Research Paper

Received: 20 May 2020
Last revised: 05 Aug 2020
Accepted: 19 Aug 2020

Comparison of the effects of two types of high intensity interval training on the gene expression of collagen 1, 2, and SMAD/3 in the left ventricle of male rats in type 2 diabetes induced by streptozotocin

Sara Fereshtian[1], Maghsoud Peeri[1]*, Hamid Agha-Alinejad[2], Maryam Delfan[3]

1. Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Exercise Physiology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Department of Exercise Physiology, Alzahra University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: m.peeri@iauctb.ac.ir**

Citation: Fereshtian S, Peeri M, Agha-Alinejad H, Delfan M. Comparison of the effects of two types of high intensity interval training on the gene expression of collagen 1, 2, and SMAD/3 in the left ventricle of male rats in type 2 diabetes induced by streptozotocin. Daneshvar Medicine 2020; 28(3):41-53.

Abstract

Background and Objective: High-intensity interval training reduces diabetic cardiomyopathy by regulating gene expression in patients with diabetes. The aim of this study was to compare the effect of two types of high intensity interval training on the expression of collagen 1, 2 and SMAD/3 genes in the left ventricle of male rats with type 2 diabetes.

Materials and Methods: The present study was experimental. For this purpose, 28 male Wistar rats were divided into four groups: type 1 high-intensity interval training (HIIT1:1), type 2 high-intensity interval training (HIIT2:1), diabetic control (DC), and non-diabetic control (NC). Diabetes was induced in all groups except non-diabetic control group by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) after 12 hours of overnight fasting. 24 hours after the last training and recovery session, their left ventricle was extracted. Plasma glucose concentration was measured by the glucose oxidase method, ELISA method was used to measure the insulin levels, and the HOMA-IR method was used to measure the insulin resistance index. A real-time PCR technique was used to evaluate the gene expression of the collagens 1 , 2 , and SMAD/3 genes. Results were analyzed with one-way ANOVA and Tukey post hoc tests.

Results: Collagen 1 did not show a significant difference between the two exercise groups (p = 0.112). The mean values of both exercise groups were significantly lower than in the diabetic control group in collagen expression (p = 0.0001). The mean values of collagen 2 gene expression in the HIIT2: 1 training group were significantly lower than the HIIT1: 1 group (P = 0.044) and diabetic control (P = 0.002). The mean values of SMAD / 3 gene expression in HIIT2: 1 group were significantly lower than HIIT1: 1 (P = 0.002) and diabetic control (P = 0.020). The mean weight values and insulin resistance index in the HIIT1 group and glucose in the HIIT2: 1 group were significantly lower.

Conclusion: Based on the findings, it can be concluded that 4 weeks of type 2 HIIT compared to other groups had a higher effect on reducing the expression of collagen 2 and SMAD / 3 genes in the left ventricle of diabetic rats with down-regulated of genes. Therefore HIIT-2 may improve diabetic cardiomyopathy syptoms.

Keywords: High intensity interval training, Collagen, SMAD/3, Insulin resistance

مقاله پژوهشی

مقایسه اثر دو نوع تمرین تناوبی شدید بر بیان ژنهای کلاژن ۱، ۲ و SMAD/3 در بطن چپ موش های بزرگ آزمایشگاهی نر مبتلا به دیابت نوع ۲ القاء شده با استرپتوزوسین

نویسندگان: سارا فرشتیان [۱]، مقصود پیری [۱*]، حمیدآقا علینژاد [۲]، مریم دلفان [۳]

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: مقصود پیری **Email: m.peeri@iautcb.ac.ir**

دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۳۱
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۹/۰۵/۱۵
پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۹

چکیده

مقدمه و هدف: تمرین تناوبی با شدت متناسب به وسیله تنظیم بیان ژن در بیماران مبتلا به دیابت، کاردیومیوپاتی دیابتی را کاهش می دهد. هدف از این مطالعه مقایسه اثر دو نوع تمرین تناوبی شدید بر بیان ژنهای کلاژن ۱، ۲ و SMAD/3 در بطن چپ موش های بزرگ آزمایشگاهی نر مبتلا به دیابت نوع ۲ بود.

مواد و روش ها: پژوهش حاضر از نوع تجربی است. بدین منظور ۲۸ سر موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر دیابتی به چهار گروه ۷ تایی تقسیم شدند؛ تمرین تناوبی شدید نوع ۱ (HIIT1:1)، تمرین تناوبی شدید نوع ۲ (HIIT2:1)، کنترل دیابتی (DC)، کنترل سالم (NC) تقسیم شدند. القاء دیابت به همه گروه‌ها به جز کنترل سالم توسط تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین (STZ) پس از ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه انجام شد. ۲٤ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و ریکاوری بعد از آن آزمودنی‌ها بی‌هوش شدند. سپس بطن چپ آنها استخراج شد. گلوکز پلاسما توسط روش گلوکز اکسیداز، مقادیر انسولین با روش الایزا و مقاومت به انسولین با روش HOMA-IR اندازه گیری شد. جهت تعیین بیان ژنهای کلاژن ۱، ۲ و SMAD/3 از روش Real time-PCR و مقایسه گروه ها توسط (one way anova) و آزمون تعقیبی Tukey برای تعیین اختلاف بین گروهی در سطح آلفای ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج: کلاژن ۱ در بین هر دو گروه تمرین تفاوت معناداری را نشان نداد (**p=**۰/۱۱۲). میانگین مقادیر هر دو گروه تمرین نسبت به گروه کنترل دیابتی به صورت معناداری در بیان کلاژن ۱ کمتر بود (**p=**۰/۰۰۰۱). میانگین مقادیر بیان ژن کلاژن ۲ در گروه تمرین **HIIT2:1** نسبت به گروه **HIIT1:1** (**P=**۰/۰٤٤) و کنترل دیابتی (**P=**۰/۰۰۲) به صورت معناداری کمتر بود. میانگین مقادیر بیان ژن **SMAD/3** در گروه **HIIT2:1** نسبت به **HIIT1:1** (**P=**۰/۰۰۲) و کنترل دیابتی (**P=**۰/۰۲۰) به صورت معناداری کمتر بود. میانگین مقادیر وزن و شاخص مقاومت به انسولین در گروه **HIIT1:1** و گلوکز در گروه **HIIT2:1** به صورت معناداری کمتر بود.

