

Original Article

The effects of eight weeks high intensity interval training on the levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene expression in left ventricle of type 2 diabetic rats

Fatemeh Noraie¹, Magsood Peeri^{1*}, Mohammad Ali Azarbayjani¹, Maryam Delfan²

¹Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

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

Received: 13 Jun 2019 Accepted: 14 Jul 2019 First Published online: 17 April 2021
Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(1):100-107

Abstract

Background: According to previous research's, the function of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) impairs in diabetes. Therefore, the present study conducted aimed to investigate the effects of eight weeks high intensity interval training (HIIT) on the levels of eNOS gene expression in left ventricle tissue of type 2 diabetic rats.

Methods: in experimental research, the 14 male Wistar rats with eight weeks old and the average weight of 160 ± 10 g feeding of high fat and sweet diets (30% fat and 25% fructose) for seven months. The rats after confirming the type 2 diabetes, randomly assigned into two groups of six rats consist of control and HIIT groups. The rats in the HIIT group trained for eight weeks and five sessions per week. The 24 hours after last training sessions, blood samples collected and the left ventricle removed and the levels of eNOS gene expression measured by Real Time PCR assay in heart tissue.

Results: There was a significant increase in eNOS gene expression in HIIT group compared to the control group ($p=0.011$). Moreover, the levels of glucose, insulin and insulin resistance (HOMA-IR) was significantly lower in the HIIT group compared to the control group ($p<0.05$).

Conclusion: It seems that HIIT play an important role in improving heart tissue endothelial function and improve the insulin sensitivity in diabetic rats by high fat and sweet diets.

Keywords: High Intensity Interval Training (HIIT), Angiogenesis, Insulin Resistance

How to cite this article: Noraie F, Peeri M, Azarbayjani MA, Delfan M. [The effects of eight weeks high intensity interval training on the levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene expression in left ventricle of type 2 diabetic rats]. Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(1):100-107. Persian.

مقاله پژوهشی

تاثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) در بطن چپ موش‌های دیابتی نوع ۲

فاطمه نورایی^{۱*}، مقصود پیری^{۱*}، محمد علی آذربایجانی^{۱*}، مریم دلفان^۲

^۱گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران
^۲گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران
 *نویسنده مسئول: ایمیل: m.peeri@iauctb.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۲۳ انتشار برخط: ۱۴۰۰/۱/۲۸
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛ ۴۳(۱): ۱۰۷-۱۰۰

چکیده

زمینه: بر اساس مطالعات صورت گرفته، عملکرد نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) در دیابت مختل می‌شود. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) بر میزان بیان ژن eNOS در بافت بطن چپ موش‌های دیابتی نوع ۲ انجام شد.
روش کار: در یک مطالعه تجربی، ۱۴ سر موش نر نژاد ویستار هشت هفته‌ای با میانگین وزن 160 ± 10 گرم به مدت هفت ماه با رژیم غذایی پرچرب و شیرین (۳۰ درصد چربی حیوانی، ۲۵ درصد فروکتوز) تغذیه شدند. موش‌ها پس از تایید دیابت نوع ۲، به صورت تصادفی در دو گروه شش‌تایی شامل گروه کنترل و HIIT تقسیم‌بندی شدند. موش‌ها در گروه HIIT به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته تمرین کردند. ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، نمونه‌های خونی جمع‌آوری و بافت بطن چپ جداسازی شد و بیان ژن eNOS به روش Real Time PCR در بافت قلب سنجیده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون t مستقل انجام و معناداری نیز $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.
یافته‌ها: نتایج، افزایش معنادار بیان ژن eNOS در گروه HIIT در مقایسه با گروه کنترل را نشان داد ($p=0.011$). مقادیر گلوکز، انسولین و مقاومت به انسولین (HOMA-IR) نیز در گروه HIIT به صورت معناداری کمتر از گروه کنترل بود ($p < 0.05$).
نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که HIIT نقش موثری در بهبود عملکرد اندوتلیالی بافت قلب و همچنین بهبود حساسیت انسولین در رموشهای دیابتی شده با رژیم غذایی پرچرب و شیرین دارد.

کلید واژه‌ها: تمرین تناوبی شدید (HIIT)، آنژیوژنز، مقاومت به انسولین

نحوه استناد به این مقاله: نورایی ف، پیری م، آذربایجانی م ع، دلفان م. تاثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) در بطن چپ موش‌های دیابتی نوع ۲. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛ ۴۳(۱): ۱۰۷-۱۰۰

حق تالیف برای مولف محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر گردیده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

