



مقایسه دو مدل تمرین تناوبی شدید بر مقادیر گلوکز و بیان ژن های Bax و Bcl-2 در کاردیومیوسیت رت‌های

دیابتی

حمید کیا: گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقصود پیری: گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) m.peeri@iauctb.ac.ir

مریم دلفان: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

آپوپتوز،

دیابت نوع ۲،

تمرین تناوبی شدید،

Bax،

Bcl-2

زمینه و هدف: اختلالات قلبی حاصل از افزایش آپوپتوز یکی از مهم‌ترین عوارض ناشی از دیابت است که تحت تاثیر دزهای مختلف تمرین تناوبی شدید قرار می‌گیرد. هدف از مطالعه حاضر مقایسه دو شیوه تمرین تناوبی شدید بر مقادیر گلوکز و بیان ژن های Bcl-2 و Bax در کاردیومیوسیت رت‌های دیابتی بود.

روش کار: در مطالعه تجربی حاضر، ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار هشت هفته‌ای، با میانگین وزن 321 ± 18 گرم پس از القاء دیابت بوسیله STZ به طور تصادفی به ۴ گروه کنترل سالم (NC)، کنترل دیابتی (DC)، گروه تمرین تناوبی شدید نوع یک (HIIT1:1) و گروه تمرین تناوبی شدید نوع دو (HIIT2:1) تقسیم شدند. سپس گروه‌های تمرینی ۵ روز در هفته به مدت ۴ هفته با دزهای متفاوت، اما مسافت یکسان تمرین کردند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط تحلیل واریانس یک‌سویه در سطح معناداری ۰/۰۵ انجام گرفت.

یافته‌ها: مداخله HIIT2:1 باعث کاهش معنادار مقادیر گلوکز و بیان Bax ($p < 0.01$) و افزایش معنادار Bcl-2 در کاردیومیوسیت‌ها نسبت به کنترل دیابتی شد ($p < 0.01$). HIIT1:1 تنها باعث کاهش معنادار مقادیر گلوکز نسبت به گروه DC شد ($p < 0.05$). علاوه بر این، بیان ژن Bax کاردیومیوسیت‌ها در گروه HIIT2:1 به شکل معناداری کمتر از گروه HIIT1:1 بود ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: تمرین HIIT2:1 عوارض مخرب قلبی ناشی از دیابت را به حداقل می‌رساند. علاوه بر این، دز تجویزی تمرین HIIT در این تغییرات مکانیزمی مهم و تاثیرگذار است.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Kia H, Peeri M, Delfan M. Comparison of two types of high intensity interval training on glucose levels and genes expression of Bax and Bcl-2 in cardiomyocytes of diabetic rat. Razi J Med Sci. 2021;27(12):52-62.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.

Comparison of two types of high intensity interval training on glucose levels and genes expression of Bax and Bcl-2 in cardiomyocytes of diabetic rats

Hamid Kia: Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Maghsood Peeri: Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (*Corresponding author) m.peeri@iauctb.ac.ir

Maryam Delfan: Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: Following to advent of obesity, Type-II diabetes has been converted into a pandemic disease during the recent decades and it has been introduced as one of the main reasons for mortality throughout the world more than ever. Hyperglycemia and rising glucose caused by diabetes is led to increase apoptosis in cardiomyocytes at left ventricle. Bax-gene is one of the key genes at this process in controlling start point of apoptotic process and Bcl-2 gene also inhibits apoptosis. Accordingly, researchers have always acknowledged that exercise training including HIIT may play protective role for heart against diabetic side-effects by reducing quantities of glucose and apoptosis in cardiac cells. Thus, the present study aimed to compare two HIIT methods concerning quantities of glucose and expression of apoptotic and anti-apoptotic Bax and Bcl-2 genes in cardiomyocytes of rats with type II diabetes.

Methods: In the current experimental study, 24 rats of Vistar species (8 weeks) and average weight (321 ± 18 g) were divided randomly into four groups of Normal Control (NC), Diabetic Control (DC), High Intensity Interval Training Type I (HIIT1:1) and High Intensity Interval Training Type II (HIIT2:1) after adaption to the environment for one week and familiarity with treadmill. Diabetes was induced to all groups, except Normal Control (NC) group, using Streptozotocin (STZ) and Nicotine Amide. Then, the trained groups exercised with different doses, but in identical distance 5 days a week for 4 weeks. The speed of reaching to the maximum consumed oxygen dosage (vVO_2max) was measured at the sixth day once in both weeks. HIIT1:1 Protocol: Warm up and cool down for three minutes by intensity of ($vVO_2max = 40\%$); high intensity (Frequency= 2min); first week: $vVO_2max = 80\%$ (Four times); second week: $vVO_2max = 85\%$ (Four times); third and fourth weeks: $vVO_2max = 90\%$ (Five times); low intensity (2min); $vVO_2max = 40\%$ (Four times at first and second weeks and five times at third and fourth weeks). HIIT2:1 Protocol: Warm up and cool down for three minutes by intensity of $vVO_2max = 30\%$; high intensity (Frequency= 2min); First week: $vVO_2max = 80\%$ (Five times); second week: $vVO_2max = 85\%$ (Five times); third and fourth weeks: $vVO_2max = 90\%$ (Seven times), low intensity (1min); $vVO_2max = 30\%$ (5 times at first and second weeks and seven times at third and fourth weeks). Rats were anesthetized by interperitoneal infusion of Ketamine (90mg/kg) and Xylazine (10mg/kg) 24h after the last training session. The blood sample was collected directly from hearts of rats and plasma isolation was done by centrifuging at 15°C at 3000RPM for 15min. afterward, left ventricle was extracted immediately and frozen in nitrogen (-20°C) and stored in freezer (-80°C) to measure gene expression. QRT-PCR technique was utilized to analyze variance of Bax- and Bcl-2 genes expression. To conduct statistical data analysis, normality of data was primarily examined using Shapiro-Wilcox test. Given

Keywords

Apoptosis,
Type II Diabetes,
High Intensity Interval
Training (HIIT),
Bax,
Bcl-2

Received: 31/10/2020

Published: 26/02/2021

insignificance of this test ($p > 0.05$), One-Way ANOVA statistical test was employed for determining difference between studied groups. Then, Tukey ad hoc test was used ($\text{Sig} = 0.05$) in order to determine significance position. Microsoft Excel-2007 software was utilized for drawing diagrams. All statistical tests were conducted by means of SPSS statistical software (v.21).

