

The effect of high-intensity interval training and high-protein diet on the apoptotic indices of caspase-3, Bax, and Bcl-2 in the cardiac tissue of obese male rats

Azin Ghane¹, Hossein Abednatanzi^{1*}, Marziyeh Saghebjo², Mehdi Hedayati³

1. Department of Professional Physical Education and Sport Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Birjand, Birjand, Iran
3. Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author e-mail: abednazari@gmail.com

Citation: Ghane A, Abed Natanzi H, Saghebjo M, Hedayati M. The effect of high-intensity interval training and high-protein diet on the apoptotic indices of caspase-3, Bax, and Bcl-2 in the cardiac tissue of obese male rats. *Daneshvar Medicine* 2022; 30(1):59-71. doi: 10.22070/DANESHMED.2022.15468.1151

Abstract

Background and Objective: Obesity is involved in the apoptosis of cardiac cells and the development of cardiovascular diseases. Exercise training and diet modification can affect apoptotic indices. The aim of the present study was to assess the effect of high-intensity interval training (HIIT) and high-protein diet (HPD) on the apoptotic indices of caspase-3, Bax, and Bcl-2 in the cardiac tissue of obese rats.

Materials and Methods: In the present experimental study, 40 obese male rats were divided into five equal groups, including HIIT (90% VO₂max, 5 sessions per week, 10 weeks), HPD, HIIT+HPD, obesity control-1 (OC-1), obesity control-2 (OC-2), and eight non-obese rats were also considered in the non-obese control (NC) group. Cardiac tissue was extracted 48 hours after the last intervention session to measure the levels of caspase-3, Bax, and Bcl-2 proteins. Data were analyzed using one-way ANOVA, Kruskal-Wallis, and Mann-Whitney tests ($P \leq 0.05$).

Results: The caspase-3 and Bax levels in the HIIT+HPD group was significantly lower than in the HIIT, HPD, and OC-1 groups. On the other hand, the HIIT and HPD groups showed a significantly higher Bcl-2 level than the OC-1 and NC groups. Also, there was a significantly higher of Bcl-2 to Bax ratio in the HIIT and HIIT+HPD groups compared with the OC-1 group.

Conclusion: According to the results of the present study, a combination of HIIT and HPD improves the apoptotic status of cardiac tissue. It seems that the combination of HIIT and HPD provides the necessary adaptations to inhibit obesity-induced apoptosis in the cardiac tissue of obese rats.

Keywords: High-intensity interval training, High-protein diet, Caspase-3, Cardiac tissue, Obese rats

Received: 21 Dec 2021
Last revised: 03 Apr 2022
Accepted: 10 Apr 2022

مقاله
پژوهشیتأثیر تمرین تناوبی شدید و رژیم غذایی
پرپروتئین بر شاخص های آپوپتوزی کاسپاز-۳،
Bax و Bcl-2 بافت قلب موش های بزرگ
آزمایشگاهی نر چاقنویسندگان: آذین قانع^۱، حسین عابدنطنزی^{۱*}، مرضیه ثاقبجو^۲، مهدی
هدایتی^۳

۱. گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
۳. مرکز تحقیقات سلولی مولکولی غدد درون ریز، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

Email: abednazari@gmail.com

*نویسنده مسئول: حسین عابد نطنزی

چکیده

مقدمه و هدف: چاقی در آپوپتوز سلول های قلب و بروز بیماری های قلبی- عروقی نقش دارد. تمرینات ورزشی و اصلاح رژیم غذایی می تواند بر عوامل آپوپتوزی تاثیرگذار باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تمرین تناوبی شدید (HIIT) و رژیم غذایی پرپروتئین (HPD) بر شاخص های آپوپتوزی کاسپاز-۳، Bax و Bcl-2 بافت قلب موش های بزرگ آزمایشگاهی چاق بود.

مواد و روش ها: در مطالعه تجربی حاضر، ۴۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر چاق به پنج گروه مساوی شامل HIIT (شدت ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی، پنج جلسه در هفته، ۱۰ هفته)، HPD، HIIT+HPD، کنترل چاق-۱ (OC-1) و کنترل چاق-۲ (OC-2) و هشت سر موش غیر چاق نیز در گروه کنترل غیرچاق (NC) تقسیم شدند. بافت قلب ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه مداخله برای اندازه گیری سطوح پروتئین های کاسپاز-۳، Bax و Bcl-2 خارج شد. آنالیز داده ها با استفاده از آزمون های آنالیز واریانس یک طرفه، کروسکال-والیس و من ویتنی در سطح معناداری $P \leq 0.05$ انجام شد.

نتایج: سطوح کاسپاز-۳ و Bax در گروه HIIT+HPD نسبت به گروه های HIIT، HPD و OC-1 به طور معناداری پایین تر بود. از طرفی سطح Bcl-2 در گروه های HIIT و HPD نسبت به گروه های OC-1 و NC به طور معناداری بالاتر بود. همچنین نسبت Bcl-2 به Bax در گروه های HIIT و HIIT+HPD در مقایسه با گروه OC-1 به طور معناداری بالاتر بود.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر، HIIT به همراه HPD باعث بهبود وضعیت آپوپتوزی بافت قلب می شود. به نظر می رسد HIIT به همراه HPD، سازگاری های لازم برای مهار آپوپتوز ناشی از چاقی را در بافت قلب موش های بزرگ آزمایشگاهی فراهم می سازد.

واژه های کلیدی: تمرین تناوبی شدید، رژیم غذایی پرپروتئین، کاسپاز-۳، بافت قلب، موش های چاق

دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۳۰

آخرین اصلاح ها: ۱۴۰۱/۰۱/۱۴

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۲۱

مقدمه

Bcl-xl می‌باشند که از آزاد شدن فاکتورهای پیش آپوپتوزی از میتوکندری جلوگیری می‌کنند. برعکس، مولکول‌های پیش آپوپتوزی مانند **Bax** و **Bak** با باز کردن منافذ میتوکندریایی و آزادسازی مولکول‌های آپوپتوزی به داخل سیتوزول، فرآیند آپوپتوز را سرعت می‌بخشند (۷). به دنبال تجمع **Bax** در میتوکندری، با تضعیف غشاء آن و ایجاد یک کانال در غشاء، باعث آزاد شدن سیتوکروم **C** شده که در نهایت آبشار کاسپازی (کاسپاز-۹ و در انتها کاسپاز-۳) را فعال می‌کند و موجب آپوپتوز می‌گردد (۸،۷). همچنین، نسبت **Bcl-2** به **Bax** برای تعیین این که سلول هدف در معرض آپوپتوز قرار گرفته است یا نه، ضروری است. کاهش نسبت **Bcl-2** به **Bax** منجر به آزادسازی سیتوکروم **C** به سیتوزول می‌شود و پس از اتصال آن به فاکتور-۱ پروتئاز فعال کننده آپوپتوز^۶ (**Apaf-1**)، باعث فعال‌سازی پلیمر (**ADP-ribose**) پلیمر^۷ (**PARP**) و کاسپاز-۳ می‌شود و موجب آپوپتوز می‌گردد (۱۱). اکنون مشخص شده است که آپوپتوز نقش مهمی در پاتوژنز انواع **CVD** دارد (۱۲،۵). گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن^۸ (**ROS**) می‌تواند منجر به تغییرات اکسیداتیو در سلول‌های لیبیدی، پروتئین‌ها یا **DNA** شود و یا می‌تواند در پیام‌رسانی درون سلولی یا تنظیم سلول مفید باشد، اما مقادیر بالای **ROS** میتوکندریایی^۹ (**mtROS**) می‌تواند آپوپتوز در مسیر درونی را آغاز کند و منجر به آزادسازی عوامل آپوپتوزی میتوکندری مانند سیتوکروم **C** و فاکتور القا آپوپتوز به داخل سیتوزول شود (۱۳،۱۴). بنابراین، مهار آپوپتوز یک هدف بالقوه برای مداخله درمانی جهت پیشگیری از ناراحتی‌های قلبی است (۵).