دیابت به عنوان یکی از مشکلات اصلی سلامتی، بیش از ۴۰۰ میلیون نفر را در سراسر جهان متاثر کرده است و بیشتر آنها را افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ تشکیل می‌دهند (۱). دیابت روی عملکرد قلب اثر منفی دارد و با افزایش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی مختلف در این افراد همراه است (۲). بیماری‌های قلبی-عروقی دلیل عمده مرگ و میر افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ هستند که این افزایش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی در افراد دیابتی ارتباط نزدیکی با افزایش مقاومت به انسولین و یا هیپرگلیسمی دارد (۱،۲). سازوکارهای مختلفی مانند نقص عملکرد نیتریک اکساید سنتاز (Nitric Oxide Synthase, NOS) در بروز بیماری‌های قلبی-عروقی نقش دارند (۴). نیتریک اکساید (Nitric Oxide, NO) که توسط NOS از ال آرژنین تولید می‌شود، یکی از مهمترین تنظیم کننده‌های عملکرد قلب است (۵). در بافت قلب، انواع مختلف NOS بویژه NOS اندوتلیالی (eNOS) و القایی (iNOS) (در میوسیت‌های قلبی و اندوتلیوم عروقی) وجود دارند (۵). در شرایط فیزیولوژیک، NO تولید شده توسط eNOS ریلکسیشن دیاستولیک را افزایش می‌دهد و با کاهش مصرف اکسیژن در میوسیت‌های قلبی همراه است (۶). بعضی محققان نیز عنوان کرده‌اند که افزایش تولید NO ناشی از eNOS برای اثرات ضدآپوپتوزی برخی ترکیبات مانند اریتروپویتین در بافت قلب ضروری است (۷). طبق مطالعات صورت گرفته عملکرد eNOS در وضعیت دیابت مختل می‌شود (۸). جالب اینکه، خود NO نیز در پاتوژنز مقاومت به انسولین و دیابت نقش دارد و فعالیت eNOS و تولید NO در بیماران دیابتی نوع ۲ به صورت مزمن مختل می‌شود (۹). علاوه بر این، کاهش فعالیت eNOS در اندوتلیوم آئورت و بافت قلب موش‌های درمان شده با فروکتوز نیز مشاهده شده است (۱۰). این یافته‌ها بیانگر آن است که وضعیت‌های پاتولوژیک مرتبط با مقاومت انسولین از جمله دیابت، تاحدودی ناشی از نقص مسیر NO است. در رابطه با سازوکارهای کاهش تولید NO ناشی از eNOS در وضعیت دیابت، لیپوپروتئین کم چگال گلیکوزیله و اکسید شده از جمله تنظیم کننده‌های اصلی کاهش eNOS هستند. همچنین تولید گونه‌های واکنشی اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) به صورت معناداری تولید NO از eNOS و عملکردهای فیزیولوژیک پایین دست آن را مهار می‌کند (۸). در مقابل، تمرین ورزشی نقش مهمی در بهبود عملکرد قلب در نمونه‌های انسان و حیوان مبتلا به دیابت نوع ۲ دارد که اثرات مثبت آن از طریق سازوکارهای مختلفی اعمال می‌شود (۱). در این بین، برخی محققان اثرات محافظت قلبی تمرینات ورزشی را تغییرات در مسیر eNOS می‌دانند (۴). اما برخلاف این یافته‌ها، برخی محققان نیز گزارش کرده‌اند که تمرینات ورزشی با شدت بالا به مدت هشت هفته نمی‌تواند به بازایی اختلال در عملکرد

اندوتلیال وابسته به مسیر NO در موش‌های دیابتی منجر شود (۵). در همین رابطه، نوائو و همکاران (۱۱) نیز دریافتند که در بافت قلب موش‌های مبتلا به کاردیومیوپاتی دیابت، بیان eNOS در بافت قلب به صورت معناداری در مقایسه با موش‌های سالم کاهش می‌یابد و تمرینات ورزشی شدید (با شدت ۸۰ درصد ظرفیت عملکردی روی نوارگردان) به مدت چهار هفته تاثیری بر بیان eNOS در بافت قلب ندارد. بنابراین هنوز اجماع نظر کاملی از تاثیر تمرین ورزشی بر عملکرد اندوتلیال و تغییرات eNOS از جمله در بافت قلب وجود ندارد که نیازمند انجام مطالعات بیشتر در این زمینه است. در بین انواع مختلف تمرینات ورزشی، تمرین تناوبی شدید (High-intensity Interval Training, HIIT) در مدیریت دیابت نوع ۲ بسیار اهمیت دارد. این مدل تمرینی که به شکل تناوب‌های با شدت بالا و پایین اجرا می‌شود، نقش موثری در بهبود کنترل قند خون و همچنین بهبود عملکرد سلول‌های بتا دارد (۱۲). HIIT یک روش تمرینی موثر در بازتوانی قلبی است که تاثیرات مثبت آن در وضعیت سلامتی و بیماری تایید شده است. در این مدل تمرینی (۱۳) و در مقایسه با تمرینات تداومی، HIIT اثر بیشتری بر بهبود پارامترهای مرتبط با سلامت قلبی دارد (۱۴). برخی محققان نیز تاثیرات مثبت HIIT در کاردیومیوپاتی دیابتی را با پیشگیری از تغییر شکل بطن چپ به دنبال رژیم غذایی پرچرب نشان داده‌اند (۱۵). باوجود اثرات محافظت قلبی HIIT و نقش آن در مدیریت دیابت، اطلاعات در مورد سازوکارهای سلولی آن ناقص و گاهی ضد و نقیض است و مطالعات بیشتری در مورد چگونگی تاثیر HIIT نیاز است و در این راستا در مطالعه حاضر تاثیر هشت هفته HIIT بر میزان بیان ژن eNOS در بافت قلب موش‌های دیابتی شده توسط رژیم غذایی پرچرب و شیرین مطالعه شده است.