نتیجه گیری: بر اساس یافته های بدست آمده می توان چنین نتیجه گیری کرد ٤ هفته تمرین HIIT نوع ۲ با تأثیر بالاتر بر کاهش بیان ژنهای کلاژن ۲ و SMAD/3 در بطن چپ موش های بزرگ آزمایشگاهی دیابتی بد تنظیمی ژن را تعدیل کرده و احتمالاً می تواند کاردیومیوپاتی دیابتی را بهبود بخشد.

واژه های کلیدی: تمرین تناوبی شدید، کلاژن، SMAD/3، مقاومت به انسولین

مقدمه

دیابت نوع ۲ جزء شایعترین بیماری‌های سندروم متابولیک می‌باشد (۱). به طوری که عنوان شده افراد مبتلا به دیابت چهار برابر افراد غیر دیابتی در معرض ابتلا به کاردیومیوپاتی می‌باشند (۲).مسیرهای مختلفی در روند پاتولوژی ساختار و عملکرد قلب مبتلایان به دیابت ذکر شده که از جمله آنها می‌توان به پاتوژنهای مربوط به متابولیسم گلوکز، لیپید و پروتئین‌های فاکتور رونویسی که در مقاومت به انسولین، باعث سیگنال دهی به ماتریکس خارج سلول می‌شوند اشاره کرد (۳). افزایش قند خون و تولید محصولات پیشرفته گلیکاسیونی، استرس اکسایشی (٤) و التهاب ایجاد می‌کند (۵) که موجب تغییر در غشاء خارج سلول به دلیل مهار فاکتورهای میوژنین از راه تولید SMAD/3[1] می‌شود، بنابراین سنتز پروتئین های سطح غشاء نسبت به تجزیه پیشی می‌گیرد و تغییرات پاتولوژی در ساختار سلول ایجاد می‌کند (۵). همچنین در زمان افزایش مقاومت به انسولین خون و اکسیژن‌رسانی به قلب کاهش می‌یابد (٦) و افزایش موقتی در فشار بطن چپ به عنوان پاسخی جبرانی باعث افزایش تراکم کلاژن در غشاء بیرونی میوسیت می‌شود (۷). متعاقب این تغییرات سفتی و سختی در ساختار قلب به دلیل بالارفتن کلاژنهای نوع ۱ و ۲ ایجاد می‌شود (٦،۷). لازم به ذکر است که کلاژن‌های نوع ۱ و ۲ به عنوان پروتئین‌های مهم در تغییرات ساختار میوکارد شناخته شده‌اند (٦). به طوریکه عنوان شده افزایش ترشح کلاژن ۱ درجه سختی بافت قلب را نشان می‌دهد (۷). افزایش تولید و رهاسازی (AGE) باعث اتصال گیرنده AGE (RAGE) به AMPK می‌شود و مقدار پروتئین SMAD/3 افزایش یافته که موجب گسترش بالاتر سطوح کلاژن در غشاء خارجی میوسیت می‌شود (۸). همینطور تولید SMSD/3 موجب مهار عملکرد پروتئین کینازی AKT به PBK[2] و به وسیله کاهش یا مهار MTORC-1[3] عملکرد پروتئین انقباضی اکتین را تضعیف می‌کند (۹). سپس کاهش در اتصال کلسیم درون سلولی ایجاد می‌شود که باعث سنتز بیشتر کلاژن نوع ۱ می‌گردد (۱۰). این تغییرات در مبتلایان به بیماری قلبی نیز حادث می‌شود (۹،۱۰). از این رو عنوان شده انتقال گلوکز و اسیدهای چرب در افراد دیابتی به درستی انجام نمی‌شود (۹). که موجب جهش‌های ژنی به سمت تغییرات پاتولوژیکی در ارگانهای حیاتی از جمله قلب می گردد (۷). با این حال تاکنون مسیرهای ایجاد کاردیومیوپاتی دیابتی به طور دقیق شناسائی نشده‌اند (۱۱). اما آثار تعدیل کننده تمرین منظم در کاهش ابتلا به اختلال قلب دیابتی و نیز بهبود سلامت و تعادل در راه اندازی و مصرف بهتر گلوکز در کنار سایر مراحل درمانی به تأیید رسیده است (۱۲). در خصوص شدت تمرین عنوان شده تمرین HIIT که شامل تناوب‌های با شدت بالا و تناوب‌های استراحتی فعال با شدت کم است و به نوعی تمرین استقامتی معرفی می‌شود (۱۳). تناوب‌های استراحتی در این نوع از تمرینات که پس از اجرای وهله‌های شدید انجام می‌شود اثرگذاری بیشتری در انتقال گلوکز ایجاد کرده و نیز جهش‌های ژنی را در بیماران متابولیکی بهبود می‌بخشد (۱۲). در مطالعه حاضر از دو نوع تمرین تناوبی شدید استفاده شد. علت استفاده از انواع متفاوت این تمرینات، دستکاری در عوامل شدت و مدت تمرین است که به نوبه خود سبب تغییر در بکارگیری انواع مختلف تمرین برای گروه‌های خاص می-شود و نیز مکانیسم اثر تمرین را بر عوامل مولکولی و تغییرات مربوط به آن‌ها در راه اندازی آبشارهای پیام رسانی را تغییر می‌دهد. در مطالعات مربوط به عضله‌ی قلب به خصوص در ارتباط با کاردیومیوپاتی ناشی از دیابت، حجم کم یا زیاد تمرینات و یا شدت کم یا زیاد تمرین، تغییرات چشمگیری را در نتایج بالینی و آزمایشگاهی نشان داده است (۱٤،۱۵). با این حال در این خصوص نتایج متناقض و محدودی در دست است (۱٦).

