Journal of Sport and Exercise Physiology
2024, 17(2): 34-47

Orginal Article

Investigating the mutual effects of autophagy and apoptosis in heart tissue of type 2 diabetic rats in interaction with aerobic exercise training and vitamin D3 injection

Hadi Golpasandi[1], Mohammad Rahman Rahimi[1*], Slahadin Ahmadi[2]

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Humanities and Social Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

Abstract

Background and Purpose: The interplay between autophagy and apoptosis is crucial in understanding heart health, particularly in the context of type 2 diabetes. The aim of this study was to investigate how aerobic training and vitamin D3 supplementation modulate the cardiac tissue of diabetic rats and highlight potential therapeutic strategies to improve cardiac function in diabetic conditions. Therefore, in this study, the effects of aerobic training and vitamin D3 injection on autophagy and apoptosis of heart tissue of diabetic rats were investigated.

Materials and Methods: Forty male Wistar rats with a weight range of 200 - 240 grams were divided into two groups receiving a standard diet (8 rats) and a high-fat diet (32 rats) for 6 weeks. After 6 weeks, in order to induce type 2 diabetes, 35 mg/kg body weight of streptozotocin (STZ) was injected intraperitoneally. Rats receiving high-fat diet were randomly divided into 4 groups, diabetes control (DC), diabetes + aerobic training (DAT), diabetes + vitamin D3 injection (DVD) and diabetes + aerobic training + vitamin D3 injection (DVDAT). The rats in the aerobic training group underwent aerobic training with an intensity of 60% of the maximum running speed through a treadmill for eight weeks, 3 sessions/week in the aerobic training groups. The groups receiving vitamin D3 received a diluted solution of vitamin D3 with sesame oil at a dose of 10000 IU/kg weekly. After the completion of aerobic training interventions and vitamin D3 injection and anesthetizing the mice, the heart tissue was extracted and the protein levels of Beclin -1, Bax and Bcl -2 in the left ventricle of the heart tissue were measured by western blot technique. The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA).

Results: Data analysis showed that type 2 diabetes increased the levels of Beclin-1, Bax and decreased Bcl-2 ($P<0.001$). Aerobic training, vitamin D3 and their interaction both decreased Beclin-1, Bax and increased Bcl -2, and that these changes were higher in the DVDAT group ($P<0.001$). The results also showed that fasting glucose levels and insulin resistance index decreased significantly in DAT, DVD and DVDAT groups ($P<0.001$), and this decrease was more in DVDAT group ($P<0.001$).

* Corresponding Author's E-mail: r.rahimi@uok.ac.ir
https://doi.org/10.48308/joeppa.2024.235803.1257
Received: 23/05/2024 Revised: 29/06/2024 Accepted: 30/06/2024

Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Conclusion: In general, it could be concluded that type 2 diabetes causes disturbances in cellular and metabolic homeostasis, including insulin resistance, through increased autophagy and apoptosis in heart tissue, which can be reversed through aerobic training and vitamin D3, and improve glucose metabolism and insulin resistance.

Keywords: Aerobic Exercise Training, Excessive Autophagy, Apoptosis, Bax, Beclin-1 and Diabetic Cardiomyopathy

How to cite this article: Golpasandi H, Rahimi M R, Ahmadi S. Investigating the mutual effect of autophagy and apoptosis in heart tissue of type 2 diabetic rats in interaction with aerobic exercise training and vitamin D3 injection. J Sport Exerc Physiol. 2024; 17(2):34-47

نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی
۱۴۰۳، دوره ۱۷، شماره ۲، صفحه‌های ۳۴-۴۷

مقاله پژوهشی

بررسی اثر متقابل اتوفاژی و آپوپتوز در بافت قلب موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو در تعامل با تمرین هوازی و تزریق ویتامین د۳

هادی گلپسندی[۱]، محمدرحمان رحیمی[۱*]، صلاح‌الدین احمدی[۲]

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ علوم انسانی و اجتماعی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۲. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

چکیده

زمینه و هدف: تعامل بین اتوفاژی و آپوپتوز در درک سلامت قلب، به‌ویژه در زمینهٔ دیابت نوع دو، بسیار مهم است. هدف این تحقیق بررسی چگونگی تعدیل تمرین هوازی و مکمل ویتامین د۳ در بافت قلب موش‌های صحرایی دیابتی است و راهبردهای درمانی بالقوه برای بهبود عملکرد قلب در شرایط دیابتی را برجسته می‌کند. بنابراین، در این پژوهش تأثیرات تمرین هوازی و تزریق ویتامین د۳ بر اتوفاژی و آپوپتوز بافت قلب موش‌های صحرایی دیابتی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: ۴۰ سر موش نر نژاد ویستار با دامنهٔ وزنی ۲۰۰-۲۴۰ گرم به دو گروه دریافت‌کنندهٔ رژیم غذای استاندارد (هشت سر) و دریافت‌کنندهٔ غذایی پرچرب به مدت شش هفته (۳۲ سر) جایگزین شدند. پس از شش هفته، برای القای دیابت نوع دو، به مقدار ۳۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین (STZ) به‌صورت درون‌صفاقی تزریق شد. موش‌های صحرایی دریافت‌کنندهٔ رژیم غذایی پرچرب به‌طور تصادفی در چهار گروه، کنترل دیابت (DC)، دیابت+ تمرین هوازی (DAT)، دیابت+ تزریق ویتامین د۳ (DVD) و دیابت+ تمرین هوازی+ تزریق ویتامین د۳ (DVDAT) جایگزین شدند. به مدت هشت هفته، سه جلسه/ هفته، تمرین هوازی با شدت ۶۰ درصد حداکثر سرعت دویدن از طریق نوار گردان در گروه‌های تمرین هوازی انجام گرفت. گروه‌های دریافت‌کنندهٔ ویتامین د۳ محلول رقیق‌شدهٔ ویتامین د۳ با روغن کنجد با دوز ۱۰۰۰۰ IU/kg به‌صورت هفتگی دریافت کردند. پس از اتمام دورهٔ مداخلات تمرین هوازی و تزریق ویتامین د۳ و بی‌هوش کردن رت‌ها، بافت قلب استخراج شد و سطوح پروتئینی Beclin-1، Bax و Bcl-2 بطن چپ بافت قلب به روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد. تجزیه‌وتحلیل یافته‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه (آنووا) انجام گرفت.

