Research Paper

Effect of eight-week moderate intensity continuous training (MICT) and high-intensity interval training (HIIT) on FOXO1 gene expression in the heart tissue of aged rats

Khadije Hasanpour[1], Bahram Abedi[1*], Lida Moradi[2]

1. Department of Physical Education, Mahallat Branch, Islamic Azad University, Mahallat, Iran
2. Department of Physical Education, Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: bahram.abedi@iau.ac.ir**

Citation: Hasanpour Kh, Abedi B, Moradi L. Effect of eight-week moderate intensity continuous training (MICT) and high-intensity interval training (HIIT) on FOXO1 gene expression in the heart tissue of aged rats. Daneshvar Medicine 2022; 30(5):90-99.
doi: 10.22070/DANESHMED.2022.16419.1229

Abstract

Background and Objective: Mitochondrial disorder contributes to reduction of health, as well as onset and progression of the aging process. On the other hand, exercise enhances proteins, enzymes and mitochondrial function in human and animal samples. The present study aimed to evaluate eight-week moderate intensity continuous training (MICT) and high-intensity interval training (HIIT) on FOXO1 gene expression in the heart tissue of aged rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 24 old female rat (aging 16-18 months old, weighing 280-320 g) were randomly assigned into control (C), (MICT) and (HIIT) groups. HIIT exercises were performed with 85% to 110% VO_{2max} intensity and 15-25 m/min speed; MICT exercises were conducted with 65% VO_{2max} intensity and 25-25 m / min speed. Finally, the expression of FOXO1 gene was evaluated using Real time-PCR ΔΔ method and $\Delta\Delta_{Ct}$ formula. One-way analysis of variance with Tukey post hoc test in SPSS software version 22 were used to analyze the findings ($p \leq 0.05$).

Results: The results of the present study showed that compared to the control group, MICT significantly reduced the expression of FOXO1 gene in heart tissue (P=0.006). While HIIT had no significant effect on reducing FOXO1 gene expression (P=0.05). The results also showed a significant reduction in the level of gene expression in the MICT group compared to the HIIT group (P=0.03).

Conclusion: In comparison with HIIT, MICT exercises make the expression of FOXO1 gene in the heart tissue of aged laboratory white rats reduced. Controlling this protein can prevent excessive cardiac autophagy in elderly subjects.

Keywords: Continuous training, High-Intensity interval training, FOXO1, Elderly

Received: 15 Aug 2022
Last revised: 15 Nov 2022
Accepted: 24 Nov 2022

مقاله پژوهشی

تاثیر هشت هفته تمرین تداومی با شدت متوسط (MICT) و تناوبی شدید (HIIT) بر بیان ژن FOXO1 دربافت قلب موش های بزرگ آزمایشگاهی پیر

نویسندگان: خدیجه حسن پور[۱]، بهرام عابدی[۱*]، لیدا مرادی[۳]

۱. گروه تربیت بدنی، واحد محلات، دانشگاه آزاد اسلامی، محلات ، ایران
۲. گروه تربیت بدنی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: بهرام عابدی **Email: bahram.abedi@iau.ac.ir**

چکیده

مقدمه و هدف: اختلال میتوکندریایی، در کاهش تندرستی، شروع و پیشرفت روند پیری نقش دارد. از طرفی فعالیت ورزشی باعث افزایش پروتئین ها، آنزیم ها و کارایی میتوکندری در نمونه‌های انسانی و حیوانی می شود. هدف از پژوهش حاضر بررسی ۸ هفته تمرین MICT و HIIT بر بیان ژن FOXO1 در بافت قلب موش های سفید آزمایشگاهی پیر بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی تعداد ۲۴ سر موش سفید آزمایشگاهی ماده پیر (سن ۱۶-۱۸ ماهه، و وزن ۲۸۰-۳۲۰ گرم) به طور تصادفی به گروه‌های کنترل (C) ، MICT و HIIT تقسیم شدند. تمرینات HIIT با شدت ۸۵٪ تا ۱۱۰٪ VO_{2max} و سرعت ۱۵-۲۵ m/min و تمرینات MICT با شدت ۶۵٪ VO_{2max} با سرعت ۲۰-۲۵ m/min انجام شد. در نهایت میزان بیان ژن FOXO1 به وسیله روش *Real time–PCR ΔΔ* و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta C_t$ ، مورد ارزیابی قرار گرفت جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه به همراه آزمون تعقیبی توکی در نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد ($p\leq ۰/۰۵$).

نتایج: نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که تمرین MICT ، نسبت به گروه کنترل باعث کاهش معنادار بیان ژن FOXO1 در بافت قلب شد ($P=۰/۰۰۶$). در حالی که تمرینات HIIT تاثیر معناداری بر کاهش بیان ژن FOXO1 نداشت($P\leq ۰/۰۵$). همچنین نتایج نشان داد سطح بیان ژن در گروه MICT نسبت به گروه HIIT کاهش معنادار داشت($P=۰/۰۳$).