امروزه استراتژی‌های مختلفی جهت کاهش عوارض ناشی از **HFD** و چاقی وجود دارد. تمرینات ورزشی یکی از استراتژی‌های غیر دارویی است که قادر به کاهش خطرات قلبی-عروقی، محافظت از قلب و پیشگیری و درمان چاقی و عوارض متابولیکی آن است (۱۵). تمرینات ورزشی هوازی یکی از برنامه‌های تمرینی است که در مطالعات

چاقی و اضافه وزن، منشأ بسیاری از بیماری‌ها از قبیل بیماری‌های قلبی-عروقی^۱ (**CVD**)، فشارخون بالا، دیابت نوع ۲ و سرطان می‌باشد و رابطه زیادی بین چاقی و این بیماری‌ها گزارش شده است (۱-۳). نتایج مطالعات نشان داده است که مصرف بیش از حد رژیم غذایی پرچرب^۲ (**HFD**)، با اختلال در عملکرد میوسیت‌های قلبی، آسیب به میتوکندری و تنظیم افزایشی پروتئین‌های آپوپتوزی میوکارد قلب همراه است (۴،۲). سه شکل مورفولوژیکی و بیوشیمیایی متفاوت از مرگ سلولی شامل نکروز، آپوپتوز و احتمالاً اتوفازی وجود دارد که در قلب اتفاق می‌افتد (۵). آپوپتوز یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد **CVD** است و نتایج مطالعات موجود حاکی از آن است که در اثر عوامل درونی یا بیرونی مانند ایسکمی، سالخوردگی و چاقی، میزان آپوپتوز تشدید می‌شود و از این طریق مقدمات بروز انواع **CVD** را فراهم می‌کند (۳،۶). دو مسیر مولکولی آپوپتوز شامل ۱. مسیر درونی (مسیر میتوکندریایی) که به وسیله اعضای خانواده لئومای ۲ لئوسیت‌های-**B**^۳ (**Bcl-2**) کنترل می‌شود و با فعال‌سازی پروتئین ایکس مرتبط با **Bcl-2**^۴ (**Bax**) منجر به نفوذپذیری غشای میتوکندریایی می‌گردند و ۲. مسیر بیرونی (گیرنده‌های مرگ) که این مسیر به دنبال اتصال لیگاند به گیرنده‌های عامل نکروز تومور^۵ (**TNF**) آغاز شده و منجر به فعال‌سازی کاسپاز-۸ و متعاقباً کاسپاز-۳ می‌گردد (۸،۷). بنابراین، کاسپازها پروتئازهای خاصی هستند که نقش اصلی را در آپوپتوز بازی می‌کنند.

کاسپازها در فرآیند مرگ سلولی در دو دسته آغازگر و اجرایی مشارکت می‌کنند. کاسپاز-۸ که در ابتدای فرآیند فعال می‌شود به عنوان کاسپازهای آغازگر و کاسپاز-۳ که در مراحل بعدی و توسط کاسپازهای آغازگر فعال می‌شوند به عنوان کاسپازهای اجرایی آبشار کاسپازی را به راه می‌اندازند (۱۰،۹). علاوه بر کاسپازها، پروتئین‌های ضد آپوپتوزی **Bcl-2** نیز در فرآیند آپوپتوز درگیر می‌باشند. پروتئین‌های ضد آپوپتوزی خانواده **Bcl-2** مانند **Bcl-2** و

6. Apoptotic peptidase activating factor 1
7. Poly (ADP-ribose) polymerase
8. Reactive oxygen species
9. Mitochondrial ROS

1. Cardiovascular disease
2. High-fat diet
3. B. cell leukemia/lymphoma 2
4. Bcl-2-associated X protein
5. Tumor necrosis factor family of receptors

غذایی تجویز شده ایزوکالریک برای شرکت کنندگان بالای ۱۸ سال به کار برده بودند، عنوان کردند که یک رژیم غذایی محدودیت کالریک کم‌چرب پرپروتئین، در مقایسه با یک رژیم غذایی محدودیت کالریک کم‌چرب با پروتئین استاندارد، اثرات مفیدی برای کاهش وزن بدن، توده چربی و تری‌گلیسرید ایجاد کرده و باعث کاهش کم‌تر توده بدون‌چربی و هزینه انرژی استراحتی^۶ (REE) می‌شود (۲۷). از طرفی ژانگ^۷ و همکاران (۲۰۲۰)، در مطالعه‌ای نشان دادند که HPD باعث آترواسکلروز و آسیب به قلب می‌شود. مصرف پروتئین به شدت سطح اسیدآمینو خون و پلاک‌های آترواسکلروتیک را بالا می‌برد و باعث تحریک سیگنالینگ هدف راپامایسین پستانداران^۸ (mTOR) در ماکروفاژهای بافت قلب موش‌های تغذیه شده با HPD می‌گردد (۲۸). نتایج بر گرفته از مطالعات حیوانی در دهه‌های پیشین نیز به طور کلی نشان‌دهنده افزایش آتروژنز^۹ ناشی از دریافت HPD است (۲۸،۲۹). ناهمسو با این نتایج، وینکه^{۱۰} و همکاران (۲۰۱۹)، کاهش تغییرات مضر از جمله کاهش التهاب، فیبروز و هایپرتروفی بطن راست را به دنبال هشت هفته دریافت HPD در بافت قلبی موش‌های مبتلا به فشار خون شریان ریوی گزارش کردند (۳۰). با این حال، در این مطالعات تا حد زیادی ارزیابی مسیرهای آپوتوزی بافت قلبی آزمودنی‌هایی که HPD دریافت کرده باشند، مورد توجه قرار نگرفته است و ارتباط بین رژیم‌های پرپروتئین‌دار و آپوتوز بافت قلبی همچنان نامشخص باقی مانده است. چاقی با افزایش التهاب و افزایش سطح پایه رادیکال‌های آزاد و فشار اکسیداتیو، موجب افزایش گرایش سلول‌های بدن به آپوتوز می‌گردد. به دلیل محبوبیت زیاد HIIT و استفاده از HPD در مباحث کنترل وزن، بررسی آپوتوز قلبی ناشی از مصرف HFD و چاقی و اثر HIIT و HPD بر آن، از مواردی است که بر ضرورت انجام تحقیق حاضر افزوده است. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، بررسی تاثیر HIIT و HPD بر سطوح شاخص‌های آپوتوزی کاسپاز-۳، Bax و Bcl-2 بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر چاق می‌باشد.

