

# تأثیر پروتئین کیناز - B بر پروتئین‌های خانوادگی اتوفاژی FOXO (FOXO1 و FOXO3a) به دنبال تمرین تناوبی با شدت بالا در بطن چپ قلب موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین و نیکوتین آمید

ندا آقایی بهمن‌بگلو<sup>۱\*</sup>، رضا صلبوخی<sup>۲</sup>، محمد شرافتی مقدم<sup>۳</sup>

## چکیده

مقدمه: پروتئین‌های خانواده FOXO عوامل مهم در مسیر اتوفاژی هستند. پروتئین کیناز-B تنظیم‌کننده مهم برای این خانواده است که می‌تواند از طریق تمرین ورزشی تنظیم شوند. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر پروتئین کیناز-B (PKB) بر پروتئین‌های خانوادگی اتوفاژی FOXO (FOXO1 و FOXO3a) به دنبال تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) در بطن چپ قلب موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین (STZ) و نیکوتین آمید می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، ۱۲ سر موش صحرایی نر ۲ ماهه از نژاد اسپراگ و داوولی با میانگین وزن  $270 \pm 20$  گرم انتخاب و پس از ایجاد دیابت نوع دو از طریق القاء STZ و نیکوتین آمید به روش تصادفی به ۲ گروه، تمرین دیابتی (۶ سر) و کنترل دیابتی (۶ سر) تقسیم شدند؛ گروه تمرینی ۴ روز در هفته مطابق با برنامه‌ی تمرینی به مدت ۸ هفته به تمرین HIIT پرداختند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ و آزمون t-مستقل استفاده شد. سطح معنی داری  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها: تمرین HIIT منجر به افزایش معنی داری در محتوای پروتئین‌های PKB بین گروه‌های تمرین و کنترل شد ( $P=0/0001$ ). در مقابل کاهش معنی داری در محتوای پروتئین‌های FOXO1 ( $P=0/003$ ) و FOXO3a ( $P=0/006$ ) بین گروه‌های تمرین و کنترل مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به نظر می‌رسد تمرین HIIT، با افزایش و تنظیم PKB منجر به کاهش و غیرفعال شدن پروتئین‌های FOXO1 و FOXO3a در قلب آزمودنی‌های دیابتی می‌شود. مهار این پروتئین‌ها می‌تواند از اتوفاژی بیش از حد قلبی در آزمودنی‌های دیابتی جلوگیری کند.

واژگان کلیدی: تمرین تناوبی با شدت بالا، بطن چپ، پروتئین کیناز-B، پروتئین FOXO1، پروتئین FOXO3a، دیابت نوع دو

۱- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علی‌آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی‌آباد کتول، ایران

۲- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد آبادان، دانشگاه آزاد اسلامی، آبادان، ایران

۳- گروه علوم ورزشی، مؤسسه‌ی آموزش عالی آپادانا، شیراز، ایران

نشانی: گلستان، شهرستان علی‌آباد کتول، بلوار دانشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علی‌آباد کتول، کد پستی: ۴۹۴۱۷۹۳۴۵۱، تلفن: ۰۱۷۳۴۲۲۳۳۰۰، پست

الکترونیک: nedaghahi@gmail.com

## مقدمه

با وجود تحولات اخیر در راهبردهای درمانی، بیماری‌های قلبی هنوز هم یکی از سه علل مرگ‌ومیر در سطح جهان و یکی از بزرگترین تهدیدها برای بهداشت و سلامت عمومی است [۱]. برآورد شده است که ۱۷/۹ میلیون نفر در سال ۲۰۱۶ از بیماری قلبی درگذشته‌اند که حدود ۳۱ درصد از تمام مرگ‌ومیرهای جهانی است [۲].

اتوفاژی یک سازوکار بازیافت خودخوری برای کاهش پروتئین‌ها و اندامک‌های آسیب دیده است. اتوفاژی برای حفظ سوخت‌وساز سلولی حیاتی است [۳]. به‌عنوان یک سازوکار به شدت حفاظت شده، اتوفاژی نقش مهمی در حفظ تعادل انرژی و بقای سلول در پاسخ به استرس انرژی و مواد مغذی دارد [۴]. نظم اتوفاژی در چندین بیماری از جمله چاقی، دیابت، بیماری‌های قلبی و عروقی، بیماری‌های عصبی و سرطان دچار اختلال و نقص می‌شود [۵]. اختلال در اتوفاژی میوسیت‌های قلبی، نقش عمده‌ای در پاتوژنز نارسایی قلبی، کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک، کاردیومیوپاتی اتساعی، پیری قلبی، کاردیومیوپاتی دیابتی و ایسکمی/پرفیوژن مجدد (I/R)<sup>۱</sup> دارد. اتوفاژی می‌تواند سبب حفظ عملکرد قلب شود؛ همچنین یک هدف برای جلوگیری از بیماری‌های قلبی است و برای سوخت‌وساز قلبی در هر دو شرایط پایه و تنش ضروری است [۶].

در پاسخ به تغییرات در حجم کار و/یا انقباض، قلب رشد می‌کند. در واقع، عضله قلب قادر به بازسازی ساختاری قوی و سریع است. در حالت عادی و طبیعی، هایپرتروفی فیزیولوژیکی قلب با رشد میوسیت قلبی همراه است و یک فرآیند مثبت در حفظ برون‌ده قلبی و به حداقل رساندن ناهنجاری‌های قلبی است [۷].

