



The effect of aerobic training on the mir-195 gene expression in heart tissue of type 2 diabetic rats

Elaheh Piralaïy^{1*}, Badrkhan Rashwan Ismael², Gholamreza Hamidiyan³

1. Corresponding Author, Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran. epiralaïy@tabrizu.ac.ir
2. Ph.D Candidate, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran. badrxanr@gmail.com
3. Associate Professor in Comparative Histology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran. hamidian@tabrizu.ac.ir

Article Information

Article type: Research Article

Vol: 16

No: 32

P: 39-49

Received: 2024-06-11

Revised: 2024-09-14

Accepted: 2024-09-28

Cite this Article:

Elaheh Piralaïy, Badrkhan Rashwan Ismael, Gholamreza Hamidiyan. The effect of aerobic training on the mir-195 gene expression in heart tissue of type 2 diabetic rats. *Journal of Sport and Biomotor Sciences*. 2024-2025; 16(32): 39-49.

doi: 10.22034/sbs.2024.460274.1101

Publisher: Hakim Sabzevari University

© The Author(s)



 10.22034/sbs.2024.460274.1101

Abstract

Introduction and Purpose: In recent years, a strong association has been identified between miRNA and diseases such as diabetes and cardiovascular disorders. Therefore, this study aimed to investigate the effect of eight weeks of aerobic exercise on the expression of the mir-195 gene in the heart tissue of rats with type 2 diabetes.

Materials and methods: For this purpose, 18 male Wistar rats (average weight: 240 g, average age: 8 weeks) were randomly assigned to three groups: (1) healthy control, (2) diabetic control, and (3) diabetic exercise. To induce type 2 diabetes, the rats were first fed a high-fat diet (60%) for two weeks, followed by fasting streptozotocin injection. The treadmill running protocol was performed five days a week, following the principle of progressive overload. In the first week, the exercise was conducted at a speed of 5–10 m/min for 10–15 minutes, and by the eighth week, it was increased to 18–24 m/min for 60 minutes. Gene expression of *miR-195* was assessed using real-time PCR. One-way ANOVA and Tukey's post hoc test were used for statistical analysis at a significance level of $P \leq 0.05$.

Results: Eight weeks of T2DM led to a significant increase in glucose levels and miR-195 gene expression ($P \leq 0.05$). However, eight weeks of aerobic exercise significantly reduced glucose levels and miR-195 gene expression compared to the diabetic control group ($P \leq 0.05$).

Discussion and Conclusion: Our results suggest that exercise, particularly aerobic training, is an effective strategy for reducing miR-195 expression and improving myocardial function in diabetic rats.

Key Words: Aerobic training, mir-195 gene, Heart tissue, Rats, Type 2 diabetes

Extended Abstract

1. Introduction and Purpose

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disorder whose global prevalence has gradually increased in recent years. Heart disease that develops in patients with type 2 diabetes is referred to as "diabetic heart disease" (DHD) and is characterized by structural, molecular, and functional changes, playing a key role in pathogenicity pathways. MicroRNAs have been shown to be involved in cardiovascular disease (CVD) and T2DM and can serve as diagnostic and prognostic biomarkers. miR-195 is a novel class of microRNAs from the miR-15/107 family that are specifically expressed in the heart muscle and have been linked to heart failure and hypertrophy. There is a difference in the expression pattern of miR-195 between healthy individuals and diabetic patients. Since exercise improves heart health in diabetics, lowers glucose levels, and modulates the expression of cardiovascular microRNAs, including miR-195, it may be a viable therapeutic target for cardio-diabetic disease. Therefore, this study aimed to investigate the effect of eight weeks of aerobic training on miR-195 gene expression in the heart tissue of rats with type 2 diabetes.

2. Materials and Methods

This experimental-laboratory study received approval from the Ethics Committee of the University of Tabriz (ID: IR.TABRIZU.REC.1402.037). Eighteen male Wistar rats, aged approximately 8 weeks and weighing around 240 g, were kept at an ambient temperature of 20 to 22 °C, with a light-to-dark cycle of 12:12 hours and humidity levels of 55 to 65%. The rats were divided into three groups: 1) healthy control group (HC), 2) diabetic control group (DC), and 3) diabetic exercise group (DT). To induce diabetes, a low-dose sodium citrate buffer solution (0.1 mM, pH=4.5) was administered in conjunction with a high-fat diet (HFD, 60% kcal from fat), followed by an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at a low dose (35 mg/kg body weight) using the buffering solution. The aerobic training group performed the training program on a treadmill five days a week, beginning at a speed of 5-10 m/min for 10-15 minutes in the first week, progressing to a speed of 18-24 m/min for 60 minutes by the eighth week. Each session included a five-minute warm-up at the beginning and a five-minute cool-down at the end. Forty-eight hours after the last training session, the rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight), and their heart muscle tissue was extracted. The tissue was washed with physiological

serum, waste parts were removed, and the samples were transferred to liquid nitrogen for storage at -80 °C until testing. RNA extraction was performed using two 50-reaction RNA extraction kits from EURX Company in Poland, following the kit's instructions. The real-time PCR method was employed to assess miR-195 gene expression. Tukey's one-way analysis of variance and post hoc tests were conducted, with a significance level set at $P > 0.05$.

3. Results

Eight weeks of T2DM infection resulted in a significant increase in glucose levels and miR-195 gene expression ($P=0.001$). In contrast, eight weeks of aerobic training led to a significant decrease in both glucose levels and miR-195 gene expression ($P=0.001$) compared to the diabetic control group.

4. Conclusions

Overall, T2DM infection appears to increase miR-195 gene expression in rat heart tissue, which is significantly reduced by aerobic running training. Therefore, this study suggests that aerobic training may be a potential therapeutic strategy to lower miR-195 gene expression in heart tissue.

5. Acknowledgment & Funding

Authors are thankful to all interview participants for supporting this research.

6. Ethical Consideration

This study has an ethical approval number (IR.TABRIZU.REC.1402.037) from Tabriz University.

7. Contribution of authors

All authors have contributed to the article. all authors read and approved the final manuscript.