مورد بررسی قرار گرفته است. لی^۱ و همکاران (۲۰۱۳)، به بررسی اثر تمرینات هوازی بر آپوتوز بافت قلبی موش‌های چاق پرداختند. نتایج، کاهش میزان پروتئین کاسپاز-۹ را پس از ۱۲ هفته تمرین هوازی در عضله قلبی موش‌های تمرین کرده نشان داد (۱۶). همچنین پترسون^۲ و همکاران (۲۰۰۸)، گزارش کردند که ۹ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط موجب کاهش بیان پروتئین سیتوکروم C و به دنبال آن کاهش فعالیت کاسپازی و قطعه قطعه شدن DNA در میوکارد موش‌های چاق می‌شود (۱۲). با این حال، برخی از پژوهش‌ها نیز تسریع فرآیند آپوتوز و افزایش بیان پروتئین‌های کاسپازی را به دنبال تمرینات ورزشی گزارش کردند (۱۷-۱۹). در سال‌های اخیر، تمرینات تناوبی شدید^۳ (HIIT)، به عنوان یکی از محبوب‌ترین تمرینات برای کاهش عوارض قلبی ناشی از HFD مورد استفاده قرار گرفته است (۲۰-۲۲). تمرینات تناوبی شدید، تمریناتی با دوره‌های تکراری شدید و نسبتاً کوتاه با دوره‌های استراحت بین تکرارها هستند (۲۳) که به دلیل فقدان زمان برای فعالیت فیزیکی در دنیای امروز، یک جایگزین اثربخش نسبت به تمرینات هوازی طولانی مدت مطرح شده است. رضانی و همکاران (۲۰۱۹)، افزایش پروتئین ضد آپوتوزی Bcl-2 و کاهش بیان ژن Bax را پس از چهار هفته HIIT در عضله قلبی موش‌های مبتلا به دیابت را گزارش کردند (۲۴). در مجموع، با توجه به نقش حساس و کلیدی بافت قلبی در سلامتی و عملکرد، این موضوع یکی از نگرانی‌ها و چالش‌های جدی است که ذهن محققین را به خود جلب کرده است و نبود مطالعات کافی به ویژه در رابطه با اثرات HIIT بر مسیر مولکولی آپوتوز، ضرورت و اهمیت موضوع را دو چندان کرده است.

یکی دیگر از استراتژی‌های جالبی که برای کاهش وزن مورد توجه قرار گرفته است استفاده از رژیم‌های غذایی پرپروتئین^۴ (HPD) و کربوهیدرات کم است (۲۵،۲۶). ویچرلی^۵ و همکاران (۲۰۱۲)، در پژوهشی فراتحلیل مربوط به بررسی ۲۴ تحقیق کاهش وزن که رژیم‌های

6. Resting energy expenditure

7. Zhang

8. Mammalian target of Rapamycin

9. Atherogenesis

10. Vinke

1. Lee

2. Peterson

3. High-intensity interval training

4. High-protein diet

5. Wycherley

مواد و روش‌ها

طرح مطالعه

پرپروتئین دارای ۱۵ درصد کالری از چربی، ۲۷/۵ درصد از کربوهیدرات و ۵۷/۵ درصد از پروتئین (هر کیلوگرم غذا شامل: ۵۹۳/۵ گرم کازئین، ۳۹ گرم ساکاروز، ۱۵۰ گرم نشاسته ذرت، ۴۷ گرم نشاسته تصفیه‌شده، ۷۰ گرم روغن سویا، ۵۰ گرم سلولز، ۳۵ گرم مواد معدنی، ۱۰ گرم ویتامین، ۳ گرم ال-سیستین، ۲/۵ گرم کولین) تغذیه شدند (۳۱). همچنین، گروه‌های OC-2 و NC با رژیم غذایی استاندارد دارای ۱۳/۵ درصد کالری از چربی، ۵۹/۵ درصد از کربوهیدرات و ۲۷ درصد از پروتئین (حاوی ۲۹ درصد کالری چربی، ۴۰ درصد کربوهیدرات، ۲۶/۵ درصد پروتئین و ۴/۵ درصد فیبر) تغذیه شدند.

موش‌های گروه‌های HIIT و OC-1 در طول مدت ۱۰ هفته مداخله، توسط رژیم غذایی پرچرب با ترکیب ۶۰ درصد کالری از چربی، ۲۰ درصد پروتئین و ۲۰ درصد کربوهیدرات تغذیه شدند که هر ۷۷۳/۸۰ گرم از آن، حاوی ترکیبی از ۲۰۳ گرم پروتئین، ۱۹۷/۸۰ گرم کربوهیدرات، ۲۷۰ گرم چربی (۲۵ گرم روغن گیاهی و ۲۴۵ گرم روغن ذوب شده دنبه گوسفند به جای چربی خوک)، ۵۰ گرم مخلوط مواد معدنی، ۳ گرم مخلوط ویتامین‌ها و ۵۰ گرم فیبر بود (۳۲) و در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غذای مورد استفاده در تحقیق از پژوهشکده زیست فناوری رویان (اصفهان، ایران) خریداری شده و به صورت پلت با دسترسی آزاد در دسترس موش‌ها قرار گرفت.

اندازه‌گیری شاخص‌های آنترپومتری

وزن، قد و شاخص لی موش‌ها قبل و بعد از ۱۰ هفته مداخله تمرین و رژیم غذایی اندازه‌گیری شد. از ترازوی دیجیتالی (حساسیت ۰/۱ گرم، مدل N47-440، شرکت کرن^۱ کشور آلمان) جهت وزن‌کشی، کولیس دیجیتالی (مدل 1108-300، شرکت اینسایز^۲ کشور چین) برای اندازه‌گیری قد موش‌ها و برای تعیین چاقی موش‌های بزرگ آزمایشگاهی از شاخص لی^۳ استفاده شد. بر این اساس موش‌هایی که شاخص لی آن‌ها بیشتر از ۳۱۰ باشد، چاق محسوب می‌شوند (۳۳).

تحقیق تجربی حاضر مطابق با راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی-واحد علوم و تحقیقات تصویب شد (IR.IAU.SRB.REC.1400.182). در این تحقیق ۴۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر ویستار چاق ۱۲ هفته‌ای با میانگین وزنی $21/78 \pm 391/88$ گرم و هشت سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر ویستار غیر چاق ۱۲ هفته‌ای با میانگین وزن $20/50 \pm 261/88$ گرم از انستیتو پاستور (کرج، ایران) خریداری شد و پس از انتقال به محیط تحقیق، موش‌ها داخل قفس‌های پلی‌کربنات شفاف با دو موش در هر قفس، در آزمایشگاه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند با رطوبت نسبی 40 ± 5 درصد، دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت (هفت صبح، هفت شب) نگهداری شدند و در تمامی مراحل تحقیق، به غذا و آب دسترسی کامل داشتند. لازم به ذکر است که ۴۰ سر موش چاق، از سن ۱۲-۴ هفته‌ای به سفارش محقق در انستیتو پاستور، تحت رژیم غذایی پرچرب قرار گرفته بودند. پس از انتقال موش‌ها به محیط تحقیق و متعاقب یک هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه، موش‌های چاق به طور تصادفی به پنج گروه هشت تایی شامل: ۱-تمرین تناوبی شدید (HIIT) (در حالی که دریافت رژیم پرچرب در این گروه تا پایان مطالعه ادامه یافت)، ۲-رژیم غذایی پرپروتئین (HPD) (قطع رژیم غذایی پرچرب با شروع مطالعه و جایگزینی رژیم غذایی پرپروتئین تا پایان مطالعه)، ۳-تمرین تناوبی شدید+رژیم غذایی پرپروتئین (HIIT+HPD) (قطع رژیم غذایی پرچرب با شروع مطالعه و جایگزینی رژیم غذایی پرپروتئین تا پایان مطالعه)، ۴-کنترل چاق-۱ (OC-1)؛ ادامه رژیم غذایی پرچرب در طول مطالعه) و ۵-کنترل چاق-۲ (OC-2)؛ قطع رژیم غذایی پرچرب در شروع مطالعه و ادامه رژیم غذایی استاندارد) و هشت سر موش غیر چاق در گروه کنترل غیرچاق (NC) تقسیم شدند.

