌دار افزایش می‌یابد (شکل سه)، روندی که بیانگر بروز

برقرار می‌کند و یک مسیر بازخورد را از طریق مسیرهای مستقیم یا غیرمستقیم تشکیل می‌دهد (سنوک^۱ و دیگران، ۲۰۱۴؛ لیو و دیگران، ۲۰۲۱). به نظر می‌رسد که مسیر PI3K/AKT مستقیماً بر بیان پروتئین FOXO3 اثر می‌گذارد. هنگام غیرفعال شدن مسیر پیام دهی PI3K/AKT، آتروفی عضلانی از طریق فعال شدن FOXO3 افزایش می‌یابد (لیو و دیگران، ۲۰۲۱). همچنین در هنگام وجود محرک رشدی مانند IGF-1، PI3K/AKT عامل آتروفی FOXO3 را فسفریله کرده و FOXO3 در حالت فسفریله (در سیتوزول) می‌ماند. هنگام حذف محرک رشدی، با غیرفعال شدن PI3K/AKT و متعاقب آن دفسفریله شدن FOXO3، این پروتئین از سیتوزول به درون هسته جابجا شده و سبب فعال شدن ژن‌های درگیر در مهار سیکل سلولی، متابولیسم و مرگ سلولی می‌شود (کارآئی و دیگران، ۲۰۱۸).

با وجود ارتباط بین مسیر PI3K/AKT و پروتئین FOXO3، در تحقیق حاضر بر خلاف افزایش بیان PI3K و AKT ناشی از مداخله HIIT در نمونه‌های دیابتی، محتوای پروتئین FOXO3 پس از HIIT در موش‌های صحرایی گروه دیابت - تمرین تغییر معنی‌داری نکرد. هم سو با این یافته‌ها، هالووی^۴ و دیگران (۲۰۱۵) پس از اجرای HIIT و تمرین استقامتی، تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین FOXO3 عضله قلب موش‌های صحرایی دچار نقص قلبی، مشاهده نکرده‌اند. ژوه^۵ و دیگران (۲۰۱۷) نیز نشان داده‌اند که ۱۲ هفته تمرین مقاومتی، فعالیت AKT را افزایش می‌دهد؛ اما تغییر معنی‌داری در FOXO3 ایجاد نمی‌کند. احتمالاً افزایش بیان پروتئین PI3K و AKT به میزانی نبوده که باعث مهار عامل FOXO3 گردد، یا عوامل احتمالی دیگری نیز بر بیان و رونویسی و جابه‌جایی FOXO3 تاثیر گذارند که در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار نگرفته است. پروتئین FOXO3 با عامل فعال کننده مشترک گیرنده گاما - یک آلفا فعال شده با تکثیر کننده پراکسی زوم^۶ (PGC-1α) که کوفاکتوری حیاتی در بیونز میتوکندریایی است، دارای اثری متقابل است؛ به گونه‌ای که میزان بالای PGC-1α می‌تواند سبب مهار این عامل تجزیه کننده پروتئین عضلانی شود (ما و دیگران، ۲۰۱۳؛ کارآئی و دیگران، ۲۰۱۸). همچنین باید اشاره کرد که مسیر اصلی پروتئین‌های FOXO3 در تنظیم اتوفازای، ماکرو - اتوفازای است و تنظیم اتوفازای توسط مکانیسم‌های پیچیده‌ای صورت می‌گیرد که می‌تواند به محرک‌های گوناگون مانند مواد مغذی، عوامل رشدی، هورمون‌ها، غلظت کلسیم داخل سلولی، میزان ATP و هیپوکسی؛ اشاره کرد (خالصی و دیگران، ۲۰۱۸؛ کارآئی و

موش‌های صحرایی سالم، شاهد بروز آشکار هایپرتروفی فیزیولوژیک بودیم. این یافته‌ها با نتایج مطالعه نووآ^۱ و دیگران (۲۰۱۷) مبنی بر این که تمرینات با شدت بالا در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت، ضخامت و سطح مقطع سلول‌های میوسیت قلبی را کاهش داده و هایپرتروفی پاتولوژیک و فیبروز قلبی ناشی از دیابت را کنترل می‌کند؛ همسو است.