Results: Variance of weight quantities was not significant after 4 weeks, but variance of glucose showed significance increase in all three groups (DC, HIIT1:1 and HIIT2:1 groups) compared to Normal Control (NC) group ($p < 0.005$). Similarly, glucose quantities were reduced significantly in both trained groups versus DC group after four weeks ($p < 0.001$). The results of one-way ANOVA indicated significant difference in Bax-gene expression between studied groups ($p < 0.05$). The results of intergroup analysis derived from Tukey's test showed that significant increase was observed in Bax-gene expression at DC group compared to HIIT2:1 ($p < 0.001$) and NC ($p < 0.001$) groups. Likewise, significant difference was seen in terms of gene expression of this variable between two trained models ($p = 0.038$) so that further reduction and significance was observed in HIIT2:1 group. Similarly, results of one-way ANOVA suggest existing significant difference in Bcl-2 gene expression between groups ($p < 0.001$). The results of intergroup analysis derived from Tukey's test indicated significant reduction in Bcl-2 gene expression at DC group versus HIIT2:1 ($p = 0.005$) and Normal Control ($p < 0.001$) groups. Similarly, no significant difference was seen between two trained model in terms of gene expression in his variable ($p = 0.079$).

Conclusion: The results of current study indicated that diabetic induction might increase glucose quantities, Bax-gene expression and reduce Bcl-2 gene expression in cardiomyocytes at all groups (HIIT1:1, HIIT2:1 and DC groups) versus Normal Control (NC) group. Likewise, both training interventions (HIIT1:1 and HIIT2:1) reduced significantly glucose quantities in cardiomyocytes compared to DC group. In addition, HIIT2:1 training intervention significantly inhibited apoptosis-inducing of Bax gene expression and induced significantly anti-apoptosis of Bcl-2 gene expression in cardiomyocytes of rats with diabetes compared to DC group while this variance was not significant in cardiomyocytes of HIIT1:1 group versus DC group. Similarly, we showed that Bax-gene expressions were significantly reduced in cardiomyocytes of HIIT2:1 group compared to HIIT1:1 group. The findings of current study may indicate importance of different effect of various frequencies of exercise on apoptotic mechanisms of cardiomyocytes at rats with type-II diabetes. These findings showed that various HIIT frequencies might be followed with different impacts and even noticeable differences in glucose absorption in cardiomyocytes at left ventricle and response of apoptotic variable in cardiac muscle so that more tangible and beneficial mechanism variance was observed in cardiac muscle at rats in HIIT2:1 group toward inhibition of cardiac disorders. In other words, we identified that further high intensity and shorter time frequency at lower intensity in HIIT2:1 versus HIIT1:1 group might doubly affect variance of glucose quantities absorbed by cardiac muscular cells and apoptosis mechanism in cardiomyocytes while both trained groups had passed through the same distance. The more efficiently increase in glucose quantities and subsequently more optimal reduction in apoptosis process by Bax/Bcl-2 axis signifies better and more beneficial effect in this training model. Therefore, these findings not only suggest further studies for analysis of most efficient and profitable HIIT model in patients with type-II diabetes, but also this exercise training model with shorter time and higher intensity than other models could be proposed as a potential therapeutic strategy in the clinical centers relating to type-II diabetes for cardiomyopathy prophylaxis and improvement caused by diabetes.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Kia H, Peeri M, Delfan M. Comparison of two types of high intensity interval training on glucose levels and genes expression of Bax and Bcl-2 in cardiomyocytes of diabetic rat. *Razi J Med Sci.* 2021;27(12):52-62.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

امروزه دیابت نوع ۲ به یک بیماری همه‌گیر تبدیل شده است، که در چند دهه اخیر با ظهور چاقی بیش از پیش تحت تاثیر قرار گرفته و به یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان تبدیل شده است (۱). نارسایی قلبی از مهمترین عوارض دیابت است (۱) که از سال ۱۸۷۶ در بیماران مبتلا به دیابت تشخیص داده شد (۲). اخیراً این موضوع به عنوان یکی از مهمترین مسائلی تبدیل شده است که در کانون توجه محققین در کارآزمایی‌های پیش بالینی و بالینی قرار گرفته است (۳، ۴). چرا که اختلال قلبی ناشی از دیابت مستقل از سایر عوامل پاتولوژیک به عنوان عامل اصلی مرگ و میر در بیماران مبتلا به دیابت به شمار می‌رود (۱).

سازوکارهای مهمی در عوارض قلبی ناشی از دیابت وجود دارد که در بین آنها آپوتوز به عنوان یک محور پایه و کلیدی، نقش بزرگی در توسعه بیماری قلبی و کاردیومیوپاتی ناشی از دیابت ایفا می‌کند (۵). در واقع هایپرگلاسمی و افزایش گلوکز ناشی از دیابت باعث افزایش آپوتوز در کاردیومیوسیت‌های بطن چپ قلب می‌شود (۶). از طرفی، دیابت میزان آپوتوز را در سلول‌های قلبی به مقدار قابل توجهی افزایش می‌دهد (۷). در این فرآیند، ژن Bax از ژن‌های کلیدی در کنترل آغاز فرآیند آپوتوز می‌باشد که با فعال‌سازی کاسپاز ۹ در روند آپوتوز دخالت دارد. از سوی دیگر، ژن Bcl-2 نیز با جلوگیری از رهاسازی سیتوکروم C از میتوکندری، آپوتوز را مهار می‌کند (۸). به نحوی که، Bax با خنثی کردن عمل Bcl-2 آپوتوز را فعال می‌کند (۹).