در سال‌های اخیر، گام‌های قابل توجهی در افشای وقایع سلولی و مولکولی موافق و مخالف مربوط به فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک انجام شده است. در میان این سازوکارهای برجسته عوامل رونویسی FOXO (جعبه‌ی حاوی پروتئین O

زیرخانواده، Forkhead)<sup>۲</sup> بسیار مهم هستند. در پستانداران، خانواده FOXO شامل Fox1، FoxO3، FoxO4 و FoxO6 است. این پروتئین‌ها در بسیاری از انواع سلول‌ها، تنظیم‌کننده‌ی مهم برای اندازه، حیات و سوخت‌وساز سلول هستند و اهمیت آنها در قلب در حال ظهور است [۸]. همچنین در سال‌های اخیر، شواهدی از نقش محوری عوامل رونویسی FOXO برای اتوفاژی جهت تخریب لیزوزومی پروتئین و اندامک‌های آسیب دیده، برای رشد و بازسازی قلب پدید آمده است [۹]. نشان داده شده است که عوامل رونویسی FOXO برای تنظیم تعادل متابولیک، نوروزن و محافظت نوروئی، بازسازی قلبی، سوخت‌وساز عضله‌ی اسکلتی، سیستم ایمنی، اندوسیتوز، سوخت‌وساز سلول‌های بنیادی و تهاجم به رشد سلول‌های سرطانی مهم هستند [۱۰-۱۲]. در حال حاضر، روشن است که پروتئین‌های خانواده FOXO یک تنظیم‌کننده در بالادست هر دو اتوفاژی و سیستم پروتئازوم یوبیکوئیتین است [۵].

سرین و ترئونین کیناز، پروتئین کیناز-B (PKB)<sup>۳</sup> (همچنین به نام AKT شناخته می‌شود) عملکردهای بسیار مهمی دارد. عواقب ناشی از اختلال در عملکرد PKB در تنظیم‌های پاتولوژیک متنوع، از جمله سندرم رشد و رشد بیش از حد، سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی، دیابت نوع دو و مقاومت به انسولین، اختلال‌های التهابی و خودایمنی و بیماری‌های عصبی مورد بررسی قرار گرفته است [۱۳]. ارتباط ژنتیکی به شدت حفاظت‌شده‌ای بین PKB و اعضای خانواده FOXO وجود دارد و نشان داده شده است که PKB منجر به سرکوب اعمال پروتئین‌های FOXO می‌شود [۱۴].

در سال‌های اخیر، تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT)<sup>۴</sup> به‌عنوان یک مداخله‌ی ورزشی مؤثر شناخته شده است که می‌تواند منافع مشابه و بیشتری از تمرینات تداومی با شدت‌های متفاوت به‌همراه داشته باشد [۱۵]. تمرینات HIIT منجر به اثرات مشابه با تمرین‌های دیگر در سازگاری‌های متابولیکی عضله‌ی اسکلتی، آمادگی قلبی و عروقی و ترکیب بدن را نشان داده است. همچنین مشخص شده است که HIIT

<sup>2</sup> Members of the Class O of Forkhead Box Transcription Factors

<sup>3</sup> Protein kinase B

<sup>4</sup> High Intensity Interval Training

<sup>1</sup> Ischemia-Reperfusion

صحرائی نر ۲ ماهه از نژاد اسپراگداولی با میانگین وزن  $270 \pm 20$  گرم انتخاب شدند. موش‌های صحرائی در حیوان خانگی دانشگاه علوم پزشکی شیراز با دمای  $22 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰-۵۰ درصد و چرخه‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲-۱۲ نگه‌داری شدند. غذای حیوانات به‌صورت آزادانه و استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد. همچنین آب مورد نیاز حیوانات به‌صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه‌ی حیوانات آزمایشگاهی، در اختیار آنها قرار داده شد. اصول اخلاقی (کد اخلاقی IR.SUMS.REC.1396.S1062) مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شیراز مورد توجه قرار گرفت.

### روش القاء دیابت

برای ایجاد دیابت نوع دو در موش‌های صحرائی، در مرحله‌ی اول محلول نیکوتین‌آمید با دوز ۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق گردید. سپس ۱۵ دقیقه بعد محلول استرپتوزوتوسین (STZ)<sup>۲</sup> (حل‌شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با  $\text{pH}=4/5$ ) به‌صورت داخل صفاقی و فقط یک مرتبه با دوز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق گردید (۲۰). جهت اطمینان از دیابتی شدن موش‌ها، قند خون آنها ۷۲ ساعت پس از تزریق با کمک گلوکومتر و نمونه‌ی خونی گرفته شده از سیاهرگ دمی موش‌ها اندازه‌گیری شد؛ قند خون بین ۱۲۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تا ۲۶۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی شدن نوع دو در نظر گرفته شد [۱۹].