علاوه بر این‌ها، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطح گلوکز خون گروه‌های دیابت - کنترل و دیابت - تمرین یک هفته پس از تزریق STZ، به صورت معنی‌دار افزایش پیدا می‌کند، در حالی که پس از اجرای HIIT (در موش‌های صحرایی دیابتی)، با کاهش معنی‌دار همراه است. کرد و دیگران (۲۰۱۹) همسو با این یافته‌ها نشان داده‌اند که سطح گلوکز در موش‌های دیابتی تمرین کرده به طور قابل توجهی کمتر از موش‌های دیابتی بی‌تمرین (گروه کنترل) است. احتمالاً یکی از عوامل بروز DCM، آپوتوزیس ناشی از قند خون بالا و اختلال غیرعادی در گلوکز پلازما و میزان انسولین می‌باشد. در واقع، قند خون بالای درازمدت، یکی از علل اصلی تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، مقاومت به انسولین و اختلال در تنظیم کلسیم سیتوپلاسمی است که خود سلول‌های عضله قلبی را مستعد مرگ سلولی می‌کند و در نهایت، موجب تغییر انقباض عضلانی و نارسایی قلبی می‌شود (دلاس هراس و لاهرا، ۲۰۲۱؛ کرد و دیگران، ۲۰۱۹).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با القاء دیابت، محتوای پروتئین FOXO3 افزایش و محتوای پروتئین‌های PI3K و AKT کاهش می‌یابد. همسو با این یافته‌ها، یو^۲ و دیگران (۲۰۱۷) نیز نشان داده‌اند که دیابت ناشی از STZ، باعث افزایش بیان FOXO3 کاردیومیوسیت‌ها می‌شود و این اختلال متابولیک، عامل اصلی اختلالات ساختاری و عملکرد عضلات قلب می‌باشد. به طور مشخص، مقاومت به انسولین ناشی از دیابت نوع دو می‌تواند در سوخت و ساز و سنتز پروتئین‌ها از طریق مسیر پیام دهی PI3K/AKT، ایجاد اختلال کند و در صورت عدم کنترل بیماری دیابت، سنتز پروتئین عضلات تحت تأثیر قرار گرفته و سبب افزایش تجزیه پروتئین می‌شود (لیو و دیگران، ۲۰۲۱). اخیراً بیان شده است که مهار مسیر پیام دهی PI3K/AKT به واسطه بیماری دیابت و افزایش فعالیت مسیر مقابل آن، یعنی FOXO3/MAFbx/MuRF، به صورت بالقوه می‌تواند سبب آتروفی شود. در واقع، پروتئین FOXO3 با چندین مولکول درون سلولی ارتباط

1. Novoa
2. Yu
3. Seok

4. Holloway
5. Xu
6. Peroxisome proliferator-activated receptor -

gamma coactivator-1 alpha

مسیرهای پیام دهی مرتبط با آن نیاز است تا به نتایج روشن تری دست یابیم. در این تحقیق نیز چنانچه در کنار متغیرهای این مطالعه، نیمرخ عوامل اکسیدانی و آنتی اکسیدانی و همچنین با روش رنگ آمیزی تخصصی مازون تری کروماتیک^۴ و رنگ آمیزی پاس^۵، میزان فیروز بافت قلبی در نمونه های دیابتی و تغییرات آن پس از پروتکل تمرینی؛ مورد بررسی قرار می گرفت؛ می شد با اطمینان بیشتری اثر HIIT را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد.

نتیجه گیری: اجرای HIIT تغییر معنی داری در محتوای پروتئین FOXO3 در موش های صحرایی مبتلا به دیابت ایجاد نکرد، اما موجب بهبود محتوای پروتئین های PI3K و AKT گردید؛ ضمن آن که این شیوه تمرینی تغییرات مهمی را در سطح بافتی ایجاد کرد و توانست تا حد مطلوبی، هایپرتروفی پاتولوژیک ایجاد شده بر اثر دیابت را تعدیل نماید. به نظر می رسد بررسی سایر عوامل و مسیرهای پیام دهی مرتبط با عامل FOXO3 و شناسایی اثر شیوه های تمرینی، بتواند درک ما در مورد راهکار غیردارویی برای کنترل عوارض ناشی از بیماری دیابت را کامل کند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچگونه تعارض منافی در خصوص این مقاله وجود ندارد.

قدردانی و تشکر

این مطالعه با استفاده از گرنت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز با شماره SCU.SS1400.266 انجام گرفته است. بدین وسیله از همکاری و پشتیبانی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده علوم ورزشی؛ تشکر و قدردانی می شود.