نتایج: بررسی داده‌ها نشان داد که دیابت نوع دو موجب افزایش سطوح Beclin-1، Bax و کاهش Bcl-2 شد (P<۰/۰۰۱). درحالی‌که تمرین هوازی، ویتامین د۳ و تعامل هر دو موجب کاهش Beclin-1، Bax و افزایش Bcl-2 شد که این تغییرات در گروه تعاملی تمرین هوازی و ویتامین د۳ بیشتر بود (P<۰/۰۰۱). نتایج همچنین نشان داد که سطوح گلوکز ناشتا و شاخص مقاومت به انسولین در گروه‌های DAT، DVD و DVDAT کاهش معناداری یافت (P<۰/۰۰۱) که این کاهش در گروه DVDAT بیشتر بود (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان گفت که دیابت نوع دو از طریق افزایش اتوفاژی بیش‌ازحد و آپوپتوز در بافت قلب موجب اختلال در هومئوستاز سلولی و سوخت‌وسازی از جمله مقاومت به انسولین می‌شود که این می‌تواند از طریق تمرین هوازی و ویتامین د۳ معکوس شود و سوخت‌وساز گلوکز و مقاومت به انسولین بهبود یابد.

واژه‌های کلیدی: تمرین ورزشی هوازی، اتوفاژی بیش‌ازحد، آپوپتوز، Bax، بکلین-۱، دیابت کاردیومیوپاتی

نحوه استناد به این مقاله: گلپسندی ه، رحیمی م ر، احمدی ص. بررسی اثر متقابل اتوفاژی و آپوپتوز در بافت قلب موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو در تعامل با تمرین هوازی و تزریق ویتامین د۳. نشریهٔ فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی.۱۴۰۳؛۱۷(۲):۳۴-۴۷.

* رایانامه نویسنده مسئول: r.rahimi@uok.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۳ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۰

مقدمه

دیابت نوع دو (T2DM) یک بیماری مزمن سوخت‌وسازی است که با هیپرگلیسمی (سطح قند خون بالا) و مقاومت به انسولین مشخص می‌شود و با عوارض گوناگونی همراه است (۱). رشد روزافزون دیابت در سرتاسر جهان، به‌گونه‌ای است که به‌عنوان تهدید شایان توجه برای سلامت مطرح شده است. تأثیرات T2DM بر اندام‌های گوناگون از جمله قلب مشخص شده است، که به بیماری‌های قلبی- عروقی از جمله کاردیومیوپاتی منجر می‌شود (۲، ۳). دیابت کاردیومیوپاتی(DCM) یک اختلال عضلهٔ قلب است که به‌طور خاص در افراد مبتلا به دیابت مشاهده می‌شود. فرایندهای سلولی مانند اتوفاژی در توسعهٔ DCM نقش دارند (۴). گزارش شده است که اتوفاژی به‌عنوان یک مسیر تخریبی- محافظتی درون‌سلولی در T2DM مختل می‌شود، که در نتیجه به اختلال هومئوستاز محیط داخل سلولی می‌انجامد (۵). همچنین افزایش اتوفاژی می‌تواند آثار محافظتی بر بافت‌های مختلف از جمله قلب داشته باشد، به‌طوری‌که اتوفاژی از کاردیومیوسیت‌ها در شرایط فشارآفرین از جمله فشار اکسایشی و التهاب محافظت می‌کند (۵) درحالی‌که در برخی پژوهش‌ها، کاهش اتوفاژی بیش‌ازحد را به‌عنوان راهبرد محافظتی در طول ایسکمی معرفی کرده‌اند (۶). با این همه، می‌توان گفت که اتوفاژی می‌تواند در شرایط گوناگون نقشی دوگانه در بافت‌های از جمله قلب ایفا کند.

در کنار اتوفاژی، آپوپتوز یکی دیگر از فرایندهای مهم در حفظ سلامت سلولی است که رابطهٔ تنگاتنگی با اتوفاژی دارد (۷، ۸). برخلاف مفهوم مرگ سلولی اتوفاژیک، اتوفاژی اغلب در شرایط فیزیولوژیکی عملکرد محافظ سلولی را ایفا کرده و به حفظ هومئوستاز سلولی کمک می‌کند و از آپوپتوز بیش‌ازحد جلوگیری به‌عمل می‌آورد (۹). از طرفی، اتوفاژی می‌تواند از طریق تنظیم عامل کلیدی خود یعنی بکلین-۱ (Beclin-1) با پروتئین‌های ضد آپوپتوز شامل Bcl-2 و Bcl-xL موجب تنظیم منفی آپوپتوز در قلب شود (۹)، به‌طوری‌که در موش‌های صحرایی القاشده به DCM، کورکومین توانست با اتصال به Beclin-1 و Bcl-2 از طریق مسیر AMPK برای فعال کردن اتوفاژی و مهار آپوپتوز کاردیومیوسیت تداخل ایجاد کند (۱۰). نتایج مشابهی از سایر مدل‌های بیماری گزارش شده است (۱۱). افزون بر این، برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که کیناز پروآپوپتوز در قلب رت می‌تواند اتوفاژی قلبی را مهار کند (۱۲). با این همه، می‌توان گفت که درک رابطهٔ بین اتوفاژی و آپوپتوز برای بیماری‌های گوناگونی از جمله بیماری‌های قلبی- عروقی(CVD) و DCM مهم است، چراکه بر بقا و مرگ سلولی مؤثر است. آپوپتوز کاردیومیوسیت را می‌توان با تنظیم سطح اتوفاژی در DCM کاهش داد. از طرفی، گزارش شده است که اتوفاژی می‌تواند موجب آپوپتوز و مرگ سلولی در سلول‌هایی شود که سازوکارهای آپوپتوز آسیب‌دیده دارند و سطوح بیش‌ازحد اتوفاژی نیز موجب مرگ سلولی می‌شود (۱۳). ازاین‌رو گمان می‌رود که همبستگی بین اتوفاژی و آپوپتوز هنوز مورد بحث است.

پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی تأثیرات زیادی بر فرایندهای اتوفاژی و آپوپتوز دارد (۱۴). در یک مقالهٔ مروری گزارش شد که فعالیت بدنی، به‌عنوان یکی از راهبردهای غیردارویی از طریق برقراری تعادل بین اتوفاژی و آپوپتوز در طول دورهٔ سالمندی نقش مهمی در پیشگیری احتمالی در برابر بیماری‌های عصبی ایفا می‌کند (۱۵). از سوی دیگر، در بیماری‌های قلبی- عروقی ناشی از اتوفاژی بیش‌ازحد، تمرین ورزشی می‌تواند فعالیت اتوفاژی را مهار کند و آپوپتوز