1-Small mothers against decapentaplegic/3
2-Protein kinase B
3-Mammalian target of rapamycin

از آنجایی که اجرای برنامه تمرین تناوبی شدید به عنوان راهکاری مؤثر در کنار سایر درمان های داروئی و یا رژیم غذایی به بهبود کیفیت زندگی و سلامت قلب و عروق در بیماران دیابتی مورد توجه می‌باشد (۹،۱۲،۱۳). لذا این پژوهش در مقایسه اثر دو نوع تمرین تناوبی شدید بر بیان ژنهای کلاژن ۲،۱و SMAD/3 در بطن چپ موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر مبتلا به دیابت نوع ۲ القاء شده با STZ انجام شد.

مواد و روش ها

در پژوهش تجربی–آزمایشگاهی حاضر که با مدل حیوانی انجام شد، ۲۸ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار از مرکز تحقیقات رازی خریداری و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شدند. سن حیوانات ۵ تا ٦ هفته و در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم بود. تمام مراحل مختلف پژوهش با رعایت مسائل اخلاقی، مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلیسنگی و تصویب کد اخلاق IR.SSRC.REC.1398.548 اخذ شده از دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. حیوانات به طور تصادفی به ٤ گروه تقسیم شدند؛ ۱- گروه کنترل سالم NC (n=۷)، ۲- گروه کنترل دیابتیDC (n=۷)، ۳- گروه تمرین تناوبی شدی مدل ۱(HIIT1:1) (n=۷)، ٤- گروه تمرین تناوبی شدید مدل ۲(HIIT2:1) (n=۷). حیوانات در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف ساخت شرکت رازی راد و در محیط با دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ با دسترسی آزادانه به آب و غذای مخصوص حیوانات (پلت) نگهداری شدند.

نحوه القای دیابت

دیابت در همه حیوانات به جز گروه کنترل سالم بدین صورت القاء شد؛ پس از یک شب ناشتایی ابتدا محلول نیکوتین‌آمید با دوز ۱۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی تزریق شد. بعد از ۱۵ دقیقه، محلول تازه تهیه شده استرپتوزوتوسین (**STZ**) در بافر سیترات با **pH** ٤/٥ به صورت داخل صفاقی با دوز ٦۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بافر ۰/۰۵ مول سیترات به صورت حل شده گاواژ شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت از تزریق به وسیله از ورید دم حیوانات شاخص دیابتی شدن با در نظر گرفتن قند خون بالاتر از ۱۲٦ میلی‌گرم بر دسی لیتر تائید شد (۱۷). گروه کنترل سالم فقط بافر سیترات را با همان حجم ذکر شده دریافت نمودند.

اجرای تمرین

پس از یک هفته آشناسازی حیوانات با راه رفتن بر روی تردمیل مخصوص جوندگان با سرعت ٦ متر بر دقیقه، قبل از اجرای برنامه‌های تمرین، ابتدا ارزیابی توان هوازی با محاسبه سرعت بیشینه در زمان رسیدن به **VO2 max** و محاسبه شدت تمرین با استفاده از آزمون فزاینده لئاندرو و همکاران (۲۰۰۷) بدین صورت انجام شد: بعد از ۳ دقیقه گرم کردن با سرعت ۵ متر بر دقیقه و با شیب صفر درجه توسط تغییر در سرعت نوار گردان که در هر ۲ دقیقه یکبار **m/mim** ۰/۲ افزایش یافت. بر این اساس تعیین حداکثر سرعت بیشینه زمانی بود که حیوانات حداقل ۱ تا ۳ دقیقه نتوانند با یک سرعت ثابت بدوند و بلافاصله با افزایش سرعت قادر به دویدن نباشند (۱۸). در این مطالعه قبل از انجام پروتکل‌های تمرینی، هر دو مدل تمرین تناوبی شدید از لحاظ بار حجمی یکسان سازی شدند. در این راستا به مؤلفه‌های زمان و شدت تمرین توجه قرار گرفت و نهایتاً با محاسبات عددی، حجم دو نوع تمرین بدین صورت همسان سازی و تنظیم شد؛ برنامه تمرین تناوبی شدید مدل ۱ (**HIIT1:1**) شامل ۵ دقیقه گرم و سرد کردن با شدت ۳۰ درصد سرعت بیشینه (۵ متر بر دقیقه) و ٦ دقیقه تناوب تمرین با شدت ۸۵ درصد سرعت بیشینه در هفته اول که به ۲۰ دقیقه دویدن با شدت ۹۰ درصد سرعت بیشینه در پایان هفته چهارم رسید. تعداد تکرار تناوب با شدت بالا در دو هفته اول چهار تکرار بود که در هفته های سوم و چهارم به پنج تکرار رسید، زمان تناوب با شدت بالا

دو دقیقه و تناوب با شدت پائین نیز دو دقیقه بود. اجرای تمرین تناوبی شدید مدل ۲ (**HIIT2:1**) نیز پس از اجرای برنامه گرم و سرد کردن به نحوی که عنوان شد، شامل ٦ دقیقه با شدت ۸۵ درصد سرعت بیشینه در هفته اول و ۹۰ درصد سرعت بیشینه از هفته دوم تا پایان هفته چهارم اجرا شد. تناوب با شدت پائین ۳۰ درصد سرعت بیشینه رسید. تعداد تکرار تناوب با شدت بالا در هفته اول و دوم پنج تکرار، در هفته سوم و چهارم به هفت تکرار رسید. زمان تناوب با شدت بالا دو دقیقه و تناوب با شدت پائین ۱ دقیقه در نظر گرفته شد جدول ۱ (۱۸). همچنین بر طبق الگوی تمرینی انجام شده، سنجش **VO2max** در روز ششم هفته دوم بررسی شد و سرعت تمرین بر اساس آن تا پایان هفته چهارم تعیین شد. همینطور یک روز در هفته برای استراحت در نظر گرفته شد. گروه های کنترل سالم و کنترل دیابتی، در هیچگونه برنامه تمرینی شرکت نداشتند، اما برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان ۵ بار در هفته و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوار گردان کاملاً بی‌حرکت قرار می‌گرفتند.

