

## Effects of Eight Weeks of High-Intensity Interval Training on the Expression of the Nkx2.5 and Tbx5 Genes in the Heart Tissue of Type 2 Male Diabetic Rats

Mahdieh Kousha<sup>1</sup> , Hossein Abednatanzi<sup>1\*</sup> , Mandana Gholami<sup>1</sup> , Farshad Ghazalian<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Physical Education and Sports Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

### Article Info

**Article type:**  
Research article

### Article History:

Received: 01 September 2021  
Revised: 19 September 2021  
Accepted: 12 December 2021  
Published Online: 27 May 2022

### \* Correspondence to:

Hossein Abednatanzi  
Dept of Physical Education and  
Sports Sciences, Science and  
Research Branch, Islamic Azad  
University, Tehran, Iran  
Email:  
abednazar@gmail.com

### ABSTRACT

**Introduction:** Exercise and antioxidants consumption are known as protective effect against the risk of diabetes. Therefore, the current study aimed to investigate the effects of eight weeks of high-intensity interval training (HIIT) and thyme honey on the expression of Nkx2.5 and Tbx5 genes in the heart tissue of male type 2 diabetic rats.

**Material & Methods:** This experimental study was performed on 36 male diabetic rats which were randomly divided into four groups of control (n=8), HIIT (n=10), thyme honey (n=8), and HIIT+thyme honey (n=10). The HIIT training intervention was conducted in eight weeks (five sessions per week) and included 2 to 8 intervals with 2 min running at 80%-90% VO<sub>2</sub>max and 1 min at 50%-56% VO<sub>2</sub>max. Additionally, the supplement groups consumed 3 g/kg of thyme honey, 5 days/week. Both Nkx2.5 and Tbx5 gene expression in heart tissue were measured using real-time RT-PCR. To evaluate the differences among the groups, ANOVA and LSD post hoc tests were used at the significance level of P≤0.05. (Ethic code: IR.SSRC.REC.1399.080)

**Findings:** The results revealed that the expression of the Nkx2.5 gene was significantly increased only in the HIIT group, compared to the control group (P=0.03); however, it was not observed in other intervention groups (P>0.05). The expression of the Tbx5 gene was significantly increased in both HIIT (P=0.02) and HIIT+thyme honey (P=0.02) groups, compared to the control group.

**Discussion & Conclusion:** The HIIT is associated with increased expression of the Nkx2.5 and Tbx5 genes in the heart tissue of diabetic rats; however, it can not be said exactly that thyme honey has similar effects in diabetic rats.

**Keywords:** Antioxidant, Diabetes, High-intensity interval training, Honey

### ➤ How to cite this paper

Kousha M, Abednatanzi H, Gholami M, Ghazalian F. Effects of Eight Weeks of High-Intensity Interval Training on the Expression of the Nkx2.5 and Tbx5 Genes in the Heart Tissue of Type 2 Male Diabetic Rats. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(2): 71-81.



## آثار ۸ هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن های Nkx2.5 و Tbx5 بافت قلب رت های نر دیابتی نوع ۲

مهديه كوشا<sup>۱</sup>، حسين عابد نطنزی<sup>۱\*</sup>، ماندانا غلامی<sup>۱</sup>، فرشاد غزالیان<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

#### نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۰

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۱

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۳/۰۷

#### نویسنده مسئول:

حسین عابد نطنزی

گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

#### Email:

abednazari@gmail.com

**مقدمه:** فعالیت بدنی و مصرف آنتی اکسیدان ها به عنوان اثر محافظتی در برابر خطر دیابت شناخته می شوند؛ بنابراین، هدف پژوهش حاضر بررسی آثار ۸ هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) و غسل آویشن بر بیان ژن های Nkx2.5 و Tbx5 بافت قلب رت های نر دیابتی نوع دو است.

**مواد و روش ها:** این مطالعه تجربی روی ۳۶ رت دیابتی صورت گرفت. رت ها به طور تصادفی به چهار گروه کنترل دیابتی (۸ سر)، تمرین تناوبی (۱۰ سر)، غسل آویشن (۸ سر)، تمرین تناوبی و مصرف غسل آویشن (۱۰ سر) تقسیم شدند. مداخله تمرینی به صورت هشت هفته HIIT، شامل ۲ تا ۸ تناوب دودقیقه ای با شدت ۸۰ تا ۹۰ درصد  $VO_{2max}$  و استراحت یک دقیقه ای با شدت ۵۰ تا ۵۶ درصد  $VO_{2max}$ ، به مدت ۵ جلسه در هفته اجرا گردید. علاوه بر این، ۳ گرم بر کیلوگرم غسل آویشن، ۵ روز در هفته در گروه های مکمل مصرف شد. بیان ژن های Nkx2.5 و Tbx5 توسط real-time RT-PCR اندازه گیری گردید. برای بررسی تفاوت میان گروه ها، از ANOVA و آزمون تعقیبی LSD در سطح معنی داری  $P \geq 0.05$  استفاده شد.

**یافته ها:** نتایج نشان می دهد که بیان ژن Nkx2.5، تنها در گروه HIIT ( $P=0.03$ ) نسبت به گروه کنترل، افزایش معناداری دارد؛ اما این یافته در سایر گروه های مداخله تکرار نمی شود ( $P \geq 0.05$ ). بیان ژن Tbx5 بافت قلبی در هر دو گروه HIIT ( $P=0.02$ ) و HIIT\*عسل آویشن ( $P=0.02$ ) نسبت به گروه کنترل، به طور معناداری افزایش می یابد.

**بحث و نتیجه گیری:** HIIT با افزایش بیان ژن های Nkx2.5 و Tbx5 در بافت قلب رت های دیابتی ارتباط دارد، درحالی که به طور دقیق نمی توان گفت غسل آویشن اثرات مشابهی در رت های دیابتی داشته باشد.