سلول‌های اتوفاژیک را کاهش دهد و در نتیجه سطوح نشانگرهای پیش‌آگهی بیماری قلبی- عروقی را بهبود بخشد (۱۶). در این زمینه در یک تحقیق حیوانی دیگر، تأثیرات تعدیل‌کنندگی تمرینات ورزشی هوازی در تعامل با مکمل‌سازی ویتامین د۳ در اتوفاژی بیش‌ازحد در بافت قلب موش‌های صحرایی القاشده به دیابت نوع دو گزارش شد (۱۷). ویتامین د۳ نقش حیاتی در تنظیم فرایندهای سوخت‌وسازی حیاتی برای کنترل دیابت نوع دو ایفا می‌کند (۱۸). یافته‌های اخیر نشان داده است که ویتامین د۳ اتوفاژی و آپوپتوز را در برخی بیماری‌ها تنظیم می‌کند (۱۹). برای نمونه از آپوپتوز سلولی ناشی از ویروس آنفولانزا با بازگرداندن شار اتوفاژیک جلوگیری کرده و یک راهبرد درمانی بالقوه برای عفونت‌های ویروسی ارائه می‌کند (۱۹). تعامل بین آپوپتوز و اتوفاژی پیچیده است. در برخی زمینه‌های سلولی، اتوفاژی با سرکوب آپوپتوز بقای سلولی را افزایش می‌دهد، درحالی‌که در برخی دیگر، می‌تواند به مرگ سلولی منجر شود. گمان می‌رود ویتامین د۳ تأثیر چندوجهی بر فرایندهای سلولی از جمله اتوفاژی و آپوپتوز دارد. درک تعامل بین ویتامین د۳، آپوپتوز و اتوفاژی ممکن است راهبردهای درمانی بالقوه‌ای را برای مدیریت دیابت نوع دو و عوارض مرتبط ارائه دهد. با این همه، پژوهش‌های بیشتری برای درک کامل سازوکارهای این تأثیرات و پیامدهای آنها برای سلامتی و بیماری دیابت نوع دو مورد نیاز است. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر یک دوره تمرین هوازی به‌همراه ویتامین د۳ بر آپوپتوز و اتوفاژی در بافت قلب موش‌های صحرایی القاشده به دیابت نوع دو انجام گرفت.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش: پژوهش حاضر از نوع تجربی و نوع طرح به‌صورت پس‌آزمون همراه با گروه کنترل بود که در کمیتهٔ پژوهش‌های حیوانی دانشگاه کردستان با کد (IR.UOK.REC.1400.015) تصویب شد. ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با دامنهٔ وزنی ۲۰۰-۲۴۰ گرم و سن شش هفته، از انستیتو پاستور کرج خریداری و به آزمایشگاه حیوانی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انتقال شد. موش‌های صحرایی در قفس‌های پلاستیکی ویژه از جنس پلی‌کربنات شفاف، در اتاقی تحت کنترل دما (۲ ± ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد) ، چرخهٔ ۱۲ ساعته روشنایی/تاریکی با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی نگهداری شدند. شایان ذکر است که تمام فرایند آزمایشی کار با حیوانات تحت راهنمایی‌های NIH (۲۰۲۰) جهت مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. پس از دورهٔ آشناسازی یک‌هفته‌ای، موش‌های صحرایی به‌صورت تصادفی به دو گروه کنترل سالم (هشت سر) و دیابتی (۳۲ سر) تقسیم شدند.

روش اجرای پژوهش: برای القای دیابت نوع دو در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار از روش ترکیبی رژیم غذایی پرچرب (HFD) (به مدت شش هفته) به‌همراه تزریق استرپتوزوتوسین (STZ) استفاده شد. ترکیب رژیم HFD شامل چربی (۴۵ درصد)، کربوهیدرات (۳۵ درصد) و پروتئین (۲۰ درصد) بود که به مدت شش هفته اعمال و در پی آن تزریق داخل‌صفاقی ۳۵ میلی‌گرم/کیلوگرم STZ در محلول بافر سیترات ۰/۱ مول/لیتر و pH ۴/۵؛ انجام گرفت (۲۰). به‌منظور تأیید القای دیابت نوع دو در موش‌های صحرایی، ۷۲ ساعت پس از تزریق STZ، سطوح قند خون ناشتای آن‌ها از ورید دمی به مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر با استفاده از دستگاه گلوکومتر (با نشان Accu Check، ساخت آلمان) اندازه‌گیری شد (۲۰). موش‌های صحرایی با سطح گلوکز خون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر یا بیشتر دیابتی در نظر

گرفته شدند. سطح سرم گلوکز در موش‌های صحرایی گروه کنترل در خلال مدت زمان تحقیق در محدودهٔ طبیعی (۸۰- ۱۰۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر) باقی ماند (۲۱). شایان ذکر است که موش‌های صحرایی دیابتی‌شده، پس از تزریق STZ رژیم غذایی پرچرب را تا پایان مداخلات پژوهش حاضر دریافت کردند (۲۰). موش‌های صحرایی دیابتی‌شده به‌طور تصادفی در چهار گروه هشت‌تایی؛ شامل کنترل دیابت (DC)، دیابت+ ویتامین د۳ (DVD)، دیابت+ تمرین هوازی (DAT) و دیابت+تمرین هوازی+ ویتامین د۳ (DVDAT) جایگزین شدند. برای تصادفی‌سازی حیوانات از روش طرح بلوک تصادفی استفاده شد، به‌طوری‌که در این طرح ابتدا نمونه‌ها از لحاظ میزان قند خون یکسان‌سازی شدند و سپس به‌طور تصادفی در گروه‌های مداخله‌ای پژوهش حاضر گذاشته شدند. شایان ذکر است که تصادفی‌سازی به روش طرح بلوک تصادفی با استفاده از نرم‌افزار مینی تب، نسخهٔ ۲۱/۴ انجام گرفت.

پس از القای دیابت نوع دو، برای آشناسازی موش‌های صحرایی گروه تمرینی به مدت یک هفته، پنج روز در هفته، با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در روز شامل راه رفتن و دویدن روی نوار گردان را اجرا کردند. سپس به‌منظور محاسبهٔ بیشترین سرعت دویدن، آزمون عملکرد ورزشی درجه‌بندی‌شده بر اساس آزمون طراحی‌شده بدفورد را اجرا نکردند (۲۲). پس از برآورد بیشترین سرعت دویدن موش‌های صحرایی، گروه‌های تمرینی به مدت هشت هفته، هر هفته، پنج جلسه در هفته به فعالیت ورزشی روی نوار گردان پرداختند. تمرین اصلی شامل هشت هفته، هر هفته پنج جلسه که جهت رعایت اصل اضافه بار تمرین، شدت و مدت به‌صورت تدریجی، در هفتهٔ اول با شدت ۵۵ درصد شروع و تا ۶۵ درصد سرعت بیشینه دویدن در هفته ششم افزایش داشت و هفته‌های هفتم و هشتم شدت ثابت در نظر گرفته شد (۲۳).