نتیجه‌گیری: تمرینات MICT در مقایسه با تمرینات HIIT باعث کاهش بیان ژن FOXO1 در بافت قلب موش های سفید آزمایشگاهی پیر است. مهار این پروتئین می تواند از اتوفاژی بیش از حد قلبی در آزمودنی های سالمند جلوگیری کند.

واژه های کلیدی: تمرینات تداومی، تمرینات تناوبی شدید، FOXO1، سالمند

دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۴
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۰۸/۲۴
پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی با افزایش سن افزایش می‌یابند (۱). با این حال سالیان مدیدی است که درباره دلایل و روش‌های پیشگیری از بیماری‌های قلبی مطالعات فراوانی به عمل می‌آید که به واسطه آن‌ها اطلاعات جدیدی به دست آمده است. طی چند دهه اخیر تصور می‌رفت که چربی اشباع شده و کلسترول عوامل اصلی در ابتلا به بیماری شریان کرونری هستند.از این رو به افراد توصیه می‌شد که تا حد امکان این دو عامل را در رژیم غذایی خود محدود کنند. اما بر اساس مطالعات جدید و با در نظر گرفتن دیگر شرایط سلامتی، ایجاد محدودیت شدید در دریافت اسیدهای چرب اشباع شده یا جایگزینی آن‌ها با اسیدهای چرب غیر اشباع چندگانه، اقدام چندان مناسبی محسوب نمی‌شود. در روش‌های پیشگیرانه از بیماری‌های قلبی، بسته به ژنتیک افراد، تغذیه از۵۰ درصد اهمیت برخوردار است. در جهت پیشگیری از اینگونه بیماری‌ها فعالیت بدنی نیز برای همگان مفید واقع می‌گردد (۲). فعالیت بدنی که در مقابل بیماری‌های قلبی عروقی راه حل کاربردی مناسبی به شمار می‌رود باعث کاهش عوامل خطرزای قلبی، جلوگیری از تخریب میوکارد و افزایش عملکرد قلب می‌شود .سازگاری سلولی به فعالیت بدنی می‌تواند به عوامل اندوژنز و اگزوژنز مربوط باشد، به طوری که فعالیت بدنی با ایجاد هایپرتروفی و تجدید کاردیوسیت‌ها منجربه رشد قلبی می‌شود و همچنین باعث تکثیر، تفکیک وجابه جایی سلول های اندوتلیال نابالغ به سلول‌های اندوتلیال بالغ شده که در نتیجه موجب احیاء اندوتلیال و آنزیوژنز (تشکیل عروق جدید) می‌شود (۳). مکانیسم‌های درگیر در تنظیم پروتئین‌های آنژیواستاتیک در پاسخ به تمرین ورزشی نیاز به بررسی بیشتری دارند. البته کاملا واضح است که حفظ تعادل میان عوامل آنژیواستاتیک در آغاز آنژیوژنز ناشی از فعالیت بدنی بسیار مهم می‌باشد. قابلیت تأثیر پروتئین‌های FOXO (جعبه حاوی پروتئین O زیر خانواده، Forkhead)[1] در کنترل رشد و توسعه سلول‌های قلبی-عروقی، آنژیوژنز و تکثیر سلول‌های عضلانی صاف جهت حفظ عملکرد دستگاه قلبی- عروقی ضروری است (۳). در این خانواده FOXO1 و FOXO3 در سلول‌های اندوتلیال فراوان‌ترین هستند (٤). این پروتئین‌ها در بسیاری از انواع سلول‌ها، تنظیم‌کننده‌ی مهم برای اندازه، حیات و سوخت وساز سلول هستند و اهمیت آن‌ها در قلب در حال ظهور است (۵). 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.از طرفی نشان داده شده است که عوامل رونویسی FOXO برای تنظیم تعادل متابولیک، نوروژنز و محافظت نورونی، بازسازی قلبی، سوخت وساز عضله‌ی اسکلتی، سیستم ایمنی، اندوسیتوز، سوخت وساز سلول‌های بنیادی و تهاجم به رشد سلول‌های سرطانی مهم هستند (٦). در حال حاضر، روشن است که پروتئین‌های خانواده FOXO یک تنظیم کننده در بالادست هر دو اتوفاژی و سیستم پروتئازوم یوبیکوئیتن است (۷). عوامل رونویسی FOXO1 در حین تمرین ورزشی بطور موقت تظیم می شوند که با تغییرات در بیان پروتئین فشاری آنژیواستاتیک ترومبوزوپوندین (TSHBS1) همسو می‌باشند. بر اساس شواهد، حذف FOXO1/3a/4 اندوتلیال افزایش در THBS1 mRNA ناشی از فعالیت بدنی را از بین برده و موجب تسریع پاسخ آنژیوژنیک به فعالیت ورزشی می شوند. بر این اساس، پروتئین‌های FOXO تنظیم‌کنندگان فیزیولوژیکی THBS1 در عضله اسکلتی هستند و از همه مهم‌تر تنظیم منفی پروتئین‌های FOXOی اندوتلیال در پاسخ به فعالیت بدنی، ظرفیت شبکه مویرگی برای وقوع آنژیوژنز را بالا می برند (۸). FOXOها در بی مهرگان تا پستانداران وجود دارند، بدین ترتیب که جانداران بی مهره از یک ژن FOXO و پستانداران از چهار ژن FOXO شامل (fxHR)FOXO1، (fkHRL1) FOXO3a، (AFx)oxO4 و FOXO6 برخوردارندکه به ترتیب دارای ٦٥٥، ٦٧٣، ٥٠٥، ٤٩٢ اسیدامینه می‌باشند. فعالیت رونویسی FOXO توسط اصلاحات و سپس رونویسی پیچیده اما منظمی چون فسفریلاسیون، استیلاسیون و یوبی کوئی تیناسیون می شود (۹). این اصلاحات می‌توانند فعال کننده و یا بازدارنده