### پروتکل تمرینی

پس از القای دیابت موش‌های صحرائی به روش تصادفی به ۲ گروه: گروه تمرین دیابتی (۶ سر) و کنترل دیابتی (۶ سر) تقسیم شدند. موش‌های گروه‌های تمرین برای آشنایی با نوارگردان به‌مدت یک هفته با سرعت ۵ تا ۱۰ متر بر دقیقه، روی نوارگردان دویند. برنامه‌ی گروه تمرینی به‌مدت ۸ هفته و هر هفته ۴ جلسه بود. موش‌های

می‌تواند آثار مفیدتری برای بهبود کنترل گلیسمی داشته باشد [۱۶]. در تحقیقی Kavazis و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی تأثیر تمرین تداومی هوازی بر بیان ژن FOXO3a پرداختند. این محققان نشان دادند تمرین ورزشی کوتاه‌مدت، در اثر وجود دوکسوروبیسین<sup>۱</sup> منجر به کاهش رونویسی FOXO3a mRNA در عضله قلب و در عضله نعلی می‌شود [۱۷]. در تحقیقی دیگر Marfe و همکاران (۲۰۱۲) پس از یک وهله فعالیت بدنی طولانی‌مدت تا رسیدن به درماندگی در بافت عضله‌ی قلب و اسکلتی موش‌ها، کاهش رونویسی FOXO3a را مشاهده کردند [۱۸].

در طول سال‌های گذشته، تحقیق‌های اساسی یک شبکه‌ی پیچیده از سازوکارهای تنظیمی از مسیرها و پروتئین‌ها را نشان داده‌اند که در کنترل آبشار سیگنالینگ انسولین بسیار مهم هستند. شناسایی رفتار پروتئین‌ها در تنظیم سوخت‌وساز، آپوپتوز، اتوفازی و هایپرتروفی قلب برای آریتمی، نارسایی قلبی و مرگ ناگهانی مفید است. هدف قرار دادن عملکردهای این پروتئین‌ها به‌دنبال تمرین‌های ورزشی مبهم است، که شناسایی این عوامل مبهم می‌تواند یک ابزار قدرتمند در درمان بیماری‌های قلبی فراهم کند. از طرفی دیگر بیماران دیابتی مستعد عارضه‌ی کاردیومیوپاتی و مرگ سلولی در قلب خود هستند. بنابراین، تمرین‌های ورزشی می‌تواند عامل غیردارویی مهمی به‌عنوان یک عامل محافظتی برای قلب بیماران دیابتی در نظر گرفته شود؛ بنابراین، هدف از تحقیق حاضر، بررسی تأثیر پروتئین کیناز-B بر پروتئین‌های خانواده‌ی اتوفازی FOXO (FOXO1 و FOXO3a) به‌دنبال تمرین تناوبی با شدت بالا در بطن چپ قلب موش‌های صحرائی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین و نیکوتین‌آمید است.

### روش‌ها

#### نمونه و نوع تحقیق

پژوهش حاضر از نوع تجربی-بنیادی است که به‌صورت گروه تجربی و کنترل انجام گرفت؛ در این پژوهش، ۱۲ سر موش

<sup>2</sup> Streptozotocin

<sup>1</sup> Doxorubicin

تمرینی در شروع هر جلسه با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه گرم می‌کردند. سپس برنامه‌ی تمرینی شامل ۵ وهله ۴ دقیقه‌ای با شدت معادل ۸۵ تا ۹۵ درصد حداکثر سرعت و دوره‌های استراحت فعال ۳ دقیقه‌ای با شدت معادل ۵۰ تا ۶۰ درصد حداکثر سرعت انجام شد. در پایان هر جلسه نیز موش‌ها با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه سرد می‌کردند. کل مدت‌زمان دویدن موش‌های صحرایی در هر جلسه بر روی نوارگردان ۴۴ دقیقه بود. شیب نوارگردان صفر درجه و در ۸ هفته تغییری نداشت [۲۰].

### آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت

آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت با سرعت ۵ متر در دقیقه شروع و هر ۳ دقیقه سرعت ترمیل ۵ متر در دقیقه افزایش یافت تا موش‌های صحرایی به خستگی (چسبیدن موش‌ها به انتهای ترمیل) برسند. سرعتی که در آن موش‌های صحرایی به خستگی رسیدند، به‌عنوان حداکثر سرعت در نظر گرفته شد [۲۱].

### روش بافت برداری

برای از بین بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای غیرقابل کنترل استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه‌ی تمرینی، بعد از ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین، موش‌ها با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۳ تا ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، بی‌هوش شدند. سپس بافت بطن چپ قلب از بدن حیوان برداشته شد و در سرم فیزیولوژیک شستشو داده و سپس بلافاصله با استفاده از مایع ازت منجمد و برای سنجش‌های بعدی با دمای ۸۰- فریزر شد [۲۲].

### روش‌های آزمایشگاهی

با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن-بلات متغیرهای پژوهش اندازه‌گیری شد. برای استخراج پروتئین‌های بافت بطن چپ قلب از بافر RIPA حاوی ۰/۰۵ میلی مولار بافر تریس (pH برابر ۸)، ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد

