Research Paper

The Effect of High Intensity Interval Training on Serum TNF-α Levels and FOXO1 Gene Expression of Hippocampus in Male Diabetic Wistar Rats

Soudabeh Rezaei[1], Neda Khaledi[*2]

1. Master Student of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2. Associate Professor in Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Received: 2019/03/10 **Accepted:** 2019/06/10

Abstract

Introduction: Increasing the expression of FOXO1 gen in hippocampus as well as inflammatory factor of TNF-α in diabetic individual's causes the expression of genes involved in apoptosis and disrupts its performance. The aim of the present study was investigation of the effect of 6-weeks HIIT on FOXO1 gene expression in the hippocampus and level of serum TNF-α in male Wistar diabetic rats.

Materials and Methods: For this study, 48 male Wistar rats (4 weeks old) with 150±10 g weight were categorized in 4 groups of (n=12): diabetic rats, exercise diabetic, control and exercise control. For induction of diabetes, peritoneal injection of STZ solution (50 mg/kg) was used. After a week of familiarization with the environment and practice, HIIT protocol consisted of 3 days per week for 6 weeks with 50% to 110% of maximum oxygen consumption was performed. 24 hours after the completion of the exercise, the functional test was taken and the animals were autopsy 48 hours after the functional test. FOXO1 gene expression was evaluated using Real Time PCR technique.

Results: Regarding the results, HIIT significantly decreased FOXO1 gene expression in training groups (P≤0.01). Also, TNF-α protein decreased significantly (P≤0/05). Weight gain of the hippocampus was associated with a reduction in the FOXO1 gene in the diabetic training group.

Conclusion: HIIT probably reduce the weight loss of the hippocampal tissue that caused by diabetes, by reducing the FOXO1 apoptotic and inflammatory factors of TNF-α.

***Corresponding Author:** Neda Khaledi
Address: Associate professor in exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
E-mail: n.khaledi@khu.ac.ir

Keywords: High Intensity Interval Training, TNF-α، Apoptosis, Time to exhaustion, Neuronal loss

How to cite this article: Rezaei S., Khaledi N. The Effect of High Intensity Interval Training on Serum TNF-α Levels and FOXO1 Gene Expression of Hippocampus in Male Diabetic Wistar Rats, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2021; 28(4):688-699.

Copyright © 2021 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

Introduction

Diabetes mellitus is considered as a serious metabolic problem in the world. Type 2 diabetes are characterized by hyperglycemia, insulin resistance, and relative insulin deficiency. Based on the results of recent studies, high levels of glucose are regarded as the main reason of damage to the nervous system. Hippocampus is a part of limbic system which is an important learning and memory center and its neurons are extremely vulnerable to diabetes. Lower hippocampal and brain volume are likely to happen in T2DM.

Several proteins and genes are involved in the pathway for apoptosis or the programmed cell death, and some studies indicated that the activation of FOXO transcription factors can signal the expression of genes involved in apoptosis. FOX transcription factors which is related to the subgroup O (FOXO) include four isoforms (FOXO 1,3,4,6) in mammals. FOXO's function is associated with many human diseases such as cancer and diabetes. FOXO1 is expressed in almost all tissues and is considered as a regulator for cell death during insulin resistance and diabetes. Many physiological changes in diabetes mellitus occur in the brain such as inflammation, insulin resistance, and decrease in neurogenesis in the hippocampus. Inflammation in the brain is a defensive response which can cause neuronal loss. Furthermore, inflammatory mediators such as cytokines (TNF-α) play an important role in increasing their levels, insulin resistance, and trigged apoptosis. Exercise training increases fitness, improves glycemic, and decreases insulin resistance in patients with type 2 diabetes. Evidence suggests that exercise may prevent nerve cell death, stimulate neurogenesis in the hippocampus, and improve memory and learning. FOXO1 is expressed in almost all tissues and is considered a regulator of cell death during insulin resistance and diabetes.

Kuga et al. reported the positive effects of exercise on reducing inflammation, increasing insulin sensitivity and expressing growth factors like BDNF in hippocampal neurons by focusing their study on hippocampal insulin signaling and neuroprotection mediated by physical exercise in Alzheimer´s disease. In addition, they demonstrated exercising can prevent cell death through decreasing the activity of FOXO1, especially in the hippocampus region. However, a large body of research indicated the positive effects of exercise on diabetes and brain. However, no agreement was observed between intensity, volume, or type of exercise. By considering the above studies, few studies were conducted on the neuroprotective effects of high intensity interval training on hippocampal neurons. Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of HIIT on FOXO1 gene expression in hippocampus and TNF-α of individuals with type 2 diabetes.

Methodology

Ethical consideration

The present study was reviewed by the Animal Ethics Committee of Sport Science Research Institute. In addition, the Ministry of Science and Technology confirmed the ethical research standards with the approval code of IR.SSRI.REC.1397.305.

Animals

The animals used in this experimental study were Wistar rats. To this aim, 24 male rats (weight= 165±5 gr) were selected from Pastoor Institute in IRAN. The study begins with one-week acclimatization in order to allow the rats to become familiar with their new surroundings which was environmentally controlled (55 ± 5 humidity,20 ± 5 °C temperature),12-12 H light-dark cycle (lights on 6:00–18:00 hours).Then, the rats were randomly divided into two groups of 12. one group participated in the exercise training including diabetes high intensity interval training (DIIT). However, the other group Diabetes (D) had no exposure to any physical activity.

Induction of Type 2 Diabetes

For inducing hyperglycemic and insulin resistance diabetic rats were exposed to high fat diet for the first 4 weeks including 22% fat, 48% carbohydrates, and 20% protein from Razi Institute of Dermatology in IRAN. Type 2 diabetes mellitus was induced by dissolving STZ (50 mg/kg, i.p.; Sigma) in a citrate buffer (pH 4.5) and injected in each rat. Then, the blood samples from the tail were obtained 24 hours after the injection. The blood glucose meter (Beurer GL42, Germany) measured the glucose levels to determine the rats are diabetic (>250 mg/d).

Quantitative RT- PCR

Quantitative RT-PCR is applied to detect gene expression quantitatively, which consists of synthesizing cDNA from RNA by reverse transcription, and amplifying a specific cDNA by a polymerase chain reaction(PCR).The first strand cDNA synthesis was performed using a transcription Kit(Maxcell).The relative expression levels of FOXO1 via Real-time & PCR(real-time&PCR kit

Measurement of Serum TNF-α

Serum levels of TNF-α were measured by using a spectrophotometric assay by a commercial kit (ZellBio, GmbH, and Veltlinerweg, Germany) with sensitivity less than 15 pg/ml and TNF Intra-assay CVs were 6.1%.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed through MSTATC software. The normality of the data was determined by Bartlet test. In the present study, 2-ΔΔCt was considered as the point of estimation ratio (Yuan et al., 2006) according to User Bulletin 2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. MRNA expression (fold change) showed by ratio ± Semite. In addition, Fisher test was run to find the ratio of variance and Bonferroni post hoc test was utilized to confirm the differences.

