

تأثیر تمرینات تناوبی شدید و مصرف مکمل نیکوتین آمید مونونوکلوئید بر استرس اکسیداتیو حاصل از افزایش سن در بافت قلب موش صحرائی

سکینه طاهری^۱، سجاد ارشدی^۱، عبدالعلی بنایی فر^۲، وحید ایمانی پور^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هرچند نقش تمرینات ورزشی و مکمل دهی نیکوتین آمید مونونوکلوئید (NMN یا Nicotinamide mononucleotide) بر بهبود استرس اکسیداتیو تأیید شده، اما اثر تعاملی این دو متغیر در بافت قلب هنوز به طور کامل شناخته نشده است. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تمرینات تناوبی شدید (High intensity interval training یا HIIT) و مصرف مکمل NMN بر استرس اکسیداتیو در بافت قلب موش های صحرائی انجام شد.

مواد و روش ها: ۴۸ رت نژاد اسپراگو داوولی ۸ تا ۱۰ ماهه، به صورت تصادفی در شش گروه شاهد هفته اول (شاهد پیش از مطالعه)، شاهد هفته آخر (شاهد)، دارونما (دریافت نرمال سالین)، تمرین HIIT، مکمل NMN، ترکیبی (HIIT + NMN) تقسیم شدند. گروه های تمرین و ترکیبی سه جلسه در هفته به مدت ۸ هفته، HIIT را روی تردمیل انجام دادند. ۵۰۰ میلی گرم مکمل NMN نیز به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی برای گروه های NMN و ترکیبی تجویز گردید. ۲۴ ساعت پس از آخرین تمرین و تجویز NMN، حیوانات قربانی شدند و قلب آن ها جهت ارزیابی شاخص های استرس اکسیداتیو [مالون دی آلدئید (MDA یا Malondialdehyde)، پروتئین کربونیل (PC یا Protein carbonyl)، بیان ژن های سوپراکسید دیسموتاز (SOD یا Superoxide dismutase) و گلو تاتیون پراکسیداز (GPX یا Glutathione peroxidase)] خارج گردید. داده ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها: بیان ژن GPX در گروه های NMN، HIIT و ترکیبی در مقایسه با گروه های شاهد و شم به طور معنی داری افزایش یافت، اما این افزایش در گروه ترکیبی نسبت به بقیه گروه ها بیشتر بود ($P < 0/050$). همچنین، میزان MDA و PC در این گروه ها نسبت به گروه های شاهد و شم کاهش یافت که بیشترین کاهش در گروه ترکیبی مشاهده شد ($P < 0/001$).

نتیجه گیری: به نظر می رسد مصرف NMN و انجام HIIT می تواند استرس اکسیداتیو را در بافت قلب کاهش دهد، اما ترکیب NMN و HIIT تأثیرات بیشتری دارد. بنابراین، می توان با ترکیب HIIT و مکمل NMN، به کاهش بیشتر استرس اکسیداتیو و افزایش آنتی اکسیدان دست یافت.

کلید واژه ها: نیکوتین آمید مونونوکلوئید؛ تمرینات تناوبی شدید؛ استرس اکسیداتیو

ارجاع: طاهری سکینه، ارشدی سجاد، بنایی فر عبدالعلی، ایمانی پور وحید. تأثیر تمرینات تناوبی شدید و مصرف مکمل نیکوتین آمید مونونوکلوئید بر استرس اکسیداتیو حاصل از افزایش سن در بافت قلب موش صحرائی. پژوهش در علوم توانبخشی ۱۳۹۹؛ ۱۶: ۳۲۰-۳۱۰.

تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۱۰/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۷

نظر می رسد که افزایش گونه های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) یا ROS) و نیتروژن (Reactive nitrogen species یا RNS) به سطحی بیش از تحمل و ظرفیت طبیعی سلول، در تمام سلول هایی که به طور هوازی انرژی تأمین می کنند، موجب ترکیب این عوامل با ساختارهای پروتئینی و فسفولیپیدی و افزایش عواملی همچون مالون دی آلدئید (MDA یا Malondialdehyde) و پروتئین کربونیل (PC یا Protein carbonyl) می شود و در نتیجه، با آسیب به ارگانل های درون سلولی، اختلالاتی را در سلول به وجود می آورد (۳، ۲).