**واژه های کلیدی:** آنتی اکسیدان، تمرین تناوبی شدید، دیابت، عسل

**استناد:** كوشا، مهديه؛ عابد نطنزی، حسين؛ غلامی، ماندانا؛ غزالیان، فرشاد. آثار ۸ هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن های Nkx2.5 و Tbx5 بافت قلب

رت های نر دیابتی نوع ۲. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، تیر ۱۴۰۰؛ ۸۱-۷۱.



دیابت بیماری‌ای است که به علت اختلال در ترشح و کارکرد انسولین، به هایپرگلیسمی مزمن و اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و لیپیدها منجر می‌شود (۱). بیماری‌های قلبی-عروقی علت اصلی مرگ در بیماران دیابتی است (۱). همه تحقیقات حضور یک کاردیومیوپاتی دیابتی اختصاصی مستقل از اختلالات قلبی-عروقی و پرفشار خونی را گزارش کرده‌اند که در آن تغییرات در سطح کاردیومیوسیت‌ها آشکار است (۲). در گذشته اعتقاد داشتند قلب یک عضو پس میتوزی با تمایز انتهایی است و قادر به ساخت مجدد نیست؛ زیرا سلول‌های آن چرخه تکثیری ندارند. با وجود این، اخیراً نشان داده‌اند سلول‌های عضلانی قلب در مراحل انتهایی نارسایی قلبی می‌توانند تکثیر شوند (۳). تزریق موضعی سلول‌های بنیادی قلبی (CSCs) به عضله قلبی حیوانات و انسان‌های مبتلا به MI، بافت کرونری را ترمیم و عملکرد بطنی را بهتر کرده است (۴)، درحالی‌که دیگر یافته‌ها نشان داد که تعداد بسیار اندکی از میوسیت‌های جدید در طول پیری یا پس از آسیب تولید می‌گردد. مطالعات اندکی نشان می‌دهد، این سلول‌ها نمی‌توانند به میوسیت‌های جدید تمایز پیدا کنند (۵). سلول‌های بنیادی قلب انسان در پاسخ به اضافه‌بار فعال می‌شوند و در جهت تبدیل به کاردیومیوسیت‌ها تمایز می‌یابند (۶). بررسی بیان پروتئین‌های عامل‌های رونویسی برای تأیید تمایز میوسیت‌های قلبی اهمیت دارد. *Nkx2-5* یا پروتئین هموباکس قلب، یک ژن اختصاصی قلب و مارکر تمایز کاردیومیوسیت است. *Tbx5* یک عامل پروتئینی رونویسی دیگری است که با رشد قلب ارتباط دارد. همراه با سیگنالینگ رشد اندام‌های فوقانی، *Tbx5* در رشد سپتوم قلب و همچنین سامانه الکتریکی که انقباضات قلب را هماهنگ می‌نماید، نقش مهمی را بازی می‌کند (۵).

استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز سه واکنش فیزیولوژیکی ضروری در ایجاد و پیشرفت کاردیومیوپاتی دیابتی هستند. فلاونوئیدها و فنولیک اسید، دو ترکیب

اصلی ایجادکننده فعالیت آنتی‌اکسیدانی عسل به‌شمار می‌روند که از واکنش اتواکسیداسیون جلوگیری می‌کنند و اثر مهارکنندگی روی رادیکال‌های آزاد دارند (۷). نقش اصلی مسیرهای آنتی‌اکسیدانی *ARE/Keap/Nrf2* برای توضیح مسیرهای مختلف مولکولی درگیر در دیابت در حال کشف هستند (۸). در موش‌های ایسکمی‌شده که با تزریق سلول‌های بنیادی تحت درمان بودند، مصرف آنتی‌اکسیدان طبیعی رزوراترول سازوکار دفاع آنتی‌اکسیدانی را از طریق فعال‌سازی هسته‌ای *Nrf2* و افزایش بیان *Nrf2* و *Ref-1*، به میزان فراوانی افزایش داد. *Ape1/Ref-1* نیز چندین عامل رونویسی را فعال و اتصال DNA آن‌ها را از طریق احیای باقیمانده سیستمین تسهیل می‌کند. محیط ردوکس داخل سلولی ایجادشده، باعث افزایش زنده ماندن سلول‌های بنیادی، تکثیر و نوزایی سلول قلبی و افزایش عملکرد قلبی می‌شود (۹).

خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار بالای گیاه آویشن به اثبات رسیده است؛ اما به سبب طعم تند، مقدار فراوان آن قابل مصرف خوراکی نیست (۱۰). یکی از راه‌های مصرف این ماده بدون درک طعم آن، استفاده از عسل آویشن است. کارواکرول از فلاونوئیدهای مهم آویشن به‌شمار می‌رود. کارواکرول با فعال‌سازی *PPAR $\gamma$*  باعث سرکوب بیان پروتئین سیکلواکسیژناز-۲ (*COX-2*) ناشی از لیپوپلیساکارید در سلول‌های *U937* شبه‌ماکروفاژ انسانی می‌شود که سازمان متابولیسم لیپید و هموستاز گلوکز و تعدیل‌کننده دیابت است (۱۱). پلی‌فنل‌های عسل به‌طور بالقوه با فعال‌سازی تنظیم‌کننده‌های ژنی برای مسیرهای متابولیک شامل متابولیسم لیپیدی، حساسیت‌زایی انسولینی و هموستاز گلوکز، از بیماری‌های مزمن مرتبط با استرس اکسیداتیو و التهاب جلوگیری می‌کنند (۸).