جدول ۱. برنامه تمرین تناوبی با دو شدت متفاوت در مدت ۴ هفته

تمرین تناوبی شدید نوع ۱			**HIIT1:1**		
هفته های تمرین	۱	۲		۳	۴
تناوب با شدت بالا (m/min)	۱۲	۱۶		۱۸	۱۸
تناوب با شدت پائین (m/min)	۵	۶		۶	۶
سرعت بیشینه در زمان رسیدن به VO2max(ml/min)	۱۵	۱۸		۲۰	۲۰
تمرین تناوبی شدید نوع ۲			**HIIT2:1**		
زمان تمرین (**min**)	۶	۸		۱۰	۱۲
سرعت (**m/min**)	۹	۱۰		۱۰	۱۲

متغیر	نوع تمرین	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم
سرعت بیشینه در زمان رسیدن به VO2max(ml/min)	تمرین تناوبی شدید نوع ۱	۱۵	۱۸	۲۰	۲۰
	تمرین تناوبی شدید نوع ۲	۱۲	۱۶	۱۸	۱۸
زمان تمرین (min)	تمرین تناوبی شدید نوع ۱	۶	۸	۱۰	۱۲
	تمرین تناوبی شدید نوع ۲	۶	۸	۱۰	۱۲
سرعت (m/min)	تمرین تناوبی شدید نوع ۱	۱۲	۱۶	۱۸	۱۸
	تمرین تناوبی شدید نوع ۲	۹	۱۰	۱۰	۱۲

روش استخراج نمونه و سنجش ژن های کلاژن ۱، ۲ و SMAD/3

۲٤ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین موش‌های بزرگ آزمایشگاهی توسط تزریق درون صفاقی کتامین ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. سپس خون به طور مستقیم از بطن چپ حیوانات دریافت شد و در لوله های حاوی هپارین ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰ متر بر دقیقه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس بافت بطن چپ بلافاصله استخراج و در نیتروژن ۲۰- منجمد و برای سنجش بیان ژن در فریزر ۸۰- نگه‌داری شد. جهت سنجش بیان ژنهای کلاژن ۲،۱ و**SMAD/3** از روش **Realtime-PCR** با **Premix Extaqit** و از **GAPDH** به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. اندازه‌گیری مقدار بیان این ژن به صورت توأمان با هر یک از ژن‌ها به وسیله کیت **Mir nasy mini kit 50** (**qiagene** ساخت آلمان) و طبق دستورالعمل **Vandesompele** و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد (۱۹). برای استخراج **RNA** میزان ۵۰ میلی‌گرم بافت منجمد قلب حیوان هموژن کرده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت محلول **RNA** از آن استخراج شد، و با آنزیم **DNaseI** از هرگونه آلودگی به **DNA** و آنزیم های تخریب کننده **RNA** پاکسازی شد. از هرکدام از نمونه‌ها ۲ میکروگرم **mRNA** برای سنتز اولین رشته **cDNA** استفاده شد**.** مقدار نسبی بیان ژنی ژن‌های مورد مطالعه در قلب با کمک پرایمرهای اختصاصی آن‌ها اندازه گیری شد. نسبت جذبی ۲٦۰ تا ۲۸۰ نانوگرمی برای تمام نمونه‌های استخراج شده ۱/۸ تا ۲ بود. جهت بررسی کیفیت **RNA** استخراج شده از روش الکتروفروز و ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. قبل از سنجش **cDNA** برای اطمینان از نبود **DNA** در نمونه استخراج شده **DNAs treatment** (**thermos scientific**، ساخت آلمان) انجام شد. سنتز **cDNA** با کیت **transe criptor first Strand cDNA Synthesis Kit** (**Roche**، ساخت آلمان) انجام شد (۲۰). برنامه **Real time PCR** به وسیله دستگاه **Rotrogene 6000, corbet"** (ساخت آلمان) انجام شد. این برنامه بر اساس **SYBER Green** (**Ampliqon**، ساخت دانمارک) با دور ۹۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۱۵ دقیقه و بلافاصله ٤۰ چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ ثانیه با پرایمر طراحی شده (ساخت نیکا زیست ژن ایران) انجام شد. سنجش گلوکز پلاسما به روش گلوکز اکسیداز (شرکت پارس آزمون) و اندازه‌گیری مقادیر انسولین از روش الایزا (**Crystal chem** ساخت کانادا) با ضریب تغییر۰/۰۵ و حساسیت ۱ **ml/dl** بررسی گردید. شاخص مقاومت به انسولین به روش **HOMA-IR** با فرمول زیر اندازه‌گیری شد**:**

HOMA-IR(انسولین ناشتا) = **[µU/mL]** (گلوکز ناشتا) × **(mmol/L)] /22.5**

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

در بخش مربوط به آمار توصیفی از شاخص پراکندگی انحراف معیار و نمودار استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون شاپیروویلک بررسی شد. جهت تعیین اختلافات بین گروهی از آزمون آنووای یک راهه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری ۰/۰۵ استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار **GraphPad Prism** نسخه ۸ انجام شد.