8. Conflict of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

تأثیر تمرین هوازی بر بیان ژن mir-195 در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع دو

الهه پیرعلائی^{۱*}، بدرخان رشوان اسماعیل^۲، غلامرضا حمیدیان^۳

۱. نویسنده مسئول، استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. epiralaiy@tabrizu.ac.ir
۲. دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. badrxanr@gmail.com
۳. دانشیار بافت شناسی مقایسه‌ای، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. hamidian@tabrizu.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: پژوهشی	مقدمه و هدف: در سال‌های اخیر رابطه بسیار نزدیکی بین miRNA و بیماری‌های دیابت و قلبی عروقی پیدا شده است. بنابراین، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرین هوازی بر بیان ژن mir-195 در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع دو انجام شد.
دوره: ۱۶	مواد و روش‌ها: برای این منظور، ۱۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (با میانگین وزنی ۲۴۰ گرم و میانگین سن ۸ هفته‌ای) بصورت تصادفی به سه گروه (۱) کنترل سالم، (۲) کنترل دیابتی، و (۳) تمرین دیابتی تقسیم شدند. برای القاء دیابت نوع دو، ابتدا یک رژیم غذایی پرچرب (۶۰ درصد) به مدت دو هفته و سپس تزریق استرپتوزوسین در حالت ناشتا صورت گرفت. پروتکل تمرین دویدن روی تردمیل پنج روز در هفته با رعایت اصل اضافه بار در هفته اول با سرعت ۵-۱۰ متر در دقیقه به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و در هفته هشتم با سرعت ۲۴-۱۸ متر در دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه به دست آمد. برای بررسی بیان ژن miR-195 از روش Real-time PCR استفاده شد. از آزمون‌های تحلیل واریانس یک‌راهه و تعقیبی توکی، در سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ استفاده شد.
شماره: ۳۲	یافته‌ها: هشت هفته ابتلاء به T2DM منجر به افزایش معنی‌دار در گلوکز و بیان ژن miR-195 شد ($P \leq 0.05$). با این حال هشت هفته تمرین هوازی منجر به کاهش معنی‌دار در گلوکز و بیان ژن miR-195 نسبت به گروه کنترل دیابتی شد ($P \leq 0.05$).
صفحه: ۳۹-۴۹	نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که ورزش به ویژه تمرینات هوازی یک استراتژی مناسب برای کاهش miR-195 و بهبود عملکرد میوکارد در موش‌های دیابتی است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۱۲	واژه‌های کلیدی: تمرین هوازی، ژن miR-195، بافت قلب، موش‌های صحرایی، دیابت نوع دو
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۶/۲۴	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۷	
نحوه ارجاع به این مقاله: الهه پیرعلائی، بدرخان رشوان اسماعیل، غلامرضا حمیدیان. تأثیر تمرین هوازی بر بیان ژن mir-195 در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع دو. نشریه ورزش و علوم زیست حرکتی. ۱۴۰۳؛ ۱۶ (۳۲): ۳۹-۴۹. Doi: 10.22034/sbs.2024.460274.1101	
ناشر: دانشگاه حکیم سبزواری	



© نویسنده(گان).

مقدمه

دیابت نوع دو^۱ (T2DM) یک اختلال متابولیک مزمن است که شیوع جهانی آن در سال‌های اخیر به تدریج افزایش یافته است. اطلس فدراسیون بین‌المللی دیابت^۲ تخمین زده است که تا سال ۲۰۴۵ (۶۹۳) میلیون بزرگسال به دیابت مبتلا خواهند شد (۱). T2DM با افزایش سطح گلوکز خون مشخص می‌شود. این در نتیجه ترشح ناکافی انسولین و عدم پاسخگویی بافت‌های حساس به انسولین رخ می‌دهد و در نهایت منجر به هیپرگلیسمی می‌شود (۲). بیماری قلبی که در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو ایجاد می‌شود "بیماری قلبی دیابتی"^۳ (DHD) نامیده می‌شود و با تغییرات ساختاری، مولکولی و عملکردی تعریف می‌شود (۳) و نقش کلیدی در مسیرهای بیماری‌زایی دارد، بطوری که بیماران دیابتی ۱/۵ تا ۲ برابر بیشتر در معرض خطر فشار خون بالا، دو تا چهار برابر بیشتر در معرض خطر بیماری عروق کرونر و ۳۴ درصد بیشتر در معرض خطر فیبریلاسیون دهلیزی هستند (۴). بازسازی ساختاری قلب دیابت منجر به تغییرات مورفولوژیکی و عملکردی، همچنین فعال شدن سیستم رنین-آنژیوتانسین-آلدوسترون، استرس اکسیداتیو بیش از حد ناشی از هیپرگلیسمی و مقاومت به انسولین می‌شود، که همگی بر نارسایی قلب تأثیر دارند. طبق مطالعه آینده‌نگر دیابت انگلستان، هیپرگلیسمی خطر نارسایی قلبی را با یک درصد افزایش HbA1c به ازای هر هشت درصد از بیماری‌های قلبی افزایش می‌دهد (۵). مطالعه لیو همکاران (۲۰۲۰) کشف کرد که اختلال عملکرد قلبی مشاهده شده در دیابت با تغییر بیان میکروRNAهای خاص (miRNAs/miRs) مرتبط است (۵).

نشان داده شده است که MicroRNAها در CVD و T2DM تغییر می‌کنند و می‌توانند به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی و پیش‌آگهی کاربرد داشته باشند (۲). miRNAها گروهی از RNAهای غیر کدکننده تک رشته‌ای هستند که تقریباً ۲۲ نوکلئوتید طول دارند و در تنظیم بیان ژن پس از رونویسی نقش دارند. آنها در فرآیندهای فیزیولوژیکی کلیدی دخیل هستند و بیان آنها در حالت‌های بیماری مانند CVDs و T2DM تغییر می‌کند (۶، ۷). آسیب ناشی از CVD به عضله قلب باعث می‌شود، این miRNAها در گردش خون آزاد شوند. miRNAهای آزاد شده در گردش خون بسیار پایدار، به راحتی قابل تشخیص هستند و نتایج ثابتی را در سطوح بیان ارائه می‌دهند. با توجه به این ثبات، miRNAها به عنوان نشانگرهای زیستی تشخیصی برای بسیاری از بیماری‌های مزمن مانند دیابت، سرطان و اختلالات قلبی عروقی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند (۸).