اما اینکه چگونه مسیر کلیدی مذکور در قلب بیماران دیابتی را می‌توان مهار و یا کند کرد، از جمله مسائلی است که محققان در حوزه دیابت و ورزش به دنبال یافتن پاسخی برای آن هستند. بر این اساس، محققان همواره در تحقیقات خود به نقش تمرینات ورزشی در پیشگیری و درمان چاقی و دیابت نوع ۲ اذعان داشته (۱۰، ۱۱) و تأکید می‌کنند که تمرین ورزشی نه تنها یکی از استراتژی‌های مؤثر برای مهار گسترش بیماری‌هایی از جمله دیابت می‌باشد (۳) بلکه به عنوان یک روش کمک درمانی مفید در مهار توسعه عوارض ناشی از بیماری شامل صدمات قلبی و کاهش بروز مرگ

و میر قلبی ناشی از آن می‌باشد (۱۰-۱۲). به نحوی که، تمرینات ورزشی از جمله تمرین HIIT از طریق کاهش مقادیر گلوکز و آپوتوز در سلول‌های قلبی نقش حفاظتی از قلب را در برابر عوارض دیابت ایفا می‌کنند (۱۲). در ارتباط با تاثیر تمرین‌های بدنی با دزهای مختلف نشان داده شده است که HIIT بر مکانیزم‌های آپوتوزی و ضدآپوتوزی سلول‌های قلبی از جمله Hsp70 و Bcl-2 و کاهش APAF-1 و Bax (۱۳)، کاهش فرآیند آپوتوز (۱۴)، بهبود ساختار قلب (دیواره بطن چپ) و عملکرد سیستمیک (حجم ضربه‌ای)، افزایش سرعت اولیه پرشدن دیاستولی، کاهش چربی کبدی و کاهش HbA1c در بیماران مبتلا به دیابت تاثیرات چشمگیری دارد (۱۵). بر این اساس، تمرین تناوبی شدید ممکن است عوارض قلبی ناشی از دیابت نوع ۲ را مهار کند و این نوع تمرین می‌تواند به عنوان یک استراتژی بی‌خطر غیر دارویی و کارآمد در کلینیک‌ها و بیمارستان‌ها به کار گرفته شود (۱۶).

با توجه به شواهد علمی مذکور، اهمیت تمرین HIIT بر عوامل مکانیزمی درگیر در کاردیومیوپاتی، عوامل متابولیکی، شاخص توده بدنی (BMI)، چربی بدن و VO_{2peak} بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ واضح و مبرهن است (۱۷، ۱۸). از سوی دیگر، روش‌های تمرینی HIIT متنوعی وجود دارند که بر کنترل دیابت، مقادیر گلوکز و مهار آپوتوز تاثیر گذار هستند و به نظر می‌رسد که تمرین تناوبی شدید نیز تا حدود زیادی موجب تغییرات مثبت در متغیرهای فیزیولوژیکی شده که نقش زیادی در سلامتی دارند. اما در عین حال دز مناسب این گونه تمرینات هنوز هم مشخص نیست و این که کدام مدل تمرینی بیشتر و بهتر محور کلیدی آپوتوز را در کاردیومیوسیت‌ها تحت تاثیر قرار می‌دهد از مسائل ضروری و مهم دیگری به شمار می‌رود که پژوهشگران این پژوهش با طرح این سوال که آیا دو مدل تمرینی HIIT با دزهای متفاوت، تاثیرات متفاوتی بر متغیرهای گلوکز، BAX و Bcl-2 در کاردیومیوسیت‌های رت‌های مبتلا به دیابت دارد، به دنبال پاسخگویی به آن بودند. لذا، هدف از پژوهش حاضر مقایسه دو روش HIIT بر مقادیر گلوکز و بیان ژن‌های آپوتوزی و ضدآپوتوزی Bax و Bcl-2 در کاردیومیوسیت رت‌های مبتلا به دیابت است.

روش کار

طرح پژوهش حاضر از نوع تجربی بود. بدین منظور، تعداد ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار، با سن هشت هفته و میانگین وزن 18 ± 321 گرم از موسسه رازی تهران خریداری و به محیط آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. کلیه رت‌ها در شرایط کنترل شده محیطی از جمله دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتیگراد، رطوبت بین ۵۰-۴۵ درصد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت (۸ صبح تا ۸ شب) نگهداری شدند. همه حیوانات به آب و غذای ویژه جوندگان به صورت آزادانه دسترسی داشتند. سپس همه آنها پس از ورود به آزمایشگاه، به مدت یک هفته در اتاق ویژه استراحت حیوانات نگهداری شدند تا به محیط جدید عادت کنند. ضمن دوره سازگاری محیطی، آشناسازی حیوانات با تردمیل حیوانات جهت انجام تمرین تناوبی شدید مدل ۱ و تناوبی شدید مدل ۲ نیز انجام شد. در نهایت پس از القاء دیابت توسط ماده استرپتوزوتوسین (STZ) و نیکوتین آمید به رت‌ها، همه آنها به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی شامل: گروه کنترل سالم (NC)، گروه کنترل دیابتی (DC)، گروه HIIT1:1 و گروه HIIT2:1 تقسیم شدند. همچنین، کلیه اصول اخلاقی مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مطالعات انسانی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران با دریافت کد اخلاق (IR.SSRI.REC.1398.548) از پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی در طول دوره تحقیق توسط محققین رعایت شد.

روش القای دیابت: القای دیابت در همه رت‌ها به جز گروه کنترل سالم پس از یک هفته سازگاری با محیط و آشناسازی با تردمیل اعمال شد. این القا به صورت درون صفاقی ۱۲۰ میلی گرم/کیلوگرم (mg/kg) نیکوتین آمید (Nicotine amide) به صورت حل شده در محلول سالین، و ۱۵ دقیقه بعد تزریق ۶۰ میلی گرم/کیلوگرم (mg/kg) STZ به صورت حل شده در محلول بافر ۰/۰۵ مول سیترات (PH=4.5) انجام شد. سپس ۷۲ ساعت پس از تزریقات، با اندازه گیری میزان قند خون ناشتا از ورید دم موش‌ها گسترش هایپرگلیسمی در آنها تایید شد. موش‌های صحرایی با سطح قند خون ناشتا بیش از ۱۶/۶ میلی مول/لیتر (mmol/l) به عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته

شدند (۱۹). اندازه گیری گلوکز با استفاده از گلوکومتر صفر یک ساخت ژاپن انجام شد.