نتایج

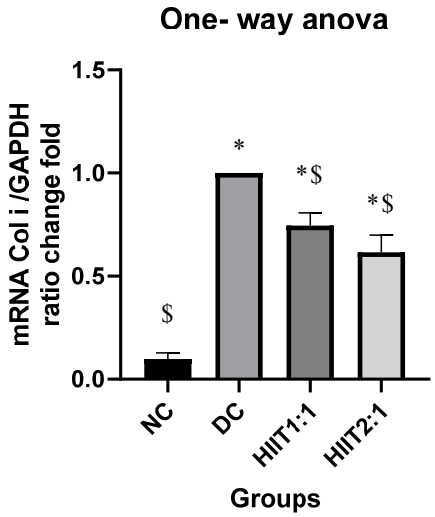
برای اطمینان از نرمال بودن داده ها، پس از بررسی عادی یا نرمال بودن چولگی و کشیدگی توزیع داده‌ها، از آزمون شاپیروویلک استفاده شد و نتایج این آزمون، نشان داد توزیع داده‌ها نرمال می‌باشد. جدول ۲ تغییرات وزن و شاخص گلوکز را در گروه‌های پژوهش نشان می‌دهد.

جدول ۲. تغییرات وزن و شاخص گلوکز به تفکیک گروه ها

متغیر	گروه ها			
	NC	DC	HIIT1:1	HIIT2:1
وزن (گرم)	۲۸۲/۵±۳۹/۳۳	۲۸۶/۲±۳۳/۸۸	۲۸۶/۷±۴۲/۵۹	۲۷۷/۲±۲۱/۰۵
گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر)	۱۲۱/۳۱±۰/۷۰	۱۴۱/۵۲±۳/۴۷	۱۲۹/۱۴±۰/۸۴	۱۲۴/۲۳±۲/۵۳$#
انسولین(میلی واحد بر دسی لیتر)	۸۱/۵۰±۰/۴	۵۱/۸۷±۰/۸	۷۸/۰۴±۰/۵**Y**	۶۱/۱۸±۰/۰۴

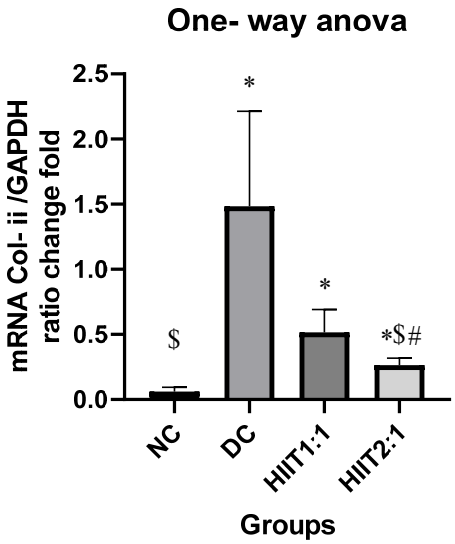
NC: گروه کنترل سالم، **DC**: گروه کنترل دیابتی، **HIIT:1**: گروه تمرین تناوبی شدید نوع ۱، **HIIT:2**: گروه تمرین تناوبی شدید نوع ۲
اعداد به شکل میانگین± انحراف استاندارد بیان شده اند. * معناداری نسبت به گروه کنترل سالم، $ معناداری نسبت به گروه کنترل دیابتی، # معناداری نسبت به گروه HIIT-1، Y معناداری نسبت به گروه **HIIT-2**

میانگین مقادیر شاخص گلوکز در گروه HIIT2:1 نسبت به سایر گروه ها به صورت معناداری کمتر بود. میانگین مقادیر وزن و انسولین در گروه HIIT1:1 نسبت به سایر گروه ها به صورت معناداری کمتر بود. میانگین مقادیر ژن کلاژن ۱ در هر دو گروه تمرین نسبت به گروه DC به صورت معناداری کمتر بود (P=۰/۰۰۰۱). در حالیکه بین دو گروه تمرین در میانگین مقادیر کلاژن ۱ تفاوت معناداری مشاهده نشد (P=۰/۱۱۲) (شکل ۱).



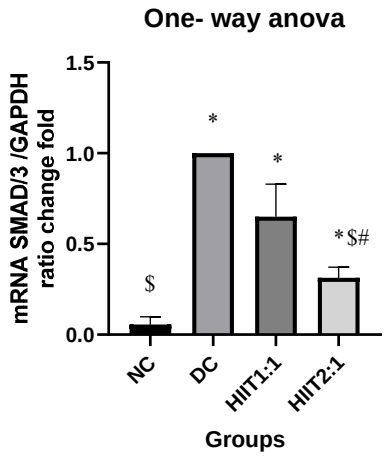
شکل ۱. میانگین مقادیر بیان ژن کلاژن ۱ نسبت به GAPDH در گروه های پژوهش بوسیله روش آماری تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی
* معناداری نسبت به گروه کنترل سالم، $ معناداری نسبت به گروه کنترل دیابتی، # معناداری نسبت به گروه HIIT-1، Y معناداری نسبت به گروه HIIT-2
مقادیر به صورت میانگین±انحراف استاندارد گزارش شده است. تعداد حیوانات هر گروه، ۷ سر می باشد.
NC: گروه کنترل سالم، **DC**: گروه کنترل دیابتی، **HIIT:1**: گروه تمرین تناوبی شدید نوع ۱، **HIIT:2**: گروه تمرین تناوبی شدید نوع ۲

میانگین مقادیر ژن کلاژن ۲ در گروه تمرین HIIT2:1 به صورت معناداری کمتر بود (شکل ۲).
نسبت به گروه HIIT1:1 (P=۰/۰۴۴) و DC(P=۰/۰۰۲)



شکل ۲. میانگین مقادیر بیان ژن کلاژن ۲ نسبت به GAPDH در گروه های پژوهش بوسیله روش آماری تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی
*** معناداری نسبت به گروه کنترل سالم، $ معناداری نسبت به گروه کنترل دیابتی، # معناداری نسبت به گروه HIIT-1، Y معناداری نسبت به گروه HIIT-2**
مقادیر به صورت میانگین±انحراف استاندارد گزارش شده است. تعداد حیوانات هر گروه، ۷ سر می باشد.