[1] Members of the Class O of Forkhead Box Transcription Factors

باشند و از طریق آنها کنترل دقیق عوامل FOXO در پاسخ به محرک بیرونی با تغییرات در جایگاه سلولی انجام می‌پذیرد (۱۰). این درحالی است که امروزه FOXO به عنوان تنظیم‌کننده‌ی تعادل بین عوامل پیش آنژیوژنز و آنتی آنژیوژنیک در پاسخ به فعالیت بدنی شناخته شده است (۱۱). Slop و همکاران اولین افرادی بودندکه در سال ۲۰۱٤ نقش فاکتورهای رونویسی FOXO را در آنژیوژنز عضله اسکلتی در پاسخ به تمرین استقامتی مورد بررسی قرار دادند (۱۲). در همین رابطه کارائی و همکاران (۲۰۱۸) تاثیر هشت هفته تمرین تداومی و تناوبی شدید را بر بیان ژن FOXO1 بافت قلب موش های صحرایی نژاد ویستار پرداختند و به این نتیجه رسیدند که تمرینات تداومی تاثیر معناداری بر کاهش بیان ژن FOXO1 دارد درحالی که تمرینات تناوبی شدید این چنین نیست (۱۳). Li و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیقی با بررسی تأثیر تمرین ورزشی مقاومتی برفعالیت AKT- eNOS و بیان Ref-1 توسط FOXO1 در آئورت موش های F344 بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که فسفریلاسیون FOXO1 در گروه تمرین کرده در مقایسه با گروه کنترل به طور چشمگیری کاهش می یابد (١٤). از آنجایی که ارتباط بین عوامل آنژیوژنیک و آنژیواستاتیک در سازگاری بهینه با فعالیت بدنی از اهمیت زیادی برخوردار است از این رو دستیابی به شیوه های تمرینی مناسب و شدت‌های متفاوت، در سال‌های اخیر مورد توجه محققان حوزه فیزیولوژی ورزشی قرار گرفته است. همچنین بر اساس اطلاعات ما، اثرات سازگاری با تمرین ورزشی بر عوامل FOXO در بافت قلبی افراد سالمند انجام نشده است. با توجه به مطالب فوق، مطالعه حاضر باهدف بررسی تاثیر دونوع روش تمرین HIIT و MICT بر بیان ژن FOXO1 بافت قلب موش‌های سفید آزمایشگاهی پیر انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی-بنیادی است که به صورت گروه تمرین و کنترل انجام گرفت. در این پژوهش ٢٤ سر موش سفید آزمایشگاهی پیر ماده از نژاد اسپراگ دوالی با میانگین سنی ١٦-١٨ ماه و محدوده وزنی ٢٨٠-٣٢٠ گرم از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تهیه و به آزمایشگاه تخصصی فیزیولوژی ورزشی این واحد دانشگاهی منتقل شدند. پژوهش حاضر مطابق دستورالعمل های موسسه ملی بهداشت (NIH) انجام و با کد اخلاق (IR.IAU.ARAK.REC.1398.012) توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تایید و انجام شد. تمامی موش ها در قفس های تمیز و استریل شده شفاف تحت شرایط استاندارد با چرخه تاریکی و روشنایی ١٢ ساعته و دمای ٢٢-١٩ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.حیوانات با رژیم غذایی استاندارد آزمایشگاهی جوندگان (پروتئین خام ٢٠/٥٠-١٩/٥٠٪، چربی ٤/٥-٥/٣٪، فیبر ٤/٥-٤٪، کلسیم ١-٠/٩٥ ٪، فسفر ٠/٧-٠/٦٥٪، نمک ٠/٥٥-٥٪، لیزین ١/١٥٪، متیونین ٠/٣٣٪ ترئونین ٠/٧٢٪ تریپتوفان٠/٢٥٪، کالری ١٧-١٦/١٦ mj/kg) و آب لوله‌کشی به صورت دسترسی نامحدود تغذیه شدند. در ادامه موش های صحرایی ماده جهت همگن سازی دوره عادت ماهانه بر اساس تحقیق صدوقی و همکاران در سال ١٣٩٥ انجام شد. در این روش جهت هم سیکل سازی موش های صحرایی ماده مقدار ٥٥٠ میکرو گرم استرادیول والرات و ٣ میلی گرم پروژسترون به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن موش های صحرایی در روغن کنجد حل شد و به صورت عضلانی به موش های صحرایی تزریق گردید؛ پس از گذشت ٣٦ ساعت مقدار ٠/٣ میلی لیتر سرم فیزیولوژی توسط سمپلر به آرامی به واژن حیوانات تزریق گردید و سپس دو قطره از مایع فوق برداشته و اسمیر واژینال تهیه شد. سپس نمونه ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ٤٥٠ برابر بررسی گردید؛ با توجه به تغییر سلول جنسی در دوره های مختلف سیکل ماهانه، موش های سفید آزمایشگاهی با دوره یکسان استروس که سلول ها شاخی شکل و فاقد کوکوسیت هستند به عنوان نمونه آماری انتخاب شدند (١٥). این نکته قابل ذکر است که به دلیل هم سیکل نشدن تعداد ٣ سر موش سفید آزمایشگاهی از دوره تحقیق حذف شدند و در ادامه ٢١ سر از ٢٤ سر موش سفید آزمایشگاهی پیر به عنوان نمونه هم سیکل انتخاب شدند.درادامه پس از طی یک دوره یک هفته‌ای سازگاری با محیط آزمایشگاه موش‌های سفید آزمایشگاهی به طور تصادفی به ٣ گروه ٧ سری کنترل