Experimental procedure

High intensity interval training

The HIIT started after the animals were acclimatized and familiarized with the exercise training with the intensity of 30-50% of VO2max within a three-day period. The repetition during the three sessions ranged from 6 to 8 in one minute with a 2-min rest period between the sets. As shown in Table 1, the main HIIT protocol was progressive during six weeks (3 sessions a week) (50-110% VO2max).The HIIT started with a 5-min warm-up (45- 50% VO2max).The rats performed 10 repetitions of a 1-min run. However, the speed and degree of incline varied from week to another week (1st =50 to 60%vo2max /2◦incline,2nd =65-75% vo2max /4◦ incline, 3rd= 75 to 85% vo2max /6 incline ◦, 4th =85 to 95% vo2max /8◦ incline,5th =90 to 100% vo2max /10 incline◦ 6th =100 to 110% vo2max /10◦ incline), and 2- min inactive rest time between the sets.

Result

The present study was conducted to evaluate the expression of FOXO1, in male Wistar rats which were involved in diabetes. In addition, RT-PCR was used to measure the expression of genes in the present study, which is a periodic exercise. Significant effects were observed on the expression of FOXO1 in the brain hippocampus. Further, a significant difference is observed at the level of FOXO1 expression in the diabetes and DIIT groups (0.001130). In other words, the expression of FOXO1 expression in the DIIT group decreased significantly.

In addition, after six weeks of HIIT, serum levels of TNF-α inflammatory factors were significant. As shown in Figure 4, a significant difference is observed in TNF-α expression between D and DIIT groups. In other words, the serum levels of TNF-α in the D group increased significantly while it decreased in the DIIT group. Further, a significant difference was reported between D and DIIT groups (0.000).

Discussion

The results of this study show that exercise increased hippocampal weight along with decreased expression of FOXO1 gene as an apoptotic factor in the diabetic group, intense intermittent exercise and also decreased TNF-α protein expression. Due to the changes in the weight of the hippocampus between the diabetic group and severe periodic diabetes, we see that the hippocampal weight has increased in the severe periodic diabetes group compared to the diabetic group. Also, the hippocampal weight of rats in the severe periodic group is slightly different from that in severe periodic diabetes. Therefore, it can be said that intense periodic exercise has probably reduced the effect of apoptotic factors, which has prevented the analysis and weight loss of the hippocampus, even in the case of diabetes. Many studies. have had consistent results with the present study, which show that intense intermittent exercise has increased the volume of nerve cells in the brain and hippocampus. As a result, as shown in studies, exercise increases the electrical activity of the hippocampus and increases the neuronal density of the hippocampus without changing the rate of apoptosis or decreasing apoptosis.

One of the possible mechanisms to reduce apoptosis and the genes involved in it is exercise.

Exercise intervention is thought to modulate the apoptotic factor FOXO1 in the hippocampus and ultimately help preserve nerve cells. Intense exercise increases the activity of the AKT protein and, with its insulin-like properties, increases insulin sensitivity and prevents the activation of FOXO1. One of the causes of neuroprotection is the decrease in FOXO1 activity. One of the most important regulators of FOXO is the Akt protein. The AKT protein increases the phosphorylation of FOXO1 and inactivates it and directs it out of the nucleus, thus protecting cells in acute conditions and neuroinflammation. On the other hand, FOXO protein increases the gene expression of glycogen phosphatase, which increases glycogenolysis in the liver and raises blood glucose levels.

Considering the changes in the hippocampus weight between the diabetes and DIIT groups, the hippocampus weight in the DIIT group increased. The results of the present study were consistent with some other research. Therefore, HIIT increases the level of electrical activity of the hippocampus without any change in the amount of apoptosis to increase neuronal density of the hippocampus or decrease the density. In fact, HIIT increases nerve growth factors and prevents hippocampal weight loss even in diabetic conditions to some extent. Further, some diseases such as Alzheimer's, schizophrenia, and diabetes are associated with apoptosis levels. It has been reported that pre-preparation with exercise causes the incremental regulation of anti-apoptotic proteins, simultaneous reduction of pre-apoptotic proteins, and increase in the ratio of antiapoptotic proteins in order to reduce apoptosis and increase neuronal survival.

Further, exercise intervention modulates the FOXO1 apoptotic factor in hippocampus and ultimately helps maintain nerve cells. Furthermore, intense exercise increases the activity of the AKT[1] and insulin-like protein, increases insulin sensitivity, and prevents the activation of FOXO1and CASPASE-3. On the other hand, FOXO protein enhances the glycogen phosphatase gene expression which increases glycogenolysis in the liver and raises blood glucose levels. Regarding the effects of sports activities on FOXO1 levels, a short period of aerobic training for 5 consecutive days (60 minutes at a speed of 30 m/min with zero slope) resulted in reducing FOXO1 in cardiac muscle and soleus of mice. In another study demonstrated exercising can prevent cell death through decreasing the activity of FOXO1, especially in the hippocampus region. Also, HIIT reduced fasting blood sugar and insulin levels, and increased insulin sensitivity among the people with type II diabetes compared to moderate-intensity continuous training.

The results of the present study indicated that HIIT plays a significant effect on reducing the serum TNF-α in rats with diabetes, leading to a significant increase in TNF-α in the diabetes group, compared to the DIIT group. Research indicated that TNF-α is reduced in the exercise effect. The results of these studies are line with those in the present study. However, since the practice of this study is severe in response after a session, it increases the inflammatory factor of TNF-α, although it seems that the adaptation to exercise decreases or increases serum levels of TNF-α. The results indicate that factors such as the characteristics of the training program including the intensity and duration of activity, type of training program, and length of time of exercise program can be effective in TNF-α changes. Further, a negative relationship was observed between the expression of TNF-α (r=-0.87).

Conclusions

Based on the results, the DIIT group improved in neurogenicity, which is probably related to the effects of HIIT adaptation in reducing apoptotic factors. Furthermore, an improvement occurred in the level of insulin secretion in the DIIT, compared to the diabetic group. The level of TNF-α expression, which is a pro-inflammatory and apoptotic factor, reduced by HIIT. By reducing the factors such as oxidative stress, inflammation, as well as increasing neurotrophin secretion and neurotropin, and the beneficial effects of exercise on the structure and function of the brain, especially the diabetic hippocampus, are at risk of injury. This type of exercise should be implemented in people with diabetes in order to improve performance.