رژیم‌های غذایی حیوانات

با شروع پروتکل تحقیق، موش‌های گروه‌های HPD و HIIT+HPD، به مدت ۱۰ هفته با یک رژیم غذایی

1. Kern
2. Insizze
3. Lee index

برنامه تمرین تناوبی شدید

در ابتدای تحقیق، موش‌ها جهت آشناسازی با چگونگی دویدن روی نوارگردان برای پنج روز، ۱۰ دقیقه در روز با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه فعالیت نمودند. سپس برنامه تمرین بر اساس پروتکل HIIT از تحقیق کیم و همکاران^۱ (۲۰۱۴) اقتباس شد و در آن موش‌ها پنج روز در هفته به مدت ۱۰ هفته، با شدت ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی روی نوارگردان مخصوص چونندگان (با شیب صفر درجه) دویدند. در ابتدای دوره تمرین، هر جلسه تمرین با پنج تناوب ۳۰ ثانیه‌ای با سرعت ۲۹ متر بر دقیقه همراه با یک دقیقه استراحت فعال بین دو تناوب (با سرعت ۱۳ متر بر دقیقه) شروع شد. هر هفته یک تناوب و یک متر بر دقیقه به ترتیب به تعداد تناوب‌ها و سرعت نوارگردان اضافه شد. تعداد تناوب‌ها و سرعت دویدن در هفته هشتم به ترتیب به ۱۲ تناوب و ۳۶ متر بر دقیقه (حدود ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) رسید و تا پایان دوره مداخله (پایان هفته دهم)، ثابت باقی ماند. گرم کردن و سرد کردن نیز با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه (با شدت حدود ۴۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) در ابتدا و انتهای هر جلسه تمرین انجام شد (۳۴).

نمونه برداری و سنجش‌های بیوشیمیایی

متعاقب ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرین (پایان هفته دهم) و بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه، موش‌ها با ترکیبی از کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) بیهوش شدند. پس از جراحی، بافت قلب برداشته و شست‌وشو داده شد و بلافاصله در نیتروژن مایع (با دمای ۱۹۶-درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. نمونه‌ها تا هنگام سنجش‌های بیوشیمیایی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت هوموژنیزه کردن بافت، ابتدا با استفاده از ترازوی دیجیتال جادور^۲ تایوانی مدل SKY-600 (حساسیت اندازه‌گیری ۰/۰۱ گرم)، میزان ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های جامد جدا و به داخل میکروتیوپ منتقل گردید. پس از رساندن دمای نمونه‌ها به دمای اتاق، بافر فسفات نمکی^۳ (PBS) (pH 7.4, 100mM) به عنوان بافر

هوموژنیزه کننده به آن افزوده شد و توسط دستگاه هوموژن کننده (مدل MM400، ساخت شرکت رسش کشور آلمان) به مدت پنج دقیقه با فرکانس ۳۰، هوموژنیزه شد (در مجموع ۱۰۰ میلی‌گرم بافت به ازای یک میلی‌لیتر بافر PBS). برای جلوگیری از تخریب پروتئین‌ها، مورد استفاده حاوی کوکتل آنتی پروتئاز^۴ بود (Problock (Goldbio Inc., USA). سپس نمونه‌های بافت هوموژن شده، سانتریفیوژ گردید (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و مایع رویی (سوپرناتانت‌ها) به دقت جمع‌آوری و الیکوت^۵ شد و جهت اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. سطوح بافتی پروتئین‌های کاسپاز-۳، Bax و Bcl-2 به روش الایزا و با استفاده از کیت‌های تحقیقاتی الایزا مخصوص موش‌های بزرگ آزمایشگاهی (محصول شرکت زلبایو^۶، کشور آلمان) اندازه‌گیری گردید. درصد تغییرات و حساسیت کیت‌های مذکور به ترتیب ۷/۱ درصد و ۰/۰۶ نانوگرم در میلی‌لیتر، ۶/۲ درصد و ۰/۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر و ۵/۹ درصد و ۰/۰۵ نانوگرم در میلی‌لیتر بود. علاوه‌براین، پروتئین تام نمونه‌ها نیز با کیت اندازه‌گیری پروتئین به روش بردفورد^۷ (محصول شرکت زلبایو، کشور آلمان) اندازه‌گیری شد و سپس غلظت کاسپاز-۳، Bax و Bcl-2 بر اساس نانوگرم بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در ابتدا به منظور بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک و برای بررسی فرض برابری واریانس‌ها، از آزمون لون استفاده شد. با توجه به طبیعی بودن توزیع داده‌های کاسپاز-۳، Bax و Bcl-2 و برقراری فرض برابری واریانس‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. با توجه به این که داده‌های نسبت Bcl-2 به Bax از توزیع طبیعی برخوردار نبود در نتیجه از آزمون ناپرامتریک کروسکال-والیس و من ویتنی جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه

4-Anti-protease cocktail

5- Aliquot

6- ZellBio

7- Bradford

1- Kim et al

2- Jadever

3- Phosphate buffered saline

در جدول ۱ میانگین و انحراف معیار شاخص‌های آنروپومتری موش‌ها در گروه های مورد مطالعه ارائه شده است (جدول ۱).

بین گروه‌ها استفاده شد. تمام محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ و در سطح معناداری $P \geq 0.05$ صورت گرفت.

نتایج

جدول ۱. شاخص های آنروپومتری در گروه های مورد مطالعه قبل و بعد از پروتکل تحقیق. HIIT: تمرین تناوبی شدید، HPD: رژیم غذایی پرپروتئین، OC-1: کنترل چاق-۱، OC-2: کنترل چاق-۲ و NC: کنترل غیرچاق

Lee obesity index		Body weight (g)		Variables
M±SD		M±SD		
after	before	after	before	Groups
315.86±4.57	338.52±16.66	442.93±29.86	390.37±26.35	HIIT
304.13±3.11	323.73±8.29	374.50±26.57	370.53±19.81	HPD
306.85±2.56	334.55±15.29	381.23±21.53	387.47±26.83	HIIT+HPD
338.45±8.38	331.78±9.43	524.70±48.87	395.78 ±38.82	OC-1 *
327.29±3.85	327.61±7.09	505.38±49.80	388.18±34.67	OC-2 *
318.81±2.53	301.19±4.96	419.06±49.26	283.10±42.26	NC *

* OC-1 (کنترل چاق-۱): ادامه رژیم غذایی پرچرب در طول مطالعه؛ OC-2 (کنترل چاق-۲): قطع رژیم غذایی پرچرب در شروع مطالعه و ادامه رژیم غذایی استاندارد؛ NC (کنترل غیرچاق): دریافت‌کننده رژیم غذایی استاندارد

