

Original Article

The effect of 4 weeks high intensity interval training (HIIT) on the content of FOXO3a Beclin-1 proteins in the left ventricular heart tissue with type 2 diabetic rats

Jokar M¹, Sherafati-Moghadam M^{2*}

1- Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. Iran.

2- Department of PURE and Basic Science, Hashtgerd Branch, Islamic Azad University, Alborz, I.R. Iran.

Received: 2019/09/17 | Accepted: 2020/04/21

Abstract:

Background: Autophagy is a mechanism that could be inhibited or activated through exercise. FOXO3a and Beclin-1 proteins are important proteins in autophagy regulation. Therefore, this study aimed to investigate the effect of 4 weeks high intensity interval training (HIIT) on the content of FOXO3a and Beclin-1 proteins in the left ventricular heart tissue with type 2 diabetic rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 12 two-month-old Sprague-Dawley rats with a mean weight of 270 ± 20 g were selected. After diabetic induction with STZ and Nicotinamide, rats were randomly assigned to two groups, diabetic training (6 heads) and diabetic control (6 heads). The training group trained for 4 days a week in accordance with the training program for 4 weeks, while the control group did not have any training program. Also, the rats did not receive any insulin treatment during the study period. The protein content of the present study was measured by Western blotting. Data were analyzed by SPSS software version 19 and independent t-test.

Results: Four weeks of HIIT training resulted in a significant decrease in FOXO3a ($P=0.03$) and Beclin-1 ($P=0.0001$) proteins content in the diabetic training group compared to the diabetic control group.

Conclusion: Four weeks of HIIT training would decrease the content of FOXO3a and Beclin-1 proteins which leads to inhibition of autophagy in the left ventricle of subjects with type 2 diabetes. Therefore, HIIT training could be a new therapeutic approach in diabetics.

Keywords: High intensity interval training, Heart muscle, Protein FOXO3a, Protein Beclin-1, Type 2 diabetes

***Corresponding Author:**

Email: m.sherafati@hiau.ac.ir

Tel: 0098 916 672 9271

Fax: 0098 264 421 0165

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2020; Vol. 24, No 2, Pages 160-169

Please cite this article as: Jokar M, Sherafati-Moghadam M. The effect of 4 weeks high intensity interval training (HIIT) on the content of FOXO3a Beclin-1 proteins in the left ventricular heart tissue with type 2 diabetic rats. *Feyz* 2020; 24(2): 160-9.

تأثیر ۴ هفته تمرین تناوبی پرشدت بر محتوای پروتئین‌های جعبه سرچنگالی-3Oa

بکلین-۱ در بافت بطن چپ قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲

مسعود جوکار^۱، محمد شرافتی مقدم^{*۲}

خلاصه:

سابقه و هدف: اتوفاژی مکانیسمی است که می‌تواند از طریق فعالیت ورزشی مهار یا فعال شود. پروتئین‌های جعبه سرچنگالی-3Oa (FOXO3a) و بکلین-۱ (Beclin-1) پروتئین‌های مهم در تنظیم اتوفاژی هستند؛ بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، بررسی تأثیر ۴ هفته تمرین تناوبی پرشدت (HIIT) بر محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 در بافت بطن چپ قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۱۲ سر موش صحرایی نر ۲ ماهه از نژاد اسپراگوداوی با میانگین وزن ۲۷۰ ± ۲۰ گرم انتخاب و پس از دیابتی شدن از طریق القای STZ و نیکوتین آمید به روش تصادفی به ۲ گروه تمرین دیابتی (۶ سر) و کنترل دیابتی (۶ سر) تقسیم شدند. گروه تمرینی ۴ روز در هفته مطابق با برنامه تمرینی به مدت ۴ هفته به تمرین HIIT پرداختند؛ در حالی که گروه کنترل هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند. همچنین موش‌های صحرایی هیچ‌گونه درمانی را با انسولین در طول دوره پژوهش دریافت نکردند. محتوای پروتئین‌های تحقیق حاضر به روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ و از آزمون t مستقل استفاده شد.

نتایج: چهار هفته تمرین HIIT منجر به کاهش معنی‌داری در محتوای پروتئین‌های FOXO3a ($P=0.0001$) و Beclin-1 ($P=0.003$) گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی شد.

نتیجه‌گیری: چهار هفته تمرین HIIT با کاهش محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 FOXO3a می‌تواند رویکرد جدید درمانی برای دیابت باشد.

وازگان کلیدی: تمرین تناوبی پرشدت، عضله قلبی، پروتئین FOXO3a، پروتئین Beclin-1، دیابت نوع ۲
دو ماهنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۹، صفحات ۱۶۰-۱۶۹

مقدمه

علاوه‌بر این، اتوفاژی با جلوگیری از تجمع پروتئین‌های سمتی و از طریق عملکرد آن در جنبه‌های مختلف اینمی، از جمله: از بین بردن میکروب‌های تهاجمی و مشارکت آن در ارائه آتنی ژن نقش مهمی در محافظت از سمتی بدن دارد [۳]. بیماری قلبی که اغلب تحت عنوان کار迪ومیوپاتی دیابتی اطلاق می‌شود، علت اصلی مرگ در میان بیماران دیابتی است [۴]. عارضه کار迪ومیوپاتی با کاهش توده عضلانی قلب، ضعف عضلانی قلب و کاهش فیزیکی ظرفیت عملکردی مشخص می‌شود [۶]. مکانیسم دقیق بروز کار迪ومیوپاتی دیابتی به خوبی شناخته نشده است؛ اما مکانیسم‌های متعددی از جمله نقص در بیان پروتئین‌های مسیرهای سلولی [۷]، اختلال در متابولیسم انسولین [۸] و ناهنجاری‌های میوفیلامنت‌ها در بروز این عارضه دخیل هستند [۹]. کار迪ومیوپاتی دیابتی یکی از مهم‌ترین عوارض ناشی از دیابت نوع ۲ می‌باشد و آن را به عنوان بیماری ویژه‌ی عضله‌ی قلب می‌دانند [۱۰]. در این عارضه هرگونه اختلال غیرعادی در گلوكز پلاسم و میزان انسولین، سلول‌های عضله‌ی قلبی را مستعد مرگ سلولی می‌کند و در نهایت موجب تغییر انقباضی عضلانی می‌شود [۱۱]. یکی از مسیرهای مهم در کار迪ومیوپاتی دیابتی در قلب مسیر FOXO3a/Beclin-1