miR-195 کلاس جدیدی از miRNAها (۸) از خانواده miR-15/107 است (۹). که بطور خاص در عضله قلب بیان می‌شود (۱۰، ۱۱) و با نارسایی قلبی و هایپرتروفی مرتبط است (۱۲، ۱۳). بین الگوی بیان miR-195 در افراد سالم و بیماران دیابتی تفاوت وجود دارد (۱۴). در طول دیابت، بیان miR-195 در کاردیومیوسیت‌ها افزایش می‌یابد و منجر به کاهش بیان Sirt1 و BCL2 می‌شود، که منجر به تغییرات ساختاری و عملکردی در قلب بیماران دیابتی می‌شود (۱۴، ۱۵). مهار miR-195 از آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌های تحریک شده با پالمیتات جلوگیری می‌کند و بیان بیش از حد تراریخته miR-195 باعث نارسایی و هایپرتروفی قلبی می‌شود (۱۶). غیرفعال‌سازی درمانی miR-195 هایپرتروفی میوکارد را کاهش می‌دهد و جریان خون کرونر و عملکرد میوکارد را در دیابت حداقل تا حدی با کاهش آسیب اکسیداتیو، مهار آپوپتوز، ترویج رگ‌زایی و کاهش فیبروز، بهبود می‌بخشد. بنابراین، miR-195 ممکن است یک هدف درمانی جایگزین برای بیماری‌های قلبی دیابتی باشد (۱۶، ۱۷).

ورزش منظم با کاهش مرگ و میر قلبی عروقی همراه است و می‌تواند به طور مثبت بر عوامل خطر CVD تأثیر بگذارد و خطر ابتلا به دیابت نوع دو کاهش دهد (۱۸). ارتباط بین عوامل خطر قلبی عروقی و حساسیت به انسولین در بیماران دیابتی مشهود است و این از طریق تحقیقات ورزشی نشان داده شده است. به عنوان مثال، ورزش با تعدیل عوامل مختلف از جمله عوامل خطر سیستمیک قلبی عروقی، عملکرد اندوتلیال و عروق و عملکرد قلب، اثرات مفید بسیاری بر سیستم قلبی عروقی در بیماران مبتلا به دیابت دارد (۵). بنابراین، ورزش هوازی ابزاری مؤثر در پیشگیری از اختلال عملکرد قلبی عروقی در بیماران دیابتی است و همچنین برای مدیریت گلوکز خون در افراد مبتلا به دیابت مهم است (۱۸). همچنین ورزش منظم منجر به کاهش گلوکز خون و بهبود مقاومت به انسولین می‌شود (۱۹). در یک مطالعه حیوانی که توسط لیو و همکاران (۲۰۲۰) انجام شد. یافته‌ها نشان داد هشت هفته فعالیت بدنی با شدت متوسط و بالا، از شروع اختلال عملکرد سیستمیک و دیاستولیک ناشی از DM و بیماری قلبی در موش‌ها جلوگیری می‌کند (۵). همچنین کاشف و همکاران (۲۰۲۳) در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که شش هفته تمرین مقاومتی سطح گلوکز و بیان ژن miR-195 را در موش‌های دیابتی کاهش می‌دهد (۲۰). خاکدان و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه خود نشان دادند که (HIIT) به طور مؤثر بیان miR-195 را کاهش می‌دهد و بیان Sirt1 و BCL-2 را در موش‌های صحرایی دیابتی افزایش می‌دهد (۱۵).

روش القاء دیابت: بعد از دو هفته ایجاد وضعیت مقاومت به انسولین، تعداد ۱۲ موش صحرایی (گروه‌های کنترل دیابتی و تمرین دیابتی) به منظور القای دیابت، ابتدا با مصرف رژیم غذای پرچرب^۴ (HFD ۶۰ درصد کیلوکالری از چربی) که بصورت تجاری (D12492، رژیم‌های تحقیقاتی) به مدت دو هفته قبل از القای دیابت به دست آمده بود، القا شد. HFD شامل ۲۰٪ پروتئین، ۲۰٪ کربوهیدرات و ۶۰٪ چربی بود (۲۱). سپس با تزریق داخل صفاقی استروپتوزوسین^۵ (STZ) دوز پایین (۳۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) از محلول بفری سیترا سدیم ۰/۱ مولار با pH=۴/۵ در کنار یخ استفاده شد (۲۱). جهت القای دیابت تجربی پس از تعیین قند خون موش‌های صحرایی ناشتا، ناحیه تزریق توسط الکل ضد عفونی شده و محلول آماده شده استروپتوزوسین به روش داخل صفاقی با سرنگ انسولین به موش‌های صحرایی مقید شده تزریق شد. پس از تزریق، موش‌ها به داخل قفس منتقل شدند و آب و غذا در اختیار آنها قرار گرفت. ۷۲ ساعت پس از تزریق استروپتوزوسین، القای دیابت با اندازه‌گیری قند خون ناشتا از خون گرفته شده از ورید دم توسط دستگاه گلوکومتر دیجیتال تایید شد. موش‌های که قند خون آنها بالاتر از ۳۰۰ میلی گرم در دسی‌لیتر بود برای ادامه تحقیق به عنوان موش‌های دیابتی در نظر گرفته شدند (۲۲).

پروتکل تمرین: گروه تمرین هوازی برنامه تمرینی بر روی تردمیل را طبق (جدول ۱) پنج روز در هفته به مدت هشت هفته انجام دادند. پنج دقیقه در ابتدای تمرین برای گرم کردن و پنج دقیقه در انتهای تمرین برای سرد کردن در نظر گرفته شد. شدت تمرین برای گرم کردن و سرد کردن برابر با ۵۰ درصد حداکثر سرعت دویدن در نظر گرفته شد (۲۳). به منظور تحریک موش‌ها برای دویدن، از محرک صوتی (ضربه به دیواره تردمیل) استفاده شد. پس از شرطی نمودن موش‌ها در سایر جلسات به منظور رعایت نکات اخلاقی کار با حیوان آزمایشگاهی، فقط از محرک صوتی استفاده شد. در طی هشت هفته، موش‌های صحرایی گروه کنترل نیز برای آشنایی با تردمیل، به صورت بدون حرکت روی تردمیل قرار گرفتند (۲۴). تمام مراحل تمرین با رعایت اساس اصل اضافه بار اجرا گردد.

از آنجایی که تمرینات ورزشی سلامت قلب بیماران دیابتی را بهبود می‌بخشد، سطح گلوکز و دیابت نوع دو را کاهش می‌دهد و بیان miRNAهای قلبی عروقی (۵) miR-195 در دیابت را تعدیل می‌کند (۲۰). بنابراین، تمرین ورزشی و بیان miR-195 ممکن است یک هدف درمانی جایگزین برای بیماری‌های قلبی دیابتی باشد (۱۶، ۱۷). برای این منظور، با توجه به اهمیت تمرین ورزشی و miR-195 در بافت قلب دیابتی، در حال حاضر مطالعه اثرات تمرین هوازی در بافت قلب موش‌های مبتلا به دیابتی نوع دو بررسی نشده است. بنابراین، این سوال مطرح می‌شود که آیا هشت هفته تمرین هوازی چه تغییراتی در بیان ژن miR-195 در بافت قلب موش‌های دیابت نوع دو اعمال می‌نماید. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر هشت هفته تمرین هوازی بر بیان ژن miR-195 در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع دو بود.