فعالیت ورزشی همچنین از راه تشکیل کاردیومیوسیت‌های جدید به رشد قلبی منجر می‌شود

(۱۳، ۱۲). تمرین تناوبی شدید در مقایسه با شدت متوسط، با افزایش بیان ژن‌های ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و هایپرتروفی فیزیولوژیک قلبی و در کاهش عوارض ناشی از دیابت راهبرد مؤثرتری است (۱۴). بر اساس این، شواهد نشان می‌دهند تمرین ورزشی با فعال‌سازی سلول‌های بنیادی قلبی ساکن در بافت قلب همراه است (۱۵، ۱۳، ۱۲). فعالیت ورزشی از راه فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی IGF-1-PI3K-AKT/PKB به افزایش بیان مجموعه ژنی با نقشه‌ای شناخته‌شده در فعال‌سازی، تکثیر و تمایز CSCs به کاردیومیوسیت‌ها منجر می‌شود (۱۶). از بین مجموعه ژنی ورزشی ژن‌های Tbx5 و Nkx2.5 در فرایند نوزایی، تکثیر و هایپرتروفی کاردیومیوسیت‌ها نقش چشمگیرتری ایفا می‌کنند (۱۷). بر اساس آنچه گفته شد، تاکنون پژوهشی ظرفیت تکثیر و تمایز سلول‌های قلبی را پس از ابتلا به قلب دیابتی، در پاسخ به تمرین تناوبی شدید و مصرف عسل آویشن مطالعه نکرده است؛ بنابراین، با توجه سازگاری‌های مثبت فیزیولوژیک قلبی، محافظت از قلب و بهبود عملکرد قلبی و احتمال تحریک بیان ژن‌های Tbx5 و Nkx2.5 در اثر تمرین تناوبی و عسل آویشن، ما چنین فرض کردیم که تمرین تناوبی شدید، مصرف عسل آویشن و ترکیب این دو مداخله می‌تواند در افزایش بیان ژن‌های Tbx5 و Nkx2.5 در رت‌های نر دیابتی نوع ۲ مؤثر باشد؛ بنابراین، هدف از تحقیق حاضر بررسی آثار هشت هفته تمرین تناوبی شدید و عسل آویشن بر بیان ژن‌های Tbx5 و Nkx2.5 در رت‌های نر دیابتی نوع ۲ بود.

### مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی، بر اساس روش برابری منابع (۱۸) و بر اساس راهنمای اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و رعایت بیانیه هلسینگی (۱۹)، تعداد ۳۶ رت نر نژاد ویستار جوان به‌عنوان نمونه آماری، از پژوهشگاه رویان خریداری و به حیوان‌خانه آزمایشگاه

رازی دانشگاه آزاد علوم و تحقیقات انتقال داده شدند. رت‌ها با دامنه سنی ۳۵ تا ۴۵ روز و میانگین وزنی  $110 \pm 10$  گرم بودند. رت‌ها پس از دو هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن میانگین  $197 \pm 20$  گرم، تحت رژیم پرچرب (HFD) قرار گرفتند. پس از ۲۰ هفته تغذیه با رژیم پرچرب تهیه‌شده توسط پژوهشکده زیست‌فناوری رویان که شامل ۴۵ درصد به مدت ۳ ماه و رژیم پرچرب ۶۰ درصد به مدت ۲ ماه (۲۰) و دسترسی آزاد به مواد غذایی و آب، به ۴ گروه کنترل دیابتی (۸ سر)، تمرین تناوبی (۱۰ سر)، عسل آویشن (۸ سر)، تمرین تناوبی و عسل آویشن (۱۰ سر) تقسیم گردیدند. رت‌ها در قفسه‌ای از جنس پلی‌کربنات شفاف با قابلیت اتوکلاو در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  تا ۲۴ و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ۶۵ درصد و در سالن حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند. برای القای دیابت از رژیم غذایی پرچرب به مدت ۲۰ هفته و سپس تزریق داخل صفاقی (۲۵mg/kg) محلول تازه تهیه‌شده از STZ در سرم فیزیولوژیکی استفاده گردید. یک هفته پس از تزریق، با ایجاد جراحت کوچک در دم رت‌ها، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار گرفت و گلوکز خون ناشتا توسط دستگاه گلوکومتر اندازه‌گیری شد. قند خون بین ۱۵۰ تا ۴۰۰ mg/dl به‌عنوان معیاری برای اطمینان از ابتلای رت‌ها به دیابت در نظر گرفته شد (۲۱-۲۳). طی دوره آزمایش، به رت‌های گروه عسل آویشن و گروه عسل آویشن - تمرین تناوبی، عسل آویشن با دوز ۳g/kg رقیق‌شده در آب مقطر، به روش گاواژ خورانده شد (۲۴).

دستورالعمل تمرین تناوبی: برنامه هشت هفته تمرین تناوبی، پنج جلسه در هفته با افزایش تدریجی تناوب شدید از سرعت ۳۰ الی ۳۶ متر بر دقیقه (۸۰ تا ۹۵ درصد  $\text{Vo}_{2\text{max}}$ ) و تناوب استراحت با سرعت ۱۶ تا ۲۲ متر در دقیقه (۵۰ تا ۵۶ درصد  $\text{Vo}_{2\text{max}}$ )، زمان ۱۶ الی ۳۴ دقیقه به‌صورت دویدن روی تردمیل صورت گرفت، به‌طوری‌که زمان دویدن از ۱۶ دقیقه در هفته اول، به ۳۴

خلوص و کیفیت RNA استخراج شده، cDNA با استفاده از کیت TAKARA ساخته و به فریزر منفی ۲۰ انتقال داده شد. برای انجام Realtime PCR، از مستر میکس سایبرگرین AMPLIQON استفاده گردید. در پژوهش حاضر، از ژن مرجع GAPDH به عنوان ژن خانه دار و همچنین برای آنالیز کمی داده‌های Real Time PCR، از روش دلتا دلتا سی تی بهره گرفته شد (۲۸)؛ سپس برای بررسی بیان ژن Nkx2.5 و Tbx5 بافت قلب، پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش توسط نرم افزار ID6 Allel طراحی و توسط شرکت بیوتکنولوژی سیناکلون سنتز گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول شماره ۱ آورده شده است. گرادیانت دمایی گذاشته شد و همه نمونه‌ها به صورت ۲ مرتبه تکرار در دستگاه ریل تایم پی سی آر قرار گرفتند؛ همچنین برنامه دمایی و زمانی واکنش Real Time PCR در پژوهش حاضر مطابق جدول شماره ۲ است.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS vol.22 تجزیه و تحلیل شدند. از آزمون شاپیرو ویلک برای تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها و از آزمون لوین برای تجانس واریانس‌ها و از آمار استنباطی تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی LSD برای مقایسه تفاوت میان گروه‌ها استفاده گردید. سطح معناداری در آزمون‌ها  $\alpha \geq 0.05$  در نظر گرفته شد.

