

The Effect of Eight Weeks of Aerobic Training on miR-195 Gene Expression in Heart Tissue of Wistar Rats

Received:

2024/04/25

Accepted:

2024/06/05

Online ISSN

3060-7078

Elaheh Piralaiy

1. Assistant Professor,
Department of Exercise
Physiology, Faculty of
Physical Education and Sport
Sciences, University of
Tabriz, Tabriz, Iran.

Badrkhan Rashwan Ismael
PhD student, Exercise
Physiology, Department of
Exercise Physiology, Faculty of
Physical Education and Sports
Sciences, University of Tabriz,
Tabriz, Iran.

***Correspondence:**

Email: piralaiy@tabrizu.ac.ir
Orcid: 0000-0003-2395-2031

ABSTRACT

Purposes: A considerable body of evidence supports the protective role of exercise training in cardiovascular health. Therefore, this study aimed to investigate the effects of aerobic training on miR-195 gene expression in the heart tissue of Wistar rats.

Materials and Methods: 12 Male Wistar rats aged eight weeks with a mean weight of 253 ± 21 g were randomly divided into two groups: 1) control and 2) aerobic training. The training protocol included running on a treadmill at a speed of 5-24 m/min for 10-60 minutes, five days a week, observing the overload principle. 48 hours after the last training session, all rats were anesthetized with ketamine and xylazine solution, and heart tissue samples were taken from the rats. The expression level of the miR-195 gene in heart tissue was measured using real-time PCR. Independent t-test was used using SPSS software at a significance level of ($p < 0.05$).

Results: Statistical findings for miR-195 gene expression values showed that the implementation of the aerobic training protocol increased the expression of the miR-195 gene compared to the control group ($p = 0.001$).

Conclusion: It seems that the increase in miR-195 gene expression through aerobic training decreases the expression of collagen isoforms. Also, this increase in miR-195 gene expression may play a role in the physiological hypertrophy caused by direct aerobic training in regulating the extracellular matrix.

Keywords: Aerobic Training, Heart Tissue, Healthy Wistar Rats, miR-195.

Extended abstract

Background: The term "cardiovascular disease" (CVD) refers to a variety of diseases that affect the heart and blood vessels, including myocardial ischemia, congenital heart defects, heart failure, rheumatic heart disease, high blood pressure, peripheral artery disease, atherosclerosis, and cardiomyopathies (1). Myocardial tissue is an electro active tissue capable of transmitting electrical signals that lead to a simultaneous heartbeat. Electrical impulses originate from the atrial sinus node and spread through the myocardium to induce mechanical contraction of cardiomyocytes. Cardiovascular disease as the leading cause of death worldwide is often associated with disturbances in the electrical integrity of heart tissue and arrhythmias. In many arrhythmias, a lack of conductivity as well as unidirectional conductivity leads to sufficient intercellular electrical connectivity in the gap connections. Due to the limitations of conventional therapies such as heart transplantation, pathological research and treatment in the field of heart disorders have increased in recent years (2). According to the World Health Organization, CVD accounted for approximately 33.3% of global deaths in 2021, leading to about 20.5 million deaths (3). MicroRNAs are key regulators of genetic programs such as endothelial function, lipid metabolism, cardiac development, ventricular hypertrophy, and heart rate impairment after myocardial infarction (5). Recent studies have demonstrated the prominent effects of microRNAs on the extracellular matrix of cardiology (6). MicroRNAs play a role in the growth of cells, especially cardiac cells, and help increase the level of nitric oxide in vascular antimony injuries and thus prevent the adhesion of platelets and leukocytes to the walls of the vessels and prevent disturbance in the coagulation cascade. Many scientists believe that microRNA prevents endothelin factor production in vascular contractions and prevents myocardial infarction (7). Aberrant microRNA expression has been associated with a number of myocardial pathological conditions, including hypertrophy, fibrosis, apoptosis, remodeling, arrhythmia, and heart failure (11,12). MiR-195 is associated with cardiac hypertrophy and heart failure. Xie et al. (2020) investigated the effect of miR-195 on cardiomyocyte apoptosis in heart failure mice by regulating the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway and acknowledged that miR-195 can induce inhibition of cardiomyocyte apoptosis by regulating the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway and improve heart function in HF rats (21). On the other hand, aerobic exercise reduces resting heart rate, increases diastolic time, and consequently improves myocardial blood supply (22). Lifestyle modification by increasing physical activity is one of the effective methods of preventing cardiovascular disease (25). According to studies, regular exercise by reducing plasma lipids and blood glucose, reducing oxidative stress, and increasing insulin sensitivity improves and modulates complications of cardiovascular disease (26, 27). In this regard, Khakdan et al. (2020) evaluated the role of exercise in miR-195 expression and myocardial function and stated that exercise training improves heart function (20). This study was conducted with the aim of determining the effect of eight weeks of aerobic training on miR-195 gene expression in heart tissue of healthy rats.