روش کار

نگهداری و تغذیه رت‌ها

مطالعه حاضر با کد IR.SBMU.RETECH.REC.1395.883 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تایید شده است. پژوهش حاضر از نوع تجربی و آزمایشگاهی بود و روی ۱۴ سر موش نر نژاد ویستار (۶-۴ هفته، میانگین وزن 160 ± 10 گرم) تهیه شده از موسسه تحقیقاتی رازی انجام شد. نگهداری حیوانات در طول دوره پژوهش بر اساس شرایط استاندارد آزمایشگاهی (دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰-۴۰ درصد، چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲) انجام شد و همه موش‌ها آزادانه به غذا و آب دسترسی داشتند. در کلیه مراحل پژوهش، محققان اصول اخلاقی کار با حیوانات را رعایت کردند.

دیابتی کردن رت‌ها

باتوجه به اینکه در اکثر پژوهش‌ها از STZ برای القا دیابت استفاده می‌شود که همراه مقاومت به انسولین نیست، در پژوهش حاضر برای القای دیابت به همراه مقاومت به انسولین از غذای پرچرب و شیرین استفاده شد. همه موش‌ها به مدت هفت ماه با غذای پرچرب و حاوی فروکتوز (در انستیتو رازی، برای ساخت ۱۰۰ کیلوگرم پلت پرچرب، ۴۵ کیلوگرم پودر پلت استاندارد، ۳۰ کیلوگرم چربی حیوانی حاصل از آب کردن دنبه گوسفند و ۲۵ کیلوگرم فروکتوز اضافه شد و سپس به شکل پلت استاندارد قالب زده شد) تغذیه شدند. برای تایید القا دیابت نوع ۲، میزان قند خون ناشتا با گلوکومتر mini ARKRAY-۰۱ (ساخت ژاپن) و با نمونه‌گیری خون از دم موش‌ها اندازه‌گیری شد و سطوح گلوکز بیشتر از ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر، مشخصه القای دیابت نوع ۲ بود (۲). (در این مرحله از چهار موش به شکل تصادفی، جهت اندازه‌گیری میزان انسولین پلاسما خونگیری شد و از پژوهش کنار گذاشته شدند)، موش‌های دیابتی هیچ‌گونه درمان با انسولین در طول دوره پژوهش نداشتند.

برنامه تمرین تناوبی شدید (HIIT)

پس از تایید القا دیابت، موش‌ها به شکل تصادفی به دو گروه هفت تایی شامل گروه‌های کنترل و HIIT تقسیم شدند. در این مرحله، موش‌ها به مدت یک هفته و هر روز ۳ تا ۱۰ دقیقه با سرعت ۶ تا ۱۰ متر بر دقیقه با نوارگردان ویژه جوانندگان آشنا شدند. سپس با آزمون فزاینده لیندرو و همکاران سرعت بیشینه در زمان رسیدن به حداکثر اکسیژن مصرفی محاسبه و جهت تعیین شدت تمرین استفاده شد (۱۶). بعد از یک هفته آشناسازی، پروتکل HIIT به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته اجرا شد. پروتکل HIIT شامل تناوب‌های شدید دو دقیقه‌ای با شدت ۸۰ درصد سرعت بیشینه در هفته اول و ۹۰ درصد سرعت بیشینه از هفته دوم تا پایان هفته هشتم بود و به دنبال هر تناوب شدید، یک تناوب دو دقیقه‌ای با شدت ۳۰ درصد سرعت بیشینه اجرا می‌شد. تعداد تناوب‌های شدید در هر جلسه ۴-۱ تناوب بود. پروتکل HIIT هشت هفته‌ای در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. قبل و بعد از هر جلسه HIIT، به ترتیب پنج دقیقه گرم کردن و سرد کردن با شدت ۳۰ درصد سرعت بیشینه اجرا شد. سرعت بیشینه موش‌ها هر دو هفته یکبار اندازه‌گیری و شدت تمرین جدید بر اساس آن تعیین می‌شد. طی این مدت، موش‌ها در گروه کنترل نیز پنج بار در هفته و هر جلسه به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه روی نوارگردان خاموش قرار داده می‌شدند تا هر دو گروه از نظر استرس محیطی شرایط یکسانی داشته باشند. طی دوره هشت هفته‌ای تمرین HIIT، موش‌ها همچنان با رژیم غذایی پرچرب و حاوی فروکتوز تغذیه شدند.