روش شناسی

تحقیق حاضر از نوع مطالعات تجربی-آزمایشگاهی در قالب یک طرح پس‌آزمون یک عاملی است که بر اساس مقررات نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه تبریز با شناسه (IR.TABRIZU.REC.1402.037) انجام شد. بدین منظور، تعداد ۱۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار که در شرایط طبیعی بدون ناشتا، به روش در دسترس از آزمایشگاه حیوانی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز با سن حدود هشت هفته در محدوده وزنی ۲۴۰ گرم تهیه شدند و در همان آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گرفتند. به منظور ایجاد سازگاری با محیط، جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، تمامی موش‌ها دو هفته استقرار در آزمایشگاه ویژه حیوانات با شرایط محیطی و همچنین دوره اجرای پروتکل در قالب گروه‌های چهار سر موش در قفس‌های پلی اتیلن در دمای محیطی با ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت هوا ۵۵ تا ۶۵ درصد نگهداری شدند. در طول دو هفته دوره سازگاری با محیط آزمایشگاه موش‌های صحرایی (به غیر از گروه‌های کنترل سالم و کنترل دیابتی) به مدت هفت روز تحت برنامه آشناسازی با نحوه فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی دوره آشنایی، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین نیز ۵-۱۰ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، موش‌ها به سه گروه (۱) گروه کنترل سالم^۱ (HC)، (۲) گروه کنترل دیابتی^۲ (DC)، و (۳) گروه تمرین دیابتی^۳ (DT) تقسیم

4. High-fat diet
5. Streptozotocin

1. Healthy Control
2. Diabetic Control
3. Diabetic training

جدول ۱. پروتکل تمرین هوازی با رعایت اصل اضافه بار

هفته	سرعت (متر/دقیقه)	زمان (دقیقه)	شیب
۱	۱۰-۵	۱۵-۱۰	۱۰
۲	۱۴-۱۰	۲۰	۱۰
۳	۱۸-۱۴	۳۰	۱۰
۴	۲۴-۱۸	۴۰	۱۰
۶/۵	۲۴-۱۸	۵۰	۱۰
۸/۷	۲۴-۱۸	۶۰	۱۰

بنابراین یک میکروگرم از محلول استخراج شده RNA با آنزیم DNase بافر و بازدارنده RNase به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شد. پس از آن اتیلندی آمین تتراستیک اسید^۳ (EDTA) به نمونه‌ها اضافه شد و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انگوبه شد تا آنزیم DNase غیرفعال شود. cDNAهای سنتز شده با استفاده از ترکیبات و طبق دستور العمل کیت جهت واکنش RT-PCR آماده گردیدند. پس از اتمام تقسیم بندی هر نمونه به درون دستگاه RT-PCR فرایند سنجش آغاز شد. کلیه اندازه‌گیری‌ها سه بار بر روی هر نمونه انجام گرفت. برای انجام واکنش Real Time PCR از دستگاه Real time PCR (CorbetRotor gene 6000) استفاده شد. پروتکل Real time PCR برای اندازه‌گیری عوامل بر مبنای روش سایبرگرین شامل چهار دقیقه و با دمای (۹۵ درجه سانتی‌گراد) ۴۰ تا ۴۵ سیکل مشتمل بر ۱۰ ثانیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد) ۶۰ ثانیه (۵۷ درجه سانتی‌گراد) ۳۰ ثانیه (۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در نهایت مرحله ذوب شدن در دمای (۹۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد) بود. برای تعیین سطح نسبی miR-195 از دستگاه Real-time PCR (Mastercycler gradient) ساخت شرکت Bms (bio molecular system) کشور استرالیا، به روش RT-PCR نیمه کمی و با استفاده از کیت (NORGEN) کشور کانادا با شماره تولید (۲۸۳۲۳) و بر اساس دستور العمل کارخانه مربوطه استفاده شد. پرایمرهای ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزارهای موجود (Primer^۳) و (Primer Express[®]) بررسی توالی‌های مربوط در (Gene Bank) پرایمرها و طراحی و انتخاب و سپس با نرم‌افزار (oligo 7) چک شدند و از لحاظ ارزیابی اختصاصی در nebi/primer blast چک گردید (جدول ۲). ارزش‌های چرخه‌های آستانه^۴ (Ct) میکرو RNA با استفاده از کنترل درونی U6 snRNA نرمال شدند. به طور ویژه، میزان بیان mRNA نسبی از حاصل تفریق ct مربوط به U6 snRNA از Ct مربوط به mRNA مورد نظر به دست آمد. مقدار به دست آمده در نمونه مرجع (کنترل) کسر شد. fold change با استفاده از معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (۲۶).

نمونه‌برداری و ارزیابی آزمایشگاهی: برای اندازه‌گیری متغیرهای تحقیق، موش‌ها پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کانامین (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلایزین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، به روش بدون درد توسط متخصصین کارآزموده بی‌هوش و جراحی شدند (۲۵). ابتدا با سرنگ‌های هیپارین‌دار مستقیماً از قلب خون گرفته شد و به لوله‌های آزمایش منتقل شده و در سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰-۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه پلاسما جدا شد. پلاسما جدا شده تا زمان سنجش سطح قندخون در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شد. پس از خون‌گیری کل بافت قلب خارج و درون میکروتیوپ در محاورت ازت مایع به سرعت منجمد شده و تا زمان ارزیابی مولکولی در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نحوه استخراج RNA: استخراج RNA به وسیله دو کیت ۵۰ ری اکشن استخراج RNA ساخت شرکت EURX کشور لهستان از تمامی نمونه‌های بافت طبق دستور العمل کیت صورت گرفت. قبل از شروع آزمایش، تمام ابزارهای مورد استفاده از جمله پنس، فویل‌های آلومینیومی، هاون چینی، فالكون‌ها و غیره، در داخل ظرف حاوی آب تیمار شده با دی‌اتیل پیرو کربنات^۱ (DEPC) خنثی نشده قرار گرفت تا آنزیم ریبونوکلاز^۲ (RNase) احتمالی موجود بر روی آنها خنثی گردد و نهایتاً بعد از ۲۴ ساعت با هدف خنثی نمودن DEPC دو بار به مدت ۱۵ دقیقه وسایل ذکر شده اتوکلاو شدند. DEPC با اتصال به گروه هیستیدین (Histidine) موجود در جایگاه فعال آنزیم‌ها و RNase باعث غیرفعال شدن این آنزیم‌ها گردیده و از تجزیه RNA استخراج شده جلوگیری می‌نماید.