Methodology: The present study was conducted according to the regulation of working with laboratory animals. In this study 12 male Wistar rats, were collected from the animal laboratory of Tabriz Veterinary University. Their average age and weight was eight weeks and 253 \pm 21 g. All interventions were started after at least two weeks of animals' exposure to temperature conditions of 20-22°C, relative humidity of 55-65%, minimal noise, and light-to-dark cycle from 12:12. The rats were divided into two groups of six rats including healthy control, and aerobic training groups. The protocol consists of eight weeks aerobic training, five days a week, observing the principle of overload on the treadmill. The training method consisted of three phases: warming up, the main part of the exercise, and cooling down. Exercises in the warm-up and cool-down phases were considered for five minutes at a speed of 50% of their maximum speed. Exercises for main part were performed at the speed of 5-10 m/min with a time of 10-15 in the first week and at the speed of 18-24 with a

time of 60 minutes in the eighth week. Also, the healthy control group did not participate in exercise programs. 48 hours after the last training session, heart tissue samples were taken and all rats underwent painless surgery by intraperitoneal injection of combination of ketamine and xylazine. After washing, the removed tissue was frozen and then stored in a -80°C freezer for further measurements. RNA extraction was done using two 50-reaction RNA extraction kits made by EURX in Poland from all tissue samples according to the instructions of the kit. Synthesis of cDNA was done exclusively using a special kit (Synthesis Kit PrimeScript™ 1st Strand cDNA) product of Takara commercial company. The primers of the studied genes using the existing software (Primer 3) and (Primer Express®) on the sequence of primers and designers (Gene Bank) and then with the software (oligo 7) and in terms of specific value in Nabi/Primer. After completing and obtaining the threshold cycles (CT) of the desired measurements, using mathematical calculations (A2), the level of the target expression level was normalized according to the reference controller U6. Finally, to check the normal distribution of the data, the Shapiro-Wilk test and then the independent t-test were used to check the significant difference between the control group and the training group at a significance level of $p < 0.05$ by using SPSS version 27 software.

Results: Statistical findings for miR-195 gene expression values showed that the implementation of the aerobic training protocol increased the expression of the miR-195 gene compared to the control group ($p=0.001$).

Conclusion: The findings of this study showed that the level of miR-195 was lower in the healthy control group compared to training group. The protocol of continuous aerobic training increased the expression of the miR-195 gene compared to the healthy control group. Studies have shown that exercise training regulates mRNAs in skeletal muscle, cardiology, and the immune system (36). These changes regulate the expression of target genes, resulting in short and long-term adaptations. However, the molecular mechanisms by which exercise practices influence the expression of miRNAs remain somewhat unknown (37). From the findings of that study, it can be concluded that aerobic training induces physiological hypertrophy in the heart in the training group and significantly increases the expression of miR-195, an increase in miR-195 expression probably leads to a significant decrease in expression of collagen type 1 and type 3. An increase in miR-195 in physiological hypertrophy caused by aerobic exercise may directly lead to an increase in ventricular compliance, however it requires further studies in this area.

Keywords: Aerobic Training, Heart Tissue, Healthy Wistar Rats, miR-195.

تاثیر هشت هفته تمرین هوازی بر بیان ژن miR-195 در بافت قلب موش‌های صحرایی نژاد ویستار

چکیده	<p>تاریخ ارسال: ۱۴۰۳/۰۲/۰۵</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۶</p> <p>شاپا الکترونیکی ۳۰۶۰-۷۰۷۸</p>
<p>مقدمه: مجموعه قابل توجهی از شواهد از نقش محافظتی تمرین ورزشی در قلب و عروق حمایت می‌کند. بنابراین هدف از این مطالعه حاضر بررسی اثرات تمرین هوازی بر بیان ژن miR-195 در بافت قلب موش‌های صحرایی نژاد ویستار بود.</p> <p>روش تحقیق: ۱۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار سن هشت هفته و میانگین وزن 253 ± 21 گرم به طور تصادفی به دو گروه (۱) کنترل، (۲) تمرین هوازی تقسیم شدند. پروتکل تمرین شامل دویدن روی تردمیل با سرعت ۵-۲۴ متر در دقیقه برای ۱۰-۶۰ دقیقه، بصورت پنج روز در هفته، با رعایت اصل اضافه بار بود. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، تمام موش‌ها با محلول کتامین و زایلازین بیهوش شدند و نمونه بافت قلبی از موش‌ها گرفته شد. سطح بیان ژن miR-195 در بافت قلب با استفاده از Real-time PCR اندازه‌گیری شد. از آزمون آماری تی مستقل با استفاده از نرم‌افزار SPSS در سطح معنی‌داری $p \leq 0.05$ استفاده شد.</p> <p>نتایج: یافته‌های آماری برای مقادیر بیان ژن miR-195 نشان داد که اجرای پروتکل تمرینی هوازی باعث افزایش در بیان ژن miR-195 در مقایسه با گروه کنترل شد ($p=0.001$).</p> <p>نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که افزایش بیان ژن miR-195 از طریق تمرینات هوازی باعث کاهش در بیان ایزوفوم‌های کلاژن می‌شود. همچنین، این افزایش بیان ژن miR-195 ممکن است در هیپرتروفی فیزیولوژیکی ناشی از تمرین هوازی مستقیم در تنظیم ماتریکس خارج سلولی نقش داشته باشد.</p>	<p>الهه پیرعلائی استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.</p> <p>بدرخان رشوان اسماعیل دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران</p>
<p>واژه‌های کلیدی: تمرین هوازی، بافت قلب، موش‌های صحرایی سالم، miR-195</p>	<p>* نویسنده مسئول: ایمیل: epiralaiy@tabrizu.ac.ir اورکید:</p>

مقدمه:

افزایش سطح سلامتی به خصوص سلامتی قلبی-عروقی و طول عمر انسان از حوزه‌های بسیار جالب توجه و چالش برانگیزی است که توجه بسیاری از متخصصان و فیزیولوژیست‌ها را به خود جلب کرده است. اصطلاح "بیماری‌های قلبی عروقی"^۱ (CVD) به بیماری‌های مختلفی اطلاق می‌شود که بر قلب و عروق خونی تأثیر می‌گذارد، از جمله ایسکمی میوکارد، نقص‌های مادرزادی قلب، نارسایی قلبی، بیماری روماتیسمی قلب، فشار خون بالا، بیماری شریان‌های محیطی، آترواسکلروز و کاردیومیوپاتی‌ها (۱). بافت میوکارد یک بافت الکترو اکتیو است که قادر به انتقال سیگنال‌های الکتریکی است که منجر به ضربان هم‌زمان قلب می‌شود. تکانه‌های الکتریکی از گره سینوسی دهلیزی سرچشمه می‌گیرند و از طریق میوکارد پخش می‌شوند تا انقباض مکانیکی کاردیومیوسیت‌ها را القا کنند، بیماری‌های قلبی-عروقی به‌عنوان عامل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان اغلب با اختلال در یکپارچگی الکتریکی بافت قلب و آریتمی همراه است. در بسیاری از آریتمی‌ها، فقدان رسانایی و همچنین هدایت یک‌جهته منجر به اتصال الکتریکی بین سلولی کافی در اتصالات شکاف می‌شود. با توجه به محدودیت روش‌های درمانی مرسوم مانند پیوند قلب، تحقیقات پاتولوژیک و درمانی در زمینه اختلالات قلب در چند سال اخیر افزایش یافته است (۲). به گفته سازمان جهانی بهداشت^۲، CVD ها تقریباً ۳۳/۳ درصد از مرگ و میرهای جهانی را در سال ۲۰۲۱ تشکیل می‌دادند که منجر به حدود ۲۰/۵ میلیون مرگ و میر شد. بر اساس مرجع ارائه شده، داده‌ها به طور متوسط روزانه ۵۶۰۰۰ تلفات را نشان می‌دهد. این رقم را می‌توان به‌عنوان یک مرگ که تقریباً در هر ۱/۰ ثانیه اتفاق می‌افتد تعبیر کرد (۳). طبق داده‌های مربوط به سلامت، بدیهی است که ایالات متحده با شیوع قابل توجهی از بیماری‌های قلبی عروقی مواجه است که در مجموع ۹۲/۱ میلیون نفر را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بیماری عروق کرونر قلب^۳ (CHD) به‌عنوان علت اصلی مرگ و میر مرتبط با CVD در ایالات متحده در طول یک سال مشخص شد. این وضعیت ۵۴ درصد موارد CVD را تشکیل می‌دهد و منجر به مرگ ۳۷۵۴۷۶ نفر می‌شود (۴).

microRNAها تنظیم‌کنندگان کلیدی برنامه‌های ژنتیکی مانند عملکرد اندوتلیال، متابولیسم چربی، تکامل قلبی، هایپرتروفی بطنی و اختلال ضربان قلب پس از انفارکتوس میوکارد هستند (۵). مطالعات اخیر اثرات برجسته microRNAها را بر ماتریکس خارج سلولی قلب و عروق نشان داده‌اند (۶). microRNAها در رشد سلول‌ها بخصوص سلول‌های قلبی نقش داشته و به افزایش سطح نیتریک اکساید در صدمات انتیمای عروقی کمک کرده و در نتیجه باعث پیشگیری از چسبندگی پلاکت‌ها و لکوسیت‌ها به دیواره عروق شده و از اختلال در آبشار انعقادی جلوگیری می‌کنند. بسیاری از دانشمندان معتقدند microRNA از تولید فاکتور اندوتلین در انقباضات عروقی پیشگیری کرده و از انفارکتوس میوکارد جلوگیری می‌کند (۷). تاکنون بیش از ۲۶۰۰ microRNA در ژنوم انسان شناسایی شده است که ثبات و پایداری آنها درون خون به‌عنوان یک نشانه مهم تعیین‌کننده پیشرفت بیماری است. بعضی از آنها در عموم بافت‌ها و بعضی به شکل اختصاصی در بافتی معین وجود دارد (۸،۹).

microRNA یک توالی RNA غیر کدگذاری شده کوچک متشکل از ۱۸-۲۲ نوکلئوتید است که عملکرد آن تنظیم بیان ژن‌های ضروری برای انجام فعالیت‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیک سلولی است (۱۰). بیان نابجای microRNA با تعدادی از شرایط پاتولوژیک میوکارد از جمله هیپرتروفی، فیبروز، آپوپتوز، بازسازی، آریتمی و نارسایی قلبی مرتبط است (۱۱،۱۲). به این ترتیب، miRها به‌عنوان اهداف درمانی جدید برای بیماری‌های قلبی پیشنهاد شده‌اند (۱۳،۱۴). miR-195 به‌عنوان یکی از جدیدترین miRهای درگیر در نظر گرفته می‌شود که به طور خاص در عضله قلب بیان می‌شود (۱۵،۱۶). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که miR-195 با هیپرتروفی قلبی و نارسایی قلبی مرتبط است (۱۷-۱۹). افزایش بیان miR-195 منجر به کاهش بیان

¹ Cardiovascular diseases

² World Health Organization (WHO)