1 Protein kinase B

Acknowledgment

We would like to thank all those who helped us in this research. We would also like to show our gratitude to the anonymous reviewers for their so-called insights.

Conflict Of Interest: We, the authors of the article, declare that we have no mutual interest in writing or publishing this article.

مقاله پژوهشی

تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید بر مقادیر سرمی TNF-α و بیان ژن FOXO1 هیپوکمپ موش‌های صحرایی دیابتی نر نژاد ویستار

سودابه رضایی[1]، ندا خالدی[2*]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲. استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۰

* نویسندهٔ مسئول: ندا خالدی
نشانی: دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
رایانامه: n.khaledi@khu.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0002-3859-513X
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-0393-4402

چکیده

زمینه و هدف: افزایش بیان ژن FOXO1 در هیپوکمپ و همچنین عامل التهابی TNF-α در افراد دیابتی باعث بیان ژن‌های درگیر در آپوپتوزشده و سبب تخریب عملکرد اجرایی آن می‌شود. هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن FOXO1 در هیپوکمپ و میزان سرمی TNF-α موش‌های صحرایی دیابتی نر ویستار بود.

مواد و روش‌ها: برای این مطالعه، تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر ویستار (۴ هفته‌ای) با وزن ۱۰±۱۵۰ گرم در ۴ گروه ۱۲ تایی: موش‌های دیابتی، دیابت تمرین، کنترل و کنترل تمرین دسته‌بندی شدند. به‌منظور القای دیابت از روش تزریق صفاقی محلول STZ (۵۰ mg/kg) استفاده گردید. پس از یک هفته آشناسازی با محیط و تمرین، پروتکل تمرین تناوبی شدید شامل ۳ روز تمرین در هفته به مدت ۶ هفته با شدت ۵۰ تا ۱۱۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی انجام شد. ۲۴ ساعت بعد از اتمام تمرین، آزمون عملکردی گرفته شد و ۴۸ ساعت پس از آزمون عملکردی، حیوانات تشریح شدند. بیان ژن FOXO1 با استفاده از تکنیک Real Time PCR ارزیابی گردید.

یافته‌ها: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده تمرین تناوبی شدید باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن FOXO1 در گروه‌های تمرین شد ($P\leq0/01$). همچنین پروتئین TNF-α به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P\leq0/05$). افزایش وزن هیپوکمپ همراه با کاهش ژن FOXO1 در گروه دیابت تمرین تناوبی شدید مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های پژوهش تمرین تناوبی شدید احتمالاً با کاهش عوامل آپوپتوزیFOXO1 و التهابی TNF-α از کاهش وزن بافت هیپوکمپ که بر اثر دیابت اتفاق می‌افتد، جلوگیری می‌کند.

کلیدواژه‌ها:
تمرین تناوبی شدید، TNF-α، آپوپتوز، زمان رسیدن به واماندگی، تحلیل عصبی

مقدمه

دیابت ملیتوس، شایع‌ترین مشکل متابولیکی در سراسر جهان می‌باشد. دیابت با هایپرگلیسمی ناشی از دسترسی نداشتن به انسولین یا کاهش حساسیت سلول‌ها به آن و با آسیب پیش‌رونده به ارگان‌هایی مانند چشم، کلیه، رگ‌های خونی، قلب و نیز رگ‌های محیطی و مغز همراه است (۱). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که غلظت بالای گلوکز، علت اصلی آسیب به سیستم عصبی می‌باشد. هیپوکمپ یک مرکز مهم در یادگیری و حافظه می‌باشد و نورون‌های آن در دیابت فوق‌العاده آسیب‌پذیر هستند (۲). نقص در حافظه و یادگیری در افراد دیابتی، شایع‌تر از افراد غیردیابتی گزارش شده است (۳). آپوپتوز به‌عنوان سازوکار احتمالی سمیت عصبی گلوکز مطرح شده است (۴). در مسیر آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، پروتئین و ژن‌های متعددی نقش دارند و مطالعات نشان داده است که فعال شدن عوامل رونویسی FOXO می‌تولند باعث بیان ژن‌های درگیر در

Copyright © 2021 Sabzevar University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution- Non Commercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Published by Sabzevar University of Medical Sciences.

آپوپتوز شود(۵). فاکتورهای رونویسی FOX که متعلق به زیرگروه O هستند (FOXO)، شامل چهار ایزوفرم (FOXO1,3,4,6) در پستانداران می‌باشد. عملکرد FOXO با بسیاری از بیماری‌های انسانی مانند سرطان و دیابت ارتباط دارد (۶). FOXO1 تقریباً در تمام بافت‌ها بیان می‌شود و به‌عنوان یک تنظیم‌کننده در مرگ سلولی در هنگام مقاومت به انسولین و دیابت در نظر گرفته می‌شود.

با توجه به میزان وقوع دیابت نوع ۱و ۲ در سراسر جهان انتظار می‌رود که سرعت افزایش دیابت نوع ۲ به دلیل شیوع چاقی و کاهش میزان فعالیت بدنی بیشتر باشد. شواهد نشان می‌دهد که فعالیت ورزشی ممکن است از مرگ سلول‌های عصبی جلوگیری کند، سبب تحریک نروژنز در هیپوکمپ شده و حافظه و یادگیری را بهبود می‌بخشد (۷). مطالعه مروری گابریل و همکاران (۲۰۱۷) بر سیگنالینگ انسولین و تأثیر تمرین ورزشی بر بیماری الزایمر نشان داد که هر نوع تمرین ورزشی با شدت کم، زیاد و مقاومتی در حفاظت عصبی مؤثر است. آن‌ها نشان دادند تمرین ورزشی با کاهش فعالیت FOXO1 سبب حفظ حیات سلول‌های عصبی خصوصاً در ناحیه هیپوکمپ می‌شود (۸). تغییرات فیزیولوژیک بسیاری در اثر دیابت در مغز همانند التهاب، مقاومت به انسولین و کاهش نروژنز در هیپوکمپ به‌وجود می‌آید (۹). التهاب در مغز، یک پاسخ دفاعی بدن است که می‌تواند سبب آسیب بافتی شود. این تغییرات پاتولوژیک با بسیاری از اختلالات عصبی مانند تحلیل عصبی مرتبط هستند (۱۰). واسطه‌های التهابی نظیر سایتوکین‌ها (TNF-α) نقش مهمی در التهاب سیستمیک دارند و افزایش سطح آنها موجب افزایش مقاومت به انسولین می‌شود (۱۱). تومور نکروز الفا می‌تواند با باند شدن به TNFR1 (گیرنده تومور نکروز الفا) در قسمت جایگاه مرگ، بیان ژن‌های پیش آپوپتوزی را تحریک کند و سبب راه‌اندازی آپوپتوز شود (۱۲). از آنجایی که تأثیر تمرین تناوبی شدید بر مقادیر FOXO1 در افراد دیابتی بررسی نشده است؛ هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر تمرینات تناوبی شدید بر مقادیر FOXO1 هیپوکمپ موش‌های دیابتی می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر، تجربی و با طرح پیش‌آزمون و پس‌آزمون برای آزمون عملکردی می‌باشد. در این پژوهش ۴۸ سر موش صحرایی نر ویستار با سن ۴ هفته و میانگین وزنی ۱۰±۱۵۰ گرم از انیستو پاستور ایران خریداری شده بود و پس از دو هفته آشناسازی با محیط آزمایشگاه، به‌صورت تصادفی به ۴ گروه موش‌های دیابتی (n=12)، دیابت تمرین (n=12) ، کنترل (n=12) و کنترل تمرین (n=12) تقسیم شدند که به‌صورت چهارتایی در قفس‌های تیپ ۳ مخصوص جوندگان نگهداری شدند. برای رعایت نظافت قفس حیوانات از پوشال استریل که از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شده بود، استفاده شد. کلیه حیوانات در شرایط کنترل‌شده محیطی با میانگین دمای ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت نسبی ۳±۵۸ درصد نگهداری شدند.

