Research Paper

The Effect of an 8-Week Endurance Training Program on the Content of FOXO3a and Beclin-1 Proteins in Heart Muscle of Rats With Type 2 Diabetes

Masoud Jokar[1], ***Mohammad Sherafati Moghadam**[2], **Farhad Daryanoosh**[3]

1. Department Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
2. Department of Pure and Basic Science, Hashtgerd Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran.
3. Department of Exercise Physiology, School of Education and Psychology, University of Shiraz, Shiraz, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Jokar M, Sherafati Moghadam M, Daryanoosh F. The Effect of an 8-Week Endurance Training Program on the Content of FOXO3a and Beclin-1 Proteins in Heart Muscle of Rats with Type 2 Diabetes. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences. 2020; 23(6):484-493. https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.6.1

https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.6.1

CC BY NC

Received: 14 Sep 2019
Accepted: 24 Dec 2019
Available Online: 01 Feb 2020

Keywords:
Endurance training, Cardiac muscle, beclin-1, FOXO3a, Type 2 diabetes

ABSTRACT

Background The FOXO3a/Beclin-1 pathway is an important pathway in autophagy that can be impaired in diabetic patients who are prone to cardiomyopathy.

Objective The aim of this study was to investigate the effect of an 8-week endurance training program on the content of FOXO3a and Beclin-1 proteins in the heart muscle tissue of rats with type 2 diabetes.

Methods This experimental study was conducted on 12 male two-month-old Sprague Dawley rats with a mean weight of 270±20 g. After diabetic induction by streptozotocin and nicotinamide, rats were randomly assigned into two groups of diabetic-exercise (n=6) and diabetic-control (n=6). The diabetic-exercise group received intervention 4 days per week, each session for 42 minutes at a speed of 10-30 m/m for 8 weeks, while the control group received no any training program. The rats did not receive any insulin treatment during the study. Collected data were analyzed using independent t-test at a significance level of P≤0.05.

Findings No significant changes were observed in the content of FOXO3a (P=0.12) and Beclin-1 (P=0.34) proteins in the training group compared to the control group after intervention.

Conclusion The endurance training can not affect the content of FOXO3a and Beclin-1 proteins. Therefore, it seems that endurance training may not affect autophagy signaling in the heart muscle of type 2 diabetic patients.

Extended Abstract

1. Introduction

Diabetic cardiomyopathy is one of the most important complications of type 2 diabetes, which is known as a specific disease of the heart muscle [5]. Diabetic cardiomyopathy predisposes cardiac muscle cells to cell death and eventually causes muscle contraction [6]. Autophagy is a process to maintain cellular survival through which cytoplasmic components are destroyed. Autophagy is responsible for recycling macromolecules to generate energy and renewal within the cell [8]. Defects in autophagy process can cause numerous diseases, including diabetes, cancer, neurological problems, infection, and aging [9]. Forkhead Box class O (FOXO) family member proteins such as FOXO3a are involved in autophagy promotion. FOXO3a, by activating proteins such as Beclin-1, can cause autophagy and apoptosis. Thus, this interaction may be an important mechanism in regulation of both autophagy and apoptosis [11]. By

* *Corresponding Author:*
Mohammad Sherafati Moghadam
Address: Department of Pure and Basic Science, Hashtgerd Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran.
Tel: +98 (916) 6729271
E-Mail: m.sherafati@hiau.ac.ir

regulating autophagy and apoptosis, Beclin-1 protein plays an important role as a "cell death pathway" [13].

Exercise is one of the important ways for the prevention and treatment of heart disease. It has a positive effect on the physiology and morphology of the heart tissue [14]. Cellular adaptation to physical activity can be related to cellular and molecular factors and cause cardiac growth by inducing hypertrophy and cardiomyocyte remodeling [15]. Autophagy during exercise can limit tissue damage, restore tissue integrity, terminate inflammatory responses, and generate direct signals for adaptation [16].There are limited number of studies on the cellular mechanism, autophagy, especially the FOXO3a and Beclin-1 proteins pathway, in patients with type 2 diabetic who are susceptible to cardiomyopathy and myocyte necrosis. The aim of this study was to investigate the effect of a 8-week endurance training program on the content of FOXO3a and Beclin-1 proteins in heart muscle tissue of Sprague-Dawley rats with type 2 diabetes.

2. Materials and Methods

The present study is an experimental/fundamental research conducted on twelve male 2-month-old Sprague Dawley rats with a mean weight of 270±20 g. To induce the type 2 diabetes in rats, streptozotocin was injected intraperitoneally once at a dose of 60 mg/kg body weight, after 15 minutes of nicotinamide injection at a dose of 110 mg/kg body weight [19]. To ensure that the animals were diabetic, their blood glucose level was measured 72 hours after injection, and the glucose level of 130-260 mg/dl was considered as diagnostic criterion for type 2 diabetes [20]. One week after induction of diabetes, the rats were randomly divided into two groups of diabetic- exercise (n=6) and diabetic control (n=6).

The exercise group received intervention for 8 weeks, 4 sessions per week. Each session, they ran for 42 minutes on a treadmill, which included 6-min warm up (at a speed of 10-12 m/min), 30-min endurance training (at an intensity of about 50-70% of maximum heart rate and a speed of 10-30 m/min) and 6-min cooling down (at a speed of 10-12 m/min). The treadmill incline was at zero degree and did not change for 8 weeks [21]. During this period, the control group received no any training program. The study rats did not have any insulin therapy during the study period. To eliminate the acute effects of exercise and the uncontrollable stressors in subjects during the exercise intervention, they were anesthetized based on ethical principles 24 hours after the last training session by intraperitoneal injection of Ketamine/Xylazine combination. Then, the heart muscle tissue was removed from the body, washed in physiological saline, and immediately frozen with nitrogen and kept at 80°C for future analysis.