پروتکل های ورزشی: هر گروه پروتکل مربوط به خود را پنج روز در هفته به مدت چهار هفته انجام دادند. روز ششم هر دو هفته یکبار، سرعت رسیدن به حداکثر اکسیژن مصرفی اندازه گیری شد (vVO_2max). از اینرو، با توجه به عدم دسترسی به ابزار مستقیم مانند دستگاه تجزیه و تحلیل گازهای تنفسی از پروتکل غیرمستقیم، ولی با دقت زیاد به شرح زیر استفاده شد:

بعد از سه دقیقه گرم کردن با سرعت پنج متر بر دقیقه، سرعت نوارگردان هر دو دقیقه یک بار به میزان چهار متر بر دقیقه افزایش یافت. حداکثر سرعت بیشینه زمانی بود که رت‌ها حداقل ۱/۳ دقیقه نتوانستند با یک سرعت ثابت بدون و بلافاصله پس از آن با افزایش سرعت قادر به دویدن نبوندند (شیب تردمیل صفر درجه بود). بر اساس شواهد علمی رسیدن به سرعت بیشینه با غلظت لاکتات بالاتر از شش میلی مول در لیتر و نسبت تنفسی VCO_2/VO_2 معادل ۱/۵ است. پژوهش‌ها نشان می‌دهند، ارتباط بالایی بین سرعت نوارگردان و vVO_2max رت‌ها وجود دارد ($p < 0.05$ ، $r = 0.98$). از این رو می‌توان با توجه به سرعت بیشینه دویدن، میزان vVO_2max رت‌ها را بدست آورد. در نهایت، شدت پروتکل‌ها با توجه به سرعت بدست آمده، تنظیم شدند (۲۰، ۲۱). چگونگی دزهای مداخله‌های ورزشی HIIT1:1 و HIIT2:1 در جدول شماره ۱ شرح داده شده است. لازم به ذکر است که مسافت دویدن رت‌ها در هر دو گروه مداخله تمرینی برابر بود.

سنجش متغیر های پژوهش: ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها به وسیله تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بیهوش شدند. نمونه خونی به طور مستقیم از قلب موش‌ها جمع‌آوری و جداسازی پلاسما با سانتریفیوژ کردن در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. سپس بافت بطن چپ بلافاصله استخراج و در نیتروژن -۲۰ منجمد و برای سنجش بیان ژن در فریزر -۸۰ نگه داری شد. به منظور بررسی تغییرات بیان ژن Bax و Bcl-2 از تکنیک qRT-PCR استفاده شد. بدین منظور ابتدا RNA بافت بطن چپ به وسیله تریزول استخراج شد.

جدول ۱- مداخله‌های ورزشی HIIT1:1 و HIIT2:1

گرم کردن، او سرد کردن	تناوب با شدت بالا (هر تناوب دو دقیقه)	تناوب با شدت پایین (دو دقیقه)
مداخله HIIT1:1	هفته اول: ۸۰ درصد vVO_2max (چهار تکرار) هفته دوم: ۸۵ درصد vVO_2max (چهار تکرار) هفته سوم و چهارم: ۹۰ درصد vVO_2max (پنج تکرار)	۴۰ درصد vVO_2max (چهار تکرار) هفته اول و دوم و پنج تکرار هفته سوم و چهارم)
گرم کردن او سرد کردن مداخله HIIT2:1	تناوب با شدت بالا (هر تناوب دو دقیقه) هفته اول: ۸۰ درصد vVO_2max (پنج تکرار) هفته دوم: ۸۵ درصد vVO_2max (پنج تکرار) هفته سوم و چهارم: ۹۰ درصد vVO_2max (هفت تکرار)	تناوب با شدت پایین (یک دقیقه) ۳۰ درصد vVO_2max (۵ تکرار هفته اول و دوم و هفت تکرار هفته سوم و چهارم)

توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ انجام گرفت.

یافته‌ها

در جدول شماره ۲ آمار توصیفی مربوط به وزن و مقادیر گلوکز رت‌ها در همه گروه‌های پژوهش ارائه شده است. تغییرات مقدار وزن بعد از گذشت ۴ هفته معنادار نشد، اما تغییرات مقادیر گلوکز در هر سه گروه DC، HIIT1:1 و HIIT2:1 نسبت به گروه کنترل سالم افزایش معناداری نشان داد ($p < 0/005$). همچنین کاهش مقادیر گلوکز در هر دو گروه تمرینی نسبت به گروه DC بعد از چهار هفته معنادار بود ($p < 0/001$). نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه اختلاف معنی‌داری در بیان ژن Bax بین گروه‌های پژوهش نشان داد ($p < 0/05$).

همانطور که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده، نتایج بررسی بین گروهی حاصل از آزمون توکی نشان داد که افزایش معناداری در بیان ژن Bax گروه DC نسبت به گروه‌های HIIT2:1 ($p < 0/001$) و NC ($p < 0/001$) مشاهده شد. همچنین بین دو مدل تمرینی تفاوت معناداری در بیان ژن این متغیر مشاهده شد ($p = 0/038$)، به طوری که در گروه HIIT2:1 کاهش بیشتر و معناداری مشاهده شد.

همچنین نتایج تحلیل واریانس یک‌سویه حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار در بیان ژن Bcl-2 بین گروه‌ها بود ($p < 0/001$). نتایج بررسی بین گروهی حاصل از آزمون توکی در نمودار شماره ۲ کاهش معنادار بیان ژن Bcl-2 در گروه DC نسبت به گروه‌های HIIT2:1 ($p = 0/005$) و گروه کنترل سالم ($p < 0/001$) را نشان داد. همچنین بین دو مدل تمرینی تفاوت معناداری در بیان ژن این متغیر مشاهده نشد ($p = 0/079$).