دیگران، ۲۰۱۸). از سوی دیگر، پروتئین FOXO3 در شرایط استرس های اکسیداتیو و تغذیه ای و سیگنال های مربوطه، از طریق فعال کردن ژن های مانند LC3B^۱، باعث القای اتوفاژی می شود. بنابراین، هر گونه شرایط ایجاد کننده استرس اکسیداتیو می تواند این پروتئین را فعال نگه دارد (لی و دیگران، ۲۰۱۵؛ خالصی و دیگران، ۲۰۱۸). از طرف دیگر، نشان داده شده است که شدت بالای تمرین خود می تواند عامل مهمی برای افزایش مرگ سلولی باشد. بر اساس شواهد، فعالیت بدنی با شدت های بالا در کنار ایجاد سازگاری های فیزیولوژیک، ممکن است با سیستم دفاع آنتی اکسیدانی ناکارآمد بدن همراه شود و به ایجاد استرس اکسیداتیو و آسیب های سلولی منتهی گردد (وانگ^۲ و دیگران، ۲۰۲۱؛ لو^۳ و دیگران، ۲۰۲۱). احتمالاً این ویژگی HIIT منجر به بالا نگه داشتن سطح پروتئین FOXO3 شده است. مشخص گردیده است که تمرینات ورزشی با شدت های مختلف، می توانند مرگ سلولی را مهار یا فعال کند؛ به طوری که کاوازیس و دیگران (۲۰۱۴) ضمن بررسی اثر تمرین تداومی هوازی بر بیان ژن FOXO3، کاهش رونویسی mRNA مربوط به FOXO3a را در عضله قلب و عضله نعلی نشان داده اند. ناهمسویی در نتایج احتمالاً به مدت زمان، شدت و نوع تمرین و نوع آزمودنی ها مربوط می شود (ما و دیگران، ۲۰۱۳). یافته های مطالعه حاضر در کنار یافته های مطالعات گذشته نشان از آن دارد که هرگونه دستکاری در تمرینات ورزشی می تواند بر پروتئین های مسیرهای سلولی از جمله مسیر مرگ سلولی وابسته به پروتئین های FOXO3 تأثیر بگذارد و نتایج متفاوتی را به همراه داشته باشد. در کل، به مطالعات بیشتری در خصوص تاثیر مداخله تمرینات مختلف ورزشی و بررسی دیگر عوامل مؤثر بر بیان پروتئین FOXO3 و پروتئین های

منابع

- Alvarez, C., Ramirez-Campillo, R., Martinez-Salazar, C., Mancilla, R., Flores-Opazo, M., Cano-Montoya, J., & Ciolac, E. (2016). Low-volume high-intensity interval training as a therapy for type 2 diabetes. *International Journal of Sports Medicine*, 37(9), 723-729. <https://doi.org/10.1055/s-0042-104935>.
- Asad, M.R., Fallahzadeh, E., & Barzegari, A. (2021). The effect of four types of exercise training protocols on the angiotensin-1 and canstatin expression in the left ventricle of Wistar rats. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport*, 9(17), 8-19. [In Persian], <https://doi.org/10.22077/jpsbs.2020.3105.1539>.
- Bancroft, J.D., & Gamble, M. (2008). *Theory and practice of histology techniques*. 6th edition. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia: 83-134.