EGTA، یک درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS)<sup>۱</sup> به اضافه ۰/۱ درصد آنتی‌پروتئاز کوکتیل (sigma) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌گرم بافت در ۵۰۰ میکرولیتر بافر حاوی آنتی‌پروتئاز توسط یک هموژنایزر دستی هموژن شد و نیم ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شد و سپس در یک سانتریفوژ یخچال‌دار (bo, sw14froid) در دور ۱۲۰۰۰ و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد؛ سپس مایع رویی جمع‌آوری شده و غلظت پروتئین آن با کیت تعیین‌کننده‌ی پروتئین (Bio-Rad) اندازه‌گیری گردید (در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد). در نهایت در ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری شد، سپس هموژن به‌دست آمده به نسبت ۱:۱ با نمونه‌ی لودینگ بافر (۵۰ mM Tris-کلرید هیدروژن، ۲ درصد سدیم دو دسیل سولفات، ۱۰ درصد گلیسرول، ۵ درصد بتا-مرکاپتواتانول و ۰/۰۰۵ درصد برموفنول آبی) مخلوط گردید. در ادامه، نمونه‌ها به‌مدت 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. غشاء به‌مدت 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. انکوباسیون در آنتی‌بادی ثانویه روز بعد به‌مدت 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 نرم‌افزار Image J (نسخه ۱/۸/۰/۱۱۲) اندازه‌گیری شد. آنتی‌بادی‌های (sc-anti-PKB (AKT) 135829، (Sc-374427) anti-FOXO1 (C-9) و anti-FOXO3a (DP-12) (c-48348) شرکت سانتاکروز ساخت کشور آمریکا مورد استفاده قرار گرفتند [۲۳].

### تحلیل آماری

ابتدا از آزمون کالموگروف-اسمیرنوف (KS)<sup>۲</sup> برای تعیین نرمالیتی توزیع داده‌های پژوهش استفاده شد. با توجه به نرمال

<sup>۱</sup> Sodium Dodecyl Sulfate

<sup>۲</sup> Kolmogorov-Smirnov test

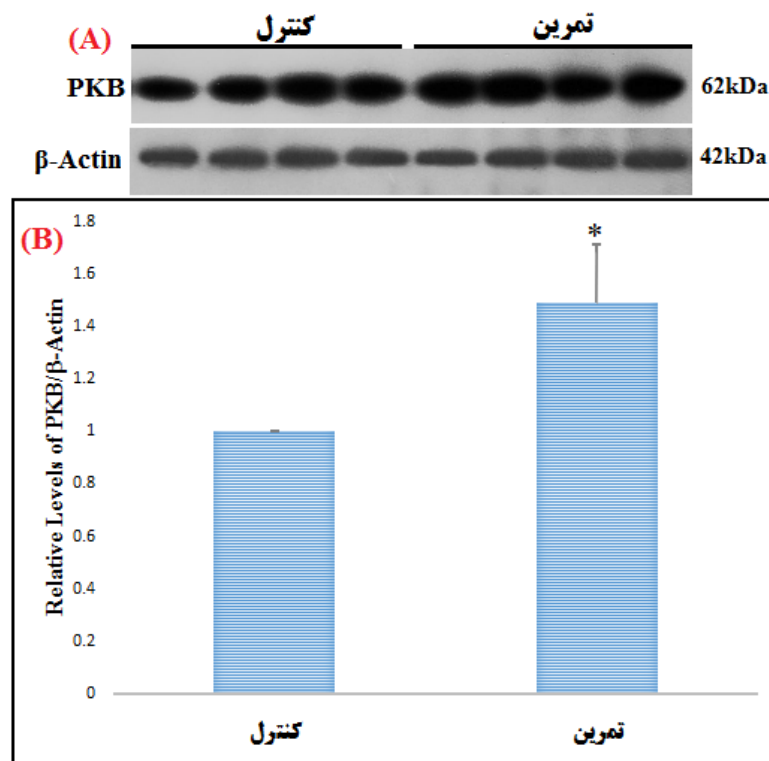
چپ عضله قلبی می‌شود ( $P=0/0001$ ) (شکل ۱، A و B). در مقابل، ۸ هفته تمرین HIIT منجر به کاهش معنی‌داری در محتوای پروتئین FOXO1 بین گروه‌های تمرین و کنترل در بافت بطن چپ عضله قلبی شد ( $P=0/003$ ) (شکل ۲، A و B).

همچنین ۸ هفته تمرین HIIT منجر به کاهش معنی‌داری در محتوای پروتئین FOXO3a بین گروه‌های تمرین و کنترل در بافت بطن چپ عضله قلبی شد ( $P=0/006$ ) (شکل ۳، A و B).

بودن توزیع داده‌ها در متغیرها، از آزمون پارامتریک  $t$  مستقل برای مقایسه بین گروهی استفاده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام گرفته است. سطح معنی‌داری تجزیه و تحلیل آماری تحقیق حاضر،  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شده است.

## یافته‌ها

در پایان پژوهش، بعد از تجزیه و تحلیل داده‌ها مشاهده شد که ۸ هفته تمرین HIIT منجر به افزایش معنی‌داری در محتوای پروتئین PKB بین گروه‌های تمرین و کنترل در بافت بطن