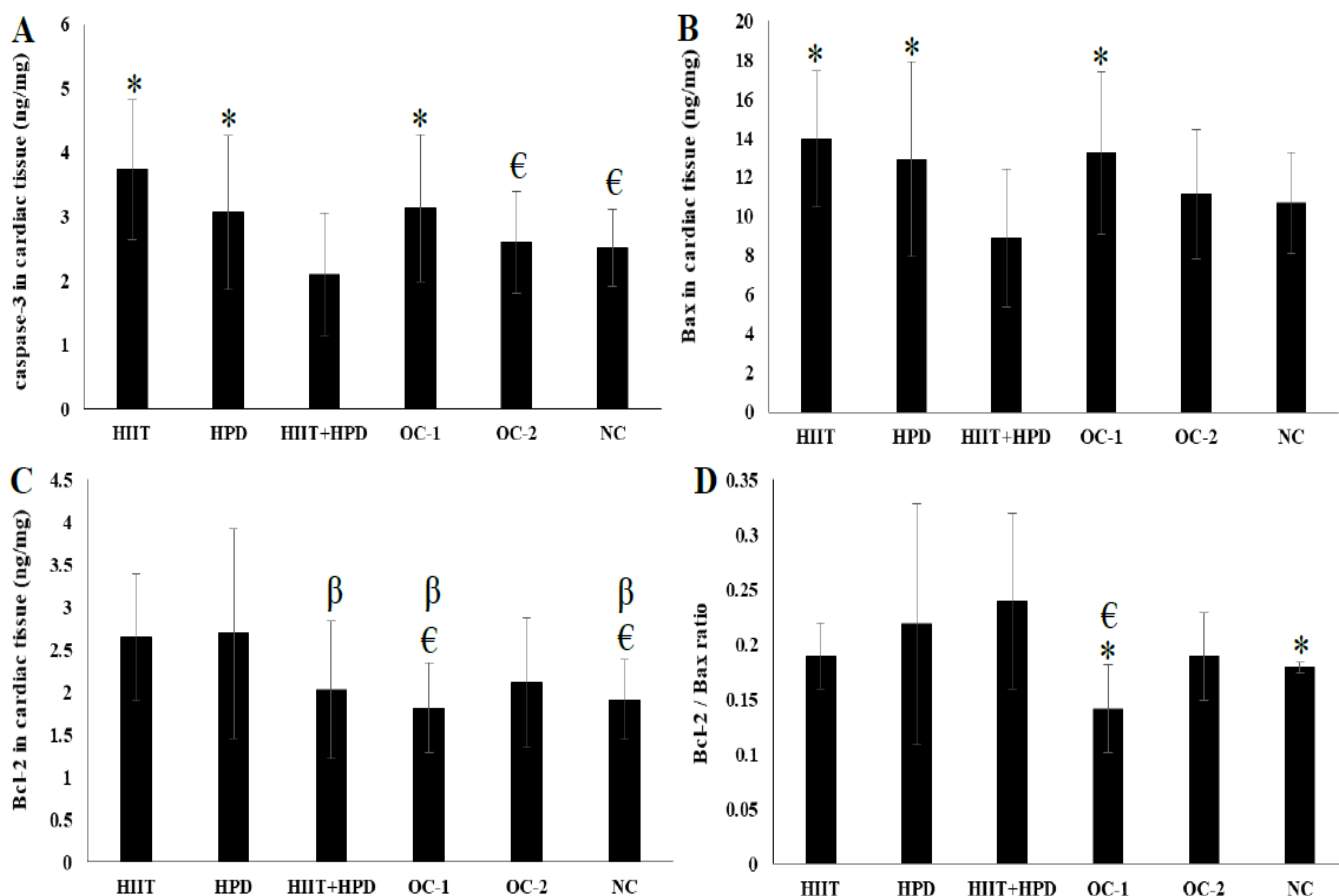
با توجه به نتایج آزمون تعقیبی توکی مشخص شد که سطح Bcl-2 بافت قلب در گروه‌های HIIT و HPD نسبت به گروه‌های OC-1 (به ترتیب $P=0.01$ و $P=0.002$) و NC (به ترتیب $P=0.05$ و $P=0.01$) پس از ۱۰ هفته مداخله به طور معناداری بالاتر بود. علاوه بر این سطح Bcl-2 بافت قلب در گروه HPD نسبت به گروه HIIT+HPD پس از ۱۰ هفته مداخله به طور معناداری بالاتر بود ($P=0.04$). بین سایر گروه‌ها در سطوح کاسپاز-۳، Bax و Bcl-2 تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P>0.05$) (شکل ۱. C). نتایج آزمون کروسکال-والیس در خصوص نسبت Bcl-2 به Bax تفاوت معناداری بین گروه‌های مورد مطالعه پس از ۱۰ هفته مداخله نشان داد ($\chi^2=14/93$ ، $P=0.01$). با توجه به نتایج آزمون من ویتنی، نسبت Bcl-2 به Bax در گروه‌های HIIT و HIIT+HPD در مقایسه با گروه OC-1 (به ترتیب $P=0.02$ و $P=0.002$) و همچنین در گروه

بر اساس نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، در سطوح پروتئین‌های کاسپاز-۳ ($F=6/92$ ، $P=0.0001$) و Bax ($F=5/90$ ، $P=0.0001$) بافت قلب بین گروه‌های مورد مطالعه پس از ۱۰ هفته مداخله تفاوت معناداری مشاهده شد. با توجه به آزمون تعقیبی توکی، سطوح کاسپاز-۳ و Bax بافت قلب در گروه HIIT+HPD نسبت به گروه‌های HIIT، HPD و OC-1 بعد از ۱۰ هفته مداخله به طور معناداری پایین‌تر بود ($P<0.05$) (شکل ۱. A و B). از طرفی سطح کاسپاز-۳ در گروه HIIT نسبت به گروه‌های OC-2 و NC، بعد از ۱۰ هفته مداخله به طور معناداری بالاتر بود (مقادیر P به ترتیب 0.008 و 0.006) (شکل ۱. A).

از دیگر نتایج مطالعه حاضر، وجود تفاوت معناداری در سطح پروتئین Bcl-2 بافت قلب بین گروه‌های مورد مطالعه پس از ۱۰ هفته مداخله بود ($F=5/45$ ، $P=0.0001$).

گروه HPD در مقایسه با گروه OC-1، تمایل به افزایش نشان داد، اما به لحاظ آماری معنادار نبود ($P=0/09$) (شکل ۱.D).