مقدمه

تجمع تغییرات متنوع زیان آور در سلول ها و بافت ها به دنبال افزایش سن (Aging) رخ می دهد که این ها مسؤول افزایش خطر بیماری ها و مرگ و میر هستند (۱). محققان یکی از مهم ترین تئوری های روند افزایش سن را افزایش رادیکال های آزاد بیان کرده اند. بر اساس این فرضیه، با افزایش سن، عملکرد سلول به دنبال افزایش استرس اکسیداتیو، موجب آسیب به ماکرومولکول های درون سلولی مانند چربی های غشایی، DNA و پروتئین ها می گردد. همچنین، به

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، تهران، ایران

نویسنده مسؤول: سجاد ارشدی؛ استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب، تهران، ایران

Email: s_arshadi@azad.ac.ir

با وجود بررسی‌های فراوان، مطالعه‌ای که به بررسی اثر تعاملی تمرینات تناوبی همراه با مصرف مکمل NMN بر کاهش استرس اکسیداتیو در بافت قلب پرداخته باشد، یافت نشد. با توجه به این که آثار نامطلوب افزایش سن بر سلامت قلب به طور چشمگیری در جهان در حال افزایش است، پیش‌بینی می‌گردد در دهه‌های آینده افراد سالمندی که به دلیل نداشتن فعالیت ورزشی به بیماری‌های ناتوان‌کننده مبتلا می‌شوند، بیشتر شود. بنابراین، انجام تحقیقی که به بررسی اثر تعاملی تمرینات تناوبی و مصرف مکمل NMN در کاهش استرس اکسیداتیو در بافت قلب بپردازد، ارزشمند خواهد بود.

بررسی نشانگرهای قلبی و بیان ژن‌ها به دلیل ملاحظات اخلاقی، مستلزم انجام استفاده از مدل‌های حیوانی می‌باشد. موش صحرایی یکی از انواع حیوانات آزمایشگاهی است که در بررسی روی سیستم قلب و عروق، به عنوان مدل خوبی از انسان کاربرد دارد. یافته‌های کلی نشان می‌دهد که موش‌ها در دوران کودکی خود به سرعت رشد می‌کنند و تقریباً در هفته ششم از نظر جنسی بالغ می‌شوند، اما ۵-۶ ماه بعد به بلوغ اجتماعی می‌رسند. هر روز از زندگی این حیوان در بزرگسالی، تقریباً معادل ۳۴/۸ روز انسانی است (یعنی یک ماه از زندگی موش با سه سال زندگی انسانی قابل مقایسه است) (۲۰). بنابراین، در پژوهش حاضر، تأثیر HIIT و مصرف مکمل NMN بر استرس اکسیداتیو در بافت قلب موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

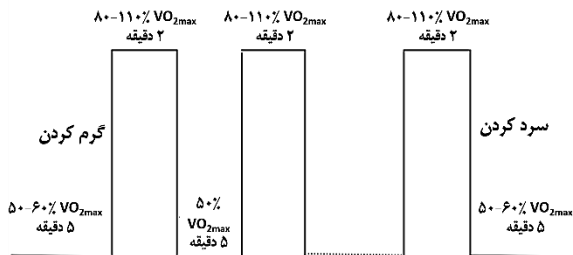
مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تجربی، ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگو-داولی ۸ تا ۱۰ ماهه با وزن 20 ± 220 گرم از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت انتخاب شدند و به طور تصادفی در شش گروه قرار گرفتند.

- ۱- شاهد پیش از مطالعه: حیوانات این گروه در ابتدای آزمایش قربانی شدند.
- ۲- شاهد: حیوانات این گروه جهت بررسی تأثیر افزایش سن بر متغیرهای وابسته در پایان آزمایش قربانی شدند.
- ۳- شم (دارونما): برای مشخص کردن اثر احتمالی فرایند تزریق، نمونه‌های این گروه پنج روز در هفته (هر روز به جز پنجشنبه و جمعه)، ۵۰۰ میلی‌گرم محلول نرمال سالین (Phosphate buffered Saline یا PBS) (محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم قابل تزریق) به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به عنوان یک ماده بی‌اثر به صورت داخل صفاقی، به مدت ۸ هفته دریافت کردند.
- ۴- تمرین (HIIT): برای مشخص کردن اثر خالص HIIT، حیوانات به مدت ۸ هفته، پنج روز در هفته (هر روز به جز پنجشنبه و جمعه) تحت تمرین قرار گرفتند.
- ۵- مکمل (NMN): برای مشخص کردن اثر خالص، حیوانات این گروه پنج روز در هفته به مدت ۸ هفته، ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مکمل NMN را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند (۲۱).
- ۶- ترکیبی: این حیوانات به مدت ۸ هفته، پنج روز در هفته، HIIT و تزریق درون صفاقی مکمل NMN را در برنامه داشتند. تمرین برای تمام حیوانات بین ساعت ۹ تا ۱۰ صبح انجام شد و پس از ۲ تا ۳ ساعت، تزریق صفاقی صورت گرفت. از آنجا که هدف تحقیق حاضر، بررسی استرس اکسیداتیو حاصل از گذر زمان بود، دو گروه شاهد در نظر گرفته شد و به منظور بررسی اثر افزایش سن، حیوانات گروه شاهد پیش‌آزمون در هفته اول و قبل از شروع پژوهش و موش‌های گروه شاهد در هفته آخر هم‌زمان با سایر گروه‌ها قربانی شدند.