فرایند تزریق ویتامین د۳ نیز بدین‌صورت بود که گروه‌های دریافت‌کنندهٔ ویتامین د۳، به مدت هشت هفته، هر هفته یک‌بار دوز IU/kg ۱۰۰۰۰ (ساخت شرکت کاسپین تامین، رشت) ویتامین د۳ را به‌صورت رقیق‌شده با روغن کنجد از طریق تزریق زیرجلدی دریافت کردند (۲۴).

۲۴ ساعت پس از دورهٔ مداخلات پژوهش شامل تزریق ویتامین د۳ و تمرینات هوازی، فرایند بی‌هوش کردن موش‌های صحرایی با استفاده از تزریق زیرجلدی ترکیب کتامین ۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم انجام شد. پس از تزریق ترکیب بی‌هوشی، هر کدام از موش‌های صحرایی به مدت ۱۰ دقیقه در محیطی آرام و به دور از استرس تنها گذاشته شدند. پس از اطمینان از بی‌هوشی حیوانات، از قسمت پشت روی تختهٔ تشریح خوابانده شدند، سپس دست و پاها به‌صورت کشیده و به حالت صلیبی بسته شدند، در نهایت، قفسهٔ سینهٔ حیوان شکافته شده و خون به‌طور مستقیم از قلب حیوان گرفته شد. نمونه‌های خونی جمع‌آوری‌شده با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و پلاسمای آن جدا و برای سنجش سطوح گلوکز و انسولین سرمی در ادامهٔ مراحل پژوهش به فریزر با دمای منفی ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد انتقال یافت.

روش‌های آزمایشگاهی: پس از استخراج بافت قلب و هموژنیزه کردن آن در نیتروژن مایع، پروتئین‌های آن روی ژل‌های SDS-PAGE جدا شده و سپس روی غشای پلی‌وینیلیدین دی فلوراید (PVDF) منتقل شدند. پس از انکوبه شدن در شیر بدون چربی، به مدت یک ساعت در دمای اتاق، غشاها با آنتی‌بادی-Beclin 1, Bax, BCL2 شرکت Santa Cruz biotechnology، کالیفرنیا، آمریکا در طول شب در دمای چهار درجهٔ

سانتی‌گراد کاوش شدند. سپس ایمونوبلات‌ها با آنتی‌بادی‌های ثانویه مربوطه به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند و با معرف ECL به علاوه (Millipore، Billerica، MA) دیده شدند. ایمونوبلات‌ها سپس با بافر نواری در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه پاک‌سازی شدند و به‌ترتیب برای کل Beclin-1, Bax, BCL2 مجدداً لکه‌دار شدند. مقادیر سرمی گلوکز (با استفاده از دستگاه Mindrey BS200) به روش کالریمتریک، انسولین (با استفاده از کیت حیوانی شرکت آلپکو، به شمارهٔ (80-INSRTH-E01, E10) به روش الایزا انجام گرفت. شاخص HOMA-IR نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲۵):

HOMA-IR= انسولین ناشتا (mmol/L) * گلوکز ناشتا (mmol/L) /22.5

تحلیل آماری: تجزیه‌وتحلیل آماری و ترسیم نمودار یافته‌های پژوهش حاضر با استفاده از نرم‌افزار Graph pad Prisma نسخهٔ ۹ انجام گرفت. مقادیر به‌عنوان میانگین، خطای استاندارد میانگین، انحراف استاندارد و درصد تغییرات میانگین ارائه شدند. داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یکطرفه و سپس آزمون تعقیبی بنفرونی تجزیه‌وتحلیل شد. مقدار احتمال P< ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

میانگین و انحراف استاندارد شاخص‌های وزن، سطوح سرمی گلوکز، انسولین و شاخص HOMA-IR در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. میانگین ± انحراف استاندارد شاخص‌های وابسته به کنترل گلایسمیک و وزن در گروه‌های مورد بررسی

گروه / متغیرها	NC	DC	DAT	DVD	DVDAT
وزن (گرم)	۴۰۸/۳ ± ۱۱/۹۳	۳۸۹ ± ۱۲/۱۸	۳۴۸/۱ ± ۱۰/۷۸	۳۷۶/۸ ± ۱۱/۸۹	۳۰۵/۴ ± ۹/۲۷
گلوکز (mmol/l)	۵/۱۹ ± ۰/۲۰	۲۴/۰۵ ± ۲/۰۱*	۱۷/۷۳ ± ۱/۶۱۹‡	۱۹/۶۵ ± ۱/۶۲۴	۱۵/۳۰ ± ۱/۶۲۶‡†
انسولین (mmol/l)	۰/۱۲ ± ۰/۰۲	۰/۴۰ ± ۰/۰۵	۰/۲۶ ± ۰/۶۰۴‡	۰/۳۳ ± ۰/۶۰۳	۰/۲۴ ± ۰/۶۰۴‡
HOMA-IR	۰/۰۲ ± ۰/۰۰	۰/۴۳ ± ۰/۰۶*	۰/۲۰ ± ۰/۶۰۴‡	۰/۲۸ ± ۰/۶۰۲	۰/۱۶ ± ۰/۶۰۲‡†

NC: کنترل سالم، DC: کنترل دیابت، DVD: دیابت+ ویتامین د۳، DAT: دیابت+ تمرین هوازی و DVDAT: دیابت+ ویتامین د۳+ تمرین هوازی، (*) معناداری نسبت به گروه NC، (§) معناداری نسبت به گروه DC، (†) معناداری نسبت به گروه DAT و (‡) معناداری نسبت به گروه DVDAT).