میانگین مقادیر بیان ژن SMAD/3 در گروه HIIT2:1
نسبت به گروه HIIT1:1(P=۰/۰۲۲) و DC(p=۰/۰۲۰)
به صورت معناداری کمتر بود شکل (۳).



شکل ۳. میانگین مقادیر بیان ژن SMAD/3 نسبت به GAPDH در گروه های پژوهش بوسیله روش آماری تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی
*** معناداری نسبت به گروه کنترل سالم، $ معناداری نسبت به گروه کنترل دیابتی، # معناداری نسبت به گروه HIIT-1، Y معناداری نسبت به گروه HIIT-2**
مقادیر به صورت میانگین±انحراف استاندارد گزارش شده است. تعداد حیوانات هر گروه، ۷ سر می باشد.

بر این اساس می توان اظهار داشت هر دو نوع تمرین و بخصوص تمرین HIIT2:1 تأثیر بالاتری در تنظیم بیان ژن در بطن چپ موش های بزرگ آزمایشگاهی نر مبتلا به دیابت دارد (جدول ۳).

جدول ۳. یافته های آزمون توکی به منظور بررسی جایگاه تفاوت های درون گروهی

متغیر	گروه (I)	گروه (J)	سطح معنی داری
Coli I	NC	DC	۰/۰۱
		HIIT:1	۰/۰۰۵
		HIIT:2	۰/۰۰۳
	DC	HIIT:1	۰/۰۰۰۱
		HIIT:2	۰/۰۰۰۱
	HIIT:1	HIIT:2	۰/۱۱۲
Coli II	NC	DC	۰/۰۰۱
		HIIT:1	۰/۰۱
		HIIT:2	۰/۰۳۰
	DC	HIIT:1	۰/۳۲۰
		HIIT:2	۰/۰۰۲
	HIIT:1	HIIT:2	۰/۰۴۴
SMAD/3	NC	DC	۰/۰۰۱
		HIIT:1	۰/۰۳۳
		HIIT:2	۰/۰۵۰
	DC	HIIT:1	۰/۲۲۰
		HIIT:2	۰/۰۲۰
	HIIT:1	HIIT:2	۰/۰۲۲

بحث و نتیجه گیری

پژوهش حاضر به مقایسه اثر ۲ نوع تمرین تناوبی شدید بر بیان ژنهای کلاژن ۲،۱ و SMAD/3 در بطن چپ موش های بزرگ آزمایشگاهی نر مبتلا به دیابت نوع ۲ پرداخت. بر طبق یافته های به دست آمده در بیان ژنهای کلاژن ۲ و SMAD/3 در گروه تمرین HIIT2:1 کاهش بیشتری نسبت به تمرین تناوبی HIIT1:1 مشاهده شد. در حالیکه هر دو نوع تمرین باعث کاهش کلاژن ۱ شدند. گلوکز در گروه تمرین HIIT2:1 نسبت به گروه HIIT1:1 کاهش بیشتری داشت. وزن و انسولین در گروه HIIT1:1 کاهش بیشتری داشت. در خصوص تأثیر شدت تمرین عنوان شده تمرین HIIT به دلیل به کارگیری تارهای تند و کند انقباض در تناوبهای شدید و استراحت فعال موجب مصرف گلوکز در اجرای شدت تمرین و کاهش مقاومت به انسولین در تناوب های استراحت فعال که با تناوب در شدت کمتری اجرا می شود، جهش ژنی را در بیماری های متابولیکی