³ Congenital heart defects

Sirt1^۴ و BCL2^۵ می‌شود (۲۰). بیان بیش از حد miR-195 برای القای هیپرتروفی قلبی و نارسایی قلبی در موش‌های تراریخته کافی است (۱۸). زی^۶ و همکاران (۲۰۲۰) اثر miR-195 بر آپوپتوز کاردیومیوسیت در موش‌های مبتلا به نارسایی قلبی با تنظیم مسیر سیگنالینگ TGF-β1/Smad3 بررسی کرده و اذعان داشتند که miR-195 می‌تواند با تنظیم مسیر سیگنالینگ TGF-β1/Smad3، آپوپتوز کاردیومیوسیت را مهار کرده و عملکرد قلب را در موش‌های صحرایی HF بهبود بخشد (۲۱). فعالیت ورزشی هوازی باعث کاهش ضریب قلب استراحتی، افزایش زمان دیاستول و در نتیجه بهبود خون‌رسانی به میوکارد می‌شود (۲۲). در پژوهشی جوکار و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد ۱۲ هفته تمرین شنای استقامتی از طریق افزایش پیش‌بار قلبی می‌تواند اثرات مفیدی بر ابعاد پایان دیاستولی بطن چپ و حجم ضربه‌ای قلب پسران نوجوان غیرفعال داشته باشد (۲۳). در این راستا، فتحی و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که هشت هفته تمرین هوازی منجر به بهبود در آمادگی قلبی تنفسی در زنان میانسال شد و می‌تواند به کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی کمک کند (۲۴). تعدیل شیوه زندگی به وسیله افزایش فعالیت بدنی یکی از روش‌های موثر در پیشگیری از بروز بیماری‌های قلبی عروقی محسوب می‌شود (۲۵). براساس مطالعات صورت گرفته انجام فعالیت‌های ورزشی منظم از طریق کاهش سطوح لیپیدهای پلاسمایی و گلوکز خون، کاهش استرس اکسایشی و افزایش حساسیت انسولینی موجب بهبود و تعدیل عوارض ناشی از بیماری قلبی عروقی می‌شود (۲۶، ۲۷). ورزش منظم بدنی به عنوان یک تعدیل کننده قوی عملکرد سیستم ایمنی شناخته شده است، زیرا شواهد قوی وجود دارد مبنی بر اینکه تمرین بر بیان و فعالیت خاص RNAهای غیر کدکننده که در تنظیم سیستم ایمنی نقش دارند، موثر است (۲۸). در این راستا خاکدان و همکاران (۲۰۲۰) نقش تمرینات ورزشی را در بیان miR-195 و عملکرد میوکارد ارزیابی کرده و بیان داشتند که تمرینات ورزشی موجب بهبود در عملکرد قلب شود (۲۰).

با توجه به اثر مثبت فعالیت بدنی به نظر می‌آید که پژوهش‌ها بر عملکردی سلولی و مولکولی ناشی از ورزش بتواند در آینده به استفاده از فعالیت بدنی به عنوان یک درمان هدفمند و بدون عوارض منجر شود. با توجه به اندک بودن مطالعات انجام شده در زمینه‌ی تاثیر فعالیت ورزشی بر miRNAهای موثر در فرآیند بافت قلب و با عنایت به جست و جوی‌های انجام شده، تاکنون تحقیقی که اثرات تمرین هوازی بر بیان ژن miR-195 در بافت قلبی موش‌های صحرایی سالم را بررسی کرده باشد یافت نشد، لذا این مطالعه با هدف تعیین تاثیر هشت هفته تمرین هوازی بر بیان ژن miR-195 در بافت قلبی موش‌های صحرایی سالم انجام شده است.

روش تحقیق:

در این مطالعه بنیادی و تجربی ۱۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزن 253 ± 21 گرم و سن هشت هفته‌ای در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز بر اساس آیین نامه نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی پس از تایید کمیته اخلاق دانشگاه تبریز با شناسه (IR.TABRIZU.REC.1402.037) انجام شد. آنها پس از انتقال به آزمایشگاه تخصصی فیزیولوژی ورزشی این واحد دانشگاهی در دمای محیط ۲۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، رطوبت هوا ۶۵-۵۵ درصد نگهداری شدند. در طول دوره موش‌ها به شکل پلت‌های استاندارد با دسترسی آزاد در جیره‌ی غذایی معمولی تغذیه شامل: ذرت، نشاسته ذرت، گلوتن ذرت، کربنات کلسیم، دی کلسیم فسفات، پریمیکس ویتامین و مواد معدنی تغذیه شدند. همچنین بطری‌های آب ۵۰۰ میلی‌لیتری برای هر قفس در نظر گرفته شد، که به طور منظم تعویض می‌گردید. این دوره بعد از یک هفته آشنایی با محیط و تغذیه با غذای معمولی انجام شد. در انتها ۱۲ سر موش صحرایی وارد گروه‌های مطالعه شدند. ۱۲ موش صحرایی به‌طور

⁴ Sirtuin 1

⁵ B-cell lymphoma 2

⁶ Xie

تصادفی در دو گروه (N=6) شامل ۱- کنترل ۲- تمرین هوازی تقسیم شدند.

برنامه تمرینی

گروه‌ها به مدت هفت روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. طی دوره آشنایی، شیب نوارگردان صفر درصد و سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۵-۱۰ دقیقه در روز بود. گروه‌های تمرین هوازی برنامه تمرینی را روی تردمیل پنج روز در هفته به مدت هشت هفته انجام دادند (جدول ۱). پنج دقیقه در ابتدای تمرین برای گرم کردن و پنج دقیقه در انتهای تمرین برای سردکردن در نظر گرفته شد. شدت تمرین برای گرم کردن و سردکردن معادل ۵۰ درصد حداکثر سرعت دویدن در نظر گرفته شد (۲۹). به منظور تحریک موش‌ها برای دویدن، از محرک صوتی (ضربه به دیواره تردمیل) استفاده شد، بدین صورت که در جلسات اول از محرک الکتریکی ولتاژ کم همراه با محرک صوتی استفاده و 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 صحرائی گروه کنترل نیز برای آشنایی با تردمیل، به صورت بدون حرکت روی تردمیل قرار گرفتند. تمام مراحل تمرین با رعایت اساس اصل اضافه بار اجرا گردد.