دقیقه در هفته هشتم افزایش یافت. رت‌ها یک هفته پیش از شروع دستورالعمل، به منظور آشنایی با تردمیل سه روز در هفته با سرعت پنج متر در دقیقه با شیب صفر درصد، با زمان ۱۰ و ۱۲ و ۱۵ دقیقه روی تردمیل راه رفتند. گروه کنترل نیز در طول اجرای دستورالعمل آشنایی، به همین ترتیب روی تردمیل راه رفتند (۲۶، ۲۵).

با خاتمه دوره تمرینی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین گروه‌های تجربی تمرینی و پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، رت‌ها توسط ترکیب داروی زایلازین (۱۰ mg/kg) و کتامین (۷۵ mg/kg) محصول شرکت آلفاسان هلند، به صورت تزریق درون صفاقی بیهوش و قربانی شدند. نمونه‌های خون از طریق خون گیری از قلب جمع آوری گردید و در دمای ۲۰- نگهداری شد. مقادیر گلوکز خون با استفاده از کیت ویژه گلوکز ساخت شرکت پارس آزمون ایران با حساسیت ۵ میلی گرم در دسی لیتر، با استفاده از دستگاه اتو آنالیزور سنجیده گردید (۲۷).

بافت قلب به منظور اندازه گیری بیان ژن، جدا و همراه یخ به فریزر منفی ۸۰ منتقل شد. در مرحله بعد، RNA با استفاده از محلول RiboEX Total RNA isolation solution (GeneAll) استخراج گردید و در نهایت، بررسی کمی و کیفی RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجیده شد. پس از اطمینان از

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای ژن‌های هدف و مرجع

نام ژن	توالی پرایمر مستقیم ۵'-۳'	توالی پرایمر معکوس ۳'-۵'	اندازه ژن bp
Nkx2.5	CTCGGATTTCACACCCACAC	CGAGGCATCAGGTTAGGTCA	۸۲
Tbx5	AGCAAGTCTCCATCCTCACC	GGCCAGTCACCTTCACTTTG	۱۷۵
GAPDH	ATCACTGCCACTCAGAAGAC	ACATTGGGGGTAGGAACAC	۱۲۵

جدول شماره ۲. برنامه دمایی و زمانی R-T PCR

مرحله	دما	مدت چرخه	تعداد تکرار
Hold	95°C	۱۰ دقیقه	۱
	95°C	۳۰ ثانیه	
Denaturation melting curve annealing, and extension	60°C	۳۰ ثانیه	۴۰
	72°C	۳۰ ثانیه	
	72°C	۳۰ ثانیه	

## یافته ها

می‌دهد که میانگین گلوکز در گروه کنترل دیابتی (۴۶۵/۵-۳۱۷) پس از هشت هفته افزایش یافت، درحالی‌که در گروه‌های تمرین (۳۷۳/۱-۲۴۵)، عسل (۳۳۷/۶-۲۳/۴۲) و عسل-تمرین (۳۳۴/۵-۱۳۸/۱۲) کاهش داشت.

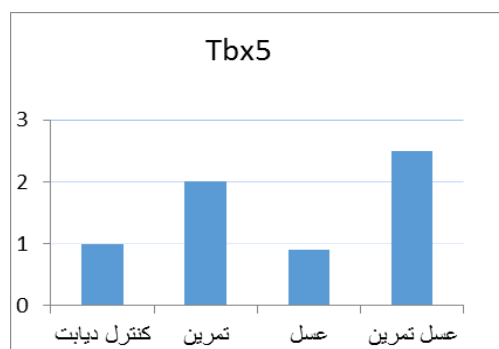
جدول شماره ۳ میانگین وزن (گرم) و شاخص گلوکز (mg/dl) رت‌ها را نشان می‌دهد. وزن پس از اعمال رژیم پرچرب افزایش قابل‌مشاهده‌ای داشته است. اجرای هشت هفته مداخله سبب کاهش وزن در گروه‌های پژوهش گردید و نیز همچنین جدول شماره ۴ نشان

جدول شماره ۳. نتایج آمار توصیفی مربوط به وزن نهایی و گلوکز

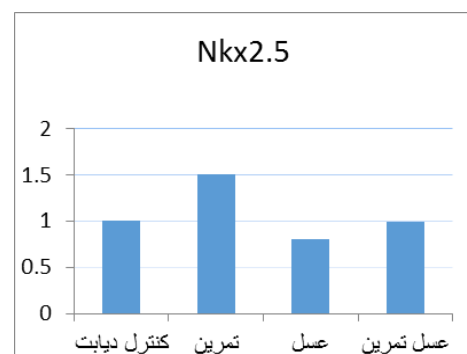
مرحله	پیش‌آزمون				پس‌آزمون				
	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد	وزن (گرم)	گلوکز (mg/dl)	انحراف	میانگین	وزن (گرم)	گلوکز (mg/dl)
کنترل دیابتی	۶	۳۸۶/۶	۴۸/۴۲	۳۱۷	۷۱/۳	۳۱۷	۷۱/۳	۴۶۵/۵	۱۰۲/۸۱
تمرین	۸	۴۰۷/۳	۶۴/۶۴	۳۷۳/۱	۵۴/۲۸	۳۷۳/۱	۵۴/۲۸	۲۴۵	۱۶۰/۳۹
عسل	۶	۳۹۳/۶	۲۲/۴۲	۳۳۷/۶	۲۳/۴۲	۳۳۷/۶	۲۳/۴۲	۳۰۵/۸۳	۹۲/۶۷
تمرین-عسل	۸	۴۱۷	۵۹/۵۳	۳۳۴/۵	۷۷/۶۸	۳۳۴/۵	۷۷/۶۸	۱۳۸/۱۲	۲۴/۵