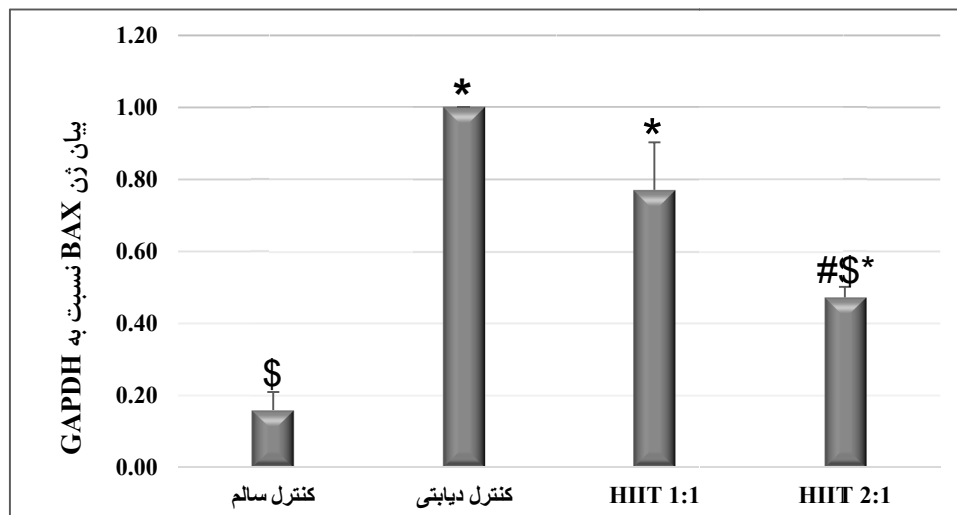
سپس OD نمونه با دستگاه نانودراپ خوانده شد. نسبت جذبی ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانوگرمی برای تمام نمونه‌های استخراج شده ۱/۸ تا ۲ بود. جهت بررسی کیفیت RNA استخراج شده از روش الکتروفورز و ژل آگارز یک درصد استفاده شد. قبل از سنجش cDNA برای اطمینان از نبود DNA در نمونه استخراج شده از DNAs treatment (thermos scientific)، ساخت transe criptor (آلمان) انجام شد. سنتز cDNA با کیت first strand cDNAsynthesis kit (roch)، ساخت (آلمان) طبق دستورالعمل کیت‌ها انجام شد. برنامه Real PCR time به وسیله دستگاه Rotrogene 6000، این برنامه بر اساس SYBER Green (ampligon، ساخت دانمارک) با دور ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و بلافاصله ۴۰ چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه با پرایمر طراحی شده (ساخت شرکت پیشگام ایران) انجام شد. در نهایت برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن مورد نظر از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. سنجش گلوکز پلاسما به روش گلوکز اکسیداز (شرکت پارس آزمون) با ضریب تغییر ۰/۰۵ و حساسیت یک ml/dl بررسی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: ابتدا طبیعی بودن داده‌ها توسط آزمون شاپیروویلک مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به معنادار نبودن این آزمون ($p > 0/05$)، برای بررسی تفاوت بین گروه‌های پژوهش از آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌سویه (One Way Anova) استفاده شد. سپس جهت تعیین جایگاه معناداری از آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده گردید. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار microsoft Excel 2007 استفاده شد. کلیه آزمون‌های آماری

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار مقادیر وزن و مقادیر گلوکز در گروه های پژوهش

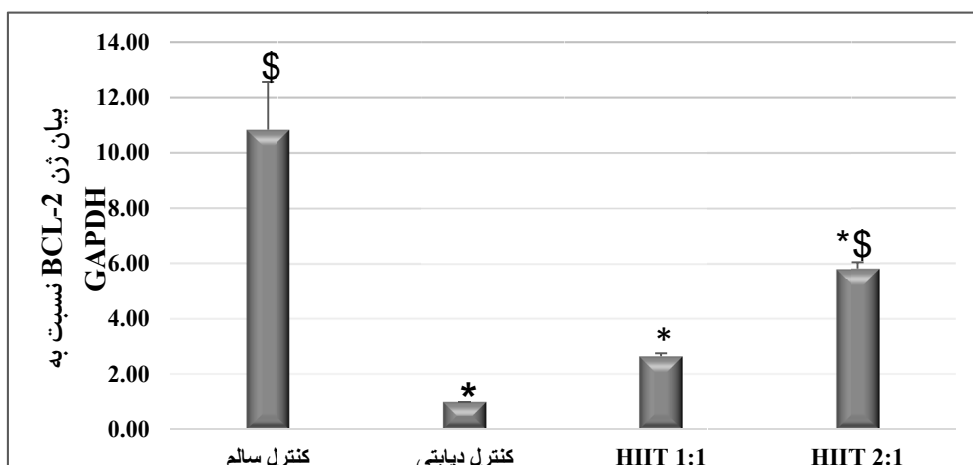
متغیر	DC	NC	HIIT1:1	HIIT2:1
وزن (گرم)	318/22 ± 23/69*	364/11 ± 80/21*	319/26 ± 00/83*	338/18 ± 66/35*
گلوکز (mmol/l)	31/51 ± 2/47*	10/30 ± 0/70¥	27/31 ± 1/85¥*	25/88 ± 2/62*¥

اعداد به شکل میانگین ± خطای معیار بیان شده اند، * نشانه ی معناداری نسبت به گروه کنترل سالم، ¥ نشانه معناداری نسبت به گروه کنترل دیابتی



نمودار ۱- تغییرات بیان ژن Bax در گروه های پژوهش

* معناداری نسبت به گروه کنترل سالم، \$ معناداری نسبت به گروه کنترل دیابتی، # معناداری نسبت به گروه HIIT 1:1



نمودار ۲- تغییرات بیان ژن bcl-2 در گروه های پژوهش (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل)

* معناداری نسبت به گروه کنترل سالم، \$ معناداری نسبت به گروه کنترل دیابتی

HIIT2:1 باعث کاهش معنادار مقادیر گلوکز کاردیومیوسیتی نسبت به گروه DC شدند. علاوه بر این، مداخله ورزشی HIIT2:1 باعث مهار معنادار بیان ژن القاء گر آپوپتوزی Bax و القاء معنادار بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 در کاردیومیوسیت رت های مبتلا به دیابت نسبت به گروه DC شد. در حالیکه در