جدول ۱: برنامه تمرینی موش‌های گروه HIIT

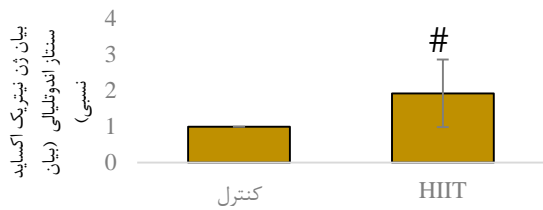
جلسه در هفته	تعداد تناوب‌های شدید دو دقیقه‌ای	سرعت (متر بر دقیقه)	هفته
۵	۲	۸۰ درصد سرعت بیشینه	هفته ۱
۵	۳	۹۰ درصد سرعت بیشینه	هفته ۲ و ۳
۵	۴	۹۰ درصد سرعت بیشینه	هفته ۴-۸

نمونه‌گیری و جداسازی بافت قلب

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه HIIT، موش‌ها با تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) بیهوش شدند و به صورت مستقیم از بطن چپ قلب موش‌ها خون نمونه‌گیری شد. برای جداسازی پلاسما، نمونه‌های خونی به مدت ۱۰ دقیقه و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. همچنین بافت بطن چپ بلافاصله پس از شست و شو در سرم فیزیولوژیک، در ازت مایع منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد.

بررسی بیان ژن eNOS

برای اندازه‌گیری بیان ژن eNOS در بافت قلب از روش qRT-PCR استفاده شد. برنامه RT-PCR با دستگاه رتروژن (کورت، آلمان) انجام شد. ابتدا RNA تام توسط کیت miRNeasy Mini Kit 50 (کیژن، آلمان) و بر اساس دستورالعمل کیت استخراج شد. قبل از تولید cDNA برای اطمینان از عدم وجود DNA در نمونه استخراج شده، DNAs treatment (ترموسایتیفیک، آلمان) انجام شد. سپس cDNA با کیت Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (روشه، آلمان) و طبق دستورالعمل کیت تولید شد. ابتدا cDNA تولید شده برای ژن eNOS با ۴۰ میکرولیتر RNase & DNase-free water رقیق شد. سپس ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از رقت‌ها به همراه ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس (آمپلیکون، دانمارک) و ۱ میکرولیتر از پرایمر فوروارد و ۱ میکرولیتر از پرایمر بکواردر در ۴ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز برای رسیدن به حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر به خوبی حل و مخلوط شد. تمام واکنش‌ها به صورت دوتایی (دابلیکیت) انجام شد. درنهایت میکروتیوپ‌ها در محل مخصوص خود در دستگاه قرار داده شد و واکنش‌های تکثیر طی ۴۰ سیکل بر اساس دستورالعمل سازنده کیت به صورت C ۹۵° به مدت ۱۵ ثانیه و C ۶۰° به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. دما و زمان دناتوراسیون اولیه به ترتیب C 95° و ۱۰ دقیقه بود. در نهایت منحنی استاندارد و تکثیر پرایمرها با نرم افزار موجود در سیستم آنالیز و رسم شد. برای اطمینان از اختصاصی بودن محصول واکنش منحنی دمای ذوب (Melting Curve) نیز رسم شد. واکنش تکثیر هر یک از ژن‌ها نیز طبق روش بالا انجام شد، با این تفاوت که واکنش تکثیر فقط برای یک رقت



نمودار ۱: بیان ژن eNOS در گروه کنترل و HIIT. نشاننده افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل

بررسی تغییرات در بیان ژن eNOS در بافت قلب موش‌ها نشان داد که میزان بیان eNOS در گروه HIIT به صورت معناداری بیشتر از گروه کنترل است ($p=0/011$). بیان ژن eNOS در دو گروه کنترل و HIIT در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. علاوه بر این، نتایج آزمون ضریب همبستگی پیرسون نشان داد که همبستگی منفی معناداری بین بیان ژن eNOS در بافت قلب و میزان مقاومت به انسولین وجود دارد ($r=-0/579$ ، $p=0/012$).

بحث

مطالعه حاضر جهت بررسی تاثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) بر بیان ژن eNOS در بافت قلب موش‌های دیابتی نوع ۲ صورت گرفت. نتایج مطالعه نشان داد که هشت هفته HIIT در موش‌های دیابتی نوع ۲ با کاهش معنادار سطوح پلاسمایی گلوکز و مقاومت به انسولین در گروه تمرین کرده در مقایسه با گروه کنترل همراه است و همزمان افزایش معنادار بیان eNOS در بافت قلب گروه HIIT نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در مطالعه چنگچی و همکاران (۱۷) در تایید مطالعه ما مشاهده شد که شش هفته تمرین ورزشی با شدت‌های مختلف (کم، متوسط، شدید) با افزایش معنادار سطوح سرمی eNOS همراه است که در این پژوهش افزایش شدت تمرین با افزایش بیشتر سطوح eNOS همراه بود و محققان عنوان کردند که سازگاری‌های ناشی از تمرین هوازی به شدت فعالیت بستگی دارد. اگرچه در این پژوهش با توجه به اندازه‌گیری سطوح سرمی eNOS نمی‌توان با قاطعیت در مورد منشأ این افزایش اظهار نظر کرد، اما یافته‌های حاضر بیانگر آن است که افزایش بیان eNOS در بافت قلب می‌تواند یکی از مسیرهای احتمالی باشد. با وجود این یافته‌های مشابه، نوع برنامه تمرین ورزشی، شدت و همچنین روش القا دیابت نوع ۲ در مطالعه چنگچی و همکاران (۱۸) متفاوت از پژوهش حاضر بود که بر تاثیر انواع مختلف تمرینات ورزشی بر eNOS تاکید دارد. برخی محققان نیز بیان کرده‌اند که تمرین ورزشی (۱۲ هفته، پنج جلسه در هفته، روی نوارگردان) موجب افزایش بیان eNOS در بطن چپ موش‌های با فشارخون بالا می‌شود که افزایش بیان eNOS با کاهش فشار خون سیستولی و دیاستولی همراه بود. بر این اساس، احتمالاً افزایش بیان eNOS می‌تواند در تعدیل وضعیت‌های