The variables of research were measured using western blot method. Proteins were measured by a chemical reaction (Chemiluminescence) and visualized using x-ray film. Densitometric analysis was conducted in ImageJ v. 112.0.8.1 software, and the results were normalized to intrinsic control protein (β-actin) in multiples control groups [24]. For statistical analysis in SPSS V. 19 software, first the Kolmogorov-Smirnov test (KS) was used to determine the normality of data distribution. Since the distribution was normal, independent t-test was used for comparing the study groups. The significance level was set as $P \leq 0.05$.

3. Results

The results showed that after 8 weeks of endurance training, there was no significant change in FOXO3a protein content between study groups (P=0.12) (Figure 1, A and B). The endurance training intervention could not significantly decrease the Beclin-1 protein content in cardiac muscle tissue (P=0.34) among study groups (Figure 2, A and B).

4. Discussion

Marfe et al. (2012) showed a decrease in FOXO3a transcription after a prolonged period of physical activity, leading to helplessness in heart and skeletal muscle tissue rats [17]. Brandt et al. (2018) showed that moderate-intensity cycling training significantly increased Beclin-1 protein content immediately and after exercise compared its content before exercise [18]. These are consistent with our results. Overall, the results of this study showed that endurance training can not significantly change the content of FOXO3a and Beclin-1 proteins. Therefore, it seems that endurance training may not affect autophagy in the heart muscle of type 2 diabetic subjects. It is necessary to pay attention to the characteristics of exercise (such as intensity, duration and type) to optimally modify the autophagy signaling in the heart muscle. Further studies should be conducted in this area.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was obtained an ethical approval from Shiraz University of Medical Sciences (Code: IR.SUMS.REC.1396.S1062).

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors' contributions

Writing: All authors; Resources & validation: Masoud Jokar; Editing and project administration: Mohammad Sharafati Moghadam; Data analysis and Methodology: Farhad Daryanoosh.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

تأثیر هشت هفته تمرین استقامتی بر محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 در بافت عضله قلب موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت نوع ۲

مسعود جوکار[۱]، *محمد شرافتی مقدم[۲]، فرهاد دریانوش[۳]

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
۲. گروه عمومی و پایه، واحد هشتگرد، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز،ایران.
۳. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت: ۲۳ شهریور ۹۸
تاریخ پذیرش: ۰۳ دی ۹۸
تاریخ انتشار: ۱۲ بهمن ۱۳۹۸

کلیدواژه‌ها:
تمرین استقامتی، عضله قلب، پروتئین Beclin-1، پروتئین FOXO3a، دیابت نوع ۲

چکیده

زمینه مسیر FOXO3a / Beclin-1 از مسیرهای مهم در مرگ سلول است و می‌تواند در بیماران دیابتی که مستعد کاردیومیوپاتی دیابتی هستند دچار اختلال شود.

هدف هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر هشت هفته تمرین استقامتی بر محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 در بافت عضله قلب موش‌های صحرایی نر نژاد اسپراگوداولی مبتلا به دیابت نوع ۲ بود.

مواد و روش‌ها در این مطالعه تجربی، ۱۲ سر موش صحرایی نر دوماهه از نژاد اسپراگوداولی با میانگین وزنی ۲۰±۲۷۰ گرم انتخاب و پس از دیابتی‌شدن از طریق القای استرپتوزوتوسین و نیکوتین‌آمید به روش تصادفی به ۲ گروه، مداخله و شاهد (هر گروه شش سر) تقسیم شدند. گروه مداخله چهار روز در هفته به مدت هشت هفته به تمرین استقامتی مطابق با برنامه تمرینی (هر جلسه ۴۲ دقیقه، سرعت بین ۱۰ تا ۳۰ متر بر دقیقه) پرداختند؛ در حالی که گروه شاهد هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند. همچنین موش‌های صحرایی هیچ‌گونه درمانی با انسولین را در طول دوره پژوهش نداشتند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تی مستقل استفاده شد.

یافته‌ها تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین‌های FOXO3a (P=۰/۱۲) و Beclin-1 (P=۰/۳۴) در گروه مداخله نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری نتایج نشان دادند که تمرین استقامتی بر محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 تأثیری ندارد. بنابراین، به نظر می‌رسد که تمرین استقامتی نمی‌تواند بر اتوفاژی در عضله قلب آزمودنی‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ تأثیری داشته باشد.

مقدمه

دیابت شیرین یکی از بیماری‌های مزمن و گسترده در سراسر جهان است که به‌سرعت و به طور قابل توجهی در حال افزایش است. با توجه به گزارش سازمان جهانی بهداشت، دیابت هفتمین علت مرگ در سال ۲۰۳۰ خواهد بود [۱]. ۹۰ درصد افراد مبتلا به دیابت در سراسر جهان مبتلا به دیابت نوع ۲ هستند؛ درنتیجه در بدن انسولین کافی تولید نمی‌شود یا سلول‌های بدن انسولین تولیدشده را تشخیص نمی‌دهند. نتیجه عدم تعادل بین پاسخ انسولین و تولید انسولین منجر به هیپرگلیسمی (یا سطح گلوکز بالا در خون) می‌شود. هیپرگلیسمی درنهایت منجر به بسیاری از بیماری‌های سیستمیک مانند نوروپاتی، نفروپاتی، رتینوپاتی و بیماری‌های قلبی‌عروقی می‌شود [۲].