(C)، MICT و HIIT تقسیم شدند.

پروتکل تمرینات HIIT و MICT

ابتدا برای آشنا سازی با نوارگردان، موش‌های صحرایی به مدت یک هفته، ۵ دقیقه در روز با سرعت ۸ متر بر دقیقه، برای سه روز بر روی نوارگردان راه رفتند. در ادامه برای بدست آوردن سرعت بیشینه موش‌های صحرایی ابتدا برای مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه گرم کردند، سپس به ازای هر ۳ دقیقه دو متر به سرعت نوار گردان اضافه شد تا سرعت به ۱۸ متر بر دقیقه رسید، پس از آن به ازای هر ۲ دقیقه ۳ متر بر دقیقه به سرعت موش‌های صحرایی افزوده شد تا موش های صحرایی به واماندگی برسند. این نکته قابل ذکر است که واماندگی در موش های صحرایی به حالتی اطلاق گردید که موش های صحرایی از فرط خستگی توان ادامه دویدن نداشته باشند و در فاصله یک دقیقه سه بار متوالی به انتهای نوارگردان برخورد نمایند (۱۶). در ادامه پس از تعیین حداکثر سرعت دویدن؛ گروه‌های HIIT با شدت ۸۵ تا ۱۱۰ درصد VO_{2max} که معادل ۷ تلاش ۱ دقیقه ای و سرعت ۳۱ متر بر دقیقه و استراحت فعال بین اینتروال ها با ٦ تلاش و سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در هفته‌ی اول انجام شد، که تدریجاً با افزایش متوسط ۲ متر بر دقیقه در هفته به ۱۰ تلاش ۱ دقیقه ای با سرعت ٤۵ متر بر دقیقه و استراحت فعال با ۹ تلاش ۱ دقیقه ای (بین اینتروال ها) با سرعت ۲۳ متر بر دقیقه در هفته‌ی هشتم رسید. و تمرین MICT65 درصد VO_{2max} که معادل سرعت ۲۰ متر بر دقیقه و زمان ۱۵ دقیقه در هفته‌ی اول شروع شد که تدریجا به سرعت ۲۵ متر بر دقیقه و زمان ۲۹ دقیقه در هفته ی هشتم رسید. شروع تمرین با گرم کردن به مدت ۳ دقیقه با شدت ۱۰ متر بر دقیقه و ۲ دقیقه با شدت ۱۵ متر و سرد کردن به مدت ۱ دقیقه با شدت ۱۵ متر در دقیقه ۲ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه به پایان رسید (۱٦).