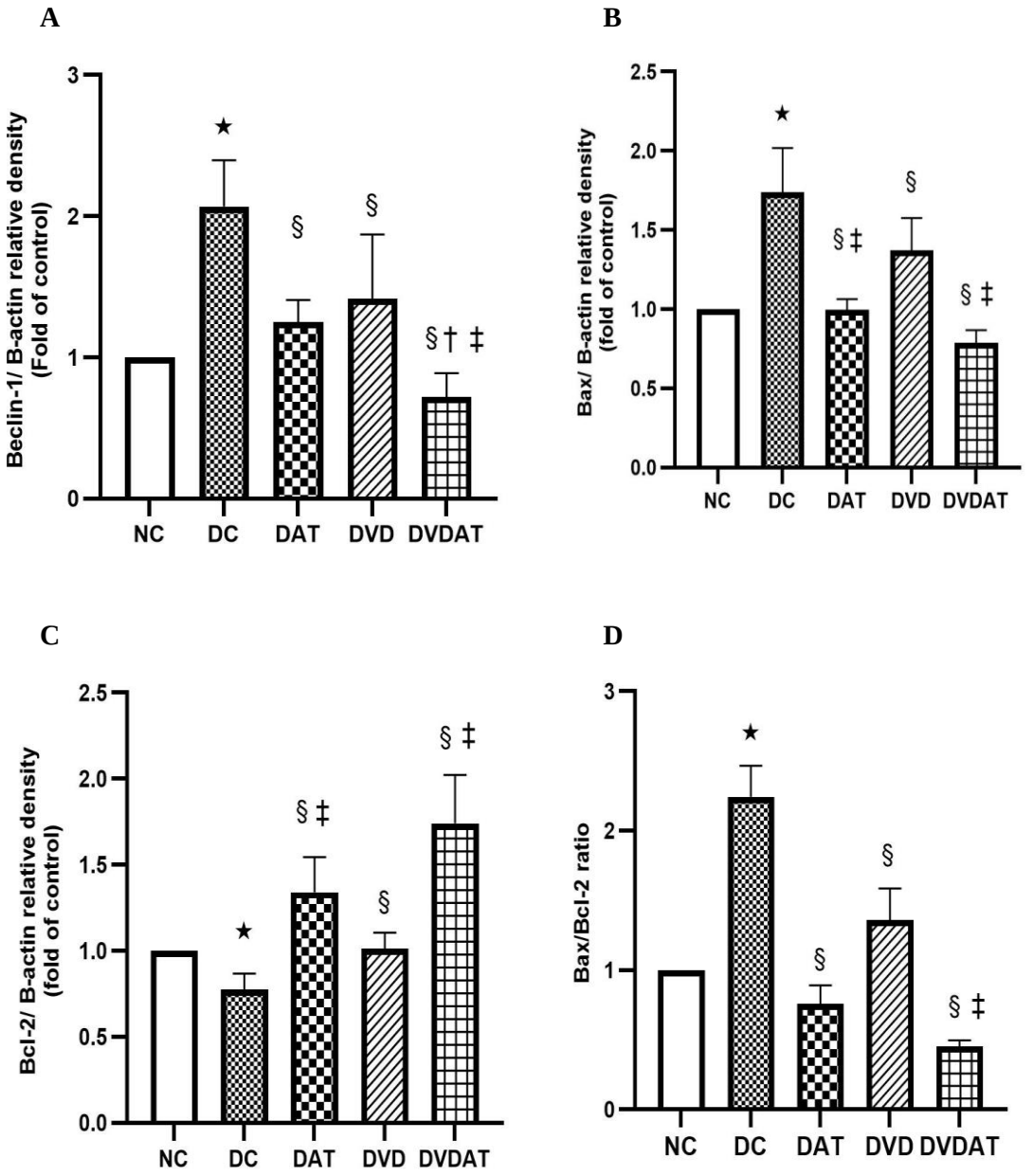
نتایج میانگین وزن نشان داد که تفاوت معناداری در وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف پژوهش حاضر وجود دارد (P< ۰/۰۰۱ ,F = ۱۰۱/۳ ,۰/۹۲= η^2). میانگین وزن در گروه DC به‌طور معناداری بالاتر از گروه NC بود (۴/۷۳ درصد). درحالی‌که در گروه‌های DAT، DVD و DVDAT نسبت به گروه DC به‌طور معناداری پایین‌تر بود (به‌ترتیب ۱۰/۵۱، ۳/۱۴ و ۲۱/۴۹ درصد) که بیشترین کاهش در گروه DVDAT نسبت به گروه DAT (۱۲/۲۷درصد) و گروه DVD (۱۸/۹۵درصد) دیده شد (جدول ۱). سطوح گلوکز در گروه‌های مختلف پژوهش حاضر تفاوت معناداری داشت (P< ۰/۰۰۱ ,F=۲۲۶/۶ ,۰/۹۶= η^2). در گروه DC به‌طور معناداری بالاتر از گروه NC بود (۷۸/۴۲ درصد، P< ۰/۰۰۱)، درحالی‌که در گروه‌های DAT، DVD و DVDAT نسبت به گروه DC پایین‌تر بود (به‌ترتیب ۲۶/۲۸، ۱۸/۳۰ و ۳۶/۳۸ درصد) که بیشترین کاهش در گروه DVDAT نسبت به گروه DAT (۱۳/۷۱ درصد) و DVD (۲۲/۱۴ درصد) دیده شد (جدول ۱).

نتایج پروتئین Beclin-1 نشان داد که تفاوت معناداری بین گروه‌های مورد بررسی وجود دارد (P< ۰/۰۰۱ ,F=۲۸/۱۳ ,۰/۷۶=η^2). به‌طوری‌که دیابت نوع دو موجب افزایش معنادار ۱۰۷ درصدی پروتئین Beclin-1 نسبت به گروه کنترل سالم شد (P< ۰/۰۰۱). درحالی‌که تمرین هوازی موجب کاهش ۴۰/۱۰درصد (P< ۰/۰۰۱)، تزریق ویتامین د۳ موجب کاهش ۳۱/۸۸درصدی (P< ۰/۰۰۱) و تعامل تمرین هوازی+ تزریق ویتامین د۳ موجب کاهش ۶۵/۲۲ درصدی (P< ۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل دیابت شد که ۴۱/۹۴ درصد کاهش در گروه تعامل تمرین هوازی+ تزریق ویتامین د۳ نسبت به گروه تمرین هوازی و ۴۸/۹۴ درصد کاهش نسبت به گروه تزریق ویتامین د۳، بود (شکل 1A).

نتایج پروتئین Bax نشان داد که تفاوت معناداری بین گروه‌های مورد بررسی وجود دارد (P< ۰/۰۰۱ ,F=۴۳/۹۵ ,۰/۸۳=η^2). تغییرات به‌گونه‌ای بود که در گروه DC نسبت به گروه NC، ۷۳ درصد افزایش در سطوح Bax دیده شد (P< ۰/۰۰۱). درحالی‌که در گروه‌های DAT، DVD و DVDAT به‌ترتیب کاهش ۴۲/۷۷ درصد (P< ۰/۰۰۱)، ۲۰/۸۱ درصد (P< ۰/۰۰۱) و ۵۴/۹۱ درصد (P< ۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل دیابت دیده شد. کاهش تغییرات در گروه DVDAT نسبت به گروه DVD، ۴۳/۰۷ درصد بود (P< ۰/۰۰۱)، اگرچه تفاوت معناداری بین گروه‌های DVDAT و DAT وجود نداشت (P< ۰/۰۸) (شکل 1B).

نتایج پروتئین Bcl-2 نشان داد که تفاوت معناداری بین گروه‌های مورد بررسی وجود دارد (P< ۰/۰۰۱ ,F=۴۰/۸۸ ,۰/۸۲=η^2). سطوح پروتئین Bcl-2 در گروه DC به‌طور معناداری پایین‌تر از گروه NC بود (۲۳درصد، P< ۰/۰۰۱)، درحالی‌که در گروه‌های DAT، DVD و DVDAT افزایش به‌ترتیب ۷۴/۰۳، ۳۱/۱۷ و ۱۲۵/۹۷درصد نسبت به گروه DC دیده شد (P< ۰/۰۰۱). افزایش تغییرات در گروه DVDAT نسبت به گروه DVD، ۶۷/۳۱ درصد و نسبت به گروه DAT، ۲۹/۸۵درصد بود (شکل 1C).