بیماری‌های قلبی‌عروقی شایع‌ترین علت مرگ‌ومیر در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ است. ۶۰ درصد مرگ‌ومیر افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ ناشی از عوارض قلبی‌عروقی است. این شیوع نارسایی به دیابت نوع ۲ مرتبط است که عمدتاً به دلیل عدم درک از مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک و فیزیولوژیک درگیر در پیشرفت کاردیومیوپاتی دیابتی است [۳، ۴]. کاردیومیوپاتی دیابتی یکی از مهم‌ترین عوارض ناشی از دیابت نوع ۲ است. کاردیومیوپاتی دیابتی را بیماری ویژه عضله قلب می‌دانند [۵]. در این عارضه هرگونه اختلال غیرعادی در گلوکز پلاسما و میزان انسولین، سلول‌های عضله قلبی را مستعد مرگ سلولی می‌کند و درنهایت موجب تغییر انقباضی عضلانی می‌شود [۶]. برخی از بیماران مبتلا به دیابت از بیماری و سکته قلبی رنج می‌برند؛ این نکته اهمیت

* نویسنده مسئول:
محمد شرافتی مقدم
نشانی: البرز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد هشتگرد، گروه عمومی و پایه.
تلفن: ۶۷۲۹۲۷۱ (۹۱۶) ۹۸+
رایانامه: m.sherafati@hiau.ac.ir

درک و درمان کاردیومیوپاتی دیابتی را مشخص می‌کند [۷].

اتوفاژی فرایندی تکاملی برای حفظ بقای سلول‌هاست که از طریق آن اجزای سیتوپلاسمی تخریب می‌شوند. اتوفاژی مسئول بازیافت ماکرومولکول‌ها برای تولید انرژی داخل سلولی و نوسازی در درون سلول است [۸]. مشخص شده است که اتوفاژی به عنوان یک شمشیر دولبه برای ترویج شخصیت بقا و یا فعال‌کردن مرگ سلولی عمل می‌کند. نقص در فرایند اتوفاژی منجر به بروز بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت، سرطان، مشکلات عصبی، عفونت و پیری می‌شود [۹].

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مهار اتوفاژی در قلب موش‌های دیابتی نوع ۱ و ۲ ممکن است به درمان کاردیومیوپاتی دیابتی کمک کند [۷]. بیماری‌های قلبی معمولاً با آسیب در بافت قلبی همراه است. مرگ سلولی ناشی از متابولیسم غیرطبیعی میوکارد، به عنوان علت اصلی کاردیومیوپاتی‌ها در نظر گرفته می‌شود. در این حالت سلول‌های عضله قلب با هیپرتروفی و فیبروز جبرانی به مقابله با کاهش بافت انقباضی ناشی از دیابت می‌پردازند [۱۰].

همه‌ساله تلاش‌های بی‌شماری برای روشن‌شدن مکانیسم‌های مولکولی بیماری‌های قلبی انجام می‌شود. از بین بسیاری از مولکول‌های درگیر در بیماری‌های قلبی، پروتئین‌های خانواده FOXO و پروتئین Beclin-1 مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۱، ۱۲]. شواهد اخیر نشان داده است که اعضای خانواده پروتئین‌های FOXO مانند FOXO1 و FOXO3a در ترویج اتوفاژی نقش دارند. این خانواده (FOXO3a) با فعال‌کردن پروتئین‌های دیگر، مانند پروتئین Beclin-1 منجر به اتوفاژی و مرگ سلولی[1] می‌شوند. در این مسیر سیگنالینگ پروتئین FOXO3a با فعال‌کردن پروتئین‌های BNIP3 و Bcl-2 منجر به فعال‌کردن پروتئین Beclin-1 می‌شود؛ بنابراین این تعامل ممکن است یک مکانیسم مهم در تنظیم هر دو اتوفاژی و آپوپتوز باشد [۱۱]. پروتئین Beclin-1 یک مولکول کلیدی در کنترل فعالیت اتوفاژی است؛ فعالیت آن توسط مکانیسم‌های متعددی از جمله اصلاح پس از ترجمه، تعامل پروتئین با پروتئین و محلی‌سازی درون‌سلولی تنظیم می‌شود. با این حال، پروتئین Be-clin-1 با تنظیم اتوفاژی و آپوپتوز نقش مهمی را به عنوان «چهارراه مرگ سلولی» ایفا می‌کند [۱۳].

فعالیت ورزشی یکی از روش‌های مهم برای پیشگیری و درمان بیماری‌های قلبی است. ورزش و تمرین می‌تواند موجب تأثیر مثبت بر فیزیولوژی و مورفولوژی[2] بافت قلب شود [۱۴]. فعالیت ورزشی موجب کاهش عوامل خطرزای قلبی، جلوگیری از تخریب میوکارد و افزایش عملکرد قلب می‌شود. سازگاری سلولی با فعالیت بدنی می‌تواند به عوامل سلولی و مولکولی مربوط باشد و با ایجاد هیپرتروفی و تجدید کاردیومیوسیت‌ها منجر به رشد قلبی شود [۱۵]. اتوفاژی طی تمرین ورزشی برای محدودکردن آسیب بافتی و بازگرداندن یکپارچگی بافت، موجب خاتمه‌دادن پاسخ‌های التهابی و ایجاد سیگنال‌های مستقیم برای سازگاری می‌شود. مسیرهای اتوفاژی توسط پروتئین‌های تغییریافته / اندامک با هدف حفظ و بازیافت منابع سلولی فعال می‌شوند [۱۶].