بحث

در پژوهش حاضر نشان داده شد که القاء دیابت باعث افزایش مقادیر گلوکز، بیان ژن Bax و کاهش بیان ژن Bcl-2 در کاردیومیوسیت همه گروه ها (گروه HIIT1:1، گروه HIIT2:1 و گروه DC) نسبت به گروه کنترل سالم می شود. همچنین هر دو مداخله ورزشی HIIT1:1 و

در افراد دیابتی جلوگیری کند. به طور کلی، هنگامی که گلوکز خون و عضله قلبی افزایش می یابد این عامل به طور خودکار اکسید شده و رادیکالهای آزاد ایجاد می کند، این روند آپوپتوز را در سلولهای عضله قلبی القاء می کند (۲۵). در فرآیند القاء آپوپتوز، افزایش مقادیر Bax باعث افزایش میزان آپوپتوز و اختلال و مرگ سلولهای عضله قلبی و کاهش مقادیر آن باعث بقای سلول و ترمیم این سلولها می شود. همچنین افزایش مقادیر Bcl-2 در جهت بقا و ترمیم سلول بوده و آپوپتوز را مهار می کند (۲۶). القای آپوپتوز به عنوان یکی از آسیبهای دیابت بر میوکارد به واسطه فعال سازی اجزای مسیرهای متعدد آپوپتوز از جمله فعال سازی Bax و مهار Bcl-2 شناخته شده است و مرگ سلولهای میوکاردی به عنوان یک اتفاق مهم در پیشرفت صدمات قلبی ناشی از دیابت به شمار می رود (۸). از اینرو، ورزش HIIT2:1 به عنوان یک ورزش تناوبی با شدت بالا و دز موثر با مهار فرآیند مذکور، احتمالاً صدمات قلبی ناشی از دیابت را به حداقل می رساند و توسعه و پیشرفت آن را کند می نماید (۲۷). با این حال، فقدان اطلاعات در مورد تاثیر دزهای مختلف تمرینات HIIT بر عضله قلب بیماران دیابتی و مکانیزمهای مرتبط با آن (۲۸)، تفسیر تاثیر سودمندترین دز این مدل تمرینی بر عضله قلبی و مکانیزمهای درگیر در کاردیومیوپاتی بیماران دیابتی را تا حدودی دشوار کرده است. با این وجود، ما نشان دادیم تاثیر تمرین HIIT2:1 باعث کاهش موثرتر مقادیر گلوکز، Bax و همچنین افزایش چشمگیرتر Bcl-2 کاردیومیوسیتها نسبت به گروه کنترل دیابتی شد. همچنین کاهش بیان ژن Bax در این گروه در مقایسه با گروه HIIT1:1 معنادار بود. از طرفی، این تاثیرات بر متغیرهای مذکور در کاردیومیوسیتهای گروه HIIT1:1 بجز کاهش معنادار گلوکز در بقیه موارد نسبت به گروه کنترل دیابتی تغییراتی مشاهده نشد. این نتایج نشان داد که دزهای متفاوت HIIT می تواند تاثیرات متفاوت و حتی اختلافات چشمگیری بر جذب گلوکز کاردیومیوسیتهای بطن چپ و پاسخ متغیرهای آپوپتوزی در عضله قلبی داشته باشد. به نحوی که، تغییرات بسیار محسوس تر و سودمندتر مکانیزمی در عضله قلب رت های گروه HIIT2:1 در جهت مهار

کاردیومیوسیتهای گروه HIIT1:1 این تغییرات نسبت به گروه DC معنادار و چشمگیر نبود. همچنین ما نشان دادیم که در کاردیومیوسیتهای گروه HIIT2:1 در مقایسه با گروه HIIT1:1 بیان ژنهای Bax کاهش چشمگیرتر و معنادارتری داشت. نتایج مطالعه حاضر اهمیت تاثیرات متفاوت دزهای مختلف ورزشی بر سازوکارهای آپوپتوزی کاردیومیوسیتهای رت های مبتلا به دیابت را نشان می دهد. این نتایج با نتایج مطالعه گذشته همسو می باشد (۲۲)، علی رغم اینکه در مطالعه حبیبی و همکارانش پروتکل ورزشی استفاده شده پروتکل ورزشی شنا بود. از سوی دیگر نتایج مطالعه حاضر تاکید بر نتایج مطالعات گذشته در رابطه با تاثیر دیابت در بروز اختلالات قلبی ناشی از تغییرات مکانیزمی در این عضو حیاتی بدن است (۲۳). علاوه بر این، نشان داده شده است که دو هفته ورزش تناوبی شدید دوچرخه سواری به مقدار ۶ جلسه در هفته باعث کاهش معنادار جذب گلوکز در کاردیومیوسیتهای بطن چپ مبتلایان به دیابت و پیش دیابت نسبت به همتایان خود در گروه ۴۰ تا ۶۰ دقیقه تمرینات مداوم دوچرخه سواری با شدت متوسط ۶۰ درصد VO_2max شد (۲۵). از طرفی، نشان داده شده است که ۸ هفته دویدن HIIT به طور معناداری بیان ژن کاردیومیوسیتی Bcl-2 را در موش های دیابتی در مقایسه با تمرین استقامتی به صورت موثرتر و معنادارتری افزایش می دهد، که متعاقب آن این تغییرات مکانیزمی به صورت HIIT در مقایسه با تمرین استقامتی در عضله قلب باعث کاهش کسر جهشی بطن چپ و کسر کوتاهی در قلب شد (۳). هر چند که مدل و دزهای تمرینی پژوهش های مذکور با مدل و دز مصرفی پژوهش حاضر متفاوت بودند، اما تأییدی بر نتایج تحقیق حاضر مبنی بر تاثیر موثرتر دزهای با شدت بالاتر در وهله های کوتاه تر است. بر این اساس، HIIT با دز موثر، نه تنها در مبحث مکانیزمی کاردیومیوپاتی ناشی از دیابت موثرتر از انواع دیگر تمرینات واقع می شود، بلکه می تواند با کاهش مقادیر گلوکز کاردیومیوسیتها و القاء بیان عوامل ضد آپوپتوزی از جمله Bcl-2 و مهار بیان نشانگرهای آپوپتوزی شامل Bax از ایجاد اختلال در قلب و متعاقب آن تغییرات ساختاری و توسعه کاردیومیوپاتی