اتوفازی یک فرآیند پروتونستاتیک است که در طول تکامل وجود دارد و در کلیه سلول‌های یوکاریوتی از مخمر تا انسان شناخته شده است [۲،۱]. در درجه اول اتوفاژی یک مسیر تخریب می‌باشد که در تمام سلول‌های یوکاریوتی اتفاق می‌افتد. اتوفاژی برای بازیافت سیتوپلاسم، تولید بلوک‌های ساختمانی ماکرومولکولی و انرژی در شرایط استرس، از بین بردن اندام‌های اضافی و آسیب‌دیده، همچنین برای سازگاری با شرایط تغذیه‌ای و حفظ هموستانز سلولی ضروری است.

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲. گروه عمومی و یا به، واحد هشتگرد، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران

* لیشان نویسنده مسئول؛

استان البرز، هشتگرد، پایین تر از میدان صنعت، خیابان شهید صدوqi، دانشگاه آزاد اسلامی واحد هشتگرد

تلفن: ۰۲۶۴۴۲۱۰۱۶۵ دوچرخه؛ ۰۹۱۶۶۷۲۹۲۷۱

پست الکترونیک: m.sherafati@hiau.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۶/۲۶ تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۲۶

بسیاری از این فشارها را ایجاد کند که ممکن است در فعالشدن اتوفازی نقش داشته باشد [۲۳]. علاوه بر این، در پژوهشی نشان داده شده است که با انجام ورزش‌های حاد و مزمن، اتوفازی رخ می‌دهد و این پاسخ مناسبی به فعالیت ورزشی است [۲۴]. افزایش بیان ژن‌های اتوفازی و همچنین القای پروتئین‌های اتوفازی در پاسخ به فعالیت ورزشی از آن زمان در بافت‌های مختلفی، هم در انسان و هم در جوندگان مشاهده شده است [۲۵، ۲۶]. درواقع، القای اتوفازی بعد از فعالیت ورزشی در اندام‌های مختلف متابولیکی، مانند عضلات، کبد، قلب، لوزالمعده و بافت چربی نشان داده شده است [۲۷]. تمرین تناوبی پرشدت (High Intensity Interval Training; HIIT) شامل تمرین هوایی است که با شدت زیاد در دوره‌های ریکاوری فعال یا غیرفعال انجام می‌شود. HIIT منجر به بهبود عملکرد قلبی - عروقی و ظرفیت هوایی در مردان و جوندگان می‌شود [۲۸]. این یافته‌ها همچنین بازسازی قلبی - عروقی را به عنوان یک پاسخ سازگار ظرفیت آنتی‌اکسیدان میوکارد و ظرفیت تنفس میتوکندری در عضله قلبی مشخص کرده است. با این حال، سازگاری متابولیک سلولی و مولکولی اساسی در قلب ناشناخته است. از پروتئین‌های مهم در فرآیند اتوفازی که تمرینات ورزشی می‌تواند بر آن تأثیرگذار باشد، پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 است. در این راستا نشان داده شده است که تمرین ورزشی حاد [۳۰] و انتقاد اکسترنیک عضله [۳۱]، می‌تواند سطوح پروتئین FOXO3a را افزایش دهد. در مقابل تمرین هوایی بر روی آزمودنی‌های سرتانی منجر به کاهش محتوای این پروتئین می‌شود [۳۲]. در ارتباط با تأثیر تمرین ورزشی بر روی محتوای پروتئین Beclin-1 نشان داده شده است که یک جلسه تمرین حاد منجر به افزایش محتوای این پروتئین می‌شود [۳۳]. Kavazis و همکاران [۲۰۱۴] در تحقیقی به بررسی تأثیر تمرین تداومی هوایی بر بیان ژن FOXO3a پرداختند. این محققان نشان دادند تمرین ورزشی کوتاه‌مدت، در اثر وجود دوکسوروپیسین (Doxorubicin) منجر به کاهش رونویسی FOXO3a mRNA در عضله قلب و عضله نعلی می‌شود [۳۴]. Li و همکاران [۲۰۱۸] در تحقیقی به بررسی تأثیر تمرین HIIT و Moderate Intensity Interval Training (MCIT) بر محتوای پروتئین Beclin-1 در قلب موش‌های صحرابی پرداختند. تمرین HIIT شامل ۱۰ هفته و ۵ جلسه در هفته بود. محتوای پروتئین Beclin-1 بعد از ۱۰ هفته