جدول ۱. پروتکل تمرین هوازی با رعایت اصل اضافه بار

شیب	زمان (دقیقه)	سرعت (متر/دقیقه)
۱۰	۱۵-۱۰	۱۰-۵
۱۰	۲۰	۱۴-۱۰
۱۰	۳۰	۱۸-۱۴
۱۰	۴۰	۲۴-۱۸
۱۰	۶۰	۲۴-۱۸
۱۰	۶۰	۲۴-۱۸

نمونه‌برداری و ارزیابی آزمایشگاهی

با رعایت مسائل اخلاقی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین در پایان هفته هشتم، (به منظور حذف اثر حاد تمرینات)، همه موش‌ها در همه گروه‌ها، وزن کشتی شدند، سپس موش‌ها با استفاده از محلول کتامین زایلازین، با تزریق سه واحد محلول کتامین (۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) جهت اندازه‌گیری پارامترهای مورد مطالعه، بیهوش و مورد جراحی قرار گرفتند و بافت عضله قلب آنها خارج شد. بافت عضله قلب خارج و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی و جداکردن قسمت‌های زاید، به نیتروژن مایع انتقال یافته و سپس در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش 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 آزمایش‌های تمامی وسایل مورد استفاده شامل پنس، فویل‌های آلومینیومی، هاون چینی، فالكون‌ها و... در داخل ظرف حاوی آب تیمار شده با دی اتیل پیرو کربنات^۷ (DEPC)،

⁷ Diethyl pyrocarbonate

خنثی نشده قرار گرفت تا آنزیم ریبونوکلاز^۸ RNase احتمالی موجود بر روی آنها خنثی گردد و نهایتاً بعد از ۲۴ ساعت باهدف خنثی نمودن DEPC ۲ بار به مدت ۱۵ دقیقه وسایل ذکر شده اتوکلاو شد. 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^۹ به صورت اختصاصی و با استفاده از کیت اختصاصی (PrimeScript tm Synthesis Kit 1st Strand cDNA) 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. بنابراین ۱ میکروگرم از محلول استخراج شده RNA با آنزیم DNase^{۱۰} بافر و بازدارنده RNase به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شد. پس از آن اتیلندی آمین تتراستیک اسید^{۱۱} (EDTA) به نمونه‌ها اضافه شد و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه 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 فرآیند سنجش آغاز شد. کلیه اندازه‌گیری‌ها سه بار بر روی هر نمونه انجام گرفت.

برای انجام واکنش Real Time PCR از دستگاه (Corbet Rotor gene 6000) استفاده شد. پروتکل Real time PCR برای اندازه‌گیری عوامل بر مبنای روش (سایبرگرین) شامل ۴ 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 (۶۵-۹۵ درجه سانتی‌گراد) بود. برای تعیین سطح نسبی miR-195 از دستگاه Real-time PCR مدل (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 (Primer³) و (PrimerExpress[®]) 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^{۱۲} (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 که باز از مقدار به دست آمده در نمونه مرجع (کنترل) کسر شد. fold change با استفاده از معادله 2- $\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد

جدول ۲. توالی، طول محصول و دمای ذوب پرایمر استفاده شده

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

⁸ Ribonuclease

⁹ Complementary DNA

¹⁰ Deoxyribonuclease

¹¹ Ethylenediaminetetraacetic acid

¹² cycle threshold

روش آماری:

نتایج بر اساس تغییر فولد ژن خانه GAPDH مشخص و نسبت به گروه کنترل نرمال سازی شد. برای بررسی توزیع نرمال بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک و سپس از آزمون آماری تی مستقل برای بررسی اختلاف معنی‌داری میانگین‌های بین گروه‌های کنترل و تمرین در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۷ صورت گرفت.

یافته‌ها:

مقادیر (میانگین \pm انحراف معیار) وزن و سطح بیان ژن miR-195 در بافت قلب موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه در جدول (۳) گزارش شده است.

جدول ۳. مقادیر وزن و سطح بیان ژن miR-195 گروه کنترل سالم، نسبت به گروه تمرین سالم بیان شده است

گروه مورد مطالعه		متغیر	
تمرین (N=6)	کنترل (N=6)	پیش	وزن
۲۵۴ \pm ۱۹/۳۹	۲۵۲ \pm ۲۳/۳۲		
۳۰۶ \pm ۲۳/۱۹	۲۹۵/۶۰ \pm ۱۸/۸۳	پس	
۲/۰۶ \pm ۰/۰۸	۰/۹۹ \pm ۰/۱۴	سطح بیان miR-195	

نتایج:

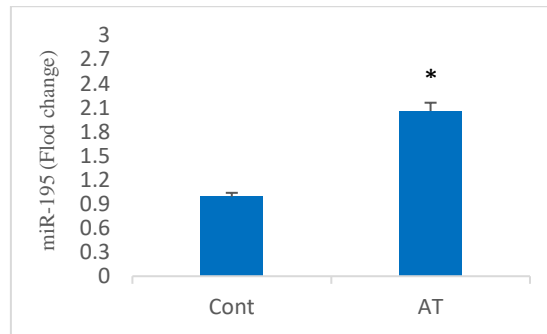
میزان میانگین و انحراف استاندارد و مقدار تی و سطح معنی‌داری نسبت بیان ژن miR-195 در گروه‌های مطالعه به ترتیب بدست آمد (جدول ۴).