نتایج نسبت Bax/Bcl-2 نیز نشان داد که تفاوت معناداری بین گروه‌های مورد بررسی وجود دارد (P< ۰/۰۰۱ ,F=۱۵۵/۲۰ ,۰/۹۴=η^2)، به‌طوری‌که در گروه DC به‌طور معناداری (۱۲۴ درصد) بالاتر از گروه NC بود (P< ۰/۰۰۱)، درحالی‌که در گروه‌های DAT، DVD و DVDAT کاهش به‌ترتیب ۶۶/۵۲، ۳۹/۷۳ و ۷۹/۹۱درصد نسبت به گروه DC دیده شد که این مقدار کاهش در گروه DVDAT نسبت به گروه‌های DAT، ۴۰ درصد و DVD ۶۶/۶۷ درصد کمتر بود (شکل 1D).



شکل ۱. سطوح پروتئینی Beclin-1، Bax، Bcl-2 و نسبت Bax/Bcl-2 در بافت قلب موش‌های صحرایی القاشده به دیابت نوع دو. (NC): کنترل سالم، (DC): کنترل دیابتی، (DAT): دیابت+ تمرین هوازی، (DVD): دیابت+ تزریق ویتامین د۳ و (DVDAT): دیابت+ تمرین هوازی+ تزریق ویتامین د۳. (*): معناداری نسبت به گروه کنترل سالم، ($): معناداری نسبت به گروه کنترل دیابت، (†): معناداری نسبت به گروه تمرین هوازی و (‡): معناداری نسبت به گروه تزریق ویتامین د۳.

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر با هدف بررسی درهمکنشی بین اتوفاژی و آپوپتوز در بافت قلب موش‌های صحرایی القاشده به دیابت نوع دو در تعامل تمرین هوازی و تزریق ویتامین د۳ انجام گرفت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دیابت نوع دو موجب اتوفاژی و آپوپتوز بیش‌فعال‌شده در بافت قلب شد که این از طریق افزایش سطوح پروتئین‌های Beclin-1، Bax و کاهش Bcl-2 مشخص

شد که با نتایج پژوهش‌های قبلی (۱۷، ۲۶) همسو بود. همچنین گزارش شده است که اتوفاژی در دیابت نوع دو مختل شده و موجب اختلال در سوخت‌وساز لیپید و حساسیت به انسولین می‌شود (۲۸). ازاین‌رو تقویت اتوفاژی یکی از راهبردهای مؤثر در درمان دیابت نوع دو به‌شمار می‌رود (۲۹). به‌تازگی در پژوهشی گزارش شد که تقویت اتوفاژی از طریق پروتئین القاگر اتوفاژی Beclin-1 و تحریک ترشح آدیپونکتین در بافت چربی، حساسیت به انسولین را بهبود می‌بخشد (۳۰). از طرفی، تحقیقات محدودی نشان داده‌اند که دیابت نوع دو موجب فعال شدن بیش‌ازحد سطوح پایهٔ اتوفاژی می‌شود (۱۷) که سازوکارهای درگیر در آن هنوز به‌طور دقیق روشن نشده‌اند. با این همه، اتوفاژی بیش‌ازحد می‌تواند به مرگ سلولی اتوفاژیک منجر شود، جایی که محتویات سلولی بیش‌ازحد تخریب می‌شود، در نتیجه می‌تواند زمینه‌ساز همبستگی بین اتوفاژی بیش‌ازحد و آپوپتوز باشد که از طریق نقش پروتئین Bcl-2 به‌عنوان یک پروتئین ضدآپوپتوزی، در مهار اتوفاژی و آپوپتوز مشخص شده است (۳۱). آپوپتوز در واقع به‌عنوان فرایند مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلولی، توسط انواع پیام‌رسانی درون‌سلولی، مانند فشار شبکهٔ آندوپلاسمی، القای مواد سمی، تحریک ریزجانداران بیماری‌زا و آسیب DNA، القا می‌شود (۳۲).

در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد که تمرین ورزشی هوازی موجب کاهش سطوح Beclin-1، Bax و افزایش Bcl-2 در بافت قلب شد که با نتایج تحقیقات گاوو و همکاران (۳۳)، زنگنه و همکاران (۳۴)، رودریگز و همکاران (۳۵) همسو و با نتایج پژوهش‌های لیو و همکاران (۳۶) و جعفری و همکاران (۳۷) ناهمسو بود. تمرین هوازی می‌تواند بیان پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی را در بافت قلب موش‌های صحرایی القاشده به دیابت نوع دو تنظیم کند (۱۷). Beclin-1 تنظیم‌کنندهٔ حیاتی اتوفاژی است که در تولید فاگوزوم‌ها به‌منظور القای اتوفاژی نقش مهمی دارد. از طرفی، اثبات شده است که Beclin-1 نقش مهمی در ارتباط اتوفاژی و مرگ سلولی از طریق پروتئین‌های تنظیمی آپوپتوز شامل Bax و Bcl-2 ایفا می‌کند (۳۸).

علاوه بر این، پیوندهای ناگسستنی بین اتوفاژی و آپوپتوز از طریق مولکول‌های کلیدی در اتوفاژی و آپوپتوز از جمله Beclin-1 و Bcl-2 در تنظیم مسیرهای درگیر در القای اتوفاژی و آپوپتوز برقرار می‌شود (۳۹)، این تعامل به‌گونه‌ای است که پروتئین ضدآپوپتوز، Bcl-2، اتوفاژی بیش‌ازحد را از طریق غیرفعال کردن Beclin-1 در قلب مهار می‌کند. با این همه، کاهش سطوح پروتئین‌های Beclin-1 و Bax در موش‌های صحرایی تمرین‌کردهٔ هوازی در بافت قلب احتمالاً نشان‌دهندهٔ نقش تنظیم کاهشی تمرین هوازی در اتوفاژی بیش‌ازحد و آپوپتوز ناشی از آن است. این در حالی است که در گروه موش‌های صحرایی دریافت‌کنندهٔ ویتامین د۳ نیز کاهش ۳۱/۸۸ درصد در سطوح Beclin-1، ۲۰/۸۱ درصد در سطوح Bax و افزایش ۳۱/۱۷ درصد در سطوح Bcl-2 نسبت به گروه کنترل دیابت دیده شد. گزارش شده است که مکمل‌سازی ویتامین د۳ از طریق کاهش سطوح Bax و افزایش Bcl-2 نقش مهمی در حفظ و بقای سلول و تنظیم التهاب وابسته به مسیر NF-kb ایفا می‌کند (۴۰). اخیراً در خصوص نقش ویتامین د۳ در تنظیم کاهشی اتوفاژی بیش‌ازحد نیز گزارش شده است که ویتامین د۳ موجب کاهش سطوح Beclin-1 در اتوفاژی بیش‌ازحد بطن چپ موش‌های صحرایی القاشده به دیابت نوع دو شد. با این همه، گمان می‌رود که در پژوهش حاضر نیز تزریق ویتامین د۳ همانند تمرین هوازی از طریق کاهش سطوح beclin-1 و Bax و همچنین افزایش Bcl-2 نقش مهمی در برقراری تعامل سازنده بین اتوفاژی و اپوپتوز ایفا می‌کند. افزون بر این، نتایج نشان داد که تعامل تمرین هوازی و تزریق ویتامین د۳ موجب کاهش