می‌باشد. بیماری دیابت می‌تواند از طریق این مسیر منجر به اتوفازی سلولی در سلول‌های قلب شود [۱۲]. خانواده پروتئین جعبه سرچنگالی (Forkhead Box; FOXO) که به طور تکاملی از فاکتورهای رونویسی محافظت‌شده هستند، از مهم‌ترین پروتئین‌هایی می‌باشد که به عنوان تنظیم‌کننده بیان ژن‌های اتوفازی و لیزوژوم‌ها شناخته شده‌اند. عملکرد و فعالیت پروتئین‌های FOXO عمدهاً توسط تغییرات پس از ترجمه، مانند فسفوریلاسیون و استیله‌شدن که بر بومی‌سازی سلولی آن‌ها تأثیر می‌گذارد، تنظیم می‌شود [۱۳]. بهترین نمونه این خانواده، پروتئین جعبه سرچنگالی (Forkhead Box O3; FOXO3a) 3Oa، از فاکتورهای رونویسی است. FOXO3a یک برنامه رونویسی را هدایت می‌کند که موجب تقویت بیان ژن‌های متعدد مربوط به اتوفازی در انواع مختلف سلول می‌شود [۱۴]. با مهار FOXO3a، رشد کارديوميوسيت‌ها و ترويج اتوفازی، اندازه کارديوميوسيت‌ها را حفظ می‌کند. این پروتئین با چندین مولکول درونسلولی ارتباط برقرار می‌کند و یک مسیر بازخورد را از طریق مسیرهای مستقیم یا غیرمستقیم تشکیل می‌دهد [۱۵]. به عنوان مثال، FOXO3a در پاسخ به استرس سلولی، رونویسی پروتئین‌های اتوفازی هسته، BCL2 مانند کاتپسین-L (Cathepsin-L)، BNIP3 (Interacting Protein 3 و بکلین-1 (Beclin-1) را تنظیم می‌کند [۱۶، ۱۷]. پروتئین Beclin-1 تنظیم‌کننده اصلی اتوفازی در سلول‌های پستانداران است [۱۸]. در مرحله آغاز اتوفازی با تشکیل غشای ایزوله عمل و یک ساختار دو غشایی ایجاد و مواد سیتوپلاسمی را در گیر می‌کند تا اتوفازی را از اتوفازی باشند. Beclin-1 شامل سه حوزه ساختاری است: یک دامنه Coiled-Coil Domain؛ BH-3، یک دامنه مارپیچ مرکزی (CCD) و یک دامنه محافظت‌شده تکامل‌یافته (ECD). این حوزه‌ها با شبکه‌ای از پروتئین‌های دخیل در تنظیم اتوفازی ارتباط برقرار می‌کنند. تصور می‌شود که کاهش سطح Beclin-1 باعث جلوگیری از اتوفازی و نیز گردش میتوکندری‌های آسیب‌دیده می‌شود که تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و استرس ژنو توکسیک را به دنبال دارد. این پروتئین نقش احتمالی تنظیم اولیه در توسعه اتوفازی میوکارد را نشان می‌دهد [۲۱]. مدت‌هاست که فعالیت ورزشی به عنوان یک محرك فیزیولوژیکی قدرتمند برای طیف گسترده‌ای از سازگاری‌های متابولیک با پیامدهای سلامتی و عملکرد شناخته شده است. بازیافت اجزای سلولی توسط اتوفازی اخیراً به عنوان یک فرآیند مهم در گیر در پاسخ‌های تطبیقی به فعالیت ورزشی محسوب می‌شود [۲۲]. به طور همزمان، فعالیت ورزشی می‌تواند

آن‌ها ۷۲ ساعت پس از تزریق با کمک گلوكومتر و نمونه خونی گرفته شده از سیاهرگ دمی موش‌ها اندازه‌گیری و قند خون بالای ۱۳۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته شد [۳۷].

پروتکل تمرینی

پس از القای دیابت، موش‌های صحرابی به روش تصادفی به ۲ گروه: تمرین دیابتی (۶ سر) و کنترل دیابتی (۶ سر) تقسیم شدند. موش‌های گروه تمرین برای آشنازی با نوار گردان به مدت یک هفته با سرعت ۵ تا ۱۰ متر بر دقیقه، روی نوار گردان دویدند. برنامه گروه تمرینی به مدت ۴ هفته و هر هفته شامل ۴ جلسه بود. موش‌های تمرینی در شروع هر جلسه با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه به مدت ۶ دقیقه خود را گرم می‌کردند. سپس برنامه تمرینی شامل ۵ و هله ۴ دقیقه‌ای با شدت معادل ۸۵ تا ۹۵ درصد حداکثر سرعت و دوره‌های استراحت فعال ۳ دقیقه‌ای با شدت معادل ۵۰ تا ۶۰ درصد حداکثر سرعت انجام شد. در پایان هر جلسه نیز موش‌ها با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه به مدت ۶ دقیقه خود را سرد می‌کردند. کل مدت زمان دویدن موش‌های صحرابی در هر جلسه بر روی نوار گردان ۴۴ دقیقه بود. شب نوار گردان صفر درجه بود و در ۴ هفته تغییری نداشت [۳۸]. آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت با سرعت ۵ متر در دقیقه شروع شد و هر ۳ دقیقه سرعت تردمیل ۵ متر در دقیقه افزایش یافت تا موش‌های صحرابی به خستگی (چسبیدن موش‌ها به انتهای تردمیل) برستند. سرعتی که موش‌های صحرابی در آن به خستگی رسیدند، به عنوان حداکثر سرعت در نظر گرفته شد [۳۹]. در این مدت، گروه کنترل هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند. همچنین موش‌های صحرابی هیچ‌گونه درمانی را با انسولین در طول دوره پژوهش نداشتند.

روش بافت‌برداری

برای از بین بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای غیرقابل کنترل استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه تمرینی، بعد از گذشت ۲۴ ساعت 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 و در سرم فیزیولوژیک شستشو داده شد و بالاصله با استفاده از مایع ازت منجمد برای سنجش‌های بعدی با دمای -۸۰ فریز شد [۴۰].