1. Light chain 3B
2. Wang

3. Lu
4. Masson trichromatic staining

5. Pas staining

- Bao, W., Pan, F., Chen, L., Su, G., Gao, X., Li, Y., ... & Song, H. (2014). The PI3K/AKT pathway and FOXO3a transcription factor mediate high glucose-induced apoptosis in neonatal rat ventricular myocytes. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16(4), e14914. <https://doi.org/10.5812/ircmj.14914>.
- Biglari, S., Afousi, A.G., Mafi, F., & Shabkhiz, F. (2020). High-intensity interval training-induced hypertrophy in gastrocnemius muscle via improved IGF-I/Akt/FoxO and myostatin/Smad signaling pathways in rats. *Physiology International*, 107(2), 220-230. <https://doi.org/10.1556/2060.2020.00020>.
- Calegari, L., Nunes, R.B., Mozzaquattro, B.B., Rossato, D.D., & Dal Lago, P. (2018). Exercise training improves the IL-10/TNF- α cytokine balance in the gastrocnemius of rats with heart failure. *Brazilian Journal of Physical Therapy*, 22(2), 154-160. <https://doi.org/10.1016/j.bjpt.2017.09.004>.
- de Las Heras, N., & Lahera, V. (2021). Relevance of mitochondrial dysfunction in heart disease associated with insulin resistance conditions. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 474(1), 21-31. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02638-8>.
- Falcao-Pires, I., Leite-Moreira, A.F. (2012). Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment. *Heart Failure Reviews*, 17, 325-344. <https://doi.org/10.1007/s10741-011-9257-z>.
- Gholipour, M., Seifabadi, M., & Asad, M.R. (2020). Comparing the effects of endurance and resistance trainings on gene expression involved in protein synthesis and degradation signaling pathways of Wistar rat soleus muscle. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications*, 77(11), 668-677. [In Persian], <http://tumj.tums.ac.ir/article-1-10197-en.html>.
- Hansen, D., Dendale, P., Jonkers, R., Beelen, M., Manders, R., Corluy, L., ... & Van Loon, L. (2009). Continuous low-to moderate-intensity exercise training is as effective as moderate-to high-intensity exercise training at lowering blood HbA1c in obese type 2 diabetes patients. *Diabetologia*, 52(9), 1789-97. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1354-3>.
- Holloway, T.M., Bloemberg, D., da Silva, M.L., Simpson, J.A., Quadrilatero, J., & Spriet, L.L. (2015). High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. *PLoS One*, 10(3), e0121138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121138>.
- Jokar, M., & Sherafati-Moghadam, M. (2020). The effect of 4 weeks high intensity interval training (HIIT) on the content of FOXO3a Beclin-1 proteins in the left ventricular heart tissue with type 2 diabetic rats. *Feyz Journal*, 24(2), 160-169. [In Persian], <https://doi.org/10.18502/ssu.v29i11.8502>.
- Kara'i, S., Ravasi, A.A., & Gholipour, M. (2018). The effect of 8 weeks continuous endurance and high intensity interval training on cardiac tissue FOXO1 and FOXO3a expression levels in male rats. *Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences*, 13(2), 62-70. [In Persian], <https://doi.org/10.22100/jkh.v13i2.1892>.
- Kavazis, A.N., Smuder, A.J., & Powers, S.K. (2014). Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 117(3), 223-230. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00210.2014>.
- Khakdan, S., Delfan, M., Heydarpour Meymeh, M., Kazerouni, F., Ghaedi, H., Shanaki, M., ... & Rahimpour, A. (2020). High-intensity interval training (HIIT) effectively enhances heart function via miR-195 dependent cardiomyopathy reduction in high-fat high-fructose diet-induced diabetic rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 126(3), 250-257. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1511599>.
- Khalesi, M., Mirdar, S., & Samadi, A. (2018). Effect of a period of swimming exercise on Sirt1 and FoxO3a genes expression in lung tissue of wistar rats. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 25(2), 73-79. [In Persian]

- Konopka, A.R., & Harber, M.P. (2014). Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 42(2), 53-61. <https://doi.org/10.1249/jes.0000000000000007>.
- Kukulski, F., Lévesque, S.A., & Sévigny, J. (2011). Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. *Advances in Pharmacology*, 61, 263-299. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385526-8.00009-6>.
- Kurd, M., Valipour Dehnou, V., Tavakoli, S.A., & Gahreman, D.E. (2019). Effects of endurance training on hippocampus DJ-1, cannabinoid receptor type 2 and blood glucose concentration in diabetic rats. *Journal of Diabetes Investigation*, 10(1), 43-50. <https://doi.org/10.1111/jdi.12868>.
- Lee, K., Ochi, E., Song, H., & Nakazato, K. (2015). Activation of AMP-activated protein kinase induce expression of FoxO1, FoxO3a, and myostatin after exercise-induced muscle damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 466(3), 289-294. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.126>.
- Li, M., Li, W., Yoon, J.-H., Jeon, B.H., & Lee, S.K. (2015). Resistance exercise training increase activation of AKT-eNOS and Ref-1 expression by FOXO-1 activation in aorta of F344 rats. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 19(3), 165-171. <https://doi.org/10.5717/jenb.2015.15071702>.
- Liu, P.-j., Hu, Y.-s., Wang, M.-j., & Kang, L. (2021). Nutrient weight against sarcopenia: regulation of the IGF-1/PI3K/Akt/FOXO pathway in quinoa metabolites. *Current Opinion in Pharmacology*, 61, 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2021.10.001>.
- Lu, Z., Xu, Y., Song, Y., Biró, I., & Gu, Y. (2021). A mixed comparison of different intensities and types of physical exercise in patients with diseases related to oxidative stress: a systematic review and network meta-analysis. *Frontiers in Physiology*, 12, 700055. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.700055>.
- Lu, J., Liu, J., Zhang, L., Wang, X., Zhang, Y., & Tang, Q. (2021). Morphological and functional characterization of diabetic cardiomyopathy in db/db mice following exercise, metformin alone, or combination treatments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20(584), 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.018>.
- Ma, J.K., Scribbans, T.D., Edgett, B.A., Boyd, J.C., Simpson, C.A., Little, J.P., & Gurd, B.J. (2013). Extremely low-volume, high-intensity interval training improves exercise capacity and increases mitochondrial protein content in human skeletal muscle. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology*, 3, 202-210. <https://doi.org/10.4236/ojmip.2013.34027>.
- Ma, Z., Qi, J., Meng, S., Wen, B., & Zhang, J. (2013). Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *European Journal of Applied Physiology*, 113(10), 2473-2486. <https://doi.org/10.1007/s00421-013-2685-9>.
- McMullen, J.R., & Jennings, G.L. (2007) Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(4), 255-262. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04585.x>.
- Moeini, M., Behpoor, N., & Tadibi, V. (2020). The effect of 8 weeks high intensity interval training on the expression of PI3K in the left ventricle and insulin resistance of male Wistar rats with type 2 diabetes. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport*, 8(16), 48-58. [In Persian], <https://doi.org/10.22077/jpsbs.2019.2681.1506>.
- Novoa, U., Arauna, D., Moran, M., Nuñez, M., Zagmutt, S., Saldivia, S., ... & Gonzalez, D.R. (2017). High-intensity exercise reduces cardiac fibrosis and hypertrophy but does not restore the nitroso-redox imbalance in diabetic cardiomyopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 7921363, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2017/7921363>.