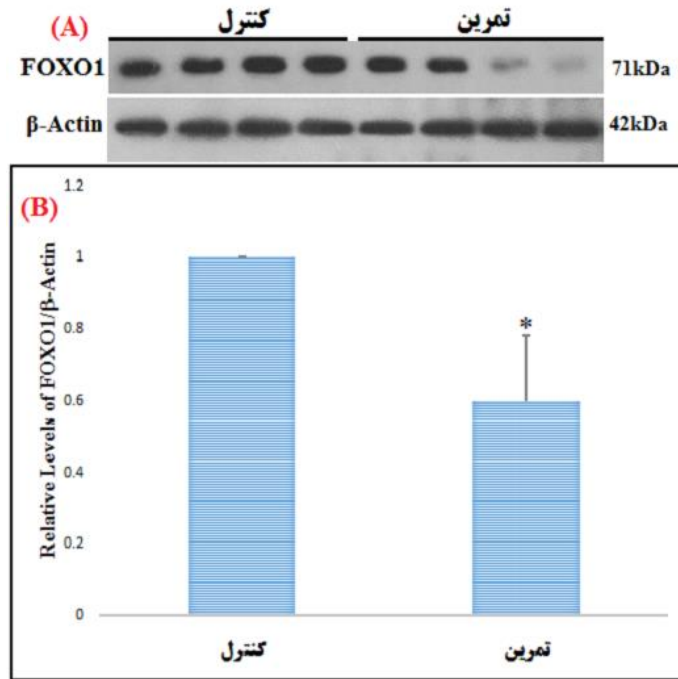


شکل ۱- مقایسه‌ی محتوای پروتئین PKB در گروه‌های مورد مطالعه

(A). تصاویر وسترن بلات محتوای پروتئین PKB و بتا-اکتین ( $\beta$ -Actin) به‌عنوان کنترل داخلی در بافت قلبی

(B). نمودار ستونی نشان دهنده‌ی مقادیر کمی شده باندهای محتوای پروتئین PKB در مقابل کنترل داخلی

(\* اختلاف معنی‌داری بین گروه تمرین نسبت به گروه کنترل)

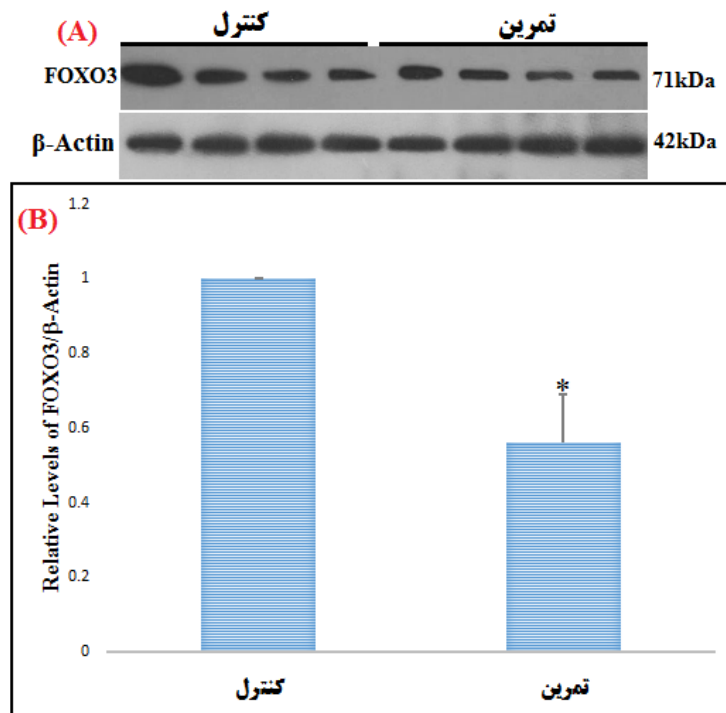


شکل ۲- مقایسه محتوای پروتئین FOXO1 در گروه‌های مورد مطالعه

(A). تصاویر وسترن بلات محتوای پروتئین FOXO1 و بتا-اکتین ( $\beta$ -Actin) به‌عنوان کنترل داخلی در بافت قلبی

(B). نمودار ستونی نشان دهنده‌ی مقادیر کمی شده باندهای محتوای پروتئین FOXO1 در مقابل کنترل داخلی

(\* اختلاف معنی‌داری بین گروه تمرین نسبت به گروه کنترل)



شکل ۳- مقایسه محتوای پروتئین FOXO3 در گروه‌های مورد مطالعه

(A). تصاویر وسترن بلات محتوای پروتئین FOXO3 و بتا-اکتین ( $\beta$ -Actin) به‌عنوان کنترل داخلی در بافت قلبی

(B). نمودار ستونی نشان دهنده‌ی مقادیر کمی شده باندهای محتوای پروتئین FOXO3 در مقابل کنترل داخلی

(\* اختلاف معنی‌داری بین گروه تمرین نسبت به گروه کنترل)

## بحث

نتایج نشان دادند که به دنبال ۸ هفته تمرین HIIT، افزایش معنی داری در محتوای پروتئین PKB وجود دارد. در مقابل محتوای پروتئین های FOXO1 و FOXO3a کاهش معنی داری را نشان داد.