چپ از نقاط ضعف و محدودیت‌های مطالعه حاضر بود. با این وجود، انجام مطالعات بیشتر در این حیطة و در رابطه با علت تفاوت در تغییرات مکانیزمی عضله قلبی مرتبط با دزهای مختلف در بیماران دیابتی چه در مطالعات پیش بالینی و چه در مطالعات بالینی ضروری و پراهمیت است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مهار موثرتر کاردیومیوپاتی در مبتلایان به دیابت بر اثر تمرین HIIT متشکل از تعداد تناوب‌های پرشدت بیشتر و مدت زمان کمتر تناوب‌های کم‌شدت اتفاق می‌افتد. به نحوی که مهار موثرتر افزایش مقادیر گلوکز و متعاقب آن کاهش بهینه‌تر فرآیند آپوپتوز از طریق محور Bax/Bcl-2 حاکی از تاثیر بهتر و سودمندتر این نوع دز تمرینی است. از اینرو این نتایج، نه تنها انجام مطالعات بیشتر جهت بررسی موثرترین و سودمندترین دز HIIT در جمعیت‌های مبتلا به دیابت را پیشنهاد می‌کند، بلکه با توجه به اینکه مدت زمان تمرین ورزشی مهمترین و شایع‌ترین مانع مشارکت بیماران دیابتی در فعالیت‌های بدنی است (۳۳)، این مدل فعالیت بدنی (مدت زمان کمتر و شدت بالاتر) نسبت به سایر تمرینات ورزشی می‌تواند به عنوان یک استراتژی بالقوه درمانی در کلینیک‌های بالینی مرتبط با دیابت نوع ۲ جهت بهبود کاردیومیوپاتی ناشی از دیابت توصیه و تجویز شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از رساله دکتری مصوب گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی می‌باشد، لذا از اساتید گروه تقدیر و تشکر می‌نمایم.

References

- Glovaci D, Fan W, Wong ND. Epidemiology of diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rep.* 2019;21(4):21.
- Hochgradige SR. Insuffizienz der Herzthätigkeit, eine häufige und beachtenswerthe Complication des Diabetes mellitus. *Berliner Klinische Wochenschrift.*

اختلالات قلبی مشاهده شد. به عبارت دیگر، ما مشخص کردیم که بیشتر بودن تعداد تناوب با شدت بالا و مدت زمان کمتر تناوب با شدت پایین در تمرین HIIT2:1 نسبت به تمرین HIIT1:1، تاثیرات مضاعفی در تغییرات مقادیر گلوکز جذبی توسط سلول‌های عضله قلبی و مکانیزم آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌ها ایجاد کرد در حالی که هر دو گروه تمرینی مسافت یکسانی را پیموده بودند. از اینرو دز تمرین HIIT بخصوص شدت و مدت زمان تناوب با شدت بالا نقش تعیین‌کننده‌ایی در تاثیرپذیری متغیرهایی از جمله گلوکز و عوامل آپوپتوزی در عضله قلبی دیابتی دارند. در این راستا، نشان داده شده است مدت زمان جلسه تمرینی و شدت تمرین نقش مهمی را ایفا می‌کنند. به نحوی که، نتایج یک مطالعه پیش‌بالینی حاکی از مهار موثرتر آپوپتوز و بهبود کارآمدتر ساختار قلبی در گروه HIIT نسبت به گروه تمرین هوازی در رت‌های مبتلا به دیابت (۳) و در مطالعات بالینی باعث بهبود ظرفیت ورزشی افراد مبتلا به بیماری قلبی عروقی شد (۲۹). اینکه چه عواملی باعث می‌شود دزهای مختلف HIIT تاثیرات مکانیزمی و ساختاری متفاوت در عضله قلبی مبتلایان به دیابت ایجاد کند هنوز هم مبهم است. اما همه این تغییرات می‌تواند در بخش اعظمی مرتبط با تغییرات ساختاری بطن چپ ناشی از بهبود موثرتر حجم ضربه‌ای، حجم پایان دیاستولی بطن چپ و کسر تزریقی در دزهای HIIT دارای وهله‌های بیشتر با شدت بالاتر گردد (۳۰، ۳۱). به نحوی که HIIT در دزهای با شدت بالاتر نسبت به دزهای یا شدت متوسط و پائین‌تر باعث افزایش بهتر و موثرتر عملکرد سیستولیک و دیاستولیک بطن چپ در بیماران دیابتی شد (۳۲) که به نوبه خود منعکس‌کننده قانون فرانک-استارلینگ است. این مطالعات تصدیق‌کننده نتایج مطالعه حاضر در مورد تاثیر کارآمدتر HIIT2:1 نسبت به HIIT1:1 در مهار افزایش گلوکز و آپوپتوز قلبی و متعاقباً بهبود کاردیومیوپاتی در رت‌های دیابتی می‌باشد. آنچه حائز اهمیت است، بررسی دزهای متفاوت HIIT بر متغیرهای مذکور تحقیق حاضر با توجه به فقدان مطالعات مکانیزم‌نگر در این حیطة بود که می‌تواند از نقاط قوت مطالعه حاضر به شمار رود. هر چند که عدم اندازه‌گیری ضخامت و تغییرات ساختاری دیواره بطن