موش‌های گروه دیابتی برای اعمال چاقی به مدت دو هفته اول تحت رژیم غذایی پرچرب شامل ۲۲ درصد چربی، ۴۸ درصد کربوهیدرات و ۲۰ درصد پروتئین تهیه‌شده از مؤسسه سرم‌سازی رازی قرار گرفتند (۱۳). پس از دوره استفاده از غذای پرچرب، برای القای دیابت در هر دو گروه از استرپتوزوتوسین به‌صورت تک‌دوز و به میزان ۵۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به روش تزریق داخل صفاقی استفاده شده بود (۱۴). ۴۸ ساعت پس از تزریق، برای اطمینان از ایجاد دیابت در موش‌ها، قطره‌های خون از ورید دمی اخذ و میزان قندخون توسط دستگاه گلوکومتر تعیین شد. قند خون بالای ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته شد (۱۵). در پژوهش حاضر به‌صورت دو هفته یک بار برای اطمینان، مقدار قند خون کنترل می‌شد.

در پژوهش حاضر برای کار با موش‌های صحرایی از ضوابط اخلاقی نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی کشور استرالیا استفاده شد. در تمامی مراحل کار، همواره این موارد مورد نظر بود. ضمناً این طرح در کمیته اخلاق پژوهشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی به شماره IR.SSRI.REC.1397.255 ثبت گردیده است.

پیش از شروع روش تمرینی در هفته چهارم که پس از القای دیابت بود، به‌منظور آشناسازی موش‌ها با روش تمرینی، موش‌ها با شدت ۳۰ تا ۵۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی (روز اول ۳۰ ،روز دوم ۴۰ و روز سوم ۵۰ درصد) و تعداد ۶ تا ۸ تکرار ۱ دقیقه‌ای (روز اول ۶ تکرار،روز دوم ۷ و روز سوم ۸ تکرار) به همراه ۲ دقیقه استراحت غیرفعال برای ۳ روز تمرین کردند و بلافاصله پس از آن وارد روش تمرینی شدند (میزان برآورد دقیق حداکثر اکسیژن مصرفی با توجه به دسترسی نداشتن به ابزار مستقیم مانند دستگاه تجزیه‌وتحلیل گازهای تنفسی با توجه به پژوهش‌های انجام شده اخیر Høyda و همکاران (۲۰۰۷)، پروتکل غیرمستقیم ولی با دقت زیاد مورد استفاده قرار گرفت. تمرین تناوبی شدید شامل ۳ روز تمرین در هفته به مدت ۶ هفته با شدت ۵۰ تا ۱۱۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی بود (جدول ۱).

جدول ۱. نمای کلی از برنامه انجام شده برای اجرای پژوهش

		هفته۱	هفته۲	هفته۳	هفته۴	هفته۵	هفته۶
آشناسازی با نوارگردان	آغاز پروتکل	۶۰-۵۰ درصد vo_2max شیب۲ درجه	۷۵-۶۵ درصد vo_2max شیب۴ درجه	۸۰-۷۵ درصد vo_2max شیب۶ درجه	۹۰-۸۵ درصد vo_2max شیب۸ درجه	۱۰۰-۹۰ درصد vo_2max شیب ۱۰درجه	۱۱۰-۱۰۰ درصد vo_2max شیب۱۰ درجه
آزمون عملکردی رسیدن به واماندگی و قند خون استراحت	آزمون عملکردی						
	آزمون تحمل قندخون و تغییرات انسولین						
	نمونه‌گیری						

نسبت استراحت به فعالیت ۱:۲، شامل ۱۰ تکرار و ۵ دقیقه گرم کردن (۴۰-۵۰ درصد vo_2max) در هر جلسه و در مجموع سه جلسه در هفته پروتکل تمرین تناوبی شدید اجرا شد.

گرم کردن موش‌ها با شدت ۴۵ تا ۵۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی به مدت ۵ دقیقه بود. سپس روش تمرینی شامل ۱۰ تکرار ۱ دقیقه‌ای دویدن روی نوار گردان با ۵۰ تا ۱۱۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی با شیب ۲ تا ۱۰ درجه که به‌صورت متناوب بین هر ۱ دقیقه ۲ دقیقه استراحت غیرفعال به موش‌ها داده می‌شد (۱۶). برای اندازه‌گیری آزمون تحمل قند خون موش‌ها در نوبت‌های منظم ناشتایی ۱۲ ساعته قرار گرفتند. قبل و بعد از ناشتایی، وزن و قند خون آنها اندازه‌گیری شد. پس از اعمال بیهوشی، با توجه به وزن هر موش در هنگام ناشتایی محلول گلوکز ۵۰ درصد به‌صورت صفاقی تزریق گردید و بلافاصله پس از تزریق از صفر تا ۱۲۰ دقیقه اندازه‌گیری قند خون ادامه یافت. پیش از هربار خون‌گیری، دم موش‌ها به مدت ۱-۲ دقیقه در آب ۴۰ درجه قرار گرفت. در انتهای آزمون به همه موش‌ها نیم سی‌سی محلول نرمال سالین تزریق شد تا غلظت خون آنها به حالت طبیعی برگردد.