نشان داده شده است که بیماری دیابت با شیوع بالای بیماری قلب و عروق همراه است که علت عمده مرگ و میر است. ویژگی های واماندگی قلبی مزمن، کاهش عملکرد بطن چپ و از دست دادن کاردیومیوسیت ها از طریق آپوپتوز، اتوفاژی یا نکروز است. تمرینات ورزشی یک رویکرد مهم غیرفارماکولوژیک است که می تواند برای افزایش کیفیت زندگی و کاهش علائم پاتولوژیک در بیماران مبتلا به نارسایی قلبی مزمن استفاده شود [۲۴]. در تحقیقی Moeini و همکاران (۲۰۲۰) به بررسی تأثیر ۸ هفته تمرین HIIT بر بیان ژن PKB در موش های صحرایی نر ویستار مبتلا به دیابت نوع دو پرداختند. تمرین HIIT منجر به افزایش معنی داری در بیان ژن PKB شد. این محققان بیان کردند که تمرین HIIT با افزایش بیان ژن PKB، هایپرتروفی فیزیولوژیکی را تحریک کرده و در جلوگیری از هایپرتروفی پاتولوژیک بطن چپ نقش دارد [۲۵]. نتایج تحقیق Moeini و همکاران با نتایج تحقیق حاضر در یک راستا هستند؛ زیرا در هر دو تحقیق ما شاهد افزایش محتوای پروتئین PKB هستیم. افزایش این پروتئین به دنبال تمرین HIIT می تواند نشان دهنده هایپرتروفی فیزیولوژیکی در بطن چپ و در کل عضله قلب باشد. در این راستا در تحقیقی دیگر Mirsepasi و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی تأثیر ۱۲ هفته تمرین HIIT، بر بیان ژن PKB در بطن چپ موش های صحرایی دیابتی نوع دو پرداختند. افزایش معنی داری در بیان ژن پروتئین PKB در گروه تمرین HIIT، نسبت به گروه کنترل دیابتی مشاهده شد [۲۶]. نتایج هر دو تحقیق Moeini و همکاران و Mirsepasi و همکاران گواه این مطلب است که تمرین های ورزشی و به خصوص تمرین HIIT می تواند راه درمان غیردارویی برای نتایج مثبت قلبی برای افراد دیابتی که مستعد کاردیومیوپاتی دیابتی هستند، باشد. البته شایان ذکر

است که برای یک برنامه ی تمرینی مطلوب باید پارامترهای تمرین HIIT، مانند تعداد دفعات، شدت، نوع و مدت زمان یا تعداد تکرارها، عملکرد متابولیک، سلامت عروق و آمادگی جسمانی را مد نظر قرار داد. شدت فعالیت ورزشی در تمرین های HIIT از اهمیت بالایی برخوردار است. زیرا شدت پایین تا متوسط فعالیت ورزشی تا حدود ۶۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی<sup>۱</sup> با افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب در فرد تأثیر می گذارد و سپس به یک فلات می رسد. در عوض با افزایش شدت فعالیت ورزشی، میزان استفاده از گلوکز را بیشتر می کند. سیگنالینگ پروتئین PKB (که از سنتز پروتئین پشتیبانی می کند) می تواند بهبود عملکرد گلوکز را در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو از طریق تمرین های ورزشی توضیح دهد [۲۷]. تنظیم محتوای پروتئین PKB می تواند از طریق دیگری (اتوفاژی) سبب تنظیم سلول های عضلانی قلبی شود. این تنظیم را از طریق پروتئین های درگیر در اتوفاژی به نام FOXO می کند. در این راستا در تحقیقی Holloway و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی تأثیر ۴ هفته تمرینات HIIT بر محتوای پروتئین FOXO3a در عضله قلب موش های صحرایی دچار نقص قلبی پرداختند. نتایج تغییر معنی داری در محتوای پروتئین FOXO3a به دنبال انجام تمرینات HIIT نشان نداد [۲۸]. نتایج تحقیق Holloway و همکاران با نتایج تحقیق حاضر در یک راستا نیست؛ زیرا ما شاهد کاهش معنی دار در محتوای پروتئین FOXO3a بودیم و این در حالی است که در تحقیق Holloway و همکاران تغییر معنی داری نکرده است. یکی از عوامل اساسی مدت زمان تمرین می تواند باشد. زیرا در تحقیق Holloway و همکاران مدت زمان تمرین HIIT چهار هفته و در تحقیق حاضر ۸ هفته بوده است. این مدت زمان تمرین HIIT می تواند بر میزان و محتوای پروتئین های بدن تأثیر به سزایی بگذارد. با این حال نشان داده شده است که پروتئین های خانواده FOXO عوامل اصلی رونویسی هستند که در چندین جنبه از بیماری های قلبی نقش دارند. پروتئین های داخل بدن نیاز به کنترل خوب رونویسی ژن، تغییرات پس از

<sup>۱</sup> VO<sub>2</sub>max

به‌نظر می‌رسد که نقش سایر پروتئین‌های درگیر در فرآیند اتوفاژی میوسیت‌ها قابل توجه باشند. همچنین در زمینه‌ی مرگ سلولی، سایر سازوکارها مانند نکروز و آپوپتوز نیز دخیل هستند [۳۲].

در نهایت نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین HIIT منجر به افزایش محتوای پروتئین PKB و به‌دنبال آن کاهش محتوای پروتئین‌های FOXO3a و FOXO1 در بافت قلب می‌شود؛ بنابراین، می‌توان گفت که ۸ هفته تمرین HIIT منجر به فعال کردن فرآیند هایپرتروفی فیزیولوژیک و مهار مسیر اتوفاژی خانوادگی FOXO شده است؛ از این‌رو تمرینات HIIT می‌تواند در قلب افراد دیابتی نوع دو که مستعد کاردیومیوپاتی و مرگ سلولی هستند، نقش یک عامل تنظیمی مفید را ایفا می‌کند. با این‌جود باید تحقیقات بیشتری در این زمینه انجام شود.

### سپاسگزاری

این پژوهش حاصل تلاش نویسندگان این تحقیق است که در دانشگاه علوم پزشکی شیراز و دانشگاه شیراز انجام شده است. از تمامی افرادی که در این امر مهم ما را یاری کردند، تشکر می‌شود.