رونویسی معکوس: سنتز cDNA و RT-PCR: سنتز cDNA برای miRNA بصورت اختصاصی و با استفاده از کیت اختصاصی (PrimeScript tm 1st Strand cDNA Synthesis Kit) محصول شرکت تجاری (Takara) انجام شد. برای ساخت cDNA ابتدا لازم است محلول RNA استخراج شده از هر گونه آلودگی به DNA و آنزیم‌های تخریب‌کننده RNA حذف شود.

3. Ethylenediaminetetraacetic acid
4. Cycle threshold

1. Diethyl pyrocarbonate
2. Ribonuclease

جدول ۲. پرایمرهای استفاده شده RT-PCR

Accession No.	Symbol Gene	Forward	Reverse	product length (bp)
NC_051345.1	miR-195	5'-CTGGCTCTAGCAGCACAGAAAT-3'	5'-CCTGGAGCAGCACAGCCAATA-3'	70

یافته‌ها

با توجه به آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (جدول ۳)، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در شاخص‌های مورد مطالعه مشاهده شد. گلوکز خون ناشتا ($F_{(3,96)} = 264/595$, $P = 0/001$) ($F_{(3,96)} = 49/534$, $P < 0/001$)

روش‌های آماری

نتایج بر اساس تغییر فولد ژن خانه (GAPDH) مشخص و نسبت به گروه کنترل نرمال‌سازی شد. توزیع نرمال داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک تأیید شد. از آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه بمنظور تفاوت‌های بین‌گروهی و از آزمون تعقیبی توکی برای مشاهده تفاوت‌های استفاده شد. تمامی تحلیل‌ها در سطح معنی‌داری $P < 0/05$ و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۷ صورت گرفت.

جدول ۳. نتایج آزمون آماری آنوای یک‌طرفه شاخص‌های مورد مطالعه در گروه‌های مختلف در پایان هفته هشتم

متغیر	گروه‌ها	میانگین	انحراف استاندارد	F	P	اندازه اثر
FBS (mg/dL)	کنترل سالم	۹۲/۲۰	۹/۴۹	۲۶۴/۵۹۵	۰/۰۰۱**	۰/۹۸
	کنترل دیابت	۳۹۶/۲۰	۳۳/۵۸			
	تمرین دیابت	۱۳۳/۲۰	۱۷/۹۲			
بیان نسبی ژن miR-195 به U6 (Fold change)	کنترل سالم	۰/۹۹	۰/۳۱	۴۹/۵۳۴	۰/۰۰۱**	۰/۹۰
	کنترل دیابت	۵/۳۱	۱/۱۲			
	تمرین دیابت	۳/۸۶	۰/۲۵			

**/اختلاف معناداری در سطح $P < 0/01$

با توجه به آزمون تعقیبی توکی (جدول ۴)، در گلوکز خون ناشتا (شکل ۱) و miR-195 (شکل ۲) تفاوت معنی‌دار در گروه کنترل سالم به گروه‌های کنترل دیابت و تمرین دیابت مشاهده شد.

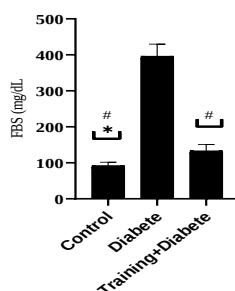
با توجه به آزمون تعقیبی توکی (جدول ۴)، در گلوکز خون ناشتا (شکل ۱) و miR-195 (شکل ۲) تفاوت معنی‌دار در گروه کنترل سالم به گروه‌های کنترل دیابت و تمرین دیابت مشاهده شد.

جدول ۴. نتایج آزمون تعقیبی توکی به منظور بررسی اختلاف بین گروه‌ها

گروه	متغیر	FBS (mg/dL)	بیان نسبی ژن miR-195
کنترل سالم	کنترل دیابت	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۱**
	تمرین دیابت	۰/۰۲۶*	۰/۰۰۱**
کنترل دیابت	تمرین دیابت	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۸*

*/اختلاف معناداری در سطح $P < 0/05$

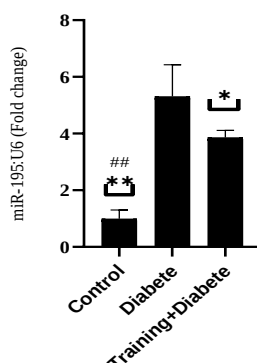
**/اختلاف معناداری در سطح $P < 0/01$



شکل ۱. مقادیر انسولین خون ناشتا در بافت قلب گروه‌های مورد بررسی

نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل دیابت در سطح $P < 0/01$

* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه تمرین دیابت در سطح $P < 0/05$



شکل ۲. بیان نسبیتی ژن miR-195 در بافت قلب گروه‌های مورد بررسی

نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل دیابت در سطح $P < 0.01$

* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل دیابت در سطح $P < 0.05$

** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه تمرین دیابت در سطح $P < 0.01$

دیابت تسهیل می‌کند (۳۰). از سوی دیگر در شرایط دیابت، اسیدهای چرب تولید شده از بافت چربی با تجمع در سلول‌های عضلانی، انتقال GLUT4 به سطح این سلول‌ها را مختل می‌کنند. فعالیت بدنی باعث اکسید شدن اسیدهای چرب و جلوگیری از تجمع آنها در سلول‌های عضلانی می‌شود (۳۱). این عمل منجر به کاهش هیپرگلیسمی می‌شود.