بیشتر در سطوح Beclin-1 (۶۵/۲۲ درصد)، Bax (۵۴/۹۱ درصد) و افزایش بیشتر Bcl-2 (۱۲۵/۹۷ درصد) نسبت به گروه‌های تمرین هوازی و تزریق ویتامین د۳ شد که این احتمالاً به‌واسطهٔ تأثیرات هم‌افزایی ناشی از تمرین هوازی و تزریق ویتامین د۳ در کاهش اتوفاژی و اپوپتوز بیش‌ازحد در بافت قلب موش‌های صحرایی القاشده به دیابت نوع دو است.

در پژوهش حاضر همچنین نشان داده شد که سطوح سرمی گلوکز و شاخص مقاومت به انسولین در گروه‌های مداخله شامل تمرین هوازی و ویتامین د۳ و تعامل هر دو نسبت به گروه کنترل دیابت نوع دو کاهش معناداری داشت. یکی از سازوکارهای احتمالی درگیر در این زمینه کاهش گلوکوتوکسیسیته در بافت قلب است، چراکه بهبود سوخت‌وساز گلوکز و مقاومت به انسولین ناشی از تمرین هوازی و تزریق ویتامین د۳، موجب کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و التهاب می‌شود و از این طریق آسیب ناشی از دیابت بر بافت قلب کاهش می‌یابد (۴۱). هرچند برای بررسی بیشتر در این زمینه، لازم است پژوهش‌های بیشتری با تمرکز بر مسیرهای پیام‌رسانی احتمالی درگیر در اتوفاژی و آپوپتوز بیش‌ازحد در بافت قلب موش‌های صحرایی القاشده به دیابت نوع دو انجام گیرد. افزون بر این، حذف اجزای آسیب‌دیده و ارتقای بقای سلول از طریق اتوفاژی تعدیل می‌شوند و آپوپتوز به‌ترتیب به حفظ هومئوستاز سلولی کمک می‌کنند و این می‌تواند به بهبود سوخت‌وساز گلوکز و مقاومت به انسولین کمک کند. از طرفی تنظیم مناسب اتوفاژی، تضمین‌کنندهٔ استفادهٔ بهینه از ذخایر انرژی سلولی است و همچنین کاهش آپوپتوز، نقش مؤثری در سلامت سلول‌های مصرف‌کنندهٔ انرژی دارد. بهبود سلامت متابولیک از طریق کنترل بهتر گلوکز از فرایندهای اتوفاژی و آپوپتوز با کاهش فشار سوخت‌وسازی بر سلول‌های قلب پشتیبانی می‌کند (۴۲).

تغییرات دیده‌شده در سطوح پروتئین Beclin-1، Bax و Bcl-2 به‌واسطهٔ تمرین هوازی و تزریق ویتامین د۳، به آبشاری از سازوکارهای سلولی مفید در بافت قلب منجر می‌شود. این موارد شامل کاهش اتوفاژی بیش‌ازحد، کاهش آپوپتوز، بهبود حساسیت به انسولین و سوخت‌وساز بهتر گلوکز است. این سازوکارها با هم، عملکرد قلب را حفظ می‌کنند، یکپارچگی بافت قلب را افزایش می‌دهند و سلامت کلی قلب را در زمینهٔ دیابت نوع دو بهبود می‌بخشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت محترم پژوهش، تحقیقات و فناوری دانشگاه کردستان جهت تصویب طرح و جناب آقای دکتر شمس‌الدین احمدی، مسئول آزمایشگاه سلولی مولکولی گروه زیست‌شناسی دانشگاه کردستان اعلام می‌کنند.

حمایت مالی

پژوهش حاضر هیچ‌گونه حمایت مالی از سازمان خاصی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان به‌طور یکسان در این تحقیق مشارکت داشتند.

تعارض منافع

نویسندگان پژوهش هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع

1. You S, Zheng J, Chen Y, Huang H. Research progress on the mechanism of beta-cell apoptosis in type 2 diabetes mellitus. Frontiers in Endocrinology. 2022 Aug 18;13:976465.

2. Packer M. Autophagy-dependent and-independent modulation of oxidative and organellar stress in the diabetic heart by glucose-lowering drugs. Cardiovascular Diabetology. 2020;19(1):62.

3. Golpasandi, Abdullahpour S, Golpasandi H. High-intensity interval training combined with saffron supplementation modulates stress-inflammatory markers in obese women with type 2 diabetes Research in Exercise Nutrition 2022, May 22; 1(1): 55-61 https://www.researchinexercisenutrition.com /article_62277.html?lang=en.

4. Dewanjee S, Vallamkondu J, Kalra RS, John A, Reddy PH, Kandimalla R. Autophagy in the diabetic heart: a potential pharmacotherapeutic target in diabetic cardiomyopathy. Ageing research reviews. 2021;68:101338.

5. Wang L-h, Wang Y-y, Liu L, Gong Q. From diabetes to diabetic complications: Role of autophagy. Current Medical Science. 2023;43(3):434-44.

6. Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. Circulation research. 2007;100(6):914-22.

7. Das S, Shukla N, Singh SS, Kushwaha S, Shrivastava R. Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer. Apoptosis. 2021:1-22.

8. Faraji H, Rahimi MR, Taeimouri S. The Effect of Salvia Officinalis Extract on P53 and Creatine Kinase Levels in Downhill Running: A Crossover Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Study. Research in Exercise Nutrition. 2022;1(1):23-9.

9. Gordy C, He Y-W. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? Protein & cell. 2012;3:17-27.

10. Yao Q, Ke Z-q, Guo S, Yang X-s, Zhang F-x, Liu X-f, et al. Curcumin protects against diabetic cardiomyopathy by promoting autophagy and alleviating apoptosis. Journal of molecular and cellular cardiology. 2018;124:26-34.

11. Yang J, Yao S. JNK-Bcl-2/Bcl-xL-Bax/Bak pathway mediates the crosstalk between matrine-induced autophagy and apoptosis via interplay with beclin 1. International journal of molecular sciences. 2015;16(10):25744-58.