ترجمه و خاموش کردن ژن پس از رونویسی دارند. بازسازی قلب ممکن است با کنترل مناسب فعالیت FOXO1/3 افزایش یابد. بعضی شواهد نشان داده‌اند که پروتئین FOXO1 عمدتاً در قلب نقشی مضر دارد؛ درحالی‌که عملکرد FOXO3a تحت تأثیر نوع سلول است [۲۹].

سلول‌های عضله‌ی قلب سلول‌های متفاوتی هستند و دارای ظرفیت بازسازی‌کننده‌ی بسیار هستند؛ بنابراین حفظ میوسیت‌های قلب بالغ در سراسر طول عمر فرد به‌طور قابل توجهی به زندگی سالم کمک می‌کند. اتوفاژی یک فرآیند ضروری برای عملکرد طبیعی قلب است. بنابراین، تنظیم فرآیند اتوفاژی از طریق فعالیت‌های ورزشی می‌تواند یک روش درمانی مفید باشد [۳۰].

مسیر پروتئین‌های خانوادگی FOXO یعنی پروتئین‌های FOXO1 و FOXO3a توسط مسیرهای سیگنالینگ پیچیده‌ای تنظیم می‌شود که می‌توان به سیگنال‌های ورودی گوناگون از جمله مواد مغذی، عوامل رشدی، هورمون‌ها، غلظت کلسیم داخل سلولی، میزان ATP، هیپوکسی و... اشاره کرد [۳۱]. البته، سنجش پروتئین‌های PKB و FOXO3a و همچنین پروتئین‌های FOXO1 و FOXO3a به تنهایی برای ارزیابی تغییرات قلبی در پاسخ به بیماری دیابت که منجر به کاردیومیوپاتی قلبی می‌شود و همچنین در پاسخ به تمرینات HIIT کافی نیست و

### مآخذ

1. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. heart disease and stroke statistics—2018 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2018; 137 (12): e67-492.
2. Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2017. *European Heart Journal* 2018; 39 (7): 508-79.
3. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018;19 (6): 349-64.
4. Shirakabe A, Zhai P, Ikeda Y, Saito T, Maejima Y, Hsu CP, et al. Drp1-dependent mitochondrial autophagy plays a protective role against pressure overload-induced mitochondrial dysfunction and heart failure. *Circulation* 2016; 133(13):1249-63.
5. Cheng Z. The FoxO-autophagy Axis in health and disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2019; 30(9):658-71.
6. Wu X, Liu Z, Yu XY, Xu S, Luo J. Autophagy and cardiac diseases: Therapeutic potential of natural products. *Medicinal Research Reviews* 2021; 41(1):314-41.
7. Ferdous A, Battiprolu PK, Ni YG, Rothermel BA, Hill JA. FoxO, autophagy, and cardiac remodeling. *Journal of Cardiovascular Translational Research* 2010; 3(4):355-64.
8. Martins R, Lithgow GJ, Link W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell* 2016; 15(2):196-207.
9. Klotz LO, Sánchez-Ramos C, Prieto-Arroyo I, Urbánek P, Steinbrenner H, Monsalve M. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox Biology* 2015; 6:51-72.