از نمونه (رقت بهینه) الگو انجام شد. جهت بررسی تغییرات بیان ژن‌ها نیز واکنش qRT-PCR به همان ترتیب یادشده انجام شد. برای کنترل داخلی از ژن GAPDH استفاده و جهت کنترل کیفی محصول واکنش GAPDH مربوط به نمونه روی ژل ۲٪ منتقل و از نظر وجود و یا عدم وجود محصول بررسی شد.

اندازه‌گیری سطوح گلوکز و انسولین پلاسمایی

گلوکز پلاسمای به روش گلوکز اکسیداز (کیت پارس آزمون، ایران) و غلظت پلاسمایی انسولین به روش الایزا (کریستال کم، آمریکا) با ضریب تغییر ۰/۰۵ و حساسیت یک میلی‌گرم بر دسی‌لیتر اندازه‌گیری شد. شاخص مقاومت به انسولین به روش HOMA-IR طبق فرمول زیر محاسبه شد (۲):

$$\text{HOMA-IR} = \left[\frac{\text{انسولین ناشتا (میکروگرم/میکرولیتر)} \times \text{گلوکز}}{100} \right]$$

تجزیه و تحلیل یافته‌ها

جهت تعیین چگونگی توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. تغییرات بین گروه کنترل و HIIT با آزمون t مستقل بررسی شد. تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ در سطح معناداری $p \leq 0/05$ انجام شد.

یافته‌ها

وزن بدن موش‌ها در ابتدا و انتهای برنامه تمرین هشت هفته‌ای، سطوح پلاسمایی انسولین، سطوح پلاسمایی گلوکز و همچنین میزان مقاومت به انسولین (HOMA-IR) موش‌ها در دو گروه کنترل و HIIT در جدول شماره ۲ ارائه شده است. آزمون t زوجی نشان داد که سطوح پلاسمایی گلوکز و انسولین در گروه HIIT به صورت معناداری کمتر از گروه کنترل است ($p < 0/001$). علاوه بر این، کاهش معنادار میزان مقاومت به انسولین (HOMA-IR) در گروه HIIT در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0/001$).

جدول ۱: وزن بدن موش‌ها، سطوح گلوکز و انسولین و همچنین مقاومت به انسولین در گروه کنترل و HIIT

گروه	وزن بدن هفته ۱ (گرم)	وزن بدن هفته ۸ (گرم)	انسولین (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	گلوکز (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	مقاومت به انسولین (HOMA-IR)
کنترل	۲۵۲/۵±۳۰/۰۵	۳۵۱/۶±۳۸/۰۲	±۰/۲۸ ۸/۵۶۵	۳۰۵/۵±۲۵/۲۴	۶/۴۵±۰/۱۹
HIIT	۲۵۵/۱±۱۹/۰۸	۳۷۴/۰±۲۷/۹۰	±۰/۱۱ ۴/۶۶۸#	۱۳۳/۱±۳۲/۶۱	±۰/۱۵ ۱/۵۳#