در تحقیقی مارفی[3] و همکاران، پس از یک دوره فعالیت بدنی طولانی‌مدت تا رسیدن به درماندگی در بافت عضله قلب و اسکلتی موش‌ها، کاهش رونویسی FOXO3a مشاهده شد [۱۷]. در تحقیقی برندت[4] و همکاران به بررسی تأثیر تمرینات ورزشی در نشانگر اتوفاژی (پروتئین Beclin-1) در عضله اسکلتی انسان پرداختند. هشت هفته تمرین به صورت دوچرخه‌سواری مداوم با شدت متوسط (به مدت ۶۰ دقیقه در روز) و دوچرخه‌سواری با شدت متوسط همراه با ۳۰ ثانیه سرعت (به ازای هر ۱۰ دقیقه تمرین با شدت متوسط، ۳۰ ثانیه تمرین با سرعت بالا انجام می‌شد) بود. محتوای پروتئین Be-clin-1 در زمان قبل، شروع و پایان تمرینات ورزشی اندازه‌گیری شد. در گروه تمرینات دوچرخه‌سواری مداوم با شدت متوسط، محتوای پروتئین Beclin-1 در زمان شروع و پایان تمرین ورزشی نسبت به زمان قبل از تمرین ورزشی افزایش معنی‌داری نشان داد، اما در گروه تمرین دوچرخه‌سواری با شدت متوسط همراه با ۳۰ ثانیه سرعت، تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین Beclin-1 مشاهده نشد [۱۸].

پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 در تنظیم مسیر اتوفاژی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. از طرفی دیگر بیماران دیابتی مستعد عارضه کاردیومیوپاتی و مرگ سلولی در قلب خود هستند؛ بنابراین، تمرینات ورزشی می‌تواند عامل غیردارویی مهمی به عنوان یک عامل محافظتی برای قلب بیماران دیابتی باشد. تحقیقات بسیار کمی، نقش مکانیسم سلولی اتوفاژی را در قلب افراد دیابتی نوع ۲ بررسی کرده‌اند؛ بنابراین، هدف از تحقیق حاضر، بررسی تأثیر هشت هفته تمرین استقامتی بر محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 در بافت عضله قلب موش‌های صحرایی نر نژاد اسپراگوداولی مبتلا به دیابت نوع ۲ بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بنیادی است که به صورت گروه تمرین و شاهد انجام گرفت؛ در این پژوهش، ۱۲ سر موش صحرایی نر دوماهه از نژاد اسپراگوداولی با میانگین وزن ۲۰±۲۷۰ گرم انتخاب شدند. موش‌های صحرایی در حیوان‌خانه دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰ تا ۵۰ درصد و چرخه تاریکی‌روشنایی ۱۲-۱۲ نگهداری شدند. غذای حیوانات به صورت آزادانه و طبق استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی از دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز تهیه شد. همچنین آب مورد نیاز حیوانات به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی،

1. Apoptosis
2. Morphologie
3. Marfe
4. Brandt

در اختیار آن‌ها قرار داده شد. اصول اخلاقی مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز مورد توجه قرار گرفت.

در هفته دهم بعد از به وزن رسیدن موش‌ها برای ایجاد دیابت در موش‌های صحرایی، محلول استرپتوزوتوسین[5] (حل‌شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با pH=۴/۵) به صورت داخل‌صفاقی و فقط یک مرتبه با دُز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن بعد از ۱۵ دقیقه تزریق نیکوتین‌آمید با دُز ۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق شد [۱۹]. جهت اطمینان از دیابتی‌شدن موش‌ها، قند خون آن‌ها ۷۲ ساعت پس از تزریق با کمک گلوکومتر و نمونه خونی گرفته‌شده از سیاهرگ دمی اندازه‌گیری شد. قند خون بالای ۱۳۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی‌شدن در نظر گرفته شد [۲۰].

پس از القای دیابت، موش‌های صحرایی به روش تصادفی به دو گروه: مداخله و شاهد تقسیم شدند (هر گروه شش سر). موش‌های گروه‌های مداخله برای آشنایی با نوارگردان[6] به مدت یک هفته با سرعت ۵ تا ۱۰ متر بر دقیقه، روی نوارگردان دویدند. برنامه گروه مداخله به مدت هشت هفته و هر هفته چهار جلسه بود. موش‌های گروه مداخله در شروع هر جلسه با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه بدنشان را گرم کردند. سپس برنامه تمرینی اصلی شامل ۳۰ دقیقه تمرین تداومی با شدتی حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد حداکثر سرعت انجام شد. در پایان هر جلسه نیز موش‌ها با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه بدنشان را سرد کردند. کل مدت‌زمان دویدن موش‌های صحرایی در هر جلسه بر روی نوارگردان ۴۲ دقیقه بود. شیب نوارگردان صفر درجه بود و در هشت هفته تغییری نداشت [۲۱]. در این مدت، گروه شاهد هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند. همچنین موش‌های صحرایی هیچ‌گونه درمانی با انسولین را در طول دوره پژوهش نداشتند.

آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت با سرعت پنج متر در دقیقه شروع و هر سه دقیقه سرعت تردمیل پنج متر در دقیقه افزایش یافت تا موش‌های صحرایی به خستگی (چسبیدن موش‌ها به انتهای تردمیل) برسند. سرعتی که در آن موش‌های صحرایی به خستگی رسیدند، به عنوان حداکثر سرعت در نظر گرفته شد [۲۲].

برای از بین بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای غیرقابل کنترل استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه تمرینی، بعد از ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون‌صفاقی 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 عضله قلبی از بدن حیوان برداشته شد و در سرم فیزیولوژیک شست‌وشو شد و بلافاصله با استفاده از مایع ازت منجمد شد و برای سنجش‌های بعدی با دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد فریزر شد [۲۳].