HIIT+HPD در مقایسه با گروه NC، پس از ۱۰ هفته مداخله به طور معناداری بالاتر بود ($P=0/01$). بین سایر گروه‌ها در نسبت Bcl-2 به Bax تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P>0/05$). از سوی دیگر، سطح این متغیر در



شکل ۱. سطوح پروتئین‌های A: Caspase-3 (کاسپاز-۳)، B: Bax، C: Bcl-2 و D: نسبت Bcl-2 به Bax بافت قلب بعد از ۱۰ هفته مداخله در گروه‌های مورد مطالعه. HIIT: تمرین تناوبی شدید، HPD: رژیم غذایی پرپروتئین، OC-1: کنترل چاق-۱، OC-2: کنترل چاق-۲ و NC: کنترل غیرچاق. €: تفاوت معنادار با HIIT. *: تفاوت معنادار با HIIT+HPD و β: تفاوت معنادار با HPD ($P \leq 0/05$)

بحث

هدف از پژوهش حاضر، بررسی تاثیر HIIT و HPD بر سطوح پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز کاسپاز-۳، Bax و Bcl-2 در بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر چاق بود. نتایج این مطالعه در خصوص تغییرات سطوح کاسپاز-۳ و Bax بافت قلب نشان داد که سطوح این دو پروتئین پس از ۱۰ هفته HIIT+HPD نسبت به گروه‌های HIIT، HPD و کنترل چاق دریافت کننده رژیم غذایی

بررسی تاثیر HIIT و HPD بر سطوح پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز کاسپاز-۳، Bax و Bcl-2 در بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر چاق بود. نتایج این مطالعه در خصوص تغییرات سطوح کاسپاز-۳ و Bax بافت قلب نشان داد که سطوح این دو پروتئین پس از ۱۰ هفته HIIT+HPD نسبت به گروه‌های HIIT، HPD و کنترل چاق دریافت کننده رژیم غذایی

مکانیکی زیاد می‌شود، ترشح گلوکوکورتیکوئیدها، تولید ROS و کلسیم داخل سلولی افزایش می‌یابد که این عوامل باعث آسیب اکسیداتیو و در نتیجه موجب آپوتوز از مسیر داخلی یا میتوکندریایی سلول می‌شود (۷).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد سطح Bcl-2 بافت قلب متعاقب انجام ۱۰ هفته مداخله در گروه‌های HIIT و HPD در مقایسه با گروه‌های کنترل چاق با تغذیه پرچرب و کنترل غیر چاق بالاتر بود. همچنین نسبت Bcl-2 به Bax بافت قلب پس از ۱۰ هفته مداخله در گروه‌های HIIT و HIIT+HPD در مقایسه با گروه کنترل چاق با تغذیه پرچرب بالاتر بود. احتمالاً دلیل این تغییرات در مطالعه حاضر، بروز واکنش‌های ضد آپوتوزی در بافت قلب است. در این راستا یادگاری و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای نشان دادند، سطح Bcl-2 و Bax بافت ریه موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در اثر شش هفته HIIT (۱۰ تناوب یک دقیقه‌ای با سرعت ۷۰-۲۵ متر بر دقیقه و پنج جلسه در هفته) نسبت به گروه کنترل بالاتر بود (۳۸). همچنین در مطالعه پوررازی و همکاران (۲۰۲۰)، بیان ژن Bcl-2 و نسبت Bcl-2 به Bax بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در اثر ۱۲ هفته HIIT (۸-۲ تناوب ۳-۴ دقیقه‌ای با سرعت ۳۷-۲۶ متر بر دقیقه و پنج جلسه در هفته) نسبت به گروه کنترل بالاتر بود (۶). افزایش Bcl-2 و نسبت Bcl-2 به Bax در بافت قلب در اثر HIIT و مصرف HPD احتمالاً ایمنی سلول را از طریق سرکوب Bax، تنظیم کلسیم رها شده از شبکه سارکوپلاسمیک/رتیکولوم اندوپلاستیک، تحکیم دیواره میتوکندری و کاهش تاثیر ROS حاصل از HIIT افزایش می‌دهد و از آپوتوز جلوگیری می‌کند (۳۸، ۳۹). همچنین Bcl-2 از فعال‌سازی آبشار کاسپاز-۳ از مسیر رهاسازی سیتوکروم C و فعال شدن کاسپاز-۹ جلوگیری می‌کند که در نهایت از شکسته شدن DNA و مرگ سلولی ممانعت می‌شود (۷).

در مطالعه حاضر مصرف HPD باعث بهبود شاخص‌های آپوتوزی و ضد آپوتوزی شد. در این راستا مطالعات انجام شده بسیار اندک است؛ در مطالعه زارعلی و همکاران (۲۰۲۰)، بیان ژن کاسپاز-۳ بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در اثر هشت هفته HIIT (۱۰-۹۰ درصد

تعدیل کرده است. کاسپازهای پروآپوتوزی ۸، ۹ و ۱۲ به ترتیب از طریق گیرنده‌های مرگ، رهایی ستوکروم C و رهاسازی بدون کنترل کلسیم از شبکه سارکوپلاسمیک/رتیکولوم اندوپلاستیک فعال می‌شوند و در نهایت با فعال کردن کاسپاز-۳ باعث مرگ برنامه ریزی شده سلول‌ها می‌شوند (۳۵). کاسپاز-۳ در میان سایر کاسپازها مسیر نهایی است و کنترل این کاسپاز در ایجاد آپوتوز اهمیت خاصی دارد (۳۵). همچنین پروتئین Bax باعث کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکندری می‌شود و در نتیجه رهایش عوامل آپوتوزی مانند ستوکروم C از فضای بین غشایی را ایجاد می‌کند. فصل مشترک پروتئین‌های آپوتوزی، در نهایت فعال‌سازی کاسپاز-۳ و تجزیه پروتئین‌های حیاتی سلول است (۷). در مطالعه حاضر، HIIT همراه با دریافت HFD، باعث افزایش سطوح پروتئین‌های آپوتوزی (کاسپاز-۳ و Bax) بافت قلب موش‌ها چاق شد که با مطالعات قبلی (۸، ۳۶، ۳۷) در زمینه افزایش کاسپاز-۳ و Bax همسو است. نتایج مطالعه بنایی و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که سطح کاسپاز-۳ بطن چپ قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در اثر هشت هفته HIIT (۱۲-۵ تناوب ۳۰-۷۵ ثانیه‌ای با شدت ۹۰-۵۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و پنج جلسه در هفته) نسبت به گروه کنترل بالاتر بود (۳۶). همچنین در مطالعه آذربایجانی و همکاران (۲۰۱۷)، بیان ژن کاسپاز-۳ و Bax بافت کبد موش‌های بزرگ آزمایشگاهی ماده در اثر هشت هفته HIIT (۱۰ تناوب یک دقیقه‌ای با شدت ۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و سه جلسه در هفته) نسبت به گروه کنترل بالاتر بود (۳۷). علاوه بر این در مطالعه‌ای که روی موش‌های چاق (۱۶ هفته سن در پایان مطالعه، نه هفته چاق بودند) انجام شد، محققین نشان دادند سطح کاسپاز-۳ بافت قلب در اثر چاقی در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نسبت به گروه کنترل لاغر، بالاتر است؛ هر چند در گروه چاقی که تمرینات هوازی (۵۵ دقیقه، سرعت ۲۰ متر بر دقیقه، نه هفته و پنج جلسه در هفته) انجام دادند، نسبت به گروه کنترل چاق سطح این شاخص پایین‌تر بود (۱۲). سازوکار آپوتوز سلولی بافت قلب در اثر HIIT به خوبی مشخص نیست، اما یکی از فرضیه‌های احتمالی در این زمینه این است که در اثر HIIT آسیب

Bax به خوبی مشخص نیست. احتمالاً سازوکار این تاثیر شامل: ۱- کاهش و جلوگیری از واکنش‌های التهابی ناشی از اسیدهای چرب اشباع و ترانس، ۲- کاهش محتوای اسیدهای چرب اشباع و ترانس غشای سلول، ۳- جلوگیری از آزاد شدن این اسیدهای چرب توسط لیپوپروتئین لیپاز، ۴- سرکوب فعالیت سیکلوآکسیژناز-۲ (COX-2) (اسیدهای چرب را به پروستاگلاندین-۲ و ترمبوکسان-۲ تبدیل می‌کند) و سرکوب مسیر پیام رسانی TNF- α و ۵- کاهش استرس اکسیداتیو و مهار عوامل ایجاد کننده التهاب از جمله لوکوترین‌ها، پروستاگلاندین‌ها و سایتوکین که در نهایت به کاهش آپوپتوز منجر می‌شود (۷، ۴۰). با این وجود برای تفسیر و بررسی دقیق تاثیر مصرف HPD بر آپوپتوز بافت قلب نیاز به مطالعات بیشتری است. از محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم بررسی سایر مسیرهای مولکولی شامل مسیر ROS، عوامل التهابی و فاکتورهای پروتئازی فعال کننده آپوپتوز به منظور بررسی هر چه دقیق‌تر فرآیند آپوپتوز در بافت قلب و تاثیر HIIT و HPD بر مسیر آپوپتوز است.