روش‌های آزمایشگاهی

با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن - بلاست متغیرهای

تمرین HIIT افزایش قابل توجهی داشت، اما تمرین MCIT تغییر معنی‌داری را نشان نداد [۳۵]. بنابراین، مشخص می‌شود پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 در تنظیم مسیر اتوفاژی نقش بسیار مهمی دارند. از طرفی دیابت می‌تواند اتوفاژی را سریع کند. همچنین مشخص شده است تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف می‌تواند اتوفاژی را مهار یا فعال کند. تحقیقات بسیار کمی، نقش مکانیزم سلولی اتوفاژی را در قلب افراد دیابتی نوع ۲ بررسی کرده‌اند؛ علاوه‌بر این، چگونگی تغییرات اتوفاژی و مکانیسم‌های زیربنایی تغییر از فعال شدن سیستم تجزیه پروتئین از طریق تمرین HIIT نیز به‌طور کامل درک نشده است؛ بنابراین، هدف از تحقیق حاضر، بررسی تأثیر ۴ هفته تمرین HIIT بر محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 در بافت عضله بطن چپ قلب موش‌های صحرابی نر نژاد اسپراگوادولی مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه و نوع تحقیق

پژوهش حاضر از نوع تجربی - بنیادی می‌باشد که به صورت گروه آزمایش و کنترل انجام شده است. در این پژوهش، ۱۲ سر موش صحرابی نر ۲ ماهه از نژاد اسپراگوادولی با میانگین وزن ۲۷۰ ± ۲۰ گرم انتخاب شدند. موش‌های صحرابی در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی شیراز با دمای ۲۲ ± ۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت $۴۰-۵۰$ درصد و چرخه تاریکی - روش‌نای ۱۲-۱۲ نگهداری شدند. غذای حیوانات به صورت آزادانه و استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد. همچنین آب موردنیاز حیوانات به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه‌ی حیوانات آزمایشگاهی، در اختیار آن‌ها قرار داده شد. اصول اخلاقی (کد اخلاقی IR.SUMS.REC.1396.S1062 با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شیراز مورد توجه قرار گرفت).

روش القای دیابت

در هفته دهم بعد از به وزن رسیدن موش‌های صحرابی برای ایجاد دیابت در آن‌ها، محلول استرپتوزوتوسین (Streptozotocin; STZ) (حل شده در بافر سیترات ۱/۱ مولار با $pH=4/5$) به صورت داخل‌صفاقی و فقط یک مرتبه با دوز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن بعد از ۱۵ دقیقه تزریق نیکوتین‌آمید با دوز ۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق شد [۳۶]. جهت اطمینان از دیابتی شدن حیوان‌ها، قند خون

انکوباسیون در آنتی‌بادی ثانویه روز بعد به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق در ۴ درصد TBST انجام شد. پروتئین‌ها با یک واکنش densitometry شیمیایی لومینسانس (ECL) و با تجزیه و تحلیل anti-FOXO3a (DP-12) (نخه ۱/۸/۰/۱۱۲ Image J) اندازه‌گیری شدند. آنتی‌بادی اویله و ثانویه (sc-) anti-FOXO3a (DP-12) (E-8) (Sc-48348) و anti-Beclin-1 (E-8) (Sc-48341) شرکت سانتاکروز ساخت کشور آمریکا مورد استفاده قرار گرفتند [۴۱].

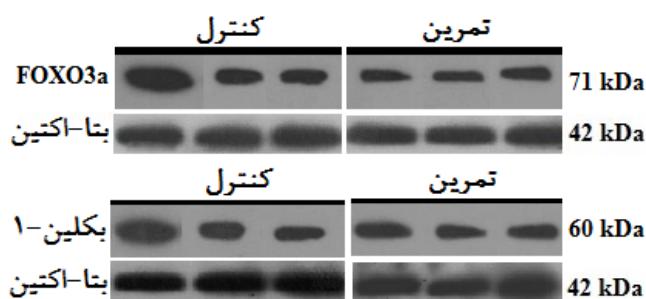
تحلیل آماری

ابتدا از آزمون کالموگروف اسمیرنوف (KS) برای تعیین نرمالیتی توزیع داده‌های پژوهش استفاده شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها در متغیرها، آزمون پارامتریک t مستقل برای مقایسه بین گروهی به کار برده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ انجام و سطح معنی‌داری تجزیه و تحلیل آماری تحقیق حاضر، $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

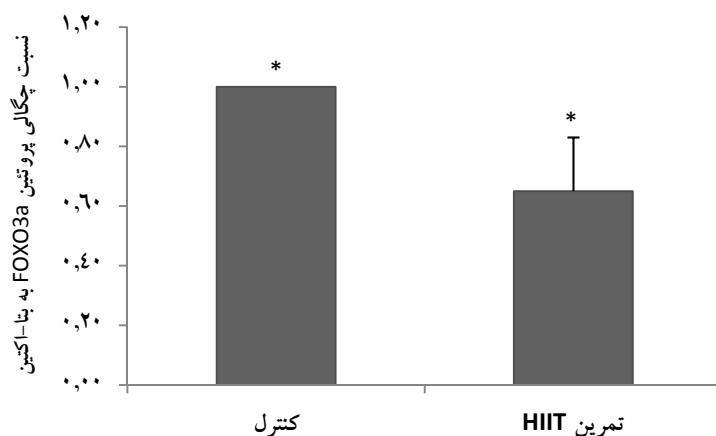
نتایج

در پایان پژوهش، نتایج نشان دادند که به دنبال چهار هفته تمرین HIIT، کاهش معنی‌داری در محتوای پروتئین FOXO3a ($P=0.03$) (شکل شماره ۱ و ۲) و محتوای پروتئین Beclin-1 ($P=0.0001$) (شکل شماره ۱ و ۳) بین گروه‌های تمرین دیابتی و کنترل دیابتی در بافت عضله قلبی وجود دارد.