جدول ۴. نتایج آزمون T مستقل

شاخص‌ها	گروه	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد	مقدار T	سطح معنی‌داری
سطح بیان miR-195	کنترل	۶	۰/۹۹	۰/۳۱	-۶/۵۰۱	۰/۰۰۱*
	تمرین هوازی	۶	۲/۰۶	۰/۱۸		

* سطح معنی‌داری کمتر از $P < 0.001$

نتایج آزمون آماری تی مستقل نشان داد که اجرای هشت هفته تمرین هوازی سبب افزایش در بیان ژن miR-195 در مقایسه با گروه کنترل شد، که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود ($p = 0.001$). این نتایج حاکی از آن است که اجرای تمرین هوازی تاثیر مثبت بر بیان ژن miR-195 در بافت قلب موش‌هایی که هشت هفته در این پروتکل شرکت داشتند، دارد.

شکل ۱. مقادیر miR-195 در گروه‌های مورد مطالعه * سطح تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل $P < 0.001$ 

بحث و نتیجه‌گیری:

اثر تمرینات هوازی بر بیان ژن miR-195 در بافت قلب موش‌های صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت. اجرای هشت هفته تمرینی هوازی سبب افزایش در بیان ژن miR-195 در بافت قلب در مقایسه با گروه کنترل شد، که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود ($p=0.001$).

در ارتباط با تمرینات ورزشی و عملکرد قلب همیشه گفت که تمرینات ورزشی تاثیر مثبت بر قلب و عملکرد قلب می‌گذارد. چندین مطالعه حیوانی در بین این‌ها (وانگ^{۱۳} و همکاران ۲۰۱۵)، (لوگاناتان^{۱۴} و همکاران ۲۰۰۷). بیان کردند که ورزش منجر به افزایش EF^{۱۵} و بهبود در LV^{۱۶} می‌شود و قلب را بهبود می‌بخشد (۳۰، ۳۱). تمرینات هوازی به طور قابل توجهی بر نحوه کنترل عملکرد قلب توسط سیستم عصبی خودمختار تأثیر می‌گذارد. تمرینات ورزشی هوازی باعث افزایش فعالیت پاراسمپاتیک و کاهش فعالیت سمپاتیک در قلب انسان در حالت استراحت می‌شود (۳۲).

چندین miRNA بر اساس مدل‌های حیوانی در نارسایی قلبی شناسایی و مشخص شده‌اند که miR-195 یکی از مهمترین آنهاست (۳۳). miR-195 مجموعه‌ای از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، از جمله کلاژن‌ها، پروتئوگلیکان‌ها، الاستین و پروتئین‌های مرتبط با میکروفیبریل‌های الاستیک را هدف قرار می‌دهد، همچنین miR-195 یک تنظیم کننده قوی ماتریکس خارج سلولی آئورت است (۳۴). در تأیید یافته‌های حاضر، نکویی^{۱۷} و همکاران (۲۰۱۶) افزایش معنی‌دار بیان برخی از miRNAها در قلب موش‌های سالم مشاهده کردند (۳۵). نتیجه تحقیق ما همسو به تحقیق خاکدان و همکاران (۲۰۲۰) بود که در تحقیق خودشان موش‌ها به چهار گروه تقسیم کردند. گروه سالم کنترل، گروه کم‌تحرکی، گروه تمرین استقامتی مداوم، گروه تمرین تناوبی با شدت بالا. پس از هشت هفته دویدن، بیان miR-195 و عملکرد میوکارد ارزیابی شد. یافته‌های این تحقیق نشان داد که سطح miR-195 در گروه سالم کنترل در مقابل هر سه گروه مورد مطالعه پایین تر بود، پروتکل تمرین استقامتی مداوم و تمرین تناوبی با شدت بالا سبب افزایش در بیان ژن miR-195 در مقایسه با گروه کنترل سالم شد بود که این افزایش معنی‌دار بود (۲۰). مطالعات نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی mRNAs را در عضله اسکلتی، قلب و عروق و سیستم ایمنی بدن تنظیم می‌کنند (۳۶). این تغییرات بیان ژن‌های هدف را تنظیم می‌کند و در نتیجه منجر به سازگاری‌های کوتاه و طولانی می‌گردد. با این وجود، مکانیسم‌های مولکولی که از طریق آن تمرینات ورزشی بیان miRNAs را تحت تأثیر قرار می‌دهد تا حدودی ناشناخته