آزمون عملکردی گروه‌های تمرینی شامل دویدن روی نوار گردان با شیب صفر درجه و سرعت اولیه ۱۰ متر بر دقیقه بود که به‌ازای هر ۲ دقیقه دویدن ۲ متر بر دقیقه به سرعت نوار گردان افزوده می‌شد تا جایی که موش‌ها به واماندگی رسیدند و قادر به ادامه آزمون نبودند (۱۷).

نمونه‌گیری و سنجش متغیرها: متغیرهای وابسته مورد پژوهش FOXO1 و TNF-α هستند. موش‌ها پس از بی‌هوشی با کتامین ۱۰ درصد (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلوزین ۲ درصد (۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و خون‌گیری مستقیم از قلب معدوم شدند. مغز به دو نیم‌کره راست و چپ تقسیم گردید، سپس از قسمت نیم‌کره راست مغز با استفاده از قاشقک هیپوکمپ جدا شد. پس از وزن کردن هیپوکمپ با ترازوی دیجیتال، بافت داخل کرایو قرار گرفت و در نهایت داخل کپسول ازت قرار داده شد تا زمانی که نمونه‌ها به یخچال با دمای ۸۵- درجه منتقل شود.

سنجش میزان تغییرات بیان ژن‌ها: استخراج RNA: RNA (اسید ریبونوکلئیک) کل با استفاده از کیت ترایزول (Trizol) ساخت کشور آلمان استخراج شد. نمونه‌های ذخیره شده در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد در هاون سرد ریخته شد و به کمک نیتروژن مایع کوبیده و به حالت پودری تبدیل شد. در مرحله بعدی به ویال‌های حاوی پودر نمونه‌های موردبررسی ۵۰۰ میکرولیتر از محلول کیت ترایزول اضافه شد. سپس ویال‌ها ۳۰ ثانیه با استفاده از دستگاه ورتکس و ۳۰ ثانیه با دستگاه هموژنایز با ۲۵۰۰ دور در دقیقه یکنواخت شدند. نمونه‌های استخراج‌شده برای استفاده بعدی در دمای منفی ۸۰ درجه قرار داده شدند.

تعیین کمی و کیفی مقدار اسید ریبونوکلئیک استخراج شده: به‌منظور بررسی کمیت و کیفیت اسید ریبونوکلئیک استخراج‌شده از دو روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. اسید ریبونوکلئیک استخراج شده با استفاده از دستگاه NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer شرکت Thermo Scientific ساخت کشور آمریکا غلظت‌سنجی شد.

تیمار اسید ریبونوکلئیک با آنزیم DNase I: پیش از ساخت cDNA، به‌منظور حذف آلودگی احتمالی اسید ریبونوکلئیک با دئوکسی‌ریبونوکلئیک‌اسید ژنومی، اسیدریبونوکلئیک استخراج شده توسط آنزیم DNase1 شرکت Fermentas ساخت کشور آمریکا تیمار شد. مواد، مقادیر و زمان هرکدام از مراحل، براساس پروتکل شرکت درآمده است.

برای تأیید خردنشدن اسید ریبونوکلئیک پس از تیمار با DNase1، مقدار ۴۰۰ نانوگرم از اسید ریبونوکلئیک‌های تیمار داده شده با آنزیم، روی ژل آگارز ۲ درصد جداسازی شدند و همچنین به‌منظور کمیت‌سنجی با روش UV اسپکتروفتومتری، نمونه‌ها توسط دستگاه Epoch micro-volume Spectrophotometer System شرکت BioTek

آمریکا و همچنین اسپکتروفتومتر نانودراپ طیف‌سنجی شدند.

ساخت cDNA: برای ساخت cDNA، نمونه‌هایی براساس کم‌غلظت‌ترین اسید ریبونوکلئیک‌ها، رقیق‌سازی شدند؛ به‌طوری که مقدار نهایی اسیدریبونوکلئیک در واکنش تقریباً ۸۸۰ نانوگرم بود. ساخت cDNA تک‌رشته‌ای با استفاده از کیت First Standard cDNA Synthesis (ساخت شرکت MXcell RNA) ساخت کشور آمریکا و به این شرح انجام شد: مخلوط کردن اسید ریبونوکلئیک (۸۸۰ نانوگرم) با یک میکرولیتر آغازگر Oligo Dt (مخلوط A) و حرارت دادن در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، افزودن بافر واکنش (حاوی ۱۰ میلی‌مول مخلوط dNTP) ۴ میکرولیتر، DTT (۸ میلی مولار) ۱ میکرولیتر. آنزیم Diastar RTase، ۱ میکرولیتر به مخلوط A و نهایتاً تنظیم حجم آب عاری از RTase تا حصول ۲۰ میکرولیتر حجم نهایی. مخلوط به‌دست‌آمده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه نگهداری شد. پس از به پایان رسیدن واکنش، نمونه‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شدند.

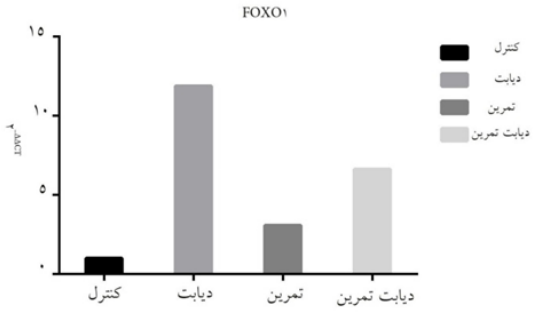
طراحی آغازگرهای اختصاصی: با رعایت شرایط زیر برای ژن‌های زیر آغازگرهای رفت و برگشتی، به کمک نرم‌افزار پرایمر ۳ و براساس توالی کدکننده ژن‌ها (CDS)، آغازگرهای انتخابی طراحی گردید. براساس طول آغازگر، شاخص‌های طراحی آغازگر بین ۲۰ تا ۲۵ نوکلئوتید، نقطه ذوب آغازگر بین ۵۸ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد، درصد GC بین ۴۰ تا ۶۰ و طول قطعه قابل تکثیر بین ۶۰ تا ۱۵۰ نوکلئوتید در نظر گرفته شد. توالی آغازگرهای طراحی شده برای ساخت به شرکت سیناکلون ارجاع داده شدند. پرایمر مستقیم ژن FOXO1 دارای توالی اغازگر Tccccacaatgatattatgtcacca و پرایمر معکوس Gagttagggcccatcagtacatttt می‌باشد. پرایمر مستقیم ژن (GAPDH) دارای توالی اغازگر Aactcccattcttccacctttgat و پرایمر معکوس Agccatattcattgtcataccagga می‌باشد.