پژوهش اندازه‌گیری شد. برای استخراج پروتئین‌های بافت قلب از بافر RIPA حاوی ۰/۰۵ میلی‌مolar بافر تریس (pH برابر ۸)، ۱۵۰ میلی‌مolar کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد EGTA، یک درصد سدیم (Sodium dodecyl sulfate; SDS) به اضافه ۰/۰ درصد آنتی‌پروتاز کوکتیل (sigma) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌گرم بافت در ۵۰۰ میکرولیتر بافر حاوی آنتی‌پروتاز توسط یک هموژنایزر دستی هموژن شد و نیم ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شد و سپس در یک سانتریفیوژ یخچال‌دار (bo, sw14rfroil) در دور ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی جمع‌آوری و غلظت پروتئین آن با کیت تعیین کننده‌ی پروتئین (Bio-Rad) (اندازه‌گیری شد (در طول موج ۵۹۵ نانومتر). در نهایت در ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری شد، سپس هموژن به دست آمده به نسبت ۱:۱ با نمونه لودینگ بافر (mM50) تریس - کلرید هیدروژن، ۲ درصد سدیم دو دسیل سولفات، ۱۰ درصد گلیسرول، ۵ درصد بتا - مرکاپتواتانول و ۰/۰۰۵ درصد برموفنول آبی) مخلوط گردید. در ادامه، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه جوشانده شدند تا تمام پروتئین‌ها کاملاً دناتوره شوند. پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل SDS-Polyacrylamide جدا و به غشای BSA نیترو‌سلولز منتقل شدند. غشا به مدت ۱ ساعت در ۵ درصد Tween 20 در Tris-Buffered Saline و ۰/۱ درصد (Tris-Buffered Saline) مسدود و در آنتی‌بادی اویله (۱:۵۰۰) انکوبه شد.



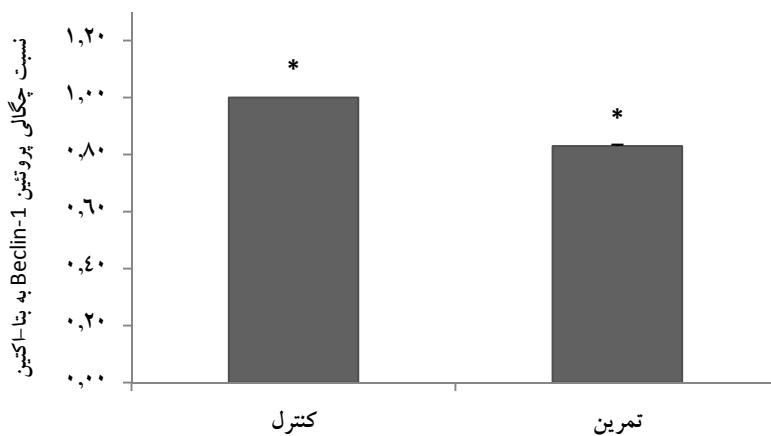
شکل شماره ۱- تصاویر وسترن‌بلاط پروتئین‌های FOXO3a و بکلین-۱ نسبت به بتا - اکتین (به عنوان کنترل داخلی) در بافت عضله قلب



شکل شماره ۲- نمودار ستونی (میانگین و انحراف استاندارد) نشان‌دهنده مقادیر کمی شده باندهای پروتئین FOXO3a در مقابل کنترل داخلی

(بنا - اکتین) می‌باشد که به صورت چند برابر گروه کنترل ارائه شده است.

(وجود تفاوت معنی‌داری بین پروتئین‌ها در سطح ۰/۰۵)



شکل شماره ۳- نمودار ستونی (میانگین و انحراف استاندارد) نشان‌دهنده مقادیر کمی شده باندهای پروتئین بکلین - ۱ در مقابل کنترل داخلی (بنا - اکتین) می‌باشد که به صورت چند برابر گروه کنترل ارائه شده است.

(وجود تفاوت معنی‌داری بین پروتئین‌ها در سطح ۰/۰۵)

است که تمرینات ورزشی در بعضی از موارد، محتوای اتوفاززووم در عضله قلب را تغییر می‌دهند [۴۳]. در این راستا در تحقیق Holloway و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی تأثیر ۴ هفته تمرینات HIIT و استقاماتی بر محتوای پروتئین FOXO3a در عضله قلب موش‌های صحرایی چهار نقص قلبی پرداختند. نتایج، تغییر معنی‌داری در محتوای پروتئین FOXO3a به دنبال انجام تمرینات تنابی پرشدت و استقاماتی نشان نداد [۴۴]. در مقابل Sun و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که افزایش حجم تمرینات استقاماتی (به مدت ۸ هفته) با افزایش مدت زمان و در عین حال شدت در سطح پایدار باعث افزایش راندمان عضلات قلبی و فعالیت‌های اتوفازی پایه از جمله افزایش محتوای پروتئین

بحث
نتایج حاصل از این تمرین نشان داد، چهار هفته تمرین HIIT منجر به کاهش معنی‌داری در محتوای پروتئین‌های Beclin-1 و FOXO3a در گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی می‌شود. تحقیقات بسیار اندکی به بررسی محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 بر روی آزمودنی‌های دیابتی که مستعد کار迪ومیوپاتی دیابتی و مرگ سلول عضله قلبی هستند، پرداخته‌اند. براساس شواهد هنوز ماهیت تمرینات ورزشی به خصوص تمرینات HIIT بر روی فرآیند اتوفازی به درستی مشخص نشده است. در مورد رابطه بین سازگاری عضلانی قلبی ناشی از تمرین ورزشی و تغییر اتوفازی پایه [۴۲] گزارش شده