ما نشان دادیم که هشت هفته دیابت باعث افزایش بیان miR-195 در بافت قلب شد، که با مطالعات بلاسکچیک و همکاران (۲۰۲۴) و شریواستاو (۲۰۲۴) همسو بود (۳۲، ۳۳). دلیل افزایش بیان miR-195 در مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل کاهش بیان Sirt1 و BCL2 باشد، که منجر به تغییرات ساختاری و عملکردی در قلب بیماران مبتلا به دیابت می‌شود (۱۴، ۱۵). همچنین، هشت هفته تمرین هوازی بیان miR-195 را در گروه تمرین دیابت بطور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش داد. مطالعه حاضر همسو با مطالعه کاشف و همکاران (۲۰۲۳) بود. این مطالعه نشان داد که شش هفته تمرین مقاومتی و هوازی باعث کاهش بیان miR-195 در گروه تمرین نسبت به گروه دیابت شد (۲۰). در مطالعه دیگر توسط خاکدان و همکاران (۲۰۲۰) به این نتیجه رسیدند که هشت هفته (HIIT) بطور موثر بیان miR-195 را در موش‌های صحرایی دیابتی کاهش داد (۱۵). همچنین در راستای مطالعه لی و همکاران (۲۰۱۷)، آنها کاهش miR-195 را پس از یک دوره تمرین مقاومتی نشان دادند (۳۴). ناهمسو با مطالعه حاضر، رولندز و همکاران (۲۰۱۴) افزایش بیان miR-195 را در عضله اسکلتی با ۱۶ هفته تمرین مقاومتی در ۱۷ بزرگسال ۴۹ ساله مبتلا به دیابت نوع دو نشان داد (۳۵). دلیل ناهمسو بودن این مطالعه با مطالعه حاضر می‌تواند در تفاوت

بحث

مطالعه حاضر به بررسی تأثیر هشت هفته تمرین هوازی بر بیان ژن miR-195 در بافت قلب موش‌های دیابت نوع دو پرداخت. هشت هفته T2DM منجر به افزایش معنی‌دار در گلوکز و بیان ژن miR-195 شد. با این حال، هشت هفته تمرین هوازی منجر به کاهش معنی‌دار در گلوکز و بیان ژن miR-195 نسبت به گروه کنترل دیابتی شد.

نتایج مطالعه حاضر پس از تزریق STZ، FBS در موش‌هایی که تحت تزریق قرار گرفتند، به طور معنی‌داری بیشتر از موش‌های گروه سالم بود. این موضوع نشان‌دهنده القای دیابت نوع دو با تزریق STZ بود. استرپتوزوسین، به دلیل شباهت ساختاری با مولکول گلوکز، از طریق ناقل گلوکز (GLUT2) وارد سلول بتا پانکراس می‌شود. مکانیسم اثر آن تولید رادیکال‌های آزاد است که باعث آسیب DNA می‌شود. آسیب DNA ناشی از استرپتوزوسین، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند گلوکز ۶-فسفاتاز کبدی و دیابتوژن استرپتوزوسین می‌گردد. این فرایند سلول را از (NAD) گزانتین اکسید تخلیه می‌کند، در نتیجه‌ی فعالیت این آنزیم رادیکال‌های آزاد تولید و باعث تخریب بافت پانکراس می‌شوند. در نهایت این منجر به افزایش قندخون و عدم ترشح انسولین در پلازما می‌شود (۲۷، ۲۸). تمرینات ورزشی فواید قابل توجهی برای قلب بیماران دیابتی دارد، که بطور مستقیم از طریق تأثیر بر مولکول‌های میوکارد یا بطور غیرمستقیم از طریق کاهش هیپرگلیسمی می‌باشد (۲۹). مهار فسفوریلاسیون (AKT) که در قلب دیابتی اتفاق می‌افتد، بطور قابل توجهی با ورزش معکوس می‌شود و GLUT4 را در سارکولمای کاردیومیوسیت‌ها افزایش می‌دهد. بنابراین متابولیسم گلوکز را در قلب مبتلا به

آزمودنی‌های مورد مطالعه، مدت زمان تمرین، نوع تمرین و بافت مورد نظر باشد.

کاهش miR-195 از طریق مکانیسم‌های متعددی، اختلال عملکرد قلبی را در کاردیومیوسیت‌ها کاهش می‌دهد. یکی از آنها miR است که هدف مستقیم miR-195 است. یکی از آنها مسیر Sirt1 است که در آن miR-195 با تأثیر مستقیم بر Sirt1 و جلوگیری از استرس شبکه آندوپلاسمی و آپوپتوز، جریان پایین دستی این پروتئین را تنظیم می‌کند (۳۱). BCL2 دومین مسیری است که هدف مستقیم miR-195 است. افزایش بیان miR-195 در قلب دیابتی با بیان BCL2 همبستگی معکوس دارد (۳۰). BCL2 مسؤول کنترل مرگ و تکثیر سلولی است (۳۶). Sirt1 متعلق به خانواده‌ی پروتئین‌های سیرتونین (SIRT) می‌باشد، این پروتئین فرایندهای بیولوژیکی مختلف مانند ترمیم DNA، تثبیت ژنوم، هموستاز گلوکز و لیپید را تنظیم می‌کند (۱۰). از داده‌های مطالعه‌ی حاضر به وضوح مشخص می‌شود که سطوح سرمی FBS در موش‌های گروه مبتلا به دیابت نسبت به موش‌های گروه سالم به شدت افزایش یافته و همبستگی مثبتی با بیان miR-195 دارد. تاکنون مکانیسم‌های اساسی مسؤول اثرات تمرینات هوازی بر بهبود متابولیسم گلوکز و لیپید به ندرت گزارش شده است (۳۷). بنابراین ژنگ و همکاران نشان داد که مهار بیان miR-195-5p هیپرتروفی را در موش‌های دیابتی ناشی از استرپتوزوسین کاهش می‌دهد. در مطالعه آنها، بیان بیش از حد miR-195-5p به طور قابل توجهی باعث افزایش هیپرتروفی قلبی ناشی از AngII شد. خاموش کردن درمانی miR-195 عملکرد میوکارد را در دیابت با کاهش آسیب اکسیداتیو، مهار آپوپتوز و ترویج رگ‌زایی سلول‌های اندوتلیال بهبود می‌بخشد. نویسندگان به این نتیجه رسیدند که miR-195 ممکن است یک هدف درمانی جایگزین برای بیماری‌های قلبی دیابتی باشد (۱۶). انتشارات قلبی نشان داده‌اند که miR-195 بیان ژن BCL-2 و Sirt1 را در کاردیومیوسیت‌ها مهار می‌کند و منجر به کاهش سطح این پروتئین‌ها در قلب‌های دیابتی می‌شود. کاهش بیان miR-195 باعث افزایش سطح پروتئین BCL-2 شد که یک پروتئین ضد آپوپتوز شناخته شده است. Sirt1 که توسط رسوراترول فعال می‌شود، باعث بهبود عملکرد قلب در مدل‌های

حیوانی دیابت می‌شود. miR-195 می‌تواند با تأثیر بر التهاب سیستمیک، حساسیت به انسولین و ایجاد آسیب کبدی به دیابتی کمک کند (۳۸، ۳۹). اخیراً خاموش کردن miR-195 برای کاهش هیپرتروفی قلب و آپوپتوز پیشنهاد شده است. این جریان خون کرونر، عملکرد قلب و کاردیومیوپاتی دیابتی ناشی از تزریق STZ را در موش‌های مبتلا به دیابت بهبود می‌بخشد (۱۶). اخیراً نشان داده شده است تغییر سطح سرمی miR-195 پس از تمرین ورزشی می‌تواند با فعال‌شدن مکانیسم مولکولی در عضلات اسکلتی مرتبط باشد (۲۹).