آنالیز و واکنش QRT-PCR: کمیت‌سنجی بیان ژن در آزمون QRT-PCR به‌صورت Relative انجام گرفت. پس از اندازه‌گیری میزان Ct، برای ژن‌های موردمطالعه در نمونه‌های تحت بررسی، کارایی PCR با استفاده از نرم‌افزار (2009, Ruijter et al. LinRegPCR) تعیین شد. سپس با استفاده از برنامه excell میزان نسبت بیان (FC) یا طبق فرمول pfaffl محاسبه گردید.

روش آماری

از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌های خام و تنظیم جدول‌ها و از برنامه‌های Excel 2013 و MSTATC و SPSS24 و Graph pad prism 6 برای تنظیم نمودارها و انجام محاسبات استفاده شد. به‌منظور بررسی صحت فرض‌های تجزیه و واریانس، آزمون نرمال بودن توزیع خطاهای آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و آزمون بارتلت برای بررسی فرض یکنواختی واریانس‌ها انجام شدند. از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای محاسبه میزان افزایش یا کاهش بیان ژن هدف در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل استفاده شد. از آزمون فیشر (F-test) و M-ANOVA با سطح معنی‌داری $p \leq 0/01$ استفاده شد. همچنین از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

۳. یافته‌ها

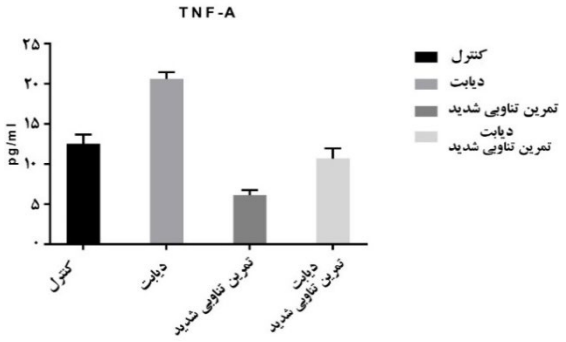


نمودار ۱. نتایج حاصل از $2^{-\Delta\Delta CT}$ بیان ژن FOXO1 در چهار گروه پژوهش

** سطح معنی‌داری بین گروه دیابت و دیابت تمرین تناوبی شدید (P=۰/۰۰۱) مشاهده شد.

در پژوهش حاضر در بررسی بیان ژن FOXO1 در موش‌های صحرایی نر ویستار که دارای مداخله دیابت بوده‌اند، نشان داده شد تمرین تناوبی شدید بر میزان بیان ژن FOXO1 در هیپوکمپ مغز، تأثیر معنی‌داری دارد. برای اندازه‌گیری بیان ژن FOXO1 موردبررسی در پژوهش حاضر از روش RT-PCR استفاده شد؛ به‌طوری که در نمودار ۱ نشان داده شده تفاوت بین گروه دیابت و دیابت تمرین تناوبی شدید (P=۰/۰۰۱) بسیار زیاد است و تفاوت معنی‌داری بین دو گروه دیابت تناوبی شدید و تناوبی شدید (P=۰/۰۰۴) وجود دارد. این بدان معنی است که میزان بیان ژن FOXO1 در گروه‌های دیابتی افزایش چشمگیری داشته در حالی که در گروه دیابت تناوبی شدید افزایش کمتری داشته است.

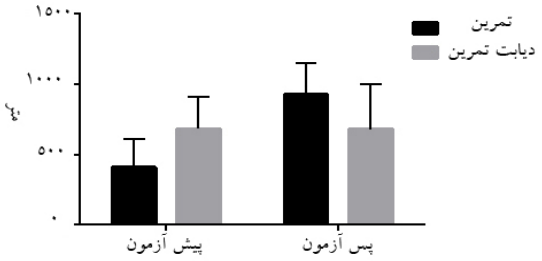
با توجه به نتایج به‌دست‌آمده قند خون قبل و بعد از ناشتایی در چهار گروه پژوهش، بین دو گروه دیابت و دیابت تناوبی شدید، تفاوت معنی‌داری نداشته است (P=۰/۲۶۴).



نمودار ۲. تغییرات TNF-α سرمی در چهار گروه پژوهش

* سطح معنی‌داری بین دوگروه دیابت و دیابت تناوبی شدید (P=۰/۰۰) مشاهده می‌شود.

با توجه به نمودار ۲ بین دو گروه دیابت و دیابت تناوبی شدید و دو گروه تناوبی شدید و دیابت تناوبی شدید، تفاوت معنی‌داری در میزان بیان TNF-α مشاهده می‌شود. این بدان معنی است که میزان پروتئین TNF-α سرمی در گروه‌های دیابتی، افزایش چشمگیری دارد در حالی که در گروه دیابت تناوبی شدید، افزایش کمتری داشته است.



نمودار ۳: میانگین آزمون عملکردی در گروه دیابت تناوبی شدید و تناوبی شدید

* بین دوگروه تناوبی شدید و دیابت تناوبی شدید (P=۰/۰۱۴) تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود.

بررسی آزمون زمان رسیدن به واماندگی بیان می‌دارد که در اثر ۶ هفته تمرین گروه دیابت تمرین توانسته میانگین زمان رسیدن به واماندگی خود را حفظ کند و گروه تمرین نیز پیشرفت داشته است. نتایج آزمون تی زوجی در بین دو گروه تناوبی شدید و دیابت تناوبی شدید (P=۰/۰۱۴) تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود.