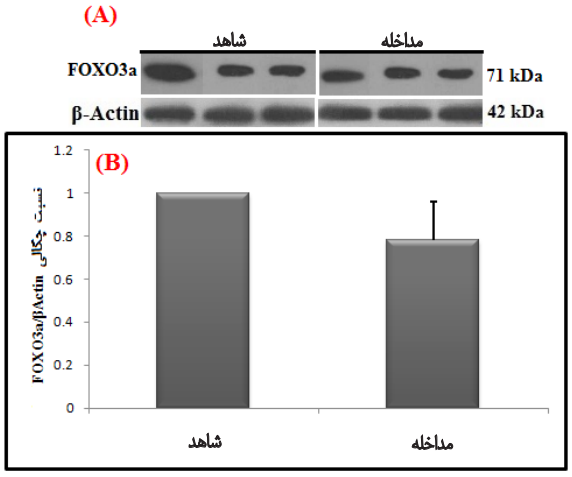
با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن بلات متغیرهای پژوهش اندازه‌گیری شدند. برای استخراج پروتئین‌های بافت قلب از بافر RIPA[7] حاوی ۰/۰۵ میلی‌مولار بافر تریس[8] (pH=۸)، ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد اتیلن گلیکول تترااستیک اسید[9] و یک درصد سدیم دودسیل سولفات[10] به اضافه ۰/۱ درصد آنتی‌پروتئاز کوکتیل (ساخت شرکت سیگما[11]) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌گرم بافت در ۵۰۰ میکرولیتر بافر حاوی آنتی‌پروتئاز توسط یک هموژنایزر دستی هموژن و نیم‌ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس در یک سانتریفیوژ یخچال‌دار (bo, sw14rfroil) در دور ۱۲ هزار و چهار درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد؛ سپس مایع رویی جمع‌آوری شد و غلظت پروتئین آن با کیت تعیین‌کننده پروتئین (Bio-Rad، ساخت آمریکا) در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. درنهایت در ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری شد، سپس هموژن به‌دست‌آمده به نسبت ۱:۱ با نمونه لودینگ بافر (mM50 تریس کلرید هیدروژن، دو درصد سدیم دو دسیل سولفات، ۱۰ درصد گلیسرول، پنج درصد بتا مرکاپتواتانول و ۰/۰۰۵ درصد برموفنول آبی) مخلوط شد.

در ادامه، نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه جوشانده شد تا تمام پروتئین‌ها کاملاً دناتوره شوند. پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل SDS–Polyacrylamide جدا و به غشای نیترو سلولز منتقل شدند. غشا به مدت یک ساعت در پنج درصد سرم آلبومین گاوی[12] در بافر تریس سالین[13] و ۰/۱ درصد بافر تریس سالین توئین ۲۰[14] مسدود و در آنتی‌بادی اولیه (۱:۵۰۰) انکوبه شد. انکوباسیون در آنتی‌بادی ثانویه روز بعد به مدت یک ساعت در دمای اتاق در چهار درصد TBST انجام شد. پروتئین‌ها (بعد از یک واکنش شیمیایی لومینسانس[15] و تجزیه و تحلیل چگالی‌سنجی[16]) با نرم‌افزار Image J (نسخه ۱/۸/۰_۱۱۲) اندازه‌گیری شدند. آنتی‌بادی اولیه و ثانویه anti-FOXO3a (DP-12) (sc-48348) و anti-Beclin-1 (E-8) (Sc-48341) (شرکت سانتاکروز ساخت کشور آمریکا) مورد استفاده قرار گرفتند [۲۴].

از آزمون کولموگروف اسمیرنوف[17] برای تعیین نرمالیتی توزیع داده‌ها استفاده شد و باتوجه به نرمال‌بودن توزیع داده‌ها در متغیرها، از آزمون پارامتریک تی مستقل برای مقایسه بین گروهی استفاده شد.

5. Streptozotocin (STZ)
6. Treadmill

7. Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
8. Tris
9. Ethylene Glycol Tetraacetic Acid (EGTA)
10. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
11. Sigma
12. Bovine Serum Albumin (BSA)
13. Tris-Buffered Saline
14. Tris-Buffered Saline-Tween (TBST)
15. Chemiluminescence (ECL)
16. Densitometry
17. Kolmogorov–Smirnov test (KS)



مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

شکل ۱. مقایسه محتوای پروتئین FOXO3a در گروه‌های موردمطالعه.
A: تصاویر وسترن‌بلات پروتئین FOXO3a و بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی در بافت عضله قلب.
B: میانگین و انحراف معیار، نشان‌دهنده مقادیر کمی‌شده باندهای پروتئین FOXO3a در مقابل کنترل داخلی (بتا اکتین) که به صورت چند برابر گروه شاهد ارائه شده است.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام گرفت. سطح معنی‌داری P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

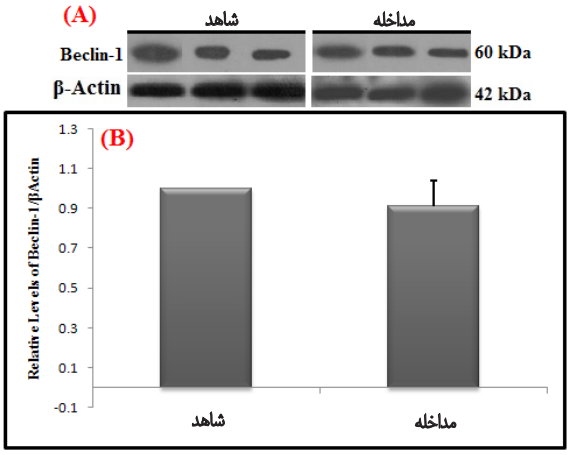
یافته‌ها

به دنبال هشت هفته تمرین استقامتی، تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین FOXO3a بین گروه‌های مداخله و شاهد در بافت عضله قلبی وجود نداشت (P=۰/۱۲) (شکل شماره ۱، A و B). همچنین، هشت هفته تمرین استقامتی منجر به کاهش معنی‌داری در محتوای پروتئین Beclin-1 بین گروه‌های مداخله و شاهد در بافت عضله قلبی نشد (P=۰/۳۴) (شکل شماره ۲، A و B).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که هشت هفته تمرین استقامتی منجر به تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 گروه مداخله نسبت به گروه شاهد نشد.