- Ramezani, N., Vanaky, B., Shakeri, N., Soltanian, Z., Fakhari Rad, F., & Shams, Z. (2019). Evaluation of Bcl-2 and Bax Expression in the Heart of Diabetic Rats after Four Weeks of High Intensity Interval Training. *Medical Laboratory Journal*, 13(1), 15-20. <https://doi.org/10.18502/ssu.v27i6.1600>.
- Roudier, E., Forn, P., Perry, M.E., & Birot, O. (2012). Murine double minute-2 expression is required for capillary maintenance and exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *FASEB Journal*, 26(11), 4530-4539. <https://doi.org/10.1096/fj.12-212720>.
- Seok, H.Y., Chen, J., Kataoka, M., Huang, Z.-P., Ding, J., Yan, J., ... & Wang, D.-Z. (2014). Loss of microRNA-155 protects the heart from pathological cardiac hypertrophy. *Circulation Research*, 114(10), 1585-1595. <https://doi.org/10.1161/circresaha.114.303784>.
- Siddiqui, N., Nessa, A., & Hossain, M. (2010). Regular physical exercise: way to healthy life. *Mymensingh Medical Journal*, 19(1), 154-158. PMID: 20046192.
- Sugimoto, K., Rashid, I.B., Shoji, M., Suda, T., & Yasujima, M. (2008). Early changes in insulin receptor signaling and pain sensation in streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *The Journal of Pain*, 9(3), 237-245. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2007.10.016>.
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B.B., ... & Mbanya, J.C. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>.
- Thomas, C., Bishop, D., Moore-Morris, T., & Mercier, J. (2007). Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 293(4), 916-922. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00164.2007>.
- Wang, L., Lavier, J., Hua, W., Wang, Y., Gong, L., Wei, H., ... & Zhang, Y. (2021). High-intensity interval training and moderate-intensity continuous training attenuate oxidative damage and promote myokine response in the skeletal muscle of ApoE KO mice on high-fat diet. *Antioxidants*, 10(7), 992. <https://doi.org/10.3390/antiox10070992>.
- Wu, Z., Huang, A., Yan, J., Liu, B., Liu, Q., Zhang, J., ... & Chen, M. (2017). Resveratrol ameliorates cardiac dysfunction by inhibiting apoptosis via the PI3K/Akt/FoxO3a pathway in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 70(3), 184-193. <https://doi.org/10.1097/fjc.0000000000000504>.
- Xu, M., Chen, X., Chen, D., Yu, B., & Huang, Z. (2017). FOXO1: a novel insight into its molecular mechanisms in the regulation of skeletal muscle differentiation and fiber type specification. *Oncotarget*, 8(6), 10662. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12891>.
- Yu, W., Chen, C., Fu, Y., Wang, X., & Wang, W. (2010). Insulin signaling: a possible pathogenesis of cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Therapeutics*, 28(2), 101-105. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2009.00120.x>.
- Yu, W., Gao, B., Li, N., Wang, J., Qiu, C., Zhang, G., ... & Zhang, Y. (2017). SIRT3 deficiency exacerbates diabetic cardiac dysfunction: role of FOXO3a-Parkin-mediated mitophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(8), 1973-1983. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.10.021>.