به عنوان یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های این تحقیق باید اشاره شود که در خصوص توجیه مکانیسم‌های مختص به تمرین هوازی امکان ارائه اطلاعات زیادی وجود ندارد. همچنین، می‌توان اشاره نمود که عدم کنترل میزان دقیق مصرف مواد غذایی، عدم کنترل میزان خواب و میزان دقیق فعالیت و حساسیت به استرپتوزوسین و نبود امکان کنترل شرایط استرس‌های ناشی از مداخله در طول اجرای تحقیق از محدودیت‌های مطالعه حاضر بود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی مصرف غذا، فعالیت و خواب تا حد امکان کنترل شود و سطوح بیان ژن miR-195 در بافت‌های متخلف اندازه‌گیری و بررسی شود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی به نظر می‌رسد ابتلاء به T2DM منجر به افزایش بیان miR-195 بافت قلبی موش‌های صحرایی می‌شود، که این افزایش توسط تمرین هوازی دوییدن کاهش چشمگیری می‌یابد. در نتیجه، مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تمرین هوازی بالقوه استراتژی درمانی برای بهبود و کاهش بیان ژن miR-195 در بافت قلب بود.

تشکر و قدردانی

از تمامی افرادی که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند، سپاسگزاریم.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارند.

منابع

1. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;138. doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.023.
2. Caria ACI, Nonaka CKV, Pereira CS, Soares MBP, Macambira SG, Souza BS de F. Exercise training-induced changes in microRNAs: Beneficial regulatory effects in hypertension, type 2 diabetes, and obesity. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. doi: 10.3390/ijms19113608.
3. Chandrasekera D, Katare R. Exosomal microRNAs in diabetic heart disease. Vol. 21, *Cardiovascular Diabetology*. 2022. doi: 10.1186/s12933-022-01544-2.