جدول ۱. پروتکل تمرین تداومی کم شدت و تناوبی شدید در موش های صحرایی

تمرین هفته	HIIT						MICT		
	شدت اینتروال شدید	تعداد اینتروال شدید	سرعت در شدت بالا	شدت اینتروال کم شدت	تعداد اینتروال کم شدت	سرعت در شدت پایین	شدت	سرعت	زمان
اول	۸۵	۷	۳۱	۵۰	٦	۱۵	٦۰	۲۰	۱۵
دوم	۸۵	۷	۳۳	۵۰	٦	۱٦	٦۰	۲۰	۱۷
سوم	۹۰	۸	۳۵	۵۰	۷	۱۷	۱۰	۲۲	۱۹
چهارم	۹۵	۸	۳۷	۵۰	۷	۱۸	۱۰	۲۲	۲۱
پنجم	۱۰۰	۹	۳۹	۵۵	۸	۱۹	٦۵	۲٤	۲۳
ششم	۱۰۰	۹	٤۱	۵۵	۸	۲۱	٦۵	۲٤	۲۵
هفتم	۱۱۰	۱۰	٤۳	۵۵	۹	۲۲	٦۵	۲۵	۲۷
هشتم	۱۱۰	۱۰	٤۵	۵۵	۹	۲۳	٦۵	۲۵	۲۹

نکته. در تمام طول دوره تمرین شدت بر اساس حداکثر سرعت دویدن، سرعت بر اساس متر بر دقیقه، تعداد اینتروال ها بر اساس تکرار های یک دقیقه ای و زمان بر حسب دقیقه در نظر گرفته شد. همچنین زمان گرم کردن و سرد کردن به مدت زمان اصلی تمرین افزوده می شد.

روش تشریح و نمونه برداری

از آنجا که تغییرات در میزان بیان ژن، تحت تأثیر عوامل بالادستی موجود در خون، مانند AKT قرار دارند، لذا به منظور از بین بردن اثرات حاد این عوامل، ٤٨ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و در حالت ١٦ ساعت ناشتایی، نمونه گیری در هر سه گروه انجام شد. موش‌های آزمایشگاهی توسط ترکیب کتامین و زایلوزین به نسبت ۳ به ۱ بیهوش شدند. پس از اطمینان از بیهوشی کامل موش‌ها با استفاده از آزمون فشردن دم و پا و اطمینان از بیهوشی کامل، حفره سینه ای با دقت باز گردید، پس از کنترل و کنار زدن بافت های دیگر بافت قلب به دقت استخراج گردید و بلافاصله در دمای ۷۰ – فریز گردید و تا زمان انتقال به آزمایشگاه سلولی مولکولی در همان دما نگهداری شدند.

اندازه گیری مقادیر بیان ژن FOXO1

ابتدا برای اندازه گیری متغیر ها، بافت قلب با استفاده از هاون و سانترفیوژ هموژن گردید و سپس بر اساس دستور العمل کیت ستونی استخراج RNA (FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit) ساخت کشور هنگ کنگ عمل شد، برای این کار کل محتویات RNA سلول (total RNA) استخراج شد. برای اطمینان از کیفیت RNA، مقدار ۵ میکرولیتر از محلول روی ژل آگارز الکتروفورز قرار داده شد و با استفاده از خاصیت جذب آن در طول موج ٢٦٠ نانومتر با دستگاه پیکو دراپ شرکت سیگما (ساخت امریکا) خلوص RNA و برای بررسی کیفیت آن با فرمول (C(µg/µl)=A260×ε×d/1000) استفاده شد. در ادامه برای سنتز cDNA طبق پروتکل موجود در کیت فرمنتاز (K1621) انجام شد. cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAid™M-MuLV Reverse transcriptase مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا پرایمرهای توسط نرم افزار Allele IDv7.8 طراحی شد و برای برای بررسی اختصاصی بودن و کارایی پرایمرها با استفاده از نرم افزار موجود در سایت NCBI استفاده شد در ادامه برای بررسی بیان ژنی متغیرها نمونه‌ها در دستگاه قرار داده شدند و پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشرفلورسانس با محاسبه $\Delta\Delta_{Ct}$ میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت به ژن کنترل داخلی و گروه کنترل با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲. توالی پرایمر های طراحی شده در تحقیق حاضر

Genes	Primer Sequences	Sizes (Bp)
B2m	Forward: 5'- CGTGCTTGCCATTCAGAAA -3'	244
	Reverse: 5'-ATATACATCGGTCTCGGTGG -3'	
FOXO1	Forward: 5'- CTAGGAGTTAGTGAGCAGGCAAC -3'	152
	Reverse: 5'- TGCTGCCAAGTCTGACGAAA -3'	

تجزیه و تحلیل داده ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلک و برابری واریانس‌ها با آزمون لون بررسی شد. با توجه برقراری شرط طبیعی بودن توزیع یافته‌های تحقیق، جهت بررسی تفاوت بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک راهه و برای تعیین محل تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین جهت تجزیه و تحلیل آماری مطالعه ابتدا اختلاف داده‌های هرگروه از میانگین ها محاسبه و سپس براساس داده‌های موجود در نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ تجزیه و تحلیل صورت گرفت ($P\leq ۰/۰۵$).