یافته‌های توصیفی میانگین تغییرات بیان ژن Tbx5 در چهار گروه پژوهش در شکل شماره ۲ درج شده است. همان‌طور که نشان داده شده است، بیان ژن در گروه تمرین-عسل (۲/۵۱۷) نسبت به گروه کنترل (۱)، گروه عسل (۰/۹۲) و گروه تمرین (۲/۱۳۷) افزایش چشمگیری دارد، درحالی‌که این شاخص در گروه عسل نسبت به گروه کنترل کاهش داشت.

شکل شماره ۱ یافته‌های توصیفی تغییرات بیان ژن Nkx2.5 را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. همان‌طور که نشان داده شده است، بیان این ژن در گروه تمرین تناوبی (۱/۴۴) نسبت به گروه کنترل (۱)، گروه عسل (۰/۸) و گروه تمرین-عسل (۰/۹۹) افزایش چشمگیری دارد، درحالی‌که کاهش مقادیر فولدچنج ژن Nkx2.5 در گروه عسل در مقایسه با گروه کنترل معنادار نبود.



شکل شماره ۲. یافته‌های توصیفی بیان ژن Tbx5



شکل شماره ۱. یافته‌های توصیفی بیان ژن Nkx2.5

جدول شماره ۴. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه میان گروه‌ها

متغیر	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	سطح معناداری
Nkx2.5	۱/۵۹۹	۳	۰/۵۳۳	۴/۱۲۸	۰/۰۱۷
Tbx5	۱۴/۹	۳	۴/۹۶	۴/۳۶	۰/۰۱۴

جدول شماره ۵. نتایج آزمون تعقیبی LSD میان گروه‌ها

متغیر/شاخص آماری	گروه	سطح معنی‌داری	تفاوت میانگین‌ها
بیان ژن Nkx2.5	تمرین	*0/03	-0/445
	کنترل	0/365	0/192
	تمرین_عسل	0/998	0/001
	عسل	*0/003	0/637
	تمرین_عسل	*0/020	0/446
	عسل	0/33	-0/19
بیان ژن Tbx5	تمرین	*0/02	-1/33
	کنترل	0/89	0/07
	تمرین_عسل	*0/01	-1/517
	عسل	*0/02	1/41
	تمرین_عسل	*0/74	-0/17
	عسل	0/016	-1/59

تفاوت معنادار است. با توجه به میانگین‌ها و یافته‌های توصیفی، عملکرد گروه تمرین و گروه تمرین\_عسل از دو گروه یادشده بهتر بود.

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعات حاضر نشان داد که هشت هفته تمرین تناوبی باعث افزایش بیان ژن Tbx5 و Nkx2.5 در بافت قلبی رت‌های دیابتی شد. وارینگ و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند تشکیل کاردیومیوسیت‌های جدید در گروه‌های تمرین ورزشی افزایش معناداری داشت (۱۱) که با نتایج مطالعه حاضر همسو است. در تأیید نتایج مطالعه حاضر، شیانو و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که با فعالیت ورزشی شنا، مقادیر Nkx2.5، C-Kit و Scal-1 افزایش معنادار دارد و به هایپرتروفی فیزیولوژیایی موش‌ها و فعال‌سازی سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز قلبی منجر می‌شود (۲۹، ۱۲) و نیز اثبات کردند C/EBP عامل بالادستی مجموعه ژنی هنگام فعالیت ورزشی است که هایپرتروفی و تکثیر کاردیومیوسیت‌ها را تنظیم می‌کند؛ بنابراین، کاهش بیان C/EBP $\beta$  ناشی از فعالیت ورزشی و نیز مهار ژنتیکی C/EBP $\beta$  به افزایش بیان مجموعه ژن‌های مرتبط به تکثیر و تمایز قلبی (Nkx2.5, Tbx5) و بهبود عملکرد قلبی منجر می‌گردد (۳۰). همتی‌نفر و همکاران (۱۳۹۸) نشان دادند مقادیر mRNA Tbx5 در هیچ گروه

برای بررسی اثر برنامه تمرینی و مصرف عسل بر بافت قلب رت‌های دیابتی در میان گروه‌های کنترل، تمرین، عسل و گروه تمرین-عسل از آزمون تحلیل واریانس یک راه استفاده شد که در جدول شماره ۴ آمده است و نتایج آن به شرح ذیل است.

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه نشان داد که در شاخص بیان ژن Nkx2.5 ( $P=0.01$ ) و شاخص بیان ژن Tbx5 ( $P=0.03$ ) تفاوت معنادار وجود دارد. با توجه به معنادار بودن اثر گروه برای بررسی بیشتر تفاوت‌ها، در ادامه از آزمون تعقیبی LSD استفاده گردید که نتایج آن در جدول شماره ۵ درج شده است.