4. Hayat SA, Patel B, Khattar RS, Malik RA. Diabetic cardiomyopathy: Mechanisms, diagnosis and treatment. Vol. 107, *Clinical Science*. 2004. doi: 10.1042/CS20040057.
5. Lew JKS, Pearson JT, Saw E, Tsuchimochi H, Wei M, Ghosh N, et al. Exercise Regulates MicroRNAs to Preserve Coronary and Cardiac Function in the Diabetic Heart. *Circ Res*. 2020;127(11). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317604.
6. Mahjoob G, Ahmadi Y, Fatima rajani H, khababaei N, Abolhasani S. Circulating microRNAs as predictive biomarkers of coronary artery diseases in type 2 diabetes patients. Vol. 36, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2022. doi:10.1002/jcla.24380.
7. Fluit MB, Mohit N, Gambhir KK, Nunlee-Bland G. To the Future: The Role of Exosome-Derived microRNAs as Markers, Mediators, and Therapies for Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. Vol. 2022, *Journal of Diabetes Research*. 2022. doi: 10.1155/2022/5126968.
8. Shen YH, Xie ZB, Yue AM, Wei QD, Zhao HF, Yin HD, et al. Expression level of microRNA-195 in the serum of patients with gastric cancer and its relationship with the clinicopathological staging of the cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(7). doi: 10.18632/oncotarget.21919.
9. Yu W, Liang X, Li X, Zhang Y, Sun Z, Liu Y, et al. MicroRNA-195: A review of its role in cancers. Vol. 11, *OncoTargets and Therapy*. 2018. doi: 10.2147/OTT.S183600.
10. Guo R, Nair S. Role of microRNA in diabetic cardiomyopathy: From mechanism to intervention. Vol. 1863, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2017. doi: 10.1016/j.bbdis.2017.03.013.
11. Ghosh N, Katore R. Molecular mechanism of diabetic cardiomyopathy and modulation of microRNA function by synthetic oligonucleotides. Vol. 17, *Cardiovascular Diabetology*. 2018. doi: 10.1186/s12933-018-0684-1.
12. Chen H, Untiveros GM, McKee LAK, Perez J, Li J, Antin PB, et al. Micro-RNA-195 and -451 regulate the LKB1/AMPK signaling axis by targeting MO25. *PLoS One*. 2012;7(7). doi: 10.1371/journal.pone.0041574.
13. Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, Simpson E, Nam YJ, Matkovich SJ, et al. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res*. 2011;109(6). doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.248880.
14. Delfan M, Kordi MR, Ravasi AA, Safa M, Nasli Esfahani E, Rambod K. The Effect of High-Intensity Interval Training and Continuous Endurance Training on Gene Expression of mir-1 and IGF-1 in Cardiomyocyte of Diabetic Male Rats. *Journal of Sport Biosciences*. 2021 May 22, 13(1):11–23. doi: 10.22059/JSB.2021.118369.892. [In Persian].
15. Khakdan S, Delfan M, Heydarpour Meymeh M, Kazerouni F, Ghaedi H, Shanaki M, et al. High-intensity interval training (HIIT) effectively enhances heart function via miR-195-dependent cardiomyopathy reduction in high-fat high-fructose diet-induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem*. 2020;126(3).doi: 10.1080/13813455.2018.1511599.
16. Zheng D, Ma J, Yu Y, Li M, Ni R, Wang G, et al. Silencing of miR-195 reduces diabetic cardiomyopathy in C57BL/6 mice. *Diabetologia*. 2015;58(8). doi: 10.1007/s00125-015-3622-8.
17. Ding H, Yao J, Xie H, Wang C, Chen J, Wei K, et al. MicroRNA-195-5p Downregulation Inhibits Endothelial Mesenchymal Transition and Myocardial Fibrosis in Diabetic Cardiomyopathy by Targeting Smad7 and Inhibiting Transforming Growth Factor Beta 1-Smads-Snail Pathway. *Front Physiol*. 2021;12. doi: 10.3389/fphys.2021.709123.
18. Colberg SR, Sigal RJ, Yardley JE, Riddell MC, Dunstan DW, Dempsey PC, et al. Physical activity/exercise and diabetes: A position statement of the American Diabetes Association. Vol. 39, *Diabetes Care*. 2016. doi: 10.2337/dc16-1728.
19. Maryam D, Mohammad Reza K, Asghar Ra, Majid S, Ansieh Na, Kamelia R. The effect of a period of intense intermittent training and continuous endurance on the expression of mir-1 and IGF 1 gene in cardiomyocytes of diabetic male rats. Vol. 13, *Sports biological sciences (movement)*; 2021. p. 1–13. doi.org/10.22059/jsb.2021.118369.892. [In Persian].
20. Kashef M, Salehpour M, Shahidi F, Nejatmand N. Comparing the Effect of Six Weeks of Aerobic and Resistance Training on Expression miR-195 in Male Rats with Diabetic Cardiomyopathy. *Journal of Isfahan Medical School*. 2023;40(704). doi 10.48305/jims.v40.i704.1128. [In Persian].
21. Sasidharan SR, Joseph JA, Anandakumar S, Venkatesan V, Ariyattu Madhavan CN, Agarwal A. An experimental approach for selecting appropriate rodent diets for research studies on metabolic disorders. *Biomed Res Int*. 2013;2013. doi: 10.1155/2013/752870.
22. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*. 2005;52(4). doi: 10.1016/j.phrs.2005.05.004.
23. Schwingshackl L, Missbach B, Dias S, König J, Hoffmann G. Impact of different training modalities on glycaemic control and blood lipids in patients with type 2 diabetes: A systematic review and network meta-analysis. Vol. 57, *Diabetologia*. 2014. doi: 10.1007/s00125-014-3303-z.
24. Nakos I, Kadoglou NPE, Gkeka P, Tzallas AT, Giannakeas N, Tsalikakis DG, et al. Exercise training attenuates the development of cardiac autonomic dysfunction in diabetic rats. *In Vivo (Brooklyn)*. 2018;32(6). doi: 10.21873/invivo.11396.
25. Mehri K, Hamidian G, Babri S, Farajdokht F, Zavvari Oskuye Z. Exercise and insulin glargine administration in mothers with diabetes during pregnancy ameliorate function of testis in offspring: Consequences on apelin-13 and its receptor. *Life Sci*. 2024 Apr 1;342:122517. doi: 10.1016/J.LFS.2024.122517.
26. Waring CD, Vicinanza C, Papalamprou A, Smith AJ, Purushothaman S, Goldspink DF, et al. The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. *Eur Heart J*. 2014;35(39). doi: 10.1093/eurheartj/ehs338.
27. Eimen M, Hosseinzadeh H. Animal models of diabetes. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*. 2003; 2(0):33. Available from: <https://jdmd.tums.ac.ir/index.php/jdmd/article/view/29>. [In Persian].
28. Amini ali, parto paria, Yousufvand namdar. The effect of induced diabetes and its treatment with zinc sulfate & vanadium on the reproductive system in rats. *Studies in Medical Sciences*. 2016; 27(6):476–85. Available from: <http://umj.umsu.ac.ir/article-1-3271-en.html>. [In Persian].
29. Khakdan S, Delfan M, Heydarpour Meymeh M, Kazerouni F, Ghaedi H, Shanaki M, et al. High-intensity interval training (HIIT) effectively enhances heart function via miR-195-dependent cardiomyopathy reduction in high-fat high-fructose diet-induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem*. 2020;126(3).doi: 10.1080/13813455.2018.1511599.

30. Wang H, Bei Y, Lu Y, Sun W, Liu Q, Wang Y, et al. Exercise prevents cardiac injury and improves mitochondrial biogenesis in advanced diabetic cardiomyopathy with PGC-1 α and Akt activation. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015;35(6). doi: 10.1159/000374021.
31. Ramzany N, Gaeini A, Choobineh S, Kordi M, Hedayati M. Changes of RBP-4 and insulin resistance after 8 weeks of aerobic training in type 2 diabetic rats. *Metabolism and Exercise*. 2017 Jan 20; 5(2):89–98. Available from: https://jme.guilan.ac.ir/article_2065_en.html. [In Persian].
32. Błaszczyk R, Petniak A, Bogucki J, Kocki J, Wysokiński A, Głowniak A. Association between Resistant Arterial Hypertension, Type 2 Diabetes, and Selected microRNAs. *J Clin Med*. 2024 Jan 18;13(2):542. doi: 10.3390/jcm13020542.
33. Shrivastav D, Singh DD. Emerging roles of microRNAs as diagnostics and potential therapeutic interest in type 2 diabetes mellitus. *World J Clin Cases*. 2024;12(3). doi: 10.12998/wjcc.v12.i3.525.
34. Margolis LM, Lessard SJ, Ezzyat Y, Fielding RA, Rivas DA. Circulating MicroRNA Are Predictive of Aging and Acute Adaptive Response to Resistance Exercise in Men. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*. 2017;72(10). doi: 10.1093/gerona/glw243.
35. Rowlands DS, Page RA, Sukala WR, Giri M, Ghimbovschi SD, Hayat I, et al. Multi-Omic integrated networks connect DNA methylation and miRNA with skeletal muscle plasticity to chronic exercise in type 2 diabetic obesity. *Physiol Genomics*. 2014;46(20). doi: 10.1152/physiolgenomics.00024.2014.
36. Papait R, Serio S, Condorelli G. Role of the epigenome in heart failure. Vol. 100, *Physiological Reviews*. 2020. doi: 10.1152/physrev.00037.2019.
37. Dore H, Freitas A, Malhotra A, Mendes M, Sharma S. The hearts of competitive athletes: An up-to-date overview of exercise-induced cardiac adaptations. Vol. 34, *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2015. doi: 10.1016/j.repc.2014.07.010.
38. Sulaiman M, Matta MJ, Sunderesan NR, Gupta MP, Periasamy M, Gupta M. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates sarcoplasmic calcium ATPase and improves cardiac function in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(3). doi: 10.1152/ajpheart.00418.2009.
39. Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS Journal*. 2011;278(3). doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07965.x.