با وجود گذشت چند دهه از تلاش‌های دارویی و بالینی پی‌درپی به منظور توسعه راهبردهای درمانی در برابر بیماری‌های قلبی، محققان به تأثیر فعالیت‌های ورزشی در بیماران قلبی‌عروقی روی آورده‌اند [۱۴]. تمرین استقامتی، به عنوان یک درمان غیردارویی، منجر به بهبود عوارض مرگ‌ومیر ناشی از مشکلات قلبی می‌شود؛ این نوع تمرینات ورزشی باعث بهبود عملکرد انقباضی قلب و هموستاز سلولی و محافظت از قلب در برابر طیف گسترده‌ای از بیماری های قلبی می‌شود [۲۵، ۲۶].



مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

شکل ۲. مقایسه محتوای پروتئین Beclin-1 در گروه‌های موردمطالعه.
A: تصاویر وسترن‌بلات پروتئین Beclin-1 و بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی در بافت عضله قلب.
B: میانگین و انحراف معیار، نشان‌دهنده مقادیر کمی‌شده باندهای پروتئین Beclin-1 در مقابل کنترل داخلی (بتا-اکتین) که به صورت چند برابر گروه شاهد ارائه شده است.

تحقیقات بسیار اندکی محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Be-clin-1 را در آزمودنی‌های دیابتی که مستعد کاردیومیوپاتی دیابتی و مرگ سلول عضله قلبی هستند، بررسی کرده‌اند. بر اساس شواهد هنوز ماهیت تمرینات ورزشی بر روی فرایند اتوفاژی به‌درستی مشخص نشده است. با وجود این، در تحقیقی مک‌میلان[18] و همکاران به بررسی تأثیر تمرین استقامتی بر روی پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 در عضله قلب موش‌های صحرایی پرداختند. تمرین ورزشی شامل دویدن موش‌ها بر روی تردمیل به مدت شش هفته و پنج روز در هفته صورت گرفت. سرعت نهایی ۲۱ متر بر دقیقه با شیب ۴۵ درجه با مدت‌زمان ۴۵ دقیقه بود. محتوای پروتئین FOXO3a تغییر معنی‌داری را نشان نداد. همچنین، تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین Beclin-1 مشاهده نشد. نتایج تحقیق آن‌ها با نتایج تحقیق حاضر در یک راستاست؛ زیرا در هر دو تحقیق محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 تغییر معنی‌داری را نشان نداده است [۲۷]. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً تمرین استقامتی نمی‌تواند بر محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 تأثیری داشته باشد.

میوسیت‌های قلب سلول‌های متفاوت و دارای ظرفیت بازسازی‌کننده بسیار محدودی هستند؛ بنابراین حفظ میوسیت‌های قلب بالغ در سراسر طول عمر فرد به طور قابل توجهی به زندگی سالم کمک می‌کند [۷، ۱۰]. اتوفاژی یک فرایند ضروری برای عملکرد طبیعی قلب است. بنابراین، تنظیم فرایند اتوفاژی از طریق فعالیت‌های ورزشی می‌تواند یک روش درمانی مفید باشد. البته این

18. McMillan

فرضیه نیز وجود دارد که تمرین ورزشی استقامتی منجر به اتوفاژی، اتوفاژی میتوکندری و میتوفاژی درون قلب می‌شود که آن‌ها را اتوفاژی قلبی ناشی از فعالیت ورزشی[19] و میتوفاژی قلبی ناشی از فعالیت ورزشی[20] می‌نامند. با وجود این، محققان می‌گویند این نوع اتوفاژی از طریق تمرین ورزشی استقامتی می‌تواند منجر به مساعدت محیط سلولی شود و سلول‌های قلبی را در برابر تنش‌هایی مانند ایسکمی و صدمات قلبی محافظت کند [۲۸].

مسیر مستقل Beclin-1 از مسیرهای مهم اتوفاژی است که پروتئین‌های متعددی در تنظیم آن نقش دارند [۲۹]. همچنین شواهد نشان می‌دهد که Beclin-1 ممکن است یک جزء ضروری در اتوفاژی نباشد. در این راستا نتایج یک مطالعه نشان داده است که با وجود کاهش محتوای Beclin-1 در طی یک جلسه تمرین استقامتی، این نوع تمرین منجر به ترویج اتوفاژی در قلب موش‌ها می‌شود [۳۰].