نتیجه گیری

به طور کلی در مطالعه حاضر نشان داده شد ۱۰ هفته تمرین HIIT به همراه HFD در موش‌های چاق باعث بالا رفتن سطح پروتئین‌های کاسپاز-۳ و Bax در بافت قلب می‌شود که احتمالاً ناشی از پیشبرد فرآیندهای آپوپتوزی است و سطح پروتئین‌های آپوپتوزی مذکور در اثر HIIT به همراه مصرف HPD تعدیل شد. از طرفی بالا رفتن سطح پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 و نسبت Bcl-2 به Bax پس از تمرین HIIT و مصرف HPD مشاهده شد که با توجه به مطالعات گذشته، این تغییرات ممکن است به دلیل سازوکار مهاری برای کاهش آپوپتوز و مقابله با کاسپاز-۳ و Bax باشد. برای بررسی و تفسیر دقیق‌تر در ارتباط با سازوکار تاثیر HIIT و به ویژه مصرف HPD بر شاخص‌های آپوپتوزی در بافت قلب به مطالعات بیشتری نیاز است.

حداکثر اکسیژن مصرفی، شش تناوب چهار دقیقه‌ای و پنج جلسه در هفته) به همراه محدودیت کالری (۵۰ درصد غذای مصرفی سایر گروه‌ها) نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود (۷). البته ذکر این نکته ضروری است که در مطالعه ذکر شده، بیان ژن کاسپاز-۳ بافت قلب اندازه‌گیری شد و با توجه به عدم اندازه‌گیری بیان پروتئین کاسپاز-۳، نمی‌توان در خصوص تغییرات پروتئین کاسپاز-۳ با قطعیت نظر داد. همچنین در مطالعه‌ای به بررسی اثر چهار نوع رژیم غذایی شامل ۱- استاندارد، ۲- محدودیت کالری (CR) (۴۰ درصد کمتر از مقدار رژیم غذایی استاندارد و دارای منبع چربی روغن سویا سرشار از امگا-۶)، ۳- CR (دارای منبع چربی روغن ماهی سرشار از امگا-۳)، ۴- CR (دارای منبع چربی خوک سرشار از اسیدهای چرب اشباع و ترانس) بر مسیرهای آپوپتوز در موش‌های مسن (۱۸ ماه) پرداختند. این محققین نشان دادند در گروه CR با منبع چربی خوک، فعالیت کاسپاز-۳ و ۹ بافت عضله افزایش یافت و سطح Bax و فعالیت کاسپاز-۳ و ۸ در پلاسما و بافت عضلانی گروه CR با منبع چربی روغن ماهی کاهش یافت (۴۰). در مطالعات گذشته محققین بیان کردند مقدار درشت مغذی‌های موجود در رژیم غذایی (چربی، پروتئین و کربوهیدرات) و میزان انرژی دریافتی می‌تواند بر متغیرهای آپوپتوزی و ضد آپوپتوزی تاثیرگذار باشد (۷، ۴۰). وجود اسیدهای چرب اشباع (مانند اسید پالمیتیک و اسید استئاریک) و اسیدهای چرب غیر اشباع ترانس (مانند اسید لینولئیک و اسید اولئیک ترانس) در HFD می‌تواند زمینه ساز استرس اکسیداتیو، التهاب و در نتیجه آپوپتوز شود. در مطالعه حاضر HPD دارای ۱۵ درصد کالری از چربی، ۲۷/۵ درصد از کربوهیدرات و ۵۷/۵ درصد از پروتئین بود که نسبت به HFD (۶۰ درصد کالری از چربی، ۲۰ درصد پروتئین و ۲۰ درصد کربوهیدرات)، دارای درصد چربی کمتر و اسیدهای چرب اشباع و ترانس کمتری نیز است، در نتیجه احتمالاً HPD می‌تواند استرس اکسیداتیو و التهاب را کاهش دهد. سازوکارهای اصلی اثر گذار HPD و رژیم‌های غذایی محدودیت کالری در سرکوب شاخص‌های آپوپتوزی کاسپاز-۳ و Bax و بهبود شاخص‌های ضد آپوپتوزی Bcl-2 و نسبت Bcl-2 به

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کارشناسان محترم بیوشیمی مرکز تحقیقات سلولی مولکولی غدد درون ریز، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی خانم‌ها لاله حقوقی راد و هدی قدکساز، جهت انجام سنجش‌های آزمایشگاهی قدردانی می‌کنند. همچنین از خانم‌ها ریحانه غلامی، بهاره سادات خورسند ذاکر و

آقای محسن علی‌آبادی به جهت همکاری ارزشمند در مراحل علمی اجرای این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

منابع

- Rahmatollahi M, Ravasi A, Soori R. Effect of 8 Weeks of Low-Intensity Continuous Training on Plasma Adipolin, Insulin Resistance, and Weight of Fatty Fat-Filled Rats. *Advances in Obesity, Weight Management & Control* 2017;7(5):342-346.
- He Y, Shi M, Wu J, Sun Z, Guo J, Liu Y, et al. Effects of a high-fat diet on intracellular calcium (Ca²⁺) handling and cardiac remodeling in Wistar rats without hyperlipidemia. *Ultrastructural Pathology* 2020;44(1):42-51.
- Pagidipati NJ, Zheng Y, Green JB, McGuire DK, Mentz RJ, Shah S, et al. Association of obesity with cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease: Insights from TECOS. *American heart journal* 2020;219:47-57.
- Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, et al. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *Journal of Hypertension* 2006;24(3):549-61.
- Lee Y, Gustafsson ÅB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis*. 2009;14(4):536-48.
- Pourrazi H, Asgharpour-Arshad M, Gholami F, Abbasi S. Effect of High-Intensity Interval Training on Apoptotic Gene Expression in Rat Myocardial Tissue. *Gene, Cell and Tissue* 2020;7(2).
- Zarali M, Etemad Z, Azizbeigi K, Karimi P. Effect of 8 Weeks of High Intensity Interval Training (HIIT) With and Without Calorie Restriction on Gene Expression of Caspase-3 and Caspase-9 Proteins in Male Rats. *Journal of Arak University of Medical Sciences* 2020;23(3):300-13.
- Ahmadabadi F, Saghebjo M, Hedayati M, Hoshyar R, Huang C-J. Treatment-induced tumor cell apoptosis following high-intensity interval training and saffron aqueous extract in mice with breast cancer. *Physiology International* 2021;108(1):19-26.
- Dabrowska C, Li M, Fan Y. Apoptotic caspases in promoting cancer: implications from their roles in development and tissue homeostasis. *Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy Springer* 2016; 930:89-112.
- Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences* 2013;17(3):48-57.
- Kazemi A, Mirzazadeh E. The Effect of Endurance Training on Tumor Tissue Levels of Caspase-3 and Caspase-9 in Mice with Breast Cancer. *Iranian Quarterly Journal of Breast Disease* 2018; 11(3): 32-43.
- Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *Journal of applied physiology* 2008;105(6):1934-43.
- El-Osta H, Circu ML. Mitochondrial ROS and apoptosis. *Mitochondrial Mechanisms of Degeneration and Repair in Parkinson's Disease Springer* 2016:1-23.
- Hekimi S, Wang Y, Noë A. Mitochondrial ROS and the effectors of the intrinsic apoptotic pathway in aging cells: the discerning killers! *Frontiers in Genetics* 2016;7:161.