تنظیم می کند (۲۱). زیرا در زمان مقاومت به انسولین که مهمترین مشخصه ابتلا به دیابت نوع ۲ است، اختلال در تولید و عملکرد پروتئین تیروزین فسفاتاز به عنوان آنزیم همولوگ در مسیر سیگنال دهی انسولین، موجب تضعیف اتصال انسولین به گیرنده اش IRS-1 می شود (٤). در این زمان سیگنال دهی درون سلولی توسط مهار حرکت GLUT-4 بر هم می ریزد و از بیرون سلول نیز انسولین به گیرنده اش اتصال نمی یابد، این دو عامل در ابتدا موجب سفت شدن غشاء برون سلولی می شوند (۲۲). از این رو اثر بارز تمرین HIIT با راه اندازی مسیر کلسیم و اتصال آن به کالمودولین (CAMK-II) که به دلیل افزایش در عملکرد پروتئین کینازی P38-MAPK است، راه اندازی مصرف گلوکز را تا حدودی بهبود می بخشد (۲۳). زیرا همراه با انقباضات مکرر عضلانی تولید و رهاسازی کلسیم باعث می شود تا چند روز بعد از تمرین انتقال و مصرف گلوکز افزایش یابد (٢٤). طبق نتایج برخی مطالعات استراحت فعال حین انجام اینگونه تمرینات عامل مهمتری باشد (۲۵). در این رابطه عنوان شده افزایش متابولیسم سلولی و نیز تولید و رهایش متسع کننده های عروقی از جمله نیتریک اکساید و پروکسی زوم آلفا تبادلات خون و اکسیژن رسانی را بهبود می دهد و می تواند ساختار غشاء میوسیت را از ایجاد و گسترش سطح فیبروز محافظت کند (۱۰). از این رو تناوب شدت در تمرینات HIIT می تواند موجب بهبود در ساختار یا عملکرد قلب و عروق شود (۱۰،۱۳،۱۹). در مورد تأثیر تمرین HIIT با حجم کم چنین عنوان شده، شدت های انفجاری کوتاه مدت با افزایش موقتی در فشار بطن چپ به دلیل تولید فاکتور القاء هایپوکسی (HIF α -1)[4] دوره ای در اجرای شدت تمرین، می تواند نقش محافظتی در سطح و محیط میوسیت داشته باشد (۱۳). در مطالعه ای که به بررسی اثر ۸ هفته تمرین با دو شدت کم و متوسط بر روی موش های بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد اسپیروگوداولی انجام شد، نتایج نشان داد تمرین با شدت متوسط بر کاهش محتوای کلاژن خارج سلولی مؤثرتر بوده و فیبروز را در بافت قلب کاهش داده است (۷). این یافته ها با نتایج مطالعه حاضر همسو است. در پژوهش دیگری ۸ هفته تمرین HIIT با شدت ۹۵ درصد، به وسیله فعال سازی فاکتور رشد شبه انسولینی ۱ (IGF-1)، پروتئین تیروزین کینازی AKT و m TORC-1 را افزایش داده و سنتز SMAD/3 را کاهش می دهد (۲۵). نتایج این مطالعه با یافته های مطالعه حاضر همسو است. در خصوص تأثیر شدت تمرین عنوان شده اینگونه تمرینات التهاب سلولی را نسبت به تمرین با شدت متوسط کاهش می دهند (١٤). نتایج پژوهش دیگری که بررسی شدت تمرین را بر ساختار و عملکرد قلب مورد بررسی قرار داده بود، به طوری که تمرین تناوبی شدید و تمرین با شدت متوسط به مدت ٤ هفته، ۵ روز در هفته انجام شد، که در آن اجرای تمرین شدید در هفته اول ۱۵ دقیقه و تا هفته چهارم به ٤۵ دقیقه رسید در حالیکه شیب دستگاه در هفته اول ۱۵ دقیقه و تا هفته چهارم به ۱۵ درجه رسید، اما تمرین با شدت متوسط با همان مدت زمان ٤۵ دقیقه و شیب صفر درجه در هفته اول، شیب پنج درجه در هفته دوم و شیب ده درجه در هفته های سوم و چهارم اجرا شد، تمرین با شدت متوسط تأثیر بالاتری در کاهش کلاژن های میوسیت و سطح مقطع عرضی داشت و فیبروز قلب را کاهش داد (٢٦). این یافته ها با نتایج مطالعه حاضر ناهمسو می باشد. در خصوص تأثیر تمرین با شدت متوسط بهبود در ظرفیت و عملکرد میتوکندریایی به دلیل تولید آنزیم های هوازی و نیز بهبود سیستم دفاع ضد اکسایشی ذکر شده است (۱۲). در حالیکه تمرین با شدت بالا به دلیل ایجاد تنش برشی بالاتر بر افزایش حساسیت انسولینی، کاهش مقاومت عروقی و بهبود نسبت های سنتز و تجزیه پروتئین اثرگذاری بالاتری دارد (۷،۱۳). بر این اساس شدت تمرین عامل مؤثرتری در بهبود ساختار و مکانیک عروق ذکر شده است (۷،۱۹،۲۲). در رابطه با نوع تمرین عنوان شده، تمرین مقاومتی موجب افزایش توده

[4] Hypoxia- inducible factor1α

عضلانی، بهبود ظرفیت گلیکولیتیکی، تأثیر بر رهایش محرک های رشدی در هر دو مدل انسانی و بالینی مبتلا به دیابت نوع ۲ می شود (۲۷). تمرین مقاومتی با به کارگیری تارهای نوع II α و IIX از تولید میوستاتین و SMAD/3 جلوگیری می کند (۲۸). در مطالعه دیگری که به بررسی اثر شدت تمرین پرداخت چنین نتیجه گیری کرد، تمرین HIT 3 روز در هفته به مدت ۳۰ دقیقه که با حجم کمتر از تمرین HIIT اجرا شد بر تنظیم گلوکز، بهبود عملکرد میتوکندری به دلیل تولید و افزایش عملکرد آنزیم هوازی سیترات سینتاز (CS) افزایش فعالیت زیر واحد کمپلکس پروتئین ۷۰ کیلو دالتونی، پروتئین میتوفیوژن۲ و افزایش فعالیت GLUT-4 در مبتلایان به دیابت مؤثرتر بود (۲۹). تمرین تناوبی شدید التهاب سلولی را کاهش می دهد (١٤). تناقض در این نتایج با یافته های مطالعه حاضر می تواند نوع، شدت، مدت تمرین و سطح سلامت آزمودنی ها باشد (۲۷). در مطالعه حاضر تمرین HIIT نوع ۲ با شدت بالاتر باعث بهبود در عملکرد ژن و متابولیسم گلوکز شد. با این حال بهتر است قبل از طراحی این تمرینات از شدت بیماری، زمان مصرف دارو و ارزیابی عملکرد قلب در این دست از بیماران آگاهی کامل داشت تا بتوان از تأثیر این نوع از تمرینات به طور ایمن و مؤثر بهره مند شد (١٤،١٧). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد٤ هفته تمرین HIIT نوع ۲ با تأثیر بالاتر بر کاهش بیان ژنهای کلاژن ۲و SMAD/3 در بطن چپ موش های بزرگ آزمایشگاهی نر مبتلا به دیابت بد تنظیمی ژن را تعدیل می کند و احتمالاً می تواند کاردیومیوپاتی دیابتی را بهبود بخشد. از محدودیت این مطالعه به عدم دسترسی به نمونه های انسانی اشاره می شود، محدودیت دیگر در عدم استفاده از روش وسترن بلات جهت سنجش پروتئین ژنهای مذکور است که به دلیل کمبود بودجه پژوهش می باشد. همچنین عدم اندازه گیری همزمان گلوکز و وزن در تمام موش ها و کنترل میزان فعالیت بدنی خارج از پروتکل تمرینی با نگهداری موش ها در قفس از دیگر محدودیتهای مطالعه حاضر بود. در پایان پیشنهاد می شود در مطالعات آینده مدل های تمرینی مذکور با تمرین هوازی و به طور گسترده تری مورد بررسی قرار بگیرد.