¹³ Wang

¹⁴ Loganathan

¹⁵ Ejection Fraction

¹⁶ Left ventricular

¹⁷ nekouei

باقی مانده است (۳۷). القای بیان miR-195 باعث افزایش آپوپتوز و تولید گونه‌های اکسیژن فعال^{۱۸} (ROS) در کاردیومیوسیت‌ها می‌شود. miR-195 مستقیماً Sirt1 را هدف قرار می‌دهد و بیان Sirt1 را سرکوب می‌کند. Sirt1 تولید ROS را مهار می‌کند و از کاردیومیوسیت‌ها در برابر آپوپتوز محافظت می‌کند (۳۸). در حالی که Sirt1 یک تنظیم‌کننده مهم هموستاز انرژی در پاسخ به در دسترس بودن مواد مغذی و مرتبط با افزایش طول عمر است، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که Sirt1 یک مهارکننده آپوپتوسیس درون‌زا در قلب است (۳۹-۴۲). اثرات محافظتی miRZip-195 در قلب ممکن است با تنظیم مثبت BCL-2 مرتبط باشد. Sirt1 یک هیستون/پروتئین داستیلاز کلاس III، تصور می‌شود که عامل مهمی در تنظیم بقای قلبی باشد (۴۳-۴۵). رسوراترول فعال‌کننده Sirt1 عملکرد قلب را در مدل‌های حیوانی بهبود می‌بخشد (۴۶-۴۸). در بیماران دیابت خاموش‌سازی درمانی miR-195 هایپرتروفی میوکارد را کاهش می‌دهد، گردش خون کرونر را بهبود می‌بخشد و اختلال عملکرد میوکارد را در موش‌های دیابتی کاهش می‌دهد. این اثرات با کاهش استرس اکسیداتیو و آپوپتوز و افزایش آنژیوژنز سلول‌های اندوتلیال در قلب‌های دیابتی مرتبط است (۴۹). بیان نابجای miR با تعدادی از شرایط پاتولوژیک میوکارد از جمله هایپرتروفی، فیبروز، آپوپتوز، تولید مجدد، آریتمی و نارسایی قلبی مرتبط است (۱۲,۵۰). وقتی miR-195 بیان می‌شود باعث القای هایپرتروفی قلبی و نارسایی قلبی می‌شود (۱۸). می‌توان اشاره نمود که عدم کنترل میزان دقیق مصرف مواد غذایی، عدم کنترل میزان خواب و میزان دقیق فعالیت و نبود امکان کنترل شرایط استرس‌های ناشی از مداخله در طول اجرای تحقیق از محدودیت‌های مطالعه حاضر بود. همچنین مدت زمان تمرین و فعال‌شدن هورمون‌هایی نظیر کاتکولامین‌ها و کورتیزول در طول تمرین که می‌تواند از دیگر عوامل تاثیر گذار بر نتایج تحقیق حاضر باشد. با این حال، هنگام نگارش مقاله حاضر، هیچ مطالعه‌ای در مورد اثرات تمرین ورزشی (بخصوص هوازی) بر بیان miR-195 در بافت قلبی موش‌های صحرایی سالم مشاهده نشد، لذا مطالعه حاضر احتمالاً اولین مطالعه از این نوع می‌باشد که نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه وجود دارد. بنابراین، مطالعه حاضر نشان داد که هشت هفته تمرین هوازی بر بیان miR-195 تاثیر گذار است. نتایج این پژوهش افزایش بیان miR-195 پس از هشت هفته تمرین هوازی در برابر گروه کنترل سالم نشان داد. در نهایت پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی علاوه بر تمرینات هوازی، سایر تمرینات ورزشی با شدت، مدت و زمان متفاوت در miR-195 در بافت‌های متخلف مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری:

از یافته‌های آن تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که تمرینات هوازی باعث القای هایپرتروفی فیزیولوژیکی در قلب در گروه تمرین و افزایش قابل توجه بیان ژن miR-195 می‌شود، افزایش بیان ژن miR-195 احتمالاً منجر به کاهش قابل توجه بیان (کلاژن نوع ۱ و کلاژن نوع ۳) شود، افزایش miR-195 در هایپرتروفی فیزیولوژیکی ناشی از ورزش هوازی ممکن است مستقیماً منجر به افزایش کامپلیانس بطنی شود که نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه دارد.