نتایج آزمون تعقیبی LSD نشان داد، در شاخص بیان ژن Nkx2.5 میان گروه تمرین با گروه کنترل ( $P=0.03$ ) و میان گروه تمرین با گروه عسل ( $P=0.03$ ) و همچنین گروه تمرین با گروه تمرین\_عسل ( $P=0.02$ ) تفاوت معنادار است. با توجه به میانگین‌ها و یافته‌های توصیفی، عملکرد گروه تمرین از سه گروه یادشده بهتر بود؛ اما میان سایر گروه‌ها در شاخص بیان ژن Nkx2.5 تفاوت معنادار نبود و همچنین نتایج آزمون تعقیبی LSD در شاخص بیان ژن Tbx5 نشان داد، میان گروه تمرین با گروه کنترل ( $P=0.02$ ) و میان گروه تمرین با گروه عسل ( $P=0.02$ ) و نیز گروه تمرین\_عسل با گروه کنترل ( $P=0.01$ ) و گروه تمرین\_عسل با گروه عسل ( $P=0.01$ )

تمرینی افزایش نیافت و تنها در گروه کنترل سالم افزایش معناداری داشت (۳) که این نتایج با مطالعه ما ناهمسو بود. احتمالاً این به سبب تفاوت در شدت تمرین و نوع بیماری رت‌ها است که در مطالعه همتی نفر رت‌ها مبتلا به MI و در مطالعه حاضر رت‌ها دیابتی بودند و تمرین تناوبی با شدت بالا در افزایش شاخص‌های نوزایی قلبی مؤثر است. همسو با نتایج مطالعه حاضر، تئو و همکارانش (۲۰۱۵) نشان داده‌اند تزریق NRG1 به موش‌های مبتلا به MI تکثیر کاردیومیوسیت‌ها و نوزایی قلبی را افزایش می‌دهد و همچنین باعث بهتر شدن عملکرد قلبی می‌شود (۳۱). همسو با افزایش بیان ژن Nkx2.5 متعاقب تمرین ورزشی، ژو و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند میوگین Irisin ناشی از ورزش از آسیب‌های قلبی-عروقی پس از ایسکمی محافظت می‌کند و باعث افزایش Nkx2.5 سلول پروژنیاتور قلبی وابسته به بازسازی سلول‌های قلبی، رگ‌زایی جدید و کاهش فیروز قلب می‌گردد و همچنین نشان داده‌شده است که بهبود عملکرد ماکروفاژی ممکن است از سامانه هدایت قلبی در برابر آسیب محافظت کند (۳۲).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد فعال شدن مسیر پیام‌رسانی C/EBP $\beta$ -NRG1-ErbB4 متعاقب تمرین ورزشی یکی از سازوکارهای سلولی-مولکولی احتمالی درگیر در افزایش شاخص‌های نوزایی و تکثیر و تمایز قلبی است (۳۱). ورزش در قلب دیابتی باعث افزایش بایوژنز میتوکندریایی و بهبود عملکرد اندوتلیال عروق می‌شود (۳۳).

از زمان‌های قدیم، عسل به سبب ارزش غذایی و درمانی مورد توجه بوده است. با این حال، مصرف آن به عنوان دارو به ویژه در بیماران دیابتی بحث‌برانگیز شده است. نتایج بررسی ۱۰۷ مقاله معتبر نشان دادند که عسل گلوکز سرم ناشتا را کاهش و پپتید c ناشتا را افزایش می‌دهد و شاخص گلاسمیک پایین دارد (۳۳)؛ از این رو، آثار مصرف عسل برای کنترل گلوکز خون و انسولین در بیماران دیابتی ثابت شده است. همان‌طور که نتایج نشان

داد، هشت هفته مصرف عسل به همراه تمرین تناوبی باعث افزایش معنی‌دار شاخص بیان ژن Tbx5 ( $P=0.02$ )، ۲/۵۱۷) در بافت قلب رت‌های دیابتی نوع ۲ شد؛ اما درباره ژن Nkx2.5 افزایش بیان آن معنی‌دار نبود.

علی‌رغم این موضوع که تمرین به همراه مصرف عسل به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی اثر هم‌افزایی در افزایش بیان ژن‌های نوزایی قلبی داشت؛ اما مصرف عسل آویشن به تنهایی، نه تنها نتوانست عامل مؤثری در پیشگیری از عوارض قلب دیابتی باشد، بلکه باعث کاهش غیرمعنادار بیان ژن‌های تکثیر و تمایز بافت قلب دیابتی شد. همسو با این نتایج، مری و ریستو (۲۰۱۶) نشان دادند مکمل آنتی‌اکسیدانی احتمالاً تأثیرات منفی بر آئیزوژنز، حساسیت انسولین، دفاع سلولی، هایپرتروفی، بایوژنز میتوکندری و ریکاوری دارند (۳۴). نجفی و همکارانش (۲۰۱۱) نشان دادند مصرف عسل خوراکی به مدت ۴۵ روز به میزان ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ به صورت حل‌شده در آب آشامیدنی ۴۰ موش صحرایی نر ویستار، باعث آثار محافظتی بر آریمی‌های ناشی از ایسکمی در قلب ایزوله موش‌ها گردید (۳۵). احتمالاً این ناهمسویی به علت تفاوت در مقدار، نوع عسل مصرف‌شده و نیز نوع بیماری رت‌ها بود. هرچند که سازوکارهای محافظتی عسل ناشناخته مانده است، بهتر است به عسل به عنوان منبع غنی از فلاونوئیدها و اسید فنولیک که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکالی بالایی دارند، توجه شود و نیز وجود منابعی از انرژی مثل گلوکز و فروکتوز، بسیاری از ویتامین‌ها، مواد معدنی و آنزیم‌ها در تغذیه بیماران بیشتر بررسی گردد.