٤. بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد تمرین سبب افزایش وزن هیپوکمپ همراه با کاهش بیان ژن FOXO1 به‌عنوان یک عامل آپوپتوزی در گروه دیابت تمرین تناوبی شدید می‌شود و همچنین بیان پروتئین TNF-α را کاهش داده است. با توجه به تغییرات وزن هیپوکمپ بین گروه دیابت و دیابت تناوبی شدید مشاهده می‌کنیم که وزن هیپوکمپ در گروه دیابت تناوبی شدید نسبت به گروه دیابت، افزایش داشته است. همچنین، وزن هیپوکمپ موش‌های صحرایی گروه تناوبی شدید در مقایسه با دیابت تناوبی شدید، تفاوت اندکی دارد. بنابراین می‌توان گفت احتمالاً تمرین تناوبی شدید، تأثیر عوامل آپوپتوزی را کاهش می‌دهد که از تحلیل و کاهش وزن هیپوکمپ حتی در شرایط دیابت تا حدی جلوگیری کرده است. پژوهش‌های بسیاری (۱۸, ۱۹) نتایجی همسو با پژوهش حاضر داشته‌اند که نشان می‌دهد تمرین تناوبی شدید سبب افزایش حجم سلول‌های عصبی در مغز و هیپوکمپ شده است. در نتیجه همان‌طور که در مطالعات ثابت شده است، تمرین سبب افزایش فعالیت الکتریکی ناحیه هیپوکمپ می‌شود و بدون تغییر در میزان آپوپتوزیس و یا کاهش آپوپتوزیس سبب افزایش دانسیته نورونی هیپوکمپ می‌گردد (۲۰). بنابراین می‌توان این‌گونه برداشت کرد که احتمالاً تمرین تناوبی شدید باعث افزایش عوامل رشد عصبی می‌شود و از کاهش وزن هیپوکمپ حتی در شرایط دیابت تا حدی جلوگیری کرده است. شواهد زیادی وجود دارند که تأثیرات مثبت فعالیت بدنی و ورزشی را بر مغز نشان داده‌اند؛ این تغییرات با عملکرد شناختی و رفتاری نیز مرتبط است. در ضمن، بسیاری از بیماری‌ها مانند آلزایمر، اسکیزوفرنی و دیابت با سطوح آپوپتوز مرتبط می‌باشند. گزارش شده است که پیش‌آماده‌سازی با فعالیت ورزشی موجب تنظیم افزایشی پروتئین‌های ضدآپوپتوزی و تنظیم کاهشی هم‌زمان پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی و افزایش نسبت پروتئین‌های ضدآپوپتوزی به پیش‌آپوپتوزی می‌شود که به کاهش آپوپتوز و افزایش بقای نورونی منجر می‌گردد (۲۱). یکی از سازوکارهای احتمالی برای کاهش آپوپتوز و ژن‌های درگیر در آن، فعالیت ورزشی می‌باشد. احتمال داده می‌شود که مداخله تمرین سبب تعدیل عامل آپوپتوزی FOXO1 در هیپوکمپ می‌گردد و در نهایت به حفظ سلول‌های عصبی کمک می‌کند. فعالیت ورزشی شدید سبب افزایش فعالیت پروتئین AKT و با خاصیت شبه‌انسولینی سبب افزایش حساسیت به انسولین می‌شود و از فعال شدن FOXO1 جلوگیری می‌کند. یکی از علل حفاظت سلول عصبی را کاهش فعالیت FOXO1 بیان کرده‌اند. یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های FOXO پروتئین Aktمی‌باشد. پروتئین AKT باعث افزایش فسفوریلاسیون FOXO1 می‌شود و آن را غیرفعال و به خارج هسته هدایت می‌کند؛ در نتیجه می‌تواند از سلول‌ها در شرایط حاد و التهاب عصبی محافظت کند. از طرفی پروتئین FOXO باعث افزایش

بیان ژنی گلیکوژن فسفاتاز می‌شود که گلیکوژنولیز را در کبد افزایش می‌دهد و مقادیر گلوکز خون را بالا می‌برد (۲۲). در شرایط دیابت نوع ۲ به علت مقاومت در برابر انسولین پروتئین Akt به شکل غیرفعال در سلول حضور دارد و در مقابل پروتئین FOXO فعال می‌باشد و با افزایش گلیکوژنولیز گلوکز خون را افزایش می‌دهد که در نهایت سبب القای بیان ژن‌های آپوپتوزی مانند P27، Bim، لیگاندهای مرگ (FASL TRAIL) می‌شود. در بررسی تأثیرات فعالیت‌های ورزشی بر سطوح FOXO1 نشان داده شد که احتمالاً یک دوره کوتاه تمرین هوازی به مدت ۵ روز متوالی (۶۰ دقیقه با سرعت ۳۰ متر بر دقیقه با شیب صفر) سبب تنظیم کاهشی FOXO1 در عضلات قلب و سولئوس موش‌ها می‌شود (۲۳). مدت تمرین در این پژوهش، کوتاه و نتیجه گرفتن از تمرین تناوبی شدید در زمان کوتاه از ویژگی‌های آن می‌باشد؛ پس احتمالاً می‌توان نتیجه گرفت که تمرین تناوبی شدید هم می‌تولند سبب کاهش فعالیت رونویسی FOXO1 شود. در مطالعه، هم‌سویی دیگر فعالیت ورزشی با القای ایسکمی بر کاهش گلوتامات و فاکتورهای آپوپتوزی هیپوکمپ موش بررسی شد. گروه تمرین به مدت ۸ هفته (۵ روز در هفته به مدت ۳۰ دقیقه) شنا کردند. آن‌ها نشان دادند تمرین ورزشی سبب محافظت بافت مغز می‌گردد و به‌طور چشمگیری سبب کاهش و سرکوب فاکتورهای آپوپتوزی و کاسپازها در هیپوکمپ موش‌های سالخورده می‌شود (۲۴).

پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تمرین تناوبی شدید، تأثیر معناداری در کاهش میزان TNF-α سرمی در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت دارد که میزان TNF-α در گروه دیابت نسبت به گروه دیابت تناوبی شدید و تناوبی شدید افزایش قابل توجهی داشته است. تأثیرات مفید فعالیت ورزشی بر کاهش عوارض دیابت می‌تواند در بخشی به دلیل بهبود مارکرهای التهابی باشد. تمرین ورزشی در کاهش TNF-α، گیرنده‌های محلول آن و مولکول‌های چسبنده در افراد بیمار، نظیر افراد مبتلا به اختلال در تحمل گلوکز(۲۵) مؤثر است. تحقیقات نشان داده‌اند که TNF-α در اثر تمرین کاهش می‌یابد (۲۶-۲۸). نتایج این پژوهش‌ها با پژوهش حاضر هم‌سو است. به نظر می‌رسد که سازوکار تغییرات TNF-α پس از تمرین‌های تناوبی، قوی‌تر از تغییرات آن پس از تمرین‌های هوازی با شدت متوسط است (۲۹). از آنجایی که روش تمرینی پژوهش حاضر، شدید است احتمالاً در پاسخ بعد از یک جلسه سبب افزایش فاکتور التهابی TNF-α می‌شود اما به نظر می‌رسد بر اثر سازگاری تمرین احتمالاً سبب کاهش مقادیر TNF-α سرمی شود. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد عواملی از قبیل ویژگی‌های مربوط به برنامه تمرینی از جمله شدت و مدت زمان فعالیت، نوع برنامه تمرینی و طول دوره زمانی انجام برنامه تمرینی می‌توانند در تغییرات TNF-α مؤثر باشند (۳۰). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد تمرین تناوبی شدید تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن FOXO1 دارد و با کاهش چشمگیر آن در گروه دیابت تمرین، توانسته از تحلیل بافت هیپوکمپ که بر اثر دیابت اتفاق می‌افتد، جلوگیری کند. میزان پروتئین TNF-α به‌عنوان عاملی پیش‌التهابی و آپوپتوزی در اثر تمرین تناوبی شدید، کاهش یافته است. همچنین تمرین تناوبی شدید بر حفظ میزان آمادگی جسمانی افراد دیابتی مؤثر است.