در تحقیق لی[21] و همکاران، محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 به دنبال یک جلسه تمرین استقامتی شامل دویدن موش‌ها بر روی تردمیل به مدت ۶۰ دقیقه با سرعت ۱۲ متر بر دقیقه با شیب صفر درجه، منجر به کاهش معنی‌دار محتوای پروتئین Beclin-1 شد؛ اما محتوای پروتئین FOXO3a افزایش معنی‌داری یافته بود [۳۰]. این نتایج با نتایج مطالعه حاضر در یک راستا نیست. لی و همکاران در تحقیق خود به جای واژه اتوفاژی از واژه کینتوفاژی[22] استفاده کردند که آن را اتوفاژی وابسته به فعالیت ورزشی تعریف کرده‌اند. این محققان با توجه به نتایج تحقیق خود که پروتئین‌های متعددی را وابسته به مسیرهای مختلف اتوفاژی اندازه‌گیری کرده بودند متذکر این مطلب شدند که کینتوفاژی با توجه به کاهش پروتئین Beclin-1 که یکی از پروتئین‌های مهم در مسیر اتوفاژی است، اتفاق افتاد. در پاسخ به نتیجه‌گیری لی و همکاران می‌توان گفت که جواب در مسیرهای دیگر اتوفاژی، از قبیل مسیر mTOR است که نقش مهمی در تنظیم اتوفاژی دارد. پروتئین mTOR هسته مرکزی دو کمپلکس mTORC1 و mTORC2 است [۳۱]. این پروتئین در پایین‌دست خود از طریق مسیر mTORC1 می‌تواند با تنظیم پروتئین‌های ATG13، ULK1 و FIP200 منجر به اتوفاژی شود [۳۲]. همچنین پروتئین mTOR از طریق مسیر mTORC2 می‌تواند با تنظیم پروتئین FOXO3a منجر به مرگ سلولی شود [۳۳].

سنجش پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 به‌تنهایی برای ارزیابی تغییرات قلبی در پاسخ به بیماری دیابت که منجر به کاردیومیوپاتی قلبی می‌شوند و همچنین در پاسخ به تمرین استقامتی کافی نیست و به نظر می‌رسد که نقش سایر پروتئین‌های درگیر در فرایند اتوفاژی میوسیت‌ها قابل‌توجه باشند. همچنین در زمینه مرگ سلولی، سایر مکانیسم‌ها مانند نکروز و آپوپتوز نیز دخیل هستند [۳۴].

به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین استقامتی منجر به تغییر معنی‌داری بر محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Be-clin-1 نمی‌شود. به نظر می‌رسد برای تغییر بهینه در سیگنالینگ اتوفاژی در عضله قلب، باید به خصوصیات تمرین ورزشی مانند شدت، مدت و نوع تمرین ورزشی دقت کرد. با وجود این باید تحقیقات بیشتری در این زمینه انجام شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه دارای کُد اخلاق به شماره IR.SUMS.REC.1396.S1062 از دانشگاه علوم‌پزشکی شیراز است.

حامی مالی

کلیه مخارج این مقاله بر عهده نویسندگان مقاله بوده است و هیچ کمک خاصی از سازمان‌های تأمین‌کننده در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

نگارش: همه نویسندگان؛ منابع و اعتبارسنجی: محمد شرافتی‌مقدم و مسعود جوکار؛ روش‌شناسی و تحلیل داده‌ها: فرهاد دریانوش و مسعود جوکار؛ ویراستاری و مدیریت پروژه: محمد شرافتی‌مقدم.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

19. Exercise-Induced Cardiac Autophagy
20. Exercise-Induced Cardiac Mitophagy
21. Lee
22. Kinetophagy

References

[1] Yang JS, Lu CC, Kuo SC, Hsu YM, Tsai SC, Chen SY, et al. Autophagy and its link to type II diabetes mellitus. Biomedicine. 2017; 7(2):8. [DOI:10.1051/bmdcn/2017070201] [PMID] [PMCID]

[2] Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. Physiol Rev. 2013; 93(1):137-88. [DOI:10.1152/physsrev.00045.2011] [PMID]

[3] Konduracka E, Cieslik G, Galicka-Latala D, Rostoff P, Pietrucha A, Latacz P, et al. Myocardial dysfunction and chronic heart failure in patients with long-lasting type 1 diabetes: A 7-year prospective cohort study. Acta Diabetol. 2013; 50(4):597-606. [DOI:10.1007/s00592-013-0455-0] [PMID] [PMCID]

[4] Gilbert RE, Krum H. Heart failure in diabetes: Effects of anti-hyperglycaemic drug therapy. Lancet. 2015; 385(9982):2107-17. [DOI:10.1016/S0140-6736(14)61402-1]

[5] Miki T, Yuda S, Kouzu H, Miura T. Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology and clinical features. Heart Fail Rev. 2013; 18(2):149-66. [DOI:10.1007/s10741-012-9313-3] [PMID] [PM0CID]

[6] Kanter M, Aksu F, Takir M, Kostek O, Kanter B, Oymagil A. Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in Streptozotocin-induced diabetic rat heart. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2017; 125(09):583-91. [DOI:10.1055/s-0035-1569332] [PMID]

[7] Kobayashi S, Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2015; 1852(2):252-61. [DOI:10.1016/j.bbadis.2014.05.020] [PMID]

[8] Sinha RA, Singh BK, Yen PM. Reciprocal crosstalk between autophagic and endocrine signaling in metabolic homeostasis. Endocr Rev. 2017; 38(1):69-102. [DOI:10.1210/er.2016-1103] [PMID]

[9] Yoshida GJ. Therapeutic strategies of drug repositioning targeting autophagy to induce cancer cell death: From pathophysiology to treatment. J Hematol Oncol. 2017; 10:67. [DOI:10.1186/s13045-017-0436-9] [PMID] [PMCID]

[10] Ward ML, Crossman DJ. Mechanisms underlying the impaired contractility of diabetic cardiomyopathy. World J Cardiol. 2014; 6(7):577-84. [DOI:10.4330/wjc.v6.i7.577] [PMID] [PMCID]

[11] Munasinghe PE, Katare R. Maladaptive autophagy in diabetic heart disease. Int J Clin Exp Physiol. 2016; 3(4):155-65. [DOI:10.4103/2348-8832.196893]

[12] 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. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2017; 1863(2):486-98. [DOI:10.1016/j.bbadis.2016.11.023] [PMID]