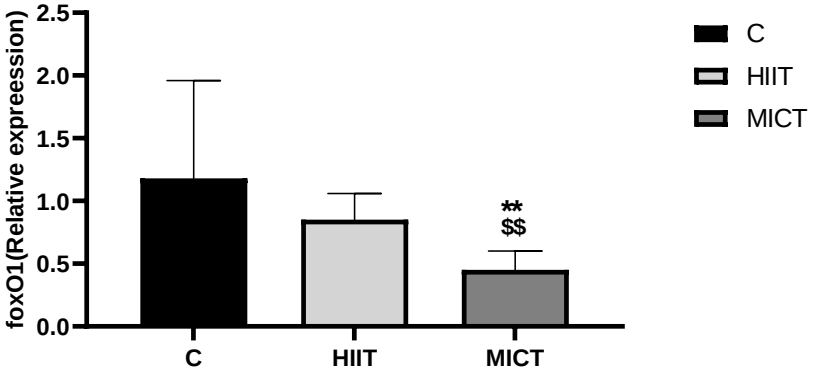
نتایج

وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد تحقیق در جدول ۳ ارائه شده است. سطوح بیان ژنی FOXO1 در شکل ۱ارائه شده است. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک راهه نشان داد تفاوت معنی داری در سطوح بیان ژن FOXO1 (P=۰/۰۰۹، F=۳/۸۵۸) در بافت قلب موش های صحرایی سالمند بین گروه های تحقیق وجود دارد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که بعد از یک دوره تمرینی سطح بیان ژن FOXO1 تنها در گروه MICT نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار داشت (P=۰/۰۰٦) همچنین نشان داده شد بیان ژن FOXO1 درگروه MICT کاهش معناداری نسبت به گروه HIIT داشت (P=۰/۰۳). با این حال در گروه HIIT بیان ژن FOXO1 کاهش داشت اما این کاهش از نظر آماری معنادار نبود (P≤۰/۰۵).

جدول٤. غربالگری جدایه های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* تولیدکننده بیوفیلم با سه روش مختلف فنوتیپی CRA، TM و TCP و روش ژنوتیپی

گروه	پیش‌آزمون (گرم)	پس آزمون (گرم)
	میانگین و انحراف استاندارد	میانگین و انحراف استاندارد
کنترل	۲۹۵/۳۱±٤/٥٧	۳۰٥/٥٧±٤/٦٤
تمرین تناوبی شدید	۳۰۰/۱٤±۳/٥۹	*۲۸۰/۲۳±۲/٤۱
تمرین تداومی	۲۸۷/۲۷±٥/٦۸	*۲٥۷/۰۰±٤/۳۲

وجود تفاوت معنادار در سطح (P≤۰/۰٥)



شکل ۱. سطوح بیان ژن **FOXO1** در بافت قلب موش های صحرایی سالمند گروه های مورد تحقیق(اطلاعات در نمودار براساس انحراف استاندارد±میانگین)

**کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل(P=۰/۰۰٦)

$$ کاهش معنادار نسبت به گروه تمرین تناوبی شدید(P=۰/۰۳)

بحث

نتایج مطالعات نشان داده‌اند که در پاسخ به فعالیت بدنی، تنظیم منفی پروتئین های FOXO1 اندوتلیال، ظرفیت شبکه مویرگی برای وقوع آنژیوژنز را بالا می برد (۸). با این حال بر اساس مطالعات بدست آمده، پژوهش حاضر جزء اولین مطالعه‌ای است که نقش دونوع فعالیت ورزشی HIIT و MICT در بیان ژن FOXO1 در بافت قلب سالمندان را مورد مقایسه و بررسی قرار می‌دهد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد تمرینات MICT تاثیر معناداری بر کاهش بیان ژن FOXO1 در بافت قلب موش‌های سفید آزمایشگاهی پیر دارد. در حالی که تمرینات HIIT اثر معناداری بر بیان ژن FOXO1 در بافت قلب موش‌های سفید آزمایشگاهی پیر ندارد. در همین راستا کارائی و

همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه خود به بررسی تمرینات MICT و HIIT در بافت بطن چپ موش های صحرایی پرداختند و نشان دادند تمرینات MICT تاثیر معناداری بر کاهش بیان ژن FOXO1 در بطن چپ بافت قلب دارد. این در حالی است که تمرینات HIIT تاثیر معناداری بر بیان ژن FOXO1 ندارد. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که بیان ژن FOXO1 در بطن چپ بافت قلب در تمرینات MICT نسبت به تمرینات HIIT هم معنادار است (۱۳) که همسو با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر می باشد. با توجه به بررسی‌های انجام شده مطالعه کارائی و همکاران (۲۰۱۸) تنها مطالعه‌ای است که بر روی بافت قلب انجام شده است و مطالعات مشابه بیشترکه بتوان نتایج آن را با یافته‌های این پژوهش مورد بررسی قرار داد، موجود نمی‌باشد. در زمینه تاثیر تمرین MICT بیان ژن FOXO1 می‌توان گفت که پژوهش حاضر با مطالعه Kavazis و همکاران (۲۰۱٤) همسو می باشد که نشان داد تمرین ورزشی کوتاه مدت، در اثر وجود دوکسوروبیسین (Dox)، منجر به کاهش حاد رونویسی FOXO1 mRNA در عضله قلب می شود (۱۷). اما از آنجایی که مطالعه حاضر تاثیر طولانی مدت اجرای تمرین MICT بر بیان ژن FOXO1 در بافت قلب را مرود بررسی قرار داده است، نمی‌توان پژوهش Kavazis و همکاران را به عنوان یک مطالعه مشابه با مطالعه حاضر به منظور مقایسه‌ی نتایج در نظر گرفت .از این رو نتایج این پژوهش با یافته‌های مطالعاتی که میزان بیان ژن‌های مذکور و یا محتوای پروتئینی آن‌ها را در عضله اسکلتی یا بافت های دیگر مورد بررسی قرار داده‌اند نیز مقایسه می‌شوند. بیگ لری و همکاران (۲۰۲۰)، آقایی بهمن بیگلو و همکاران (۲۰۲۱) و Castano و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعات خود نشان دادند که تمرینات HIIT باعث کاهش بیان ژن FOXO1 در بافت های های مختلف کبد، عضله اسکلتی و قلب می شود که با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر ناهمسو می باشند (۷،۱۱،۱۸). می‌توان از دلایل ناهمسو بودن نتایج این مطالعات با مطالعه حاضر به تفاوت در سطح سلامت نمونه‌ها، نوع و شدت تمرین و بافت مورد بررسی اشاره کرد. Liu و همکاران (۲۰۱٤)، Slopack و همکاران (۲۰۱٤) و Sanchez و همکاران (۲۰۱۵) نیز هر سه در مطالعات همسویی دریافتند FOXO1 mRNA پس از یک وهله فعالیت بدنی به طور چشمگیری بالا می رود که این افزایش پس از تمرین مکرر تضعیف می شود. همچنین آن‌ها به این نتیجه رسیدند که کاهش foxO برای آنژیوژنز ناشی از تمرین، حیاتی است (۸،۱۲،۱۹). کاهش عوامل رونویسیFOXO1 پس از تمرینات ورشی می‌توان از دو منظر مورد بررسی قرار داد. از طرفی داده‌ها نشان می‌دهند تمرین HIIT به عنوان یک روش تمرینی مناسبی، منجبر به بیان بیشتر آنزیم‌هایی مثل سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌شود که این آنزیم‌ها ROS را تجزیه می‌کنند (۲۰). مطالعات نشان داده‌اند فعالیت‌های ورزشی تداومی بر عوامل موثر بر بیان زن VEGFA تاثیر گذاشته که به نبال آن فرایند آنژیوژنز تحریک می‌شود. افزایش VEGFA منجر به فسفوریلاسیون FOXO1 به وسیله‌ی فعال سازی AKT می‌شود که موجب تغییر جایگاه foxO از هسته به سیتوپلاسم و در نتیجه عدم فعالیت و کاهش foxOها می‌گردد. این تغییر در فعالیت foxOها توسط افزایش بیان VEGFA، با روند کاهش بیان پروتئین قشری آنژیواستاتیک THBS-1 بر اثر فعالیت بدنی مشابه می‌باشد (۱۳). با این حال نتایج مطالعه حاضر، اثرات احتمالی تمرینات MICT بر سطوح برخی از عوامل تاثیرگذار بر فرایند آنژیوژنز نشان می دهد که این نوع تمرین از طریق کاهش عوامل رونویسیFOXO1 باعث بهبود سازگاری-های تمرینی می‌گردد. نتایج تحقیقات بیانگر آن است که کاهش این عوامل به بهبود فرآیند آنژیوژنز و عملکرد آنتی اکسیدان‌ها و در نتیجه کاهش ROS منجر می‌شود که به نوبه خود باعث حفاظت از قلب می‌شود. اگر چه تمرینات ورزشی باعث افزایش رگزایی در سلول های اندوتلیال و

بهبود فعالیت آنتی اکسیدان‌ها می‌شود اما جهت روشن‌تر شدن موضوع، لازم است مطالعات وسیعتری در سطح مولکولی انجام شود .به منظور روشن‌تر شدن اثر کاهش FOXO1 به دنبال انجام طولانی مدت تمرینات MICT و HIIT بر بهبود فرآیند آنژیوژنز و عملکرد آنتی اکسیدان‌ها بهتر است در راستای بررسی این تغییرات، عوامل آنژیوژنیک و آنژیواستاتیک قوی مثل VEGFA و THBS1 و همچنین فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مثل PGC-1a نیز اندازه گیری شود. از طرف دیگر به دلیل اینکه این پژوهش به منظور یافتن روشی جهت پیشگیری از بروز بیماری قلبی بر موش‌های سفید آزمایشگاهی پیر انجام شده است، پیشنهاد می شود تغییرات این فاکتورهای رونویسی بر اثر فعالیت های بدنی مناسب و تحت شرایط پاتولوژیکی مانند بیماری های قلبی عروقی و دیابتی نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه گیری