10. Cheng Z. FoxO1: mute for a tuned metabolism?. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2015; 26(8):402-3.
11. Yan H, Yang W, Zhou F, Li X, Pan Q, Shen Z, et al. Estrogen improves insulin sensitivity and suppresses gluconeogenesis via the transcription factor Foxo1. *Diabetes* 2019; 68(2):291-304.
12. Schäffner I, Minakaki G, Khan MA, Balta EA, Schlötzer-Schrehardt U, Schwarz TJ, et al. FoxO function is essential for maintenance of autophagic flux and neuronal morphogenesis in adult neurogenesis. *Neuron* 2018; 99(6):1188-203.
13. Manning BD, Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell* 2017; 169(3):381-405.
14. Webb AE, Brunet A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends in Biochemical Sciences* 2014; 39(4):159-69.
15. Little JP, Jung ME, Wright AE, Wright W, Manders RJ. Effects of high-intensity interval exercise versus continuous moderate-intensity exercise on postprandial glycemic control assessed by continuous glucose monitoring in obese adults. *Applied physiology, nutrition, and metabolism* 2014; 39(7):835-41.
16. Hafstad AD, Lund J, Hadler-Olsen E, Höper 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.
17. Kavazis AN, Smuder AJ, Powers SK. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced foxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *Journal of applied physiology* 2014; 117(3):223-30.
18. Marfe G, Manzi V, Tafani M, Pucci B, Gambacurta A, Russo MA, et al. The modulation of sirtuins and apoptotic proteins in rats after exhaustive exercise. *Journal of Molecular and Integrative Physiology* 2012;2(3):65-74.
19. Khalili A, Nekooiean AA, Khosravi MB. Oleuropein improves glucose tolerance and lipid profile in rats with simultaneous renovascular hypertension and type 2 diabetes. *Journal of Asian natural products research* 2017; 19(10):1011-21.
20. Sherafati Moghadam M, Salesi M, Daryanoosh F, Hemati Nafar M, Fallahi A. The Effect of 4 Weeks of High Intensity Interval Training on the Content of AKT1, mTOR, P70S6K1 and 4E-BP1 in Soleus Skeletal Muscle of Rats with Type 2 Diabetes: An Experimental Study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* 2018; 17(9): 843-54.
21. Garcia NF, Sponton AC, Delbin MA, Parente JM, Castro MM, Zanesco A, et al. Metabolic parameters and responsiveness of isolated iliac artery in LDLr<sup>-/-</sup>-mice: role of aerobic exercise training. *American journal of cardiovascular disease* 2017; 7(2):64-71.
22. Aghaei N, Sherafati Moghadam M, Daryanoosh F, Shadmehri S, Jahani Golbar S. The effect of 4 weeks' aerobic training on the content of mTORC1 signaling pathway proteins in heart tissue of type 1 diabetes rats. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism* 2019; 18 (3):116-125.
23. Zarei F, Sherafati Moghadam M, Shabani M, Jokar M. The effects of 4 weeks high intensity interval training on mammalian rapamycin target protein (mTOR) and sterol transcription factor regulatory protein-1 (srebp1) proteins content in diabetics obese rats adipose tissue. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism* 2019; 19 (1) :26-35
24. Jokar M, Sherafati Moghadam M. High Intensity Interval Training Inhibits Autophagy In The Heart Tissue Of Type 2 Diabetic Rats By Decreasing The Content Of Foxo3a And Beclin-1 Proteins. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism* 2019; 18 (6) :292-299
25. Moeini M, Behpoor N, Tadibi V. The effect of high-intensity interval training on the expression of protein kinase B (Akt gene) in the left ventricle of male rats with type 2 diabetes. *The Journal of Jiroft University of Medical Sciences* 2020; 7 (2) :332-340
26. Mirsepasi M, Baneifar A A, Azarbayjani M A, Arshadi S. The Effects of High Intensity Interval Training on Gene Expression of AKT1 and mTORc1 in the Left Ventricle of Type 2 Diabetic Rats: An Experimental Study. *The Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences* 2019; 17 (12) :1119-1130.
27. Kränkel N, Bahls M, Van Craenenbroeck EM, Adams V, Serratos L, Solberg EE, et al. Exercise training to reduce cardiovascular risk in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: How does it work?. *European Journal of Preventive Cardiology* 2019; 26(7):701-8.
28. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Simpson JA, Quadriatero J, Spriet LL. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. *PloS One* 2015; 10(3): e0121138.
29. Xin Z, Ma Z, Jiang S, Wang D, Fan C, Di S, et al. FOXOs in the impaired heart: new therapeutic targets for cardiac diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2017; 1863(2):486-98.
30. Lee Y, Kwon I, Jang Y, Song W, Cosio-Lima LM, Roltsch MH. Potential signaling pathways of acute endurance exercise-induced cardiac autophagy and mitophagy and its possible role in cardioprotection. *The Journal of Physiological Sciences* 2017; 67(6):639-54.
31. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science* 2009; 122(20):3589-94.
32. Tian XF, Cui MX, Yang SW, Zhou YJ, Hu DY. Cell death, dysglycemia and myocardial infarction (Review). *Biomedical Reports* 2013; 1:341-6.

## The Effect of Protein Kinase-B on FOXO Autophagy Family Proteins (FOXO1 and FOXO3a) Following High Intensity Interval Training in the Left Ventricle of the Heart of Diabetic Rats by Streptozotocin and Nicotinamide

Neda Aghaei Bahmanbeglou<sup>1\*</sup>, Reza Salboukhi<sup>2</sup>, Mohammad Sherafati Moghadam<sup>3</sup>

1. Department of Physical Education and Sport Sciences, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran

2. Young Researchers and Elites Club, Abadan Branch, Islamic Azad University, Abadan, Iran

3. Department of Sport Sciences, Apadana Institute of Higher Education, Shiraz, Iran

### ABSTRACT

**Background:** FOXO family proteins are important factors in autophagy pathway. Protein kinase-B is an important regulator for this family that can be regulated through exercise training. Therefore, the aim of this study is to investigate the effect of protein kinase-B (PKB) on FOXO autophagy family proteins (FOXO1 and FOXO3a) following high intensity interval training (HIIT) in the left ventricle of the heart of diabetic rats by streptozotocin (STZ) and nicotinamide.

**Methods:** In this experimental study, 12 two-month-old Sprague-Dawley rats with a mean weight of  $270 \pm 20$  g were selected. After type 2 diabetes induction with STZ and Nicotinamide, rats were randomly assigned to two groups, diabetic training (6 heads) and diabetic control (6 heads). The training group trained for 4 days a week in accordance with the training program for 8 weeks. SPSS software version 23 and independent t-test were used to analyze the data. Significance level is considered  $p \leq 0.05$ .

**Results:** HIIT training resulted in a significant increase in PKB protein content between training and control groups ( $P=0.0001$ ). In contrast, a significant decrease in protein content of FOXO1 ( $P=0.003$ ) and FOXO3a ( $P=0.006$ ) was observed between the training and control groups.

**Conclusion:** It seems based on the results HIIT with increasing and regulating PKB leads to a decrease and inactivation of FOXO1 and FOXO3a proteins in the hearts of diabetic subjects. Inhibition of these proteins can prevent excessive cardiac autophagy in diabetic subjects.

**Keywords:** High Intensity Interval Training, Heart Muscle, Protein Kinase-B, Protein FOXO1, Protein FOXO3a, Type 2 Diabetes

\* University Blvd, Islamic Azad University, Aliabad Katoul Branch, Aliabad Katoul, Golestan, Iran. Postal Code: 4941793451, Tel: +981734222300, Email: nedaghaei@gmail.com