12. Maejima Y, Kyoi S, Zhai P, Liu T, Li H, Ivessa A, et al. Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. Nature medicine. 2013;19(11):1478-88.

13. Kessel DH, Price M, Reiners J, John J. ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage. Autophagy. 2012;8(9):1333-41.

14. Dethlefsen MM, Halling JF, Møller HD, Plomgaard P, Regenberg B, Ringholm S, Pilegaard H. Regulation of apoptosis and autophagy in mouse and human skeletal muscle with aging and lifelong exercise training. Experimental Gerontology. 2018;111:141-53.

15. Andreotti DZ, Silva JdN, Matumoto AM, Orellana AM, De Mello PS, Kawamoto EM. Effects of physical exercise on autophagy and apoptosis in aged brain: Human and animal studies. Frontiers in Nutrition. 2020;7:94.

16. Wang L, Wang J, Cretoiu D, Li G, Xiao J. Exercise-mediated regulation of autophagy in the cardiovascular system. Journal of Sport and Health Science. 2020;9(3):203-10.

17. Golpasandi H, Rahimi MR, Ahmadi S, Łubkowska B, Cięszczyk P. Effects of Vitamin D3 Supplementation and Aerobic Training on Autophagy Signaling Proteins in a Rat Model Type 2 Diabetes Induced by High-Fat Diet and Streptozotocin. Nutrients. 2023;15(18):4024.

18. Azali Alamdari K, SatarZadeh R. Impact of Aerobic Training and Vitamin D Supplementation on Hunger Rate and Serum Ghrelin and Insulin in Middle Agead Females with Metablic Syndrome. Research in Exercise Nutrition. 2022;1(1):13-1. Doi: https://www.researchinexercisenutrition.com/article_62074.html?lang=en.

19. Chen X, Arias Z, Omori K, Yamamoto T, Shinoda-Ito Y, Takashiba S. Autophagy as a potential mechanism underlying the biological effect of 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 on periodontitis: a narrative review. BMC Oral Health. 2023;23(1):90.

20. Ali TM, Abo-Salem OM, El Esawy BH, El Askary AJTAjotms. The potential protective effects of diosmin on streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats. 2020;359(1):32-41.

21. Kanter M, Aksu F, Takir M, Kostek O, Kanter B, Oymagil AJE, et al. Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in Streptozotocin-induced diabetic rat heart. 2017;125(09):583-91.

22. Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Oppliger RA, Gisolfi CV. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. Journal of Applied Physiology. 1979;47(6):1278-83.

23. Machado MV, Martins RL, Borges J, Antunes BR, Estato V, Vieira AB, Tibirica E. Exercise training reverses structural microvascular rarefaction and improves endothelium-dependent microvascular reactivity in rats with diabetes. Metabolic syndrome and related disorders. 2016;14(6):298-304.

24. Mehdipoor M, Damirchi A, Razavi Tousi SMT, Babaei P. Concurrent vitamin D supplementation and exercise training improve cardiac fibrosis via TGF-β/Smad signaling in myocardial infarction model of rats. Journal of physiology and biochemistry. 2021;77:75-84.

25. Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. Archives of endocrinology and metabolism. 2016;60:138-42.

26. Golpasandi H, Rahimi M, Ahmadi S. Combined Effects of Vitamin D3 Supplementation and Aerobic Training on Cardiac Cathepsin D and Insulin Resistance in Diabetic Rats Induced by High-fat Diet and Streptozotocin. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2023;24(6):362-72.

27. Madonna R, Moscato S, Cufaro MC, Pieragostino D, Mattii L, Del Boccio P, et al. Empagliflozin inhibits excessive autophagy through the AMPK/GSK3β signalling pathway in diabetic cardiomyopathy. Cardiovascular Research. 2023;119(5):1175-89.

28. Zhang K. "NO" to autophagy: fat does the trick for diabetes. Diabetes. 2018;67(2):180.

29. Sehrawat A, Mishra J, Mastana SS, Navik U, Bhatti GK, Reddy PH, Bhatti JS. Dysregulated autophagy: A key player in the pathophysiology of type 2 diabetes and its complications. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-molecular basis of Disease. 2023;1869(4):166666.

30. Kuramoto, K., Kim, Y.J., Hong, J.H. and He, C., 2021. The autophagy protein Becn1 improves insulin sensitivity by promoting adiponectin secretion via exocyst binding. Cell reports, 35(8).

31. Luo S, Rubinsztein DC. BCL2L11/BIM: a novel molecular link between autophagy and apoptosis. Autophagy. 2013;9(1):104-5.

32. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. Brazilian Journal of Biology. 2020;81:1133-43.

33. Gao L, Liu F, Liu R. The mechanism of aerobic exercise regulating the PI3K/Akt-mTOR signaling pathway intervenes in hippocampal neuronal apoptosis in vascular dementia rats. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2023;20(3):1893.

34. Zanganeh F, Farzanegi P, Asgharpour H. Effect of Exercise Training and Atorvastatin Supplementation on Beclin1, LC3-I and LC3-П Expression in Old Diabetic Rats. Medical Laboratory Journal. 2022 Jan 1;16(1).

35. Rocha-Rodrigues S, Gonçalves IO, Beleza J, Ascensão A, Magalhães J. Effects of endurance training on autophagy and apoptotic signaling in visceral adipose tissue of prolonged high fat diet-fed rats. European journal of nutrition. 2018;57:2237-47.

36. Liu W, Wang Z, Xia Y, Kuang H, Liu S, Li L, et al. The balance of apoptosis and autophagy via regulation of the AMPK signal pathway in aging rat striatum during regular aerobic exercise. Experimental Gerontology. 2019;124:110647.

37. Jafari A, Zarghami Khameneh A, Nikookheslat S, Karimi P, Pashaei Z. Effects of Two Months of High Intensity Interval Training and Caffeine Supplementation on the Expression of Beclin-1 and Bcl-2 Proteins in the Myocardium of Type 2 Male Diabetic Rats. Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology. 2021;8(2):83-91.

38. Xu H-D, Qin Z-H. Beclin 1, Bcl-2 and autophagy. Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science. 2019:109-26.

39. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. Cell. 2005;122(6):927-39.

40. Huang D, Guo Y, Li X, Pan M, Liu J, Zhang W, Mai K. Vitamin D 3/VDR inhibits inflammation through NF-κB pathway accompanied by resisting apoptosis and inducing autophagy in abalone Haliotis discus hannai. Cell Biology and Toxicology. 2021:1-22.

41. Turkmen K. Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the Apocalypse. International urology and nephrology. 2017;49:837-44.

42. Yang J, Zhou R, Ma Z. Autophagy and energy metabolism. Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science. 2019:329-57.