15. Alexandre-Santos B, Machado MV, Menezes AC, Velasco LL, Sepúlveda-Fragoso V, Vieira AB, et al. Exercise-induced cardiac opioid system activation attenuates apoptosis pathway in obese rats. *Life sciences* 2019;231:116542.
16. Lee S-D, Shyu W-C, Cheng I-S, Kuo C-H, Chan Y-S, Lin Y-M, et al. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2013;23(6):566-73.
17. Ho T-J, Huang C-C, Huang C-Y, Lin W-T. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, protects against excessive endurance exercise training-induced cardiac hypertrophy, apoptosis and fibrosis in rats. *European Journal of Applied Physiology* 2012;112(8):2943-55.
18. Javid Tabrizi N, Bashiri J, Narimani Rad M. Effect of 12 Weeks of Treadmill Aerobic Training on Cytochrome c and Caspase-9 gene Expression in Cardiac Muscle of Male Rats. *Qom University of Medical Sciences Journal* 2017;11(6):1-9.
19. Li X, LU J, ZHAO H-y. Effect of long-term endurance exercise on apoptosis of cardiac sacopenia. *Journal of Xi'an Physical Education University* 2009(6):21.
20. Khalafi M, Mohebbi H, Karimi P. High-intensity interval training increases mitochondria biogenesis in adipose tissue and improves insulin resistance in high fat diet-induced obese rat. *International Journal of Applied Exercise Physiology* 2019;8(1):43-50.
21. Martinez-Huenchullan S, Ban L, Olaya-Agudo L, Maharjan BR, Williams P, Tam C, et al. Constant-moderate and high-intensity interval training have differential benefits on insulin sensitive tissues in high-fat fed mice. *Frontiers in Physiology* 2019;10:459.
22. Ahmadi N, Farsi S, Azarbayjani MA. The Effect of High Intensity Interval Training and Endurance Training on the cAMP Gene Expression and Glycerol in the Heart Tissue of Obese Rats. *International Journal of Applied Exercise Physiology* 2019;8(1):159-69.
23. Gibala MJ, Little JP, MacDonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *The Journal of Physiology* 2012;590(5):1077-84.
24. Ramezani N, Vanaky B, Shakeri N, Soltanian Z, Fakhari Rad F, Shams Z. Evaluation of Bcl-2 and Bax Expression in the Heart of Diabetic Rats after Four Weeks of High Intensity Interval Training. *Medical Laboratory Journal* 2019;13(1):15-20.
25. Nielsen L, Kristensen M, Klingenberg L, Ritz C, Belza A, Astrup A, et al. Protein from Meat or Vegetable Sources in Meals Matched for Fiber Content has Similar Effects on Subjective Appetite Sensations and Energy Intake A Randomized Acute Cross-Over Meal Test Study. *Nutrients* 2018;10(1):96.
26. Layman DK, Boileau RA, Erickson DJ, Painter JE, Shiue H, Sather C, et al. A reduced ratio of dietary carbohydrate to protein improves body composition and blood lipid profiles during weight loss in adult women. *The Journal of Nutrition* 2003;133(2):411-7.
27. Wycherley TP, Moran LJ, Clifton PM, Noakes M, Brinkworth GD. Effects of energy-restricted high-protein, low-fat compared with standard-protein, low-fat diets: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2012;96(6):1281-98.
28. Zhang X, Sergin I, Evans TD, Jeong S-J, Rodriguez-Velez A, Kapoor D, et al. High-protein diets increase cardiovascular risk by activating macrophage mTOR to suppress mitophagy. *Nature Metabolism* 2020;2(1):110-25.
29. Darioli R. Dietary Protein and Atherosclerosis. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 2011;81(2):153.
30. Vinke P, Bowen TS, Boekschoten MV, Witkamp RF, Adams V, van Norren K. Anti-inflammatory nutrition with high protein attenuates cardiac and skeletal muscle alterations in a pulmonary arterial hypertension model. *Scientific Reports* 2019;9(1):1-11.
31. Ropelle ER, Pauli JR, Fernandes MFA, Rocco SA, Marin RM, Morari J, et al. A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes* 2008;57(3):594-605.
32. Kawanishi N, Takagi K, Lee H-C, Nakano D, Okuno T, Yokomizo T, et al. Endurance exercise training and high-fat

- diet differentially affect composition of diacylglycerol molecular species in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2018;314(6):R892-R901.
33. Lee J-J, Kim HA, Lee J. The effects of *Brassica juncea* L. leaf extract on obesity and lipid profiles of rats fed a high-fat/high-cholesterol diet. *Nutrition Research and Practice* 2018;12(4):298.
34. Khorsand Zaker BS, Saghebjo M, Islami F. Effectiveness of high-intensity interval training and high-protein diet on TNF- α protein level in colon tissue of obese male rats: the importance of diet modifying. *Obesity Medicine* 2022; 31: 10040.
35. Faraji H, Mehrani E. The Effect of Omega-3 Supplementation on Caspase-3 Levels after Acute Resistance Exercise in Nonathletic Men. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology* 2019; 6(2):40-46.
36. Banaei P, Nazem F, Nazari A, Arjomand A. Preconditioning effect of high-intensity interval training (HIIT) and berberine supplementation on the gene expression of angiogenesis regulators and caspase-3 protein in the rats with myocardial ischemia-reperfusion (IR) injury. *BioMed Research International* 2020; <https://doi.org/10.1155/2020/4104965>.
37. Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi P. Effect of High Intensity Interval Training with Curcumin on Gene Expression of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in Aged Female Rat Hepatocytes. *Report of Health Care* 2017;3(3):8-14.
38. Yadegari M, Riahy S, Mirdar S, Hamidiyan G, Yousefpor M, Riyahi F. Immunohistochemical detection of apoptotic factors Bax and Bcl-2 in the lung alveoli following six weeks of high intensity exercise training. *Daneshvar Medicine* 2017;24(129).
39. Quadriatero J, Alway SE, Dupont-Versteegden EE. Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 2011;36(5):608-17.
40. Villalba JM, López-Domínguez JA, Chen Y, Khraiweh H, González-Reyes JA, Del Río LF, et al. The influence of dietary fat source on liver and skeletal muscle mitochondrial modifications and lifespan changes in calorie-restricted mice. *Biogerontology* 2015;16(5):655-70.