اختلال در جذب گلوکز توسط گیرنده انسولین، گلیکوزولیز و گلوکونوژنز در بافت‌های محیطی در دیابتی‌ها به هایپرگلیسمی و افزایش تولید ROS در قلب منجر می‌شود (۳۶). عقیده عمومی بر این است ROS / RNS که در طول ورزش توسط میتوکندری و مجموعه زیرسلولی تولید می‌گردد، سبب آسیب عضلات اسکلتی، خستگی و اختلال در ریکاوری می‌شود (۳۴). مکمل‌های



بنیادی و تکثیر و تمایز آن‌ها بر بیماران مبتلا به MI صورت گرفته است، پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده، تأثیر نوع و شدت‌های مختلف تمرین اینتروال و نیز مقادیر و انواع مختلف عسل بر بهبود عملکرد و درمان قلبی بیماران دیابتی بررسی گردد. تشریح سازوکارهایی که به فعال‌سازی CSCs از طریق فعالیت ورزشی منجر می‌شوند، می‌تواند به‌عنوان ابزار درمانی مؤثر و جدید با تکیه بر بازسازی قلبی، برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌های قلبی عروقی استفاده گردد؛ همچنین سازوکارهای دقیق‌تر تأثیرات مکمل‌های مختلف آنتی‌اکسیدانی در پیشبرد اهداف درمان جدید غیردارویی در کاردیومیوپاتی دیابتی اجرا و بررسی شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری بود و با کد اخلاق IR.SSRC.REC.1399.080 در کمیته اخلاق پزشکی پژوهشگاه تربیت‌بدنی تأیید گردید؛ بنابراین، از همه همکاران پژوهشی و کارکنان آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌شود.

کد اخلاق: IR.SSRC.REC.1399.080

## References

- Jakubik D, Fitas A, Eyiletlen C, Jarosz-Popek J, Nowak A, Czajka P, et al. MicroRNAs and long non-coding RNAs in the pathophysiological processes of diabetic cardiomyopathy. emerging biomarkers and potential therapeutics. *Cardiovasc Diabetol* 2021;20:1-29. doi.org/10.1186/s12933-021-01245-2
- Huynh K, Bernardo BC, McMullen JR, Ritchie RH. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacol Ther* 2014; 142:375-415. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.01.003
- Hematinafar M, Gaeini A, Kordi M, Chobineh S, Karimzadeh F. The effect of exercise intensity on cardiac regenerative capacity in rats with myocardial infarction. *Sports Life Sci* 2019;11:17-34. doi: 10.22059/JSB.2019.134611.1006
- Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:8692-7. doi: 10.1073/pnas.0500169102.
- Wallner M, Duran JM, Mohsin S, Troupes CD, Vanhoutte D, Borghetti G, et al. Acute catecholamine exposure causes reversible myocyte injury without cardiac regeneration. *Circ Res*. 2016;119:865-79. doi: 10.1161/CIRCRES.AHA.116.308687
- Marino F, Scalise M, Cianflone E, Salerno L, Cappetta D, Salerno N, et al. Physical exercise and cardiac repair: The potential role of Nitric Oxide in boosting stem cell regenerative biology. *antioxidants* 2021;10:1002. doi: 10.3390/antiox10071002
- Kamkar A, Khodabakhshian S. Determination of the total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of Sabalan Honey. *J Veterin Res* 2017;72:53-61. doi: 10.22059/JVR.2017.61290
- Pasupuleti VR, Arigela CS, Gan SH, Salam SKN, Krishnan KT, Rahman NA, et al. A review on oxidative stress, diabetic complications, and the

آنتی‌اکسیدانی می‌توانند استقامت ناشی از تمرین و افزایش میانجی‌های ROS / RNS را در ظرفیت آنتی‌اکسیدان، بیوتز میتوکندری، سازوکارهای دفاعی سلول و حساسیت به انسولین را کاهش دهد. هیچ شواهد قانع‌کننده‌ای برای اثبات اینکه مکمل آنتی‌اکسیدان سازگاری‌های تمرینی ورزشی را افزایش می‌دهد، وجود ندارد (۳۴). با توجه به یافته‌های این پژوهش می‌توان احتمال داد که مصرف عسل به‌عنوان مکمل آنتی‌اکسیدانی در ورزش‌های شدید، مانع از ایجاد سازگاری‌های ناشی از تمرین در تکثیر سلول‌های قلبی و بهبود عملکرد قلب می‌شود. احتمالاً در بیماران دیابتی با وجود خواص شناخته‌شده آنتی‌اکسیدانی عسل برای جلوگیری از آپوپتوز و فیروز بافت قلبی، توسط سازوکارهای شناخته‌نشده‌ای باعث مهار سیگنالینگ افزایش بیان ژن‌های تولیدکننده سلول‌های قلبی ناشی از تمرین می‌گردد.

با توجه به نتایج حاضر می‌توان گفت که تمرین تناوبی عامل مهمی در تحریک سلول‌های بنیادی و تکثیر و تمایز آن‌ها به میوسیت‌های قلبی است و انجام تمرین باعث تکثیر کاردیومیوسیت‌ها می‌شود؛ اما مصرف عسل آویشن در تکثیر سلول‌های قلبی موش‌های دیابتی مؤثر نیست. با توجه به اینکه بیشتر مطالعات درباره سلول‌های