نشاننده تفاوت معنادار با گروه کنترل

ناشی از تمرین شنا باشد (۲۳). در تایید این گفته‌ها، بیان شده است که NO برداشت گلوکز توسط بافت‌های مختلف مانند میوکارد (۲۵) و عضله اسکلتی (۲۶) را تحت تأثیر قرار می‌دهد. گریجالوا و همکاران (۲۷) نیز گزارش کردند که نه هفته تمرین استقامتی در موش‌های دیابتی حداقل تا حدودی اختلال در عملکرد eNOS میوکاردی ناشی از دیابت را با دایمیزه شدن برطرف می‌کند و افزایش بیان eNOS در میوکارد با کاهش سطوح گلوکز و مقاومت به انسولین همراه بود. در مطالعه دیگری محققان بهبود متابولیسم گلوکز به دنبال شش هفته تمرین شنا در نمونه‌های حیوانی (موش) را افزایش بیورژن میتوکندری وابسته به eNOS در بافت قلب دانستند و این تغییرات با بهبود انتقال گلوکز در بافت قلب همراه بود (۲۳). اما برخلاف نتایج مطالعه حاضر، نائو و همکاران (۱۱) تغییر معناداری را در بیان eNOS بعد از چهار هفته تمرین ورزشی با شدت بالا در بافت قلب موش‌های مبتلا به کاردیومیوپاتی دیابت نشان ندادند، اما کاهش معنادار سطوح گلوکز را در گروه تمرین کرده در مقایسه با گروه کنترل گزارش کردند. یافته‌های نائو و همکاران (۱۱) نشان می‌دهد که اثرات هیپوگلیسمیک تمرینات ورزشی در موش‌های دیابتی می‌تواند مستقل از تغییرات بیان eNOS در بافت قلب نیز رخ دهد. البته عواملی مانند دوره کوتاه تمرین ورزشی در پژوهش بالا (چهار هفته در مقابل هشت هفته)، روش متفاوت القا دیابت (تزیق STZ در مقایسه با رژیم غذایی چرب و شیرین) و همچنین وضعیت پاتولوژیک متفاوت (کاردیومیوپاتی دیابت در مقابل دیابتی) موش‌ها در دو گروه را دلایل احتمالی تناقض یافته‌های نائو و همکاران (۲۰۱۷) با نتایج مطالعه حاضر بیان کرد. شاید یکی از سازوکارهای عمده افزایش بیان eNOS به دنبال تمرینات تناوبی شدید (HIIT) در مطالعه حاضر تنش برشی باشد. در این راستا، چندین مطالعه نشان داده‌اند که تنش برشی منجر به تحریک افزایش بیان eNOS می‌شود (۲۸). در تایید این فرضیه عنوان شده است که HIIT در مقایسه با تمرین ورزشی تداومی با شدت متوسط (MICT) در بهبود عملکرد عروقی موثرتر است که احتمالاً به دلیل توانایی HIIT در تحریک جریان خون بیشتر از طریق رگ‌های تامین کننده اکسیژن برای عضلات در حال فعالیت است که فراهمی زیستی NO ناشی از تنش برشی را افزایش می‌دهد (۲۹). تیجسن و همکاران (۳۰) نیز در تایید این فرضیه بیان کردند که با افزایش شدت فعالیت ورزشی، جریان خون و تنش برشی نیز افزایش می‌یابد. البته با توجه به اینکه در مطالعه حاضر سایر سازوکارها و مسیرهای پیام‌رسانی موثر بر تولید و بیان eNOS بررسی نشد، برای مشخص شدن تأثیر HIIT بر مسیر NO و عوامل موثر بر آن در بافت قلب، مطالعات بیشتری نیاز است.

پاتولوژیک قلبی عروقی نیز موثر باشد. در مطالعه حاضر از ترکیب فروکتوز و چربی برای القا دیابت نوع ۲ استفاده شد. طبق مطالعات قبلی مصرف فروکتوز با افزایش فشار خون، مقاومت به انسولین و تنظیم کاهشی بیان eNOS همراه است و در مقابل بیان بالای eNOS به صورت معناداری فشارخون بالا و مقاومت به انسولین ناشی از فروکتوز را کاهش می‌دهد (۱۹). در مطالعه حاضر نیز تنظیم افزایشی بیان eNOS در بافت قلب با کاهش سطوح انسولین و گلوکز و مقاومت به انسولین همراه بود. در مجموع، طبق یافته‌ها مقاومت به انسولین و دیابت تا حدودی با اختلال در عملکرد اندوتلیال و بالقوه توسط تغییر بیان eNOS و تولید NO مشخص می‌شوند. با وجود این، اتفاق نظر کاملی در مورد تغییرات بیان eNOS در دیابت وجود ندارد. جسمین و همکاران (۲۰) دریافتند که بیان eNOS در قلب موش‌های دیابتی شده با STZ دو هفته بعد از القا دیابت به صورت معناداری افزایش می‌یابد که بیانگر نقش مخرب eNOS در بافت قلب است. برخی محققان کاهش بیان eNOS در بافت قلب را سه هفته بعد از القا دیابت با STZ نشان دادند (۲۱) و برخی دیگر نیز عدم تغییر مسیر NO را بعد از القا دیابت گزارش کرده‌اند (۲۲). این یافته‌های متناقض را می‌توان به نژادهای مختلف حیوانات بررسی شده، طول متفاوت دوره اعمال مداخله و همچنین تفاوت در روش دیابتی کردن نسبت داد. متأسفانه در پژوهش حاضر بیان eNOS در نمونه‌های سالم بررسی نشد و نمی‌توان در رابطه با تغییرات eNOS در موش‌های دیابتی در مقایسه با موش‌های سالم بحث کرد، اما با توجه به تنظیم افزایشی بیان eNOS بعد از تمرینات HIIT که با کاهش مقاومت به انسولین نیز همراه بود، می‌توان بیان کرد که تنظیم افزایشی بیان eNOS در بافت قلب بخشی از مسیر تأثیر مثبت تمرینات ورزشی از جمله HIIT در نمونه‌های دیابتی است که بر اساس شواهد موجود این افزایش بیان eNOS در بافت قلب به دنبال تمرینات ورزشی می‌تواند با افزایش برداشت و بهبود متابولیسم گلوکز در قلب همراه باشد (۲۳). متأسفانه در مطالعه حاضر سطوح سیستمیک گلوکز و انسولین بررسی شد و تغییرات آنها در بافت قلب مطالعه نشد. از یافته‌های دیگر پژوهش حاضر این بود که افزایش بیان eNOS در گروه HIIT با کاهش مقاومت به انسولین همراه است و همبستگی منفی معناداری بین بیان eNOS و مقاومت به انسولین مشاهده شد. همسو با این یافته‌ها، گزارش شده است که سرکوب ژن eNOS در موش‌ها با مقاومت به انسولین در کبد و سایر بافت‌های محیطی همراه است (۲۴). برخی مطالعات نیز اثرات مثبت تمرین ورزشی (۱۰ هفته شنا، پنج جلسه در هفته) در افزایش حساسیت انسولین بافت قلب را افزایش بیان eNOS در بافت قلب دانسته و بیان کردند که احتمالاً بهبود ناشی از فعالیت ورزشی در فعال‌سازی مسیر PI3K/Akt و همچنین افزایش eNOS و به دنبال آن تولید NO می‌تواند دلیل بهبود حساسیت انسولین