- 1876;13:63-5
3. 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.* 2018;1-8.
 4. Mishra MK, Horikoshi Y, Pan X, Liu P, Bai X, Bosnjak ZJ, et al. MicroRNA expression profiles in a human induced pluripotent stem cell-derived model of diabetic cardiomyopathy. *FASEB J.* 2019;33(1_supplement):713.2-.2.
 5. Gollmer J, Zirlík A, Bugger H. Established and Emerging Mechanisms of Diabetic Cardiomyopathy. *J Lipid Atheroscler.* 2019;8(1):26-47.
 6. Shizukuda Y, Reyland ME, Buttrick PM. Protein kinase C- δ modulates apoptosis induced by hyperglycemia in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circul Physiol.* 2002;282(5):H1625-H34.
 7. Guleria RS, Choudhary R, Tanaka T, Baker KM, Pan J. Retinoic acid receptor-mediated signaling protects cardiomyocytes from hyperglycemia induced apoptosis: Role of the renin-angiotensin system. *J Cell Physiol.* 2011;226(5):1292-307.
 8. Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods.* 2002;265(1-2):97-110.
 9. Mooren F, Völker K. *Molecular and cellular exercise physiology: Human Kinetics Publishers;* 2005.
 10. GHafari S, Nazarali P, Razavi A, Delfan M. Effect of continuous aerobic training versus high intensity interval training on Resistin and insulin resistance in type 2 diabetic rats. *SSU J.* 2019;26(11):934-44.
 11. Group LAR, Lewis CE, Bantle JP, Bertoni AG, Blackburn G, Brancati FL, et al. History of Cardiovascular Disease, Intensive Lifestyle Intervention, and Cardiovascular Outcomes in the Look AHEAD Trial. *Obesity.* 2020.
 12. Delfan M, Delphan M, Kordi MR, Ravasi AA, Safa M, Gorgani-Firuzjaee S, et al. High intensity interval training improves diabetic cardiomyopathy via miR-1 dependent suppression of cardiomyocyte apoptosis in diabetic rats. *J Diabetes Metab Disord.* 2020:1-8.
 13. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J.* 2004;18(10):1150-2.
 14. Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2374-82.
 15. Cassidy S, Thoma C, Hallsworth K, Parikh J, Hollingsworth KG, Taylor R, et al. High intensity intermittent exercise improves cardiac structure and function and reduces liver fat in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia.* 2016;59(1):56-66.
 16. Suryanegara J, Cassidy S, Ninkovic V, Popovic D, Grbovic M, Okwose N, et al. High intensity interval training protects the heart during increased metabolic demand in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Acta Diabetol.* 2019;56(3):321-9.
 17. Liu JX, Zhu L, Li PJ, Li N, Xu YB. Effectiveness of high-intensity interval training on glycemic control and cardiorespiratory fitness in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Aging Clin Experim Res.* 2019;31(5):575-93.
 18. Kalaki-Jouybari F, Shanaki M, Delfan M, Gorgani-Firouzjaee S, Khakdan S. High-intensity interval training (HIIT) alleviated NAFLD feature via miR-122 induction in liver of high-fat high-fructose diet induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem.* 2018:1-8.
 19. Skovsø S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Invest.* 2014;5(4):349-58.
 20. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhães-de-Castro R. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res.* 2007;21(3):751.
 21. Delphan M, Agha Alinejad H, Delfan M, Dehghan S. Intratumoral Effects of Continuous Endurance Training and High Intensity Interval Training on Genes Expression of miR-21 and bcl-2 in Breast Cancer Bearing Female mice. *Iran Q J Breast Dis.* 2017;10(2):49-57.
 22. Habibi P, Alihemmati A, Ahmadiasl N, Fateh A, Anvari E. Exercise training attenuates diabetes-induced cardiac injury through increasing miR-133a and improving pro-apoptosis/anti-apoptosis balance in ovariectomized rats. *Iran J Ba Med Sci.* 2020;23(1):79-85.
 23. Li H, Fan J, Zhao Y, Zhang X, Dai B, Zhan J, et al. Nuclear miR-320 mediates diabetes-induced cardiac dysfunction by activating transcription of fatty acid metabolic genes to cause lipotoxicity in the heart. *Circul Res.* 2019;125(12):1106-20.
 24. Hu Q, Zhang H, Gutierrez Cortes N, Wu D, Wang P, Zhang J, et al. Increased Drp1 Acetylation by Lipid Overload Induces Cardiomyocyte Death and Heart Dysfunction. *Circul Res.* 2020.
 25. Heiskanen MA, Sjöros TJ, Heinonen IH, Löytyniemi E, Koivumäki M, Motiani KK, et al. Sprint interval training decreases left-ventricular glucose uptake compared to moderate-intensity continuous training in subjects with type 2 diabetes

or prediabetes. *Sci Rep.* 2017;7(1):10531.

26. Kumar S, Sitasawad SL. N-acetylcysteine prevents glucose/glucose oxidase-induced oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in H9c2 cells. *Life Sci.* 2009;84(11-12):328-36.

27. Babae BMA, 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. *Int Cardiovasc Res J.* 2016;10(1):1-5.

28. Levinger I, Shaw CS, Stepto NK, Cassar S, McAinch AJ, Cheetham C, et al. What doesn't kill you makes you fitter: a systematic review of high-intensity interval exercise for patients with cardiovascular and metabolic diseases. *Clin Med Insights: Cardiol.* 2015;9:CMC. S26230.

29. Kraal JJ, Vromen T, Spee R, Kemps HM, Peek N. The influence of training characteristics on the effect of exercise training in patients with coronary artery disease: systematic review and meta-regression analysis. *Int J Cardiol.* 2017;245:52-8.

30. Helgerud J, Høydal K, Wang E, Karlsen T, Berg P, Bjerkaas M, et al. Aerobic high-intensity intervals improve $\dot{V}O_{2\max}$ more than moderate training. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(4):665-71.

31. Molmen-Hansen HE, Stolen T, Tjønnå AE, Aamot IL, Ekeberg IS, Tyldum GA, et al. Aerobic interval training reduces blood pressure and improves myocardial function in hypertensive patients. *Eur J Prev Cardiol.* 2012;19(2):151-60.

32. Hollekim-Strand SM, Bjørgaas MR, Albrektsen G, Tjønnå AE, Wisløff U, Ingul CB. High-intensity interval exercise effectively improves cardiac function in patients with type 2 diabetes mellitus and diastolic dysfunction: a randomized controlled trial. *J Am College Cardiol.* 2014;64(16):1758-60.

33. Korkiakangas EE, Alahuhta MA, Laitinen JH. Barriers to regular exercise among adults at high risk or diagnosed with type 2 diabetes: a systematic review. *Health Prom Int.* 2009;24(4):416-27.