تنظیم PIK3C3 منجر به ادامه آبشار اتوفازی در سلول می‌شود [۴۷]. در تحقیقی دیگر، Li و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی تأثیر تمرينات HIIT بر محتوای پروتئین Beclin-1 عضله قلب موش‌های صحرایی پرداختند. تمرين HIIT شامل ۵ جلسه در هفته به مدت ۱۰ هفته با شدت ۹۵-۹۹ درصد VO_{2max} بود. تمرين HIIT منجر به افزایش محتوای پروتئین Beclin-1 شد [۴۸]. نتایج تحقیق Li و همکاران با نتایج تحقیق حاضر هم راستا نمی‌باشد؛ زیرا محققان پژوهش حاضر کاهش معنی‌داری را در محتوای پروتئین Beclin-1 مشاهده کردند. از عوامل تأثیرگذار می‌توان به مدت تمرين ورزشی اشاره کرد. در تحقیق حاضر، مدت زمان تمرين HIIT، ۴ هفته بود و این در صورتی است که Li و همکاران به مدت ۱۰ هفته تمرين HIIT را انجام دادند. شدت تمرين ورزشی نیز می‌تواند عاملی دیگر در کسب این نتایج باشد. Li و همکاران در تحقیق خود از شدت ۹۵ تا ۹۹ درصد VO_{2max} استفاده کردند، اما محققان پژوهش حاضر، شدتی بین ۸۵ تا ۹۵ درصد حداقل سرعت را به کار گرفتند. شدت بالا می‌تواند عامل مهمی برای افزایش اتوفازی باشد. بیماری آزمودنی‌های تحقیق حاضر نیز می‌تواند عامل مهم دیگری در کسب نتایج باشد. موش‌های دیابتی به دلیل اختلال در مسیر انسولین، مستعد اتوفازی در سلول‌های خود به خصوص سلول‌های پانکراس هستند [۴۹]. از آنجایی که انسولین مسیر PI3K/AKT/mTORC1 را فعال می‌کند، در ابتدا تصور می‌شد که اتوفازی در هر دو نوع دیابت ۱ (کمبود انسولین) و ۲ (مقاومت به انسولین) افزایش می‌یابد. مطابق با این فرضیه، موش‌هایی که فاقد گیرنده انسولین (Insulin Receptor Substrate; IRS) بودند، اتوفازی را در قلب خود تقویت کردند [۵۰]. بنابراین، در آزمودنی‌های تحقیق حاضر که به دیابت نوع ۲ مبتلا بودند، مقاومت به انسولین منجر به ایجاد نقص در مسیر PI3K/AKT/mTORC1 می‌شود که این نقص می‌تواند اتوفازی را در قلب آزمودنی‌ها افزایش دهد؛ اما نتایج تحقیق حاضر کاهش محتوای پروتئین‌های Beclin-1 و FOXO3a را نشان داد که بر اثر تمرينات HIIT ایجاد شده است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که تمرينات HIIT با فعال کردن مسیر PI3K/AKT/mTORC1 می‌تواند اتوفازی را در سلول‌های بطن چپ قلب مهار کند. همچنین نشان داده شده است که سرکوب اتوفازی در قلب بیماران دیابتی به دلیل افزایش فعالیت مسیر mTORC1 و کاهش فعالیت AMP-activated AMPK (protein kinase می‌باشد [۵۱]. با این حال، عدم تناقضات عمده در روش‌های مورد استفاده برای ارزیابی اتوفازی بین مطالعات،

Beclin-1 به عنوان نشانگر اتوفازی می‌شود [۴۵]. نتایج هر دو تحقیق گزارش شده Holloway و همکاران و Sun و همکاران با نتایج تحقیق حاضر هم راستا نمی‌باشد؛ زیرا در تحقیق حاضر محتوای FOXO3a و Beclin-1 به دنبال ۴ هفته تمرين HIIT کاهش معنی‌داری یافته است و این در حالی است که در تحقیق FOXO3a و همکاران عدم معنی‌داری پروتئین Beclin-1 Holloway و همکاران افزایش محتوای پروتئین Beclin-1 گزارش شده است. مدت زمان تحقیق Holloway و همکاران با مدت زمان تحقیق حاضر یکی می‌باشد؛ بنابراین عاملی غیر از مدت زمان تمرين ورزشی تأثیرگذار است که می‌تواند شدت یا نوع آزمودنی‌ها باشد. در تحقیق Holloway و همکاران آزمودنی‌ها دچار نقص قلبی بودند، در حالی که در تحقیق حاضر آزمودنی‌ها دیابت نوع ۲ داشتند؛ اما Sun و همکاران در تحقیق خود از ۸ هفته تمرين استقامتی استفاده کرده‌اند که هم از نظر مدت زمان تمرين و هم از نظر شدت تمرين با تمرين تحقیق حاضر در تناقض می‌باشد. این مطلب نشان می‌دهد که هرگونه دستکاری در تمرينات ورزشی می‌تواند بر روی پروتئین‌های مسیرهای سلولی از جمله Beclin-1 و FOXO3a تأثیرگذار باشد و نتایج متناقضی را نشان دهد [۳۰-۳۵]. البته گفتند است که مسیرهای سلولی و مولکولی که از طریق آن اتوفازی تغییر می‌کند، حائز اهمیت است. مسیر اصلی پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 در تنظیم اتوفازی، مکانیسم سلولی ماکروآتوفازی است. اتوفازی توسط مکانیسم‌های پیچیده‌ای تنظیم می‌شود که می‌توان به سیگنال‌های ورودی گوناگون از جمله مواد غذی، فاکتورهای رشدی، هورمون‌ها، غلظت کلسیم داخل سلولی، میزان ATP، هیپوکسی و ... اشاره کرد. مسیر اصلی تنظیم کننده این عوامل، مسیر mTORC1 است که در پاسخ‌های سلولی مانند رشد، تکثیر، سنتز پروتئین و اتوفازی فعال می‌شود. مسیر Unc-51 Like mTORC1 با تنظیم پروتئین‌های ULK1 (ATG13، Autophagy Activating Kinase 1 FAK Family) FIP200 (Autophagy Related 13) Kinase-Interacting Protein of 200 kDa می‌تواند مهار کننده یا فعال کننده مکانیسم اتوفازی باشد [۴۶]. در طی پایین آمدن سطح انرژی، پروتئین ULK1 موجب فعال شدن کمپلکس III اینوزیتول-۳-کیناز کلاس Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit (Type 3; PIK3C3) می‌شود که پروتئین Beclin-1 هسته کمپلکس PIK3C3 را تشکیل می‌دهد و به منزله جایگاهی برای اتصال انواع واکنش‌گرهای دخیل در تنظیم PIK3C3 می‌باشد.