نتیجه‌گیری

نتایج حاضر نشان داد که کاهش سطوح انسولین و گلوکز در موش‌های دیابتی نوع ۲ با افزایش بیان eNOS در بافت قلب همراه است. بنابراین بخشی از اثرات مثبت HIIT در وضعیت دیابت ناشی از بهبود عملکرد اندوتلیالی و افزایش بیان eNOS در بافت‌های مختلف مانند بافت قلب است که ممکن است با بهبود عملکرد قلب و همچنین مقابله با اثرات پاتولوژیک دیابت بر قلب نیز همراه باشد.

قدردانی

پژوهش حاضر بر اساس بخشی از یافته‌های پایان‌نامه دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی نوشته شده است. از همکاران گرامی بخش آزمایشگاه گروه آناتومی و آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران که شرایط انجام پژوهش حاضر را فراهم کردند تشکر و قدرانی می‌کنیم. پروتکل این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استان تهران به شماره مرجع IR.SBMU.RETECH.REC.1395.883 تایید شده است.

منافع متقابل

مولفین هیچ منافع متقابلی از انتشار مقاله حاضر ندارند.

منابع مالی

تمام هزینه‌های انجام پژوهش حاضر توسط محققین تامین شده است.

مشارکت مولفان

نورایی ف طراحی تحقیق و انجام پروتکل تمرینات ورزشی و تدوین مقاله، پیری م طراحی تحقیق و ویرایش مقاله، دلفان م طراحی تحقیق، ویرایش مقاله، انجام آنالیزهای بیوشیمیایی، آذربایجانی م تحلیل‌های آماری و بررسی متون را عهده داشتند. همچنین تمامی نویسندگان نسخه نهایی مقاله ارسالی به مجله را مطالعه و تایید کردند.

References

1. Verboven M, Van Ryckeghem L, Belkhouribchia J, Dendale P, Eijnde BO, Hansen D, et al. Effect of Exercise Intervention on Cardiac Function in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Sports Med.* 2019 Feb;49(2):255-68. doi:10.1007/s40279-018-1003-4
2. 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 Jul;126(3):250-7. doi: 10.1080/13813455.2018.1511599
3. Farah C, Nascimento A, Bolea G, Meyer G, Gayrard S, Lacampagne A, et al. Key role of endothelium in the eNOS-dependent cardioprotection with exercise training. *J Mol Cell Cardiol.* 2017 Jan;102:26-30. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.11.008
4. Zguira MS, Vincent S, Le Douairon Lahaye S, Malarde L, Tabka Z, Saiag B. Intense exercise training is not effective to restore the endothelial NO-dependent relaxation in STZ-diabetic rat aorta. *Cardiovasc Diabetol.* 2013 Feb 11;12:32. doi:10.1186/1475-2840-12-32
5. Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1995 Jun 16;270(24):14582-6. doi: 10.1074/jbc.270.24.14582
6. Balligand JL, Cannon PJ. Nitric oxide synthases and cardiac muscle: autocrine and paracrine influences. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 1997;17(10):1846-58. doi:10.1161/01.atv.17.10.1846
7. Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, Lu X, Xenocostas A, Feng Q. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res.* 2006 Oct 1;72(1):51-9. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.06.026
8. Elrod JW, Duranski MR, Langston W, Greer JJ, Tao L, Dugas TR, et al. eNOS gene therapy exacerbates hepatic ischemia-reperfusion injury in diabetes: a role for eNOS uncoupling. *Circulation research.* 2006;99(1):78-85. doi: 10.1161/01.RES.0000231306.03510.77
9. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *The Journal of clinical investigation.* 2001;108(9):1341-8. doi: 10.1172/jci11235
10. Miatello R, Risler N, Castro C, González S, Rüttler M, Cruzado M. Aortic smooth muscle cell proliferation and endothelial nitric oxide synthase activity in fructose-fed rats. *American journal of hypertension.* 2001; 14(11):1135-41. doi: 10.1016/s0895-7061(01)02206-3
11. Novoa U, Arauna D, Moran M, Nuñez M, Zagmutt S, Saldivia S, et al. High-Intensity Exercise Reduces Cardiac Fibrosis and Hypertrophy but Does Not Restore the Nitroso-Redox Imbalance in Diabetic Cardiomyopathy. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7921363. doi: 10.1155/2017/7921363.
12. Madsen SM, Thorup AC, Overgaard K, Jeppesen PB. High intensity interval training improves glycaemic control and pancreatic β cell function of type 2 diabetes patients. *PLoS*