[13] Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T, Romagnoli A, Fimia GM, Piacentini M, et al. Beclin1: A role in membrane dynamics and beyond. Autophagy. 2012; 8(1):6-17. [DOI:10.4161/auto.8.1.16645] [PMID]

[14] Giallauria F, Acampa W, Ricci F, Vitelli A, Torella G, Lucci R, et al. Exercise training early after acute myocardial infarction reduces stress-induced hypoperfusion and improves left ventricular function. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2013; 40(3):315-24. [DOI:10.1007/s00259-012-2302-x] [PMID]

[15] Tao L, Bei Y, Zhang H, Xiao J, Li X. Exercise for the heart: Signaling pathways. Oncotarget. 2015; 6(25):20773-84. [DOI:10.18632/oncotarget.4770]

[16] Mooren FC, Krüger K. Exercise, autophagy, and apoptosis. In: Bouchard C, editor. Molecular and Cellular Regulation of Adaptation to Exercise, Progress in Molecular Biology and Translational Science. Vol 135. Amsterdam: Elsevier; 2015. p. 407-22. [DOI:10.1016/bs.pmbts.2015.07.023] [PMID]

[17] 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. J Mol Integ Physiol. 2012;2(3):65-74. [DOI:10.4236/ojmip.2012.23010]

[18] Brandt N, Gunnarsson TP, Bangsbo J, Pilegaard H. Exercise and exercise training-induced increase in autophagy markers in human skeletal muscle. Physiol Rep. 2018; 6(7):e13651. [DOI:10.14814/phy2.13651] [PMID] [PMCID]

[19] Safhi MM, Anwer T, Khan G, Siddiqui R, Moni Sivakumar S, Alam MF. The combination of canagliflozin and omega-3 fatty acid ameliorates insulin resistance and cardiac biomarkers via modulation of inflammatory cytokines in type 2 diabetic rats. Korean J Physiol Pharmacol. 2018; 22(5):493-501. [DOI:10.4196/kjpp.2018.22.5.493] [PMID] [PMCID]

[20] Khalili A, Nekooeian AA, Khosravi MB. Oleuropein improves glucose tolerance and lipid profile in rats with simultaneous renovascular hypertension and type 2 diabetes. J Asian Nat Prod Res. 2017; 19(10):1011-21. [DOI:10.1080/10286020.2017.1307834] [PMID]

[21] Shadmehri S, Sherafati Moghadam M, Daryanoosh F, Aghaei Bahmanbeglou N. The effect of endurance exercise on mTORC1 marker pathway in the soleus muscle of type 2 diabetic rats. J Qazvin Univ Med Sci. 2019; 23(2):92-103. [In Persian] [DOI:10.32598/JQUMS.23.2.92]

[22] Garcia NF, Sponton ACS, Delbin MA, Parente JM, Castro MM, Zanesco A, et al. Metabolic parameters and responsiveness of isolated iliac artery in LDLr-/-mice: Role of aerobic exercise training. Am J Cardiovasc Dis. 2017; 7(2):64-71. [PMID] [PMCID]

[23] Shabani M, Daryanoosh F, Salesi M, Kooshki Jahromi M, Fallahi AA. Effect of continuous training on the level of PPAR-γ and PRDM16 proteins in adipose tissue in overweight diabetes rats. J Qazvin Univ Med Sci. 2018; 22(3):4-12. [In Persian] [DOI:10.29252/qums.22.3.4]

[24] 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. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2018; 17(9):843-54. [In Persian] http://journal.rums.ac.ir/article-1-4269-en.html

[25] Ascensão A, Ferreira R, Magalhaes J. Exercise-induced cardioprotection-biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. Int J Cardiol. 2007; 117(1):16-30. [DOI:10.1016/j.ijcard.2006.04.076] [PMID]

[26] Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. Free Radic Biol Med. 2008; 44(2):193-201. [DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.006] [PMID]

[27] McMillan EM, Paré MF, Baechler BL, Graham DA, Rush JWE, Quadrilatero J. Autophagic signaling and proteolytic enzyme activity in cardiac and skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats following chronic aerobic exercise. PLoS One. 2015; 10(3):e0119382. [DOI:10.1371/journal.pone.0119382] [PMID] [PMCID]

[28] 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. J Physiol Sci. 2017; 67(6):639-54. [DOI:10.1007/s12576-017-0555-7] [PMID] [PMCID]

[29] Wu CA, Huang DY, Lin WW. Beclin-1-independent autophagy positively regulates internal ribosomal entry site-dependent translation of hypoxia-inducible factor 1alpha under nutrient deprivation. Oncotarget. 2014; 5(17):7525-39. [DOI:10.18632/oncotarget.2265]

[30] Lee Y, Kang EB, Kwon I, Cosio-Lima L, Cavnar P, Javan GT. Cardiac kinetophagy coincides with activation of anabolic signaling. Med Sci Sports Exerc. 2016; 48(2):219-26. [DOI:10.1249/MSS.0000000000000774] [PMID]

[31] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. Cell. 2012; 149(2):274-93. [DOI:10.1016/j.cell.2012.03.017] [PMID] [PMCID]

[32] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. J Cell Sci. 2009; 122(20):3589-94. [DOI:10.1242/jcs.051011] [PMID] [PMCID]

[33] Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. FEBS Lett. 2010; 584(7):1287-95. [DOI:10.1016/j.febslet.2010.01.017] [PMID] [PMCID]

[34] Tian XF, Cui MX, Yang SW, Zhou YJ, Hu DY. Cell death, dysglycemia and myocardial infarction (review). Biomed Rep. 2013; 1(3):341-6. [DOI:10.3892/br.2013.67] [PMID] [PMCID]