نتیجه گیری

براساس یافته های بدست آمده می توان چنین نتیجه گیری کرد ٤ هفته تمرین HIIT نوع ۲ با تاثیر بالاتر بر کاهش بیان ژنهای کلاژن۲ و SMAD/3 در بطن چپ موش های بزرگ آزمایشگاهی دیابتی بد تنظیمی ژن را تعدیل کرده و احتمالا میتواند کاردیومیوپاتی دیابتی را بهبود بخشد.

منابع

1. Liu Q, Wang S, Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: role of oxidative stress and damage. Journal of Diabetes Investigation 2014;5(6):623-34.

2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2004;27(5):1047-53.

3. Serra N, Rosales R, Masana L, Vallvé J-C. Simvastatin increases fibulin-2 expression in human coronary artery smooth muscle cells via RhoA/Rho-kinase signaling pathway inhibition. PlOS One 2015;10(7):e0133875.

4. Li W, Zhou P, Wang G, Lu X, Jiang Y, Zhao X. Anti-inflammatory effects of lycopene prevents cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. International Journal of Clinical and Experimental Medicine 2016;9(5):8047-54.

5. Kraemer WJ, Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. Sports Medicine 2005;35(4):339-61.

6. Sun Y, Weber KT. Angiotensin-converting enzyme and wound healing in diverse tissues of the rat. Journal of

Laboratory and Clinical Medicine 1996;127(1):94-101.

7. Xu X, Wan W, Ji L, Lao S, Powers AS, Zhao W, et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats. Cardiovascular Research 2008;78(3):523-32.

8. Li JH, Huang XR, Zhu H-J, Oldfield M, Cooper M, Truong LD, et al. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-β-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal 2004;18(1):176-8.

9. Buchanan TA, Metzger BE, Freinkel N, Bergman RN. Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1990;162(4):1008-14.

10. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. The Federation of European Biochemical Societies Journal 2013;280(17):4294-314.

11. Castellar A, Remedio R, Barbosa R, Gomes RJ, Caetano FH. Collagen and reticular fibers in left ventricular muscle in diabetic rats: Physical exercise prevents its changes?. Tissue and Cell 2011;43(1):24-8.

12. Estes RR, Malinowski A, Piacentini M, Thrush D, Salley E, Losey C, et al. The effect of high intensity interval run training on cross-sectional area of the vastus lateralis in untrained college students. International Journal of Exercise Science 2017;10(1):137.

13. Gibala MJ, Little JP, MacDonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. The Journal of Physiology 2012;590(5):1077-84.

14. Hadiono M, Kushartanti BW, editors. High Intensity Interval Training (HIIT) and Moderate Intensity Training (MIT) Against TNF-α and IL-6 levels In Rats. 2nd International Conference on Sports Sciences and Health 2018 (2nd ICSSH 2018) 2019: Atlantis Press.

15. Babaee Begi MA, Faramarzi H, Gaeini AA, Ravasi AA, Izadi MR, Delfan M, et al. Upregulation of ryanodine receptor calcium channels (RyR2) in rats with induced diabetes after 4 weeks of high intensity interval training. International Cardiovascular Research Journal 2016;10(1):1-5.

16. Shaban N, Kenno KA, Milne KJ. The effects of a 2 week modified high intensity interval training program on the homeostatic model of insulin resistance (HOMA-IR) in adults with type 2 diabetes. The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness 2014;54(2):203-9.

17. Pierre W, Gildas AJH, Ulrich MC, Modeste W-N, azTélesphore Benoît N, Albert K. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of Bersama engleriana leaves in nicotinamide/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. BMC Complementary and Alternative Medicine 2012;12(1):264.

18. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhães-de-Castro R. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. Journal of Strength and Conditioning Research 2007;21(3):751.

19. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 2002;3(7): research 0034. 1.

20. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M,

Shah NK, et al. IFN-λs mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. Nature Immunology 2003;4(1):69-77.

21. Zhang F, Dang Y, Li Y, Hao Q, Li R, Qi X. Cardiac Contractility Modulation Attenuate Myocardial Fibrosis by Inhibiting TGF-beta1/Smad3 Signaling Pathway in a Rabbit Model of Chronic Heart Failure. Cellular physiology and biochemistry. International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology 2016;39(1):294-302.

22. Bachar E, Ariav Y, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G (2009) Glucose Amplifies Fatty Acid-Induced Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic β-Cells via Activation of mTORC1. PLoS ONE 4(3): e4954.

23. De Waard MC, Van Der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM, et al. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. Circulation Research 2007;100(7):1079-88.

24. Kraljevic J, Marinovic J, Pravdic D, Zubin P, Dujic Z, Wisloff U, et al. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart. Cardiovascular Research 2013;99(1):55-64.

25. Launay T, Momken I, Carreira S, Mougenot N, Zhou X-L, De Koning L, et al. Acceleration-based training: A new mode of training in senescent rats improving performance and left ventricular and muscle functions. Experimental Gerontology 2017;95:71-6.

26. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Quadrilatero J, Spriet LL. High-intensity interval and endurance training are associated with divergent skeletal muscle adaptations in a rodent model of hypertension. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 2015;308(11):R927-34.

27. Santos A, Lamas L, Ugrinowitsch C, Tricoli V, Miyabara EH, Soares A, et al. Different resistance-training regimens evoked a similar increase in myostatin inhibitors expression. International Journal of Sports Medicine 2015;36(09):761-8.

28. Lessard SJ, Rivas DA, Alves-Wagner AB, Hirshman MF, Gallagher IJ, Constantin-Teodosiu D, et al. Resistance to aerobic exercise training causes metabolic dysfunction and reveals novel exercise-regulated signaling networks. Diabetes 2013;62(8):2717-27.

29. Little JP, Gillen JB, Percival ME, Safdar A, Tarnopolsky MA, Punthakee Z, et al. Low-volume high-intensity interval training reduces hyperglycemia and increases muscle mitochondrial capacity in patients with type 2 diabetes. Journal of Applied Physiology 2011;111(6):1554-60.