- One. 2015;10(8):e0133286. doi: 10.1371/journal.pone.0133286
13. Kemi OJ, Wisløff U. High-intensity aerobic exercise training improves the heart in health and disease. *Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention*. 2010;30(1):2-11. doi: 10.1097/hcr.0b013e3181c56b89
 14. Freyssin C, Verkindt C, Prieur F, Benaich P, Maunier S, Blanc P. Cardiac rehabilitation in chronic heart failure: effect of an 8-week, high-intensity interval training versus continuous training. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2012;93(8):1359-64. doi: 10.1016/j.apmr.2012.03.007
 15. Hafstad AD, Lund J, Hadler-Olsen E, Höper AC, Larsen TS, Aasum E. High-and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. *Diabetes*. 2013;62(7):2287-94. doi: 10.2337/db12-1580
 16. 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):751-6. doi: 10.1519/r-20155.1
 17. Chengji W, Xianjin F. Treadmill exercise alleviates diabetic cardiomyopathy by suppressing plasminogen activator inhibitor expression and enhancing eNOS in streptozotocin-induced male diabetic rats. *Endocrine connections*. 2018;7(4):553-9. doi: 10.1530/ec-18-0060
 18. Lee YI, Cho JY, Kim MH, Kim KB, Lee DJ, Lee KS. Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. *European journal of applied physiology*. 2006;97(2):216-24. doi:10.1007/s00421-006-0161-5
 19. Zhao CX, Xu X, Cui Y, Wang P, Wei X, Yang S, et al. Increased endothelial nitric-oxide synthase expression reduces hypertension and hyperinsulinemia in fructose-treated rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2009; 328(2):610-20. doi: 10.1124/jpet.108.143396
 20. Jesmin S, Zaedi S, Maeda S, Yamaguchi I, Goto K, Miyauchi T. Effects of a selective endothelin a receptor antagonist on the expressions of iNOS and eNOS in the heart of early streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental Biology and Medicine*. 2006;231(6):925-31. doi: 10.3181/00379727-231-2310925
 21. Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005;289(5):H2144-52. doi: 10.1152/ajpheart.00591.2005
 22. Joffe II, Travers KE, Perreault-Micale CL, Hampton T, Katz SE, Morgan JP, et al. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced, non-insulin-dependent diabetic rat: Noninvasive assessment with Doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999;34(7):2111-9. doi: 10.1016/S0735-1097(99)00436-2
 23. Vettor R, Valerio A, Ragni M, Trevelin E, Granzotto M, Olivieri M, et al. Exercise training boosts eNOS-dependent mitochondrial biogenesis in mouse heart: role in adaptation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013;306(5):519-28. doi: 10.1152/ajpendo.00617.2013
 24. Shankar RR, Wu Y, Shen HQ, Zhu JS, Baron AD. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes*. 2000;49(5):684-7. doi: 10.2337/diabetes.49.5.684
 25. Bhashyam S, Fields AV, Patterson B, Testani JM, Chen L, Shen YT, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Increases Myocardial Glucose Uptake via p38 α MAP Kinase-Mediated, Nitric Oxide-Dependent Mechanisms in Conscious Dogs with Dilated Cardiomyopathy. *Circulation: Heart Failure*. 2010;3(4):512-21. doi: 10.1161/circheartfailure.109.900282
 26. Merry TL, Steinberg GR, Lynch GS, McConell GK. Skeletal muscle glucose uptake during contraction is regulated by nitric oxide and ROS independently of AMPK. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2009; 298(3):577-85. doi: 10.1152/ajpendo.00239.2009
 27. Grijalva J, Hicks S, Zhao X, Medikayala S, Kaminski PM, Wolin MS, et al. Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Cardiovascular diabetology*. 2008;7(1):34. doi: 10.1186/1475-2840-7-34
 28. Kolluru GK, Sinha S, Majumder S, Muley A, Siamwala JH, Gupta R, et al. Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis. *Nitric Oxide*. 2010;22(4):304-15. doi: 10.1016/j.niox.2010.02.004
 29. Ramos JS, Dalleck LC, Tjonna AE, Beetham KS, Coombes JS. The impact of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on vascular function: a systematic review and meta-analysis. *Sports medicine*. 2015;45(5):679-92. doi: 10.1007/s40279-015-0321-z
 30. Thijssen DH, Dawson EA, Black MA, Hopman MT, Cable NT, Green DJ. Brachial artery blood flow responses to different modalities of lower limb exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2009;41(5):1072-9. doi: 10.1249/MSS.0b013e3181923957.