تشکر و قدردانی

از زحمات کارشناسان آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشکده فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی تشکر می‌نماییم. این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد می‌باشد و با استفاده از امکانات آزمایشگاه ورزشی حیوانات و تسهیلات دانشکده علوم ورزشی دانشگاه خوارزمی و همچنین بخشی از بودجه پژوهش از معاونت پژوهشی دانشگاه خوارزمی تأمین گردیده است.

References

[1]. Imperatore G, Boyle JP, Thompson TJ, Case D, Dabelea D, Hamman RF, et al. Projections of type 1 and type 2 diabetes burden in the U.S. population aged < 20 years through 2050: dynamic modeling of incidence, mortality, and population growth. Diabetes Care. 2012;35(12):20-25.
[2]. Watson GS, Craft S. Modulation of memory by insulin and glucose: neuropsychological observations in Alzheimer's disease. European Journal of Pharmacology. 2013;490(1):97-113.
[3]. Martinez-Tellez RG-VM, J. Flores, G. Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. Brain Res. 2015;1048(2-1):108-15.
[4]. Srinivasan S, Stevens MJ, Sheng H, Hall KE, Wiley JW. Serum from patients with type 2 diabetes with neuropathy induces complement-independent, calcium-dependent apoptosis in cultured neuronal cells. J Clin Invest. 2014;102(7): 1454-62.
[5]. Tang ED, Nunez G, Barr FG, Guan KL. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. J Biol Chem. 2015;274(24):16741-6.
[6]. Polter AY, S. Zmijewska, A. A. van Groen, T. Paik, J. H. Depinho, R. A. Peng, S. L. Jope, R. S. Li, X. Forkhead box, class O transcription factors in brain: regulation and behavioral manifestation. Biol Psychiatry. 2012;65(2):150-9.
[7]. De Senna PN, Ilha J, Baptista PP, do Nascimento PS, Leite MC, Paim MF, et al. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. Metab Brain Dis. 2011;26(4):79-69.
[8]. Kuga GK, Botezelli JD, Gaspar RC, Gomes RJ, Pauli JR, Leme JACdA. Hippocampal insulin signaling and neuroprotection mediated by physical exercise in Alzheimer´s Disease. Motriz: Revista de Educação Física. 2017;230
[9]. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes. 2005;54(6):1615-25.
[10]. McGeer EGM, P. L. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2013;27(5):741-9.
[11]. Kajitani NS, Kenichi Nakamura, Akihiko Nakatou, Tatsuaki Hiramatsu, Makoto Makino, Hirofumi. Microinflammation is a common risk factor for progression of nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. Diabetes Research and Clinical Practice. 2010;88(2):171-6.
[12]. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. Cell Signal. 2014;16(2):139-44.
[13]. Ming Zhang X-YL, Jing Li, Zhi-Gang Xu, and Li Chen. The Characterization of High-Fat Diet andMultiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2Diabetes RatModel. Experimental Diabetes Research. 2010;8(12): 23-53.
[14]. Rajasekar R MK, Rajasekaran N, Duraisamy G and Kanakasabapathi D. Effect of Alpinia calcarata on glucose uptake in diabetic rats-an in vitro and in vivo model. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders. 2014;33(13):1-13.
[15]. N. C. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. Pain research methods in molecular medicine Humana Press 2011;99:55 -65.
[16]. Songstad NT KK-H, Hafstad AD, Basnet P, Ytrehus K, Acharya G. Effects of High Intensity Interval Training on Pregnant Rats, and the Placenta, Heart and Liver of Their Fetuses. PloS one. 2015;10(11):e0143095.
[17]. Livak KJS, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2< sup>â˜ Î˜Î˜CT</sup> Method. Methods. 2011;25(4):402-8.
[18]. Yi SS, Hwang IK, Yoo KY, Park OK, Yu J, Yan B, et al. Effects of treadmill exercise on cell proliferation and differentiation in the subgranular zone of the dentate gyrus in a rat model of type II diabetes. Neurochem Res. 2014;34(6):1039-46.
[19]. Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(7):3017-22.
[20]. 2012AEcoditUSi. Diabetes Care. American Diabetes 2013;36(4):1033-46.
[21]. Chaudhry K, Rogers R, Guo M, Lai Q, Goel G, Liebelt B, et al. Matrix metalloproteinase -9(MMP-9) expression and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK2/1) activation in exercise-reduced neuronal apoptosis after stroke. Neurosci Lett. 2010;474(2):109-14.
[22]. Tsuchiya K. Forkhead box class O family member proteins: The biology and pathophysiological roles in diabetes. 2017;8(6):726-34.
[23]. 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 (1985). 2014;117(3):223-30.
[24]. Mourao FA, Leite HR, de Carvalho LE, Ferreira EVTH, Pinto MC, de Castro Medeiros D, et al. Neuroprotective effect of exercise in rat hippocampal slices submitted to in vitro ischemia is promoted by decrease of glutamate release and pro-apoptotic markers. J Neurochem. 2014;131(1):65-73.
[25]. Straczkowski M, Kowalska I, Dzienis-Straczkowska S, Stepien A, Skibinska E, Szelachowska M, et al. Changes in tumor necrosis factor-alpha system and insulin sensitivity during an exercise training program in obese women with normal and impaired glucose tolerance. Eur J Endocrinol. 2011;145(3):273-80.
[26]. Esposito KP, A. Di Palo, C. Giugliano, G. Masella, M. Marfella, R. Giugliano, D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. JAMA. 2013;289(14):804-1799.
[27]..Braith RWS, K. J. Resistance exercise training: its role in the prevention of cardiovascular disease. Circulation. 2016;113(22):2642-50.
[28]. Pervaiz N, Hoffman-Goetz L. Immune cell inflammatory cytokine responses differ between central and systemic compartments in response to acute exercise in mice. Exerc Immunol Rev. 2012; 18:142-57.
[29]. Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2010;107(2):119-25.
[30]. White LJC, V. Mc Coy, S. C. Cytokine responses to resistance training in people with multiple sclerosis. J Sports Sci. 2016;24(8):911-4.