- roles of honey polyphenols. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020:8878172. doi: 10.1155/2020/8878172
9. Farkhondeh T, Folgado SL, Pourbagher-Shahri AM, Ashrafizadeh M, Samarghandian S. The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 2020; 127:110234. doi: 10.1016/j.biopha. 2020. 110234
  10. Charalambous M, Raftopoulos V, Paikousis L, Katodritis N, Lambrinou E, Vomvas D, et al. The effect of the use of thyme honey in minimizing radiation-induced oral mucositis in head and neck cancer patients: A randomized controlled trial. *Eur J Oncol Nurs* 2018; 34:89-97. doi: 10.1016/j.ejon.2018.04.003
  11. Abdallah HM, El Dine RS, Mohamed GA, Ibrahim SR, Shehata IA, El-Halawany AM. Natural Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Activators for Diabetes. *Altern Ther Health Med* 2020; 26:28-44
  12. Xiao J, Xu T, Li J, Lv D, Chen P, Zhou Q, et al. Exercise-induced physiological hypertrophy initiates activation of cardiac progenitor cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7:663-9
  13. Leite CF, Lopes CS, Alves AC, Fuzaro CSC, Silva MV, de Oliveira LF, et al. Endogenous resident c-Kit cardiac stem cells increase in mice with an exercise-induced, physiologically hypertrophied heart. *Stem Cell Res* 2015; 15:151-64. doi: 10.1016/j.scr.2015.05.011
  14. Alavi SS, Joukar S, Rostamzadeh F, Najafipour H, Darvishzadeh-mahani F, Mortezaeizade A. Involvement of Sirtuins and Klotho in Cardioprotective Effects of Exercise Training Against Waterpipe Tobacco Smoking-Induced Heart Dysfunction *Front Physiol* 2021;12:680005. doi: 10.3389/fphys.2021.680005
  15. Waring CD, Vicinanza C, Papalamprou A, Smith AJ, Purushothaman S, Goldspink DF, et al. The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. *Eur Heart J* 2014; 35:2722-31. doi: 10.1093/eurheartj/ehs338.
  16. Bo B, Zhou Y, Zheng Q, Wang G, Zhou K, Wei J. The Molecular Mechanisms Associated with Aerobic Exercise-Induced Cardiac Regeneration. *Biomolecules* 2020; 11:19. doi: 10.3390/biom11010019
  17. Naderi N, Hemmatinfar M, Gaeini AA, Bahramian A, Ghardashi-Afousi A, Kordi MR, et al. High-intensity interval training increase GATA4, CITED4 and c-Kit and decreases C/EBP $\beta$  in rats after myocardial infarction. *Life Sci* 2019; 221:319-26. doi: 10.1016/j.lfs. 2019.02.045
  18. Ahmadi-Noorbakhsh S. Sample Size Calculation for Animal Studies with Emphasis on the Ethical Principles of Reduction of Animal Use. *Res Med* 2018;42:144-53.
  19. Mobasher M, Mahdaviniya J, Zendehtel K. Ethics, medical research, Helsinki Declaration, informed consent. *Med Ethics His Med* 2012;5:62-8.
  20. Zou F, Mao X-q, Wang N, Liu J, Ou-Yang J-p. *Astragalus polysaccharides alleviates glucose toxicity and restores glucose homeostasis in diabetic states via activation of AMPK. Acta Pharmacol Sin.* 2009; 30:1607-15. doi: 10.1038/aps.2009.168
  21. Gheibi S, Bakhtiarzadeh F, Ghasemi A. A review of high fat diet-streptozotocin model for induction of type 2 diabetes in rat. *Iran J endocrin metabol* 2016;18:135-48.
  22. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul C, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 2005; 52:313-20. doi: 10.1016/j.phrs.2005.05.004.
  23. Moeinifard M, Hedayati M. Alloxan and streptozotocin, tools for diabetes research. *J Applied Sports Physiol.* 2015;10:13-22. doi: 10.22080/JAEP.2015.915
  24. Ramli NZ, Chin K-Y, Zarkasi KA, Ahmad F. A review on the protective effects of honey against metabolic syndrome. *Nutrients* 2018;10:1009. doi: 10.3390/nu10081009.
  25. Akbarzadeh A. The effect of high intensity interval training combined with curcumin supplementation on Plasma glucose concentration and insulin resistance in diabetic rats. *SSU\_J* 2018;25:961-9.
  26. Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T, Mercier J. Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293: E916-22. doi: 10.1152/ajpendo.00164.2007
  27. Yeylaghi Ashrafi MR, Abednatanzi H, Ghazalian F. The effect of eight weeks of high intensity interval training and n-chromosomal royal jelly on G6Pase gene expression in hepatocytes, glucose levels and insulin resistance in type 2 diabetic rats. *Razi J Med Sci* 2020; 27: 135-50.
  28. Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol* 2004; 5:3. doi: 10.1186/1471-2172-5-3
  29. Zar A, Ahmadi F. Evaluation of CITED4 Gene Expression in The Cardiac Muscle of Male Rats as a Result of Resistance Exercise and Spirulina Supplement. *Jorjani Biomed J* 2021; 9: 36-44. doi: 10.29252/jorjanibiomedj.9.2.36
  30. Kartha CC. Mechanisms to Induce Cardiomyocyte Proliferation. *Cardiomyocytes in Health and Disease.* Springer; 2021. p. 269-78. doi: 10.1007/978-3-030-85536-9
  31. Tao L, Bei Y, Zhang H, Xiao J, Li X. Exercise for the heart: signaling pathways. *Oncotarget* 2015; 6: 20773. doi: 10.18632/oncotarget.4770
  32. Zhou X, Xu M, Bryant JL, Ma J, Xu X. Exercise-induced myokine FNDC5/irisin functions in cardiovascular protection and intracerebral retrieval of synaptic plasticity. *Cell biosci* 2019; 9: 1-4. doi:10.1186/s13578-019-0294-y
  33. Meo SA, Ansari MJ, Sattar K, Chaudhary HU, Hajjar W, Alasiri S. Honey and diabetes mellitus: obstacles and challenges—road to be repaired. *Saudi J biol sci* 2017; 24: 1030-3. doi:10.1016/j.sjbs.2016.12.020

34. Merry TL, Ristow M. Do antioxidant supplements interfere with skeletal muscle adaptation to exercise training? *J physiol* 2016; 594: 5135-47. doi:10.1113/JP270654
35. Bt Hj Idrus R, Sainik NQAV, Nordin A, Saim AB, Sulaiman N. Cardioprotective Effects of Honey and Its Constituent: An Evidence-Based Review of Laboratory Studies and Clinical Trials. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17: 3613. doi:10.3390/ijerph17103613
36. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S-i, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-90. doi: 10.1038/35008121.