بافت بطن چپ قلب می‌شود که می‌تواند باعث مهار مسیر اتوفاژی از طریق این مسیر شود. همچنین نتایج این تحقیق توانست با بررسی مسیر FOXO3a/Beclin-1 در آزمودنی‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ به درک ما در مورد وضعیت اتوفاژی و میتوفاژی در قلب و همچنین سهم اتوفاژی در پاتوژن کاردیومیوپاتی دیابتی کمک کند.

تشکر و قدردانی

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

References:

- [1] Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G. Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest* 2015; 125(1): 85-93.
- [2] Most J, Tosti V, Redman LM, Fontana L. Calorie restriction in humans: an update. *Ageing Res Rev* 2017; 39: 36-45.
- [3] Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 2014; 24(1):24-41.
- [4] Daryanoosh F, Bazgir B, Alizadeh H. Effect of aerobic trainings on heart's functioned and structure in diabetic Sprague-dawley albino species male rats. *Res Appl Exer Physiol* 2010; 6(12): 59-72. [in Persian]
- [5] Zhao J, Randive R, Stewart JA. Molecular mechanisms of AGE/RAGE-mediated fibrosis in the diabetic heart. *World J Diabetes* 2014; 5(6): 860-7.
- [6] Grøntved A, Pan A, Mekary RA, Stampfer M, Willett WC, Manson JE, et al. Muscle-strengthening and conditioning activities and risk of type 2 diabetes: a prospective study in two cohorts of US women. *PLoS Med* 2014; 11(1): 1-15.
- [7] Kim JA, Jang HJ, Martinez-Lemus LA, Sowers JR. Activation of mTOR/p70S6 kinase by ANG II inhibits insulin-stimulated endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 2011; 302(2): 201-8.
- [8] Jia G, Habibi J, DeMarco VG, Martinez-Lemus LA, Ma L, Whaley-Connell AT, et al. Endothelial mineralocorticoid receptor deletion prevents diet-induced cardiac diastolic dysfunction in females. *Hypertension* 2015; 66 (6): 1159-67.
- [9] Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12(3): 144-53.
- [10] Miki T, Yuda S, Kouzu H, Miura T. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev* 2013; 18(2): 149-66.
- [11] 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. *Experim Clin Endocrinol Diabetes* 2017; 125(09): 583-91.
- [12] Kobayashi S, Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852(2): 252-61.
- [13] Vainshtein A, Hood DA. The regulation of autophagy during exercise in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2015; 120(6): 664-73.
- [14] Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, Vacchelli E, Galluzzi L, Maiuri MC, et al. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol* 2013; 23(5): 310-22.
- [15] Seok HY, Chen J, Kataoka M, Huang ZP, Ding J, Yan J, et al. Loss of MicroRNA-155 protects the heart from pathological cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2014; 114(10): 1585-95.
- [16] Milan G, Romanello V, Pescatore F, Armani A, Paik JH, Frasson L, et al. Regulation of autophagy and the ubiquitin–proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat Commun* 2015; 6(6670):1-19.
- [17] Van Der Vos KE, Eliasson P, Proikas-Cezanne T, Vervoort SJ, Van Boxtel R, Putker M, et al. Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K–PKB–FOXO network regulates autophagy. *Nat Cell Biol* 2012; 14(8):829-37.
- [18] Xie Y, Kang R, Tang D. Role of the Beclin 1 Network in the Cross-Regulation between Autophagy and Apoptosis. *Elsevier Academic Press* 2016; 75-88.

احتمالاً بخش بزرگی از اختلافات در نتایج را شامل می‌شود. شواهد در حال رشد نشان می‌دهد که اتوفاژی در طی یک دوره فعالیت ورزشی در بافت‌ها و انواع سلول‌ها تغییر ایجاد می‌کند. همچنین کاملاً آشکار می‌شود که اتوفاژی از طریق افزایش گردش سلولی در سازگاری‌های ناشی از فعالیت ورزشی نقش دارد. با توجه به این نکات، مطالعه اتوفاژی و فعالیت ورزشی هنوز در مراحل ابتدایی است و تحقیقات بیشتری در مورد مکانیسم‌های فعال‌سازی اتوفاژی و کمک به سازگاری‌های طولانی‌مدت موردنیاز است [۵۲، ۱۳].