در نهایت نتایج تحقیق حاضر نشان داد تمرین **MICT** منجر به کاهش محتوای پروتئین **FOXO1** در بافت قلب نسب به تمرین **HIIT** می‌شود، بنابراین می‌توان گفت تمرین **MICT** منجر به فعال کردن فرایند هایپرتروفی فیزیولوژیک و مهار اتوفاژی خانواده **FOXO** شده است، از این رو تمرینات **MICT** می‌تواند در قلب افراد سالمند که مستعد کادیومیوپاتی و مرگ سلولی هستند، نقش یک عامل تنظیمی مفید را ایفا می‌کند.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر مطابق دستورالعمل‌های موسسه ملی بهداشت (NIH) انجام و با کد اخلاق (IR.IAU.ARAK.REC.1398.012) توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تایید و انجام شد.

تعارض و منافع

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

منابع

1. Taheri R, Mirzaei B, Demirchi A. The effect of 8 weeks of interval and resistance training on expression PGC 1α, AMPK, TFAM Elderly rat heart cells. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2021;64(1).2512-2528.
2. Kelley D. Heart disease: Causes, prevention, and current research. JCCC Honors Journal 2014;5(2):1-14.
3. Rossi R, Mereuta OM, Barbachan e Silva M, Molina Gil S, Douglas A, Pandit A, et al. Potential biomarkers of Acute Ischemic Stroke etiology revealed by mass spectrometry-based proteomic characterization of formalin-fixed paraffin-embedded blood clots. Frontiers in Neurology 2022:751.1-12
4. Paik J-H, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, et al. FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. Cell 2007;128(2):309-23.
5. 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.
6. 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.
7. Aghaei Bahmanbeglou N, Salboukhi R, Sherafati Moghadam M. 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. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism 2021;21(2):119-28.
8. Slopack D, Roudier E, Liu ST, Nwadozi E, Birot O, Haas TL. Forkhead BoxO transcription factors restrain exercise-induced

angiogenesis. The Journal of Physiology 2014;592(18):4069-4082.
9. Kaur D, Behl T, Sehgal A, Singh S, Sharma N, Badavath VN, et al. Unravelling the potential neuroprotective facets of erythropoietin for the treatment of Alzheimer's disease. Metabolic Brain Disease 2021:1-16.
10. Mishra S, Ravi V, Sundaresan NR. Role of FoxO transcription factors in aging-associated cardiovascular diseases. Vitamins and hormones. 115: Elsevier 2021;449-75.
11. Biglari S, Afousi AG, Mafi F, Shabkhiz F. High-intensity interval training-induced hypertrophy in gastrocnemius muscle via improved IGF-I/Akt/FoxO and myostatin/Smad signaling pathways in rats. Physiology International 2020;107(2):220-230.
12. Sanchez AM. FoxO transcription factors and endurance training: a role for FOXO1 and FoxO3 in exercise-induced angiogenesis. The Journal of Physiology 2015;593(Pt 2):363-364.
13. Kara'i S, Ravasi AA, Gholipour M. The Effect of 8 Weeks Continuous Endurance and High Intensity Interval Training on Cardiac Tissue FOXO1 and foxO3a Expression Levels in Male Rats. Journal of Knowledge & Health 2018;13(2):62-70.
14. Li M, Li W, Yoon J-H, Jeon BH, Lee SK. Resistance exercise training increase activation of AKT-eNOS and Ref-1 expression by FOXO-1 activation in aorta of F344 rats. Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry 2015;19(3):165-171.
15. Yazdanparast Chaharmahali B, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi Arkhazloo P. The Effect of moderate and high intensity interval trainings on cardiac apoptosis in the old female rats. Report of Health Care 2018;4(1):26-35.
16. Sadoughi S. Investigation the effect of curcumin on the hormones of pituitary-ovarian axis in alloxan-induced diabetic rats. Journal of Ardabil University of Medical Sciences 2017:16(4):441-451.
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. Castaño C, Mirasierra M, Vallejo M, Novials A, Párrizas M. Delivery of muscle-derived exosomal miRNAs induced by HIIT improves insulin sensitivity through down-regulation of hepatic FOXO1 in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 2020;117(48):30335-43.
19. Liu STK. Regulation of exercise induced endothelial sprout formation. https://yorkspace.library.yorku.ca/xmlui/handle/10315/29781?show=full
20. Tucker PS, Briskey DR, Scanlan AT, Coombes JS, Dalbo VJ. High intensity interval training favourably affects antioxidant and inflammation mRNA expression in early-stage chronic kidney disease. Free Radical Biology and Medicine 2015;89:466-72.