تقدیر و تشکر

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

¹⁸ Reactive oxygen species

- Khan SU, Khan SU, Suleman M, Khan MU, Khan MS, Arbi FM, et al. Natural Allies for Heart Health: Nrf2 Activation and Cardiovascular Disease Management. *Curr Probl Cardiol*. 2024 Jan 1;49(1):102084.
- Kawamura T, Muraoka I. Exercise-induced oxidative stress and the effects of antioxidant intake from a physiological viewpoint. Vol. 7, *Antioxidants*. 2018.
- Casper E. The crosstalk between Nrf2 and NF- κ B pathways in coronary artery disease: Can it be regulated by SIRT6? Vol. 330, *Life Sciences*. 2023.
- Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(1).
- Shahidi F, Kashef M, Delfani Z. A Review of Exercise-Based Rehabilitation Strategies in Patients with Myocardial Infarction: Focus on High-Intensity Interval Training. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2022 Feb 1 24(6):778–91. Available from: <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-6922-en.html>
- Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(35).
- Basiri S, Nejad F. Can miRNAs play a role in the prevention of cardiovascular diseases? 2021 <https://civilica.com/doc/1145530>
- Dlouhá D, Hubáček JA. Regulatory RNAs and cardiovascular disease - With a special focus on circulating microRNAs. *Physiol Res*. 2017;66.
- Westermeier F, Riquelme JA, Pavez M, Garrido V, Díaz A, Verdejo HE, et al. New molecular insights of insulin in diabetic cardiomyopathy. Vol. 7, *Frontiers in Physiology*. 2016.
- Jiang M, Liu F, Yang AG, Wang W, Zhang R. The role of long non-coding RNAs in the pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. Vol. 24, *Molecular Therapy Oncolytics*. 2022.
- Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, Gupta SK, Lorenzen J, Hartmann D, et al. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation*. 2011;124(6).
- Li RC, Tao J, Guo YB, Wu H Di, Liu RF, Bai Y, et al. In vivo, suppression of microRNA-24 prevents the transition toward decompensated hypertrophy in aortic-constricted mice. *Circ Res*. 2013;112(4).
- Laggerbauer B, Engelhardt S. MicroRNAs as therapeutic targets in cardiovascular disease. Vol. 132, *Journal of Clinical Investigation*. 2022.
- Quiat D, Olson EN. MicroRNAs in cardiovascular disease: From pathogenesis to prevention and treatment. Vol. 123, *Journal of Clinical Investigation*. 2013.
- 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.
- Ghosh N, Katare R. Molecular mechanism of diabetic cardiomyopathy and modulation of microRNA function by synthetic oligonucleotides. Vol. 17, *Cardiovascular Diabetology*. 2018.
- 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).
- Van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48).
- 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).
- 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).
- Xie C, Qi H, Huan L, Yang Y. Effect of miR-195-5p on cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure by regulating TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. Vol. 40, *Bioscience Reports*. 2020.
- Rumsfeld JS, Alexander KP, Goff DC, Graham MM, Ho PM, Masoudi FA, et al. Cardiovascular health: The importance of measuring patient-reported health status a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127(22).
- Jokar P, Behpoor N, Fasihi L, Fasihi A, Ebrahimi Torkamani B. The Effect of a Twelve-week Endurance Swimming Training on Structural and Functional Features of Heart in Inactive Male Adolescents. *Scientific Journal of Rehabilitation Medicine*. 2021 Sep 1;10(4):756–67.
- Fathei M, Hejazi K, Kiani Gol M. The effect of Eight weeks of aerobic training on Resistin levels and cardiorespiratory fitness in sedentary middle-aged women. *medical journal of Mashhad University of Medical Sciences*. 2015 Nov 22;58(9):489–97. Available from: https://mjms.mums.ac.ir/article_6503_en.html
- Dixon JB. The effect of obesity on health outcomes. Vol. 316, *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2010.
- Eapen DJ, Ghasemzadeh N, MacNamara JP, Quyyumi A. The Evaluation of Novel Biomarkers and the Multiple Biomarker Approach in the Prediction of Cardiovascular Disease. Vol. 8, *Current Cardiovascular Risk Reports*. 2014.
- Mair J, Jaffe AS. Biomarker tests for risk assessment in coronary artery disease: Will they change clinical practice? *Mol Diagn Ther*. 2014;18(1).
- Kotewitsch M, Heimer M, Schmitz B, Mooren FC. Non-coding RNAs in exercise immunology: A systematic review. *J Sport Health Sci*. 2023 Nov; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37925072/>
- Souza CS, de Sousa Oliveira BS, Viana GN, Correia TML, de Bragança AC, Canale D, et al. Preventive effect of exercise training on diabetic kidney disease in ovariectomized rats with type 1 diabetes. *Exp Biol Med*. 2019;244(9).
- 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).
- Loganathan R, Bilgen M, Al-Hafez B, Zhero S V., Alenezzy MD, Smirnova I V. Exercise training improves cardiac performance in diabetes: In vivo demonstration with quantitative cine-MRI analyses. *J Appl Physiol*. 2007;102(2).
- Sloan RP, Shapiro PA, DeMeersman RE, Bagiella E, Brondolo EN, McKinley PS, et al. The effect of aerobic training and cardiac autonomic regulation in young adults. *Am J Public Health*. 2009;99(5).
- Klimczak-Tomaniak D, Haponiuk-Skwarlińska J, Kuch M, Pączek L. Crosstalk between microRNA and Oxidative Stress in Heart Failure: A Systematic Review. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. 2022.
- Zampetaki A, Attia R, Mayr U, Gomes RSM, Phinikaridou A, Yin X, et al. Role of miR-195 in aortic aneurysmal disease. *Circ Res*. 2014;115(10).
- nekouei amin, kordi 2. Mohammad Reza, Choobineh 3. Seroose, Soleimani M, Shafiee Ahad, Hadidi V. The Effect of Eight Week Continuous Training on Expression of Mir29mRNA, In Healthy Male Rat's Cardiac Muscle. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*.

- 2016;17(6):113–20. Available from: <http://78.39.35.44/article-1-2427-en.html>
- Jourkesh M, Soori R, Earnest CP, Mirheidari L, Ravasi AA, Stannard SR, et al. Effects of six weeks of resistance-endurance training on microRNA-29 expression in the heart of ovariectomized rats. *Przeglad Menopauzalny*. 2018;17(4).
- Soci UPR, Fernandes T, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu MA, Rosa KT, et al. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics*. 2011;43(11).
- Zhu H, Yang Y, Wang Y, Li J, Schiller PW, Peng T. MicroRNA-195 promotes palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes by down-regulating Sirt1. *Cardiovasc Res*. 2011;92(1).
- Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins - Emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. Vol. 20, *Genes and Development*. 2006.
- Alcendor RR, Kirshenbaum LA, Imai SI, Vatner SF, Sadoshima J. Silent information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2004 Nov 12;95(10):971–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15486319/>
- Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*. 2007 May;100(10):1512–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17446436/>
- Pillai JB, Gupta M, Rajamohan SB, Lang R, Raman J, Gupta MP. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice are protected from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(4).
- Zhu H, Yang Y, Wang Y, Li J, Schiller PW, Peng T. MicroRNA-195 promotes palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes by down-regulating Sirt1. *Cardiovasc Res*. 2011 Oct 1;92(1):75–84. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr145>
- Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, et al. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2009 Apr 10;104(7):879–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19265035/>
- Hsu CP, Zhai P, Yamamoto T, Maejima Y, Matsushima S, Hariharan N, et al. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation*. 2010 Nov 23;122(21):2170–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21060073/>
- 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).
- Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Otani H, et al. Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(5).
- Zhang H, Morgan B, Potter BJ, Ma L, Dellsperger KC, Ungvari Z, et al. Resveratrol improves left ventricular diastolic relaxation in type 2 diabetes by inhibiting oxidative/nitrative stress: in vivo demonstration with magnetic resonance imaging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Oct;299(4): H985. Available from: </PMC/articles/PMC2957362/>
- Chen YQ, Wang XX, Yao XM, Zhang DL, Yang XF, Tian SF, et al. Abated microRNA-195 expression protected mesangial cells from apoptosis in early diabetic renal injury in mice. *J Nephrol*. 2012 Jul;25(4):566–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21983986/>
- Fiedler J, Jazbutyte V, Kirchmaier BC, Gupta SK, Lorenzen J, Hartmann D, et al. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation*. 2011 Aug 9;124(6):720–30. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/circulationaha.111.039008>