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ۴ هفته تمرین HIIT منجر به کاهش محتوای پروتئین‌های FOXO3a و Beclin-1 در

- [19] 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.
- [20] Sun Q, Fan W, Zhong Q. Regulation of Beclin 1 in autophagy. *Autophagy* 2009; 5(5): 713-6.
- [21] Ma S, Wang Y, Chen Y, Cao F. The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852(2): 271-6.
- [22] Halling JF, Pilegaard H. Autophagy-dependent beneficial effects of exercise. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2017; 7(8): 1-17.
- [23] Lo Verso F, Carnio S, Vainshtein A, Sandri M. Autophagy is not required to sustain exercise and PRKAA1/AMPK activity but is important to prevent mitochondrial damage during physical activity. *Autophagy* 2014; 10(11): 1883-94.
- [24] Grumati P, Coletto L, Schiavonato A, Castagnaro S, Bertaggia E, Sandri M, et al. Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. *Autophagy* 2011; 7(12): 1415-23.
- [25] Medina DL, Di Paola S, Peluso I, Armani A, De Stefani D, Venditti R, et al. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol* 2015; 17(3):288-99.
- [26] Vainshtein A, Tryon LD, Pauly M, Hood DA. Role of PGC-1 α during acute exercise-induced autophagy and mitophagy in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015; 308(9):C710-9.
- [27] He C, Sumpter Jr R, Levine B. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy* 2012; 8(10): 1548-51.
- [28] Hafstad AD, Boardman NT, Lund J, Hagve M, Khalid AM, Wisloff U, et al. High intensity interval training alters substrate utilization and reduces oxygen consumption in the heart. *J Appl Physiol* 2011; 111(5): 1235-41.
- [29] Trilk JL, Singhal A, Bigelman KA, Cureton KJ. Effect of sprint interval training on circulatory function during exercise in sedentary, overweight/obese women. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111(8): 1591-7.
- [30] Slopack D, Roudier E, Liu ST, Nwadozi E, Birot O, Haas TL. Forkhead BoxO transcription factors restrain exercise-induced angiogenesis. *J Physiol* 2014; 592(18): 4069-82.
- [31] Lee K, Ochi E, Song H, Nakazato K. Activation of AMP-activated protein kinase induce expression of FoxO1, FoxO3a, and myostatin after exercise-induced muscle damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 466(3): 289-94.
- [32] Møller AB, Lønborg S, Farup J, Voss TS, Rittig N, Wang J, et al. Molecular and cellular adaptations to exercise training in skeletal muscle from cancer patients treated with chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019; 145(6): 1449-60.
- [33] Kim YA, Kim YS, Song W. Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. *J Physiol Biochemi* 2012; 68(2): 229-35.
- [34] Kavazis AN, Smuder AJ, Powers SK. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced foxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2014; 117(3): 223-30.
- [35] Li FH, Li T, Su YM, Ai JY, Duan R, Liu TC. Cardiac basal autophagic activity and increased exercise capacity. *J Physiol Sci* 2018; 68(6): 729-42.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] Sherafat 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 Uni Med Sci* 2018; 17(9): 843-54. [in Persian]
- [39] Garcia NF, Sponton AC, 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.
- [40] Aghaei N, Sherafat Moghadam M, Daryanoosh F, Shadmehri S, Jahani Golbar S. The effect of 4 weeks' aerobic training on the content of mTORC1 signaling pathway proteins in heart tissue of type 1 diabetes rats. *Iran J Dia Metab* 2019; 18(3): 116-25. [in Persian]
- [41] Khani M, Motamedi P, Dehkhoda MR, Nikukheslat SD, Karimi P. Effect of thyme extract supplementation on lipid peroxidation, antioxidant capacity, PGC-1 α content and endurance exercise performance in rats. *J Int Soc Sports Nutr* 2017; 14 (1): 1-8.
- [42] 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.
- [43] Smuder AJ, Kavazis AN, Min K, Powers SK. Doxorubicin-induced markers of myocardial autophagic signaling in sedentary and exercise trained animals. *J Appl Physiol* 2013; 115(2): 176-85.
- [44] Holloway TM, Bloomberg D, Da Silva ML, Simpson JA, Quadrilatero J, Spriet LL. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and

- cardiac remodeling in hypertensive rats. *PloS One* 2015; 10(3): e0121138.
- [45] Sun M, Huang C, Wang C, Zheng J, Zhang P, Xu Y, et al. Ginsenoside Rg3 improves cardiac mitochondrial population quality: mimetic exercise training. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441(1): 169-74.
- [46] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009; 122(20): 3589-94.
- [47] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149(2): 274-93.
- [48] Li FH, Tao Li JY, Sun L, Min Z, Duan R, Zhu L, et al. Beneficial Autophagic Activities, Mitochondrial Function, and Metabolic Phenotype Adaptations Promoted by High-Intensity Interval Training in a Rat Model. *Front Physiol* 2018; 9: 571.
- [49] Kubli DA, Gustafsson ÅB. Unbreak my heart: targeting mitochondrial autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Antioxid Redox Signal* 2015; 22(17): 1527-44.
- [50] Riehle C, Wende AR, Sena S, Pires KM, Pereira RO, Zhu Y, et al. Insulin receptor substrate signaling suppresses neonatal autophagy in the heart. *J Clin Invest* 2013; 123(12): 5319-33.
- [51] Xu X, Hua Y, Sreejayan N, Zhang Y, Ren J. Akt2 knockout preserves cardiac function in high-fat diet-induced obesity by rescuing cardiac autophagosome maturation. *J Mol Cell Biol* 2012; 5(1): 61-3.
- [52] Frühbeis C, Helmig S, Tug S, Simon P, Krämer-Albers EM. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles* 2015; 4(1): 28239.