به طور کلی، منابع درون‌زای گونه‌های فعال نیتروژن-اکسیژن فعال (Reactive oxygen nitrogen species یا RONS) شامل نیکوتین‌آمید مونونوکلوئید (Nicotinamide mononucleotide یا NMN) اکسیداز، میلوپراکسیداز (Myeloperoxidase یا MPO)، لیپواکسیژناز (Lipoxygenase) و آنژیوتنن II هستند. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) اکسیداز منبع اصلی تولید رادیکال آنیون‌پراکساید می‌باشد که با کاهش یک الکترون از مولکول اکسیژن به وسیله الکترون‌های تولید شده توسط NADPH طی تنفس سلولی ایجاد و در نهایت، به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود. در حالت طبیعی این الکترون‌های آزاد توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase یا SOD)، کاتالاز، گلوٹاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase یا GPX) خنثی می‌شوند (۴، ۲). با این وجود، با افزایش سن، این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کارایی خود را از دست می‌دهند و این سیستم قادر به جبران تمام رادیکال‌های آزاد تولید شده نیست. این روند در نهایت منجر به آسیب سلولی و راه‌اندازی موتاسیون DNA میتوکندریایی و هسته می‌گردد (۵). همچنین، بروز بیماری‌های قلبی در اثر افزایش سن به طور فزاینده‌ای افزایش می‌یابد؛ به طوری که نارسایی قلبی در افراد بالای ۸۵ سال، چهار برابر بیشتر از افراد ۶۵ تا ۷۵ سال است (۶). مطالعات متعددی به بررسی تأثیر تمرینات تناوبی شدید (High intensity interval training یا HIIT) بر روی استرس اکسیداتیو و وضعیت آنتی‌اکسیدان پرداخته‌اند (۱۰-۷). نتایج پژوهشی نشان داد که HIIT سبب کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدان خواهد شد. همچنین، در بیماران مبتلا به نارسایی قلبی، GPX به دنبال HIIT افزایش یافت (۱۱). تمرینات تناوبی با شدت متوسط (Moderate-intensity interval training یا MICT) در مقایسه با انجام تمرینات HIIT، باعث افزایش قابل توجه آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شود (۱۲) و اثرات مثبت قوی‌تری بر عملکرد سیستم قلبی-تنفسی (Cardiorespiratory function)، عوامل خطر بیماری‌های قلبی-عروقی (Cardiovascular diseases یا CVD) و نشانگرهای مرتبط با عملکرد عروقی می‌گذارد (۱۳). نتایج مطالعات اخیر نشان داده است که فعالیت بدنی طولانی مدت از طریق تأثیر بر روی کروموزوم‌ها، می‌تواند فرایند افزایش سن را آهسته‌تر کند (۱۵، ۱۴). علاوه بر فعالیت‌های بدنی، مصرف مکمل‌های غذایی مناسب نیز در بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی بدن نقش دارد (۷). به تازگی شواهد قوی و محکمی نشان داده است که بیوسنتز Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) درون سلولی با مکمل‌های غذایی، می‌تواند به افزایش طول عمر ارگان‌ها و سلامت کلی سلول کمک نماید (۱۶). شواهد حاکی از آن است که کاهش سطوح NAD، موجب کوتاه شدن طول عمر سلول می‌شود؛ چرا که کاهش سطوح این شاخص، مسیر بیان سیرتوئین یک (Sirtuin 1 یا SIRT1) را مهار می‌کند و با مهار سیگنالینگ پایین دست بیوزنز میتوکندریایی، موجب نقص تنفس سلولی، کاهش طول عمر ارگان‌های درون سلولی و کاهش طول تلومر می‌گردد (۱۷). درمان با NMN موجب بهبود عملکرد عروق محیطی و افزایش تنفس سلولی می‌گردد (۱۸). در واقع، NMN نوکلئوتیدی مشتق شده از ریبوز و نیکوتین‌آمید است و از ویتامین‌های گروه B در بدن ساخته می‌شود و به طور طبیعی در تمام اشکال حیات وجود دارد (۱۹). امروزه پژوهشگران به دنبال یافتن روشی جهت ترکیب تمرین ورزشی با مکمل‌ها و یا گیاهان دارویی هستند که بتوانند اثرات مطلوب‌تری را در پیشگیری از کاهش استرس اکسیداتیو به عمل آورند.

ریکاوری HIIT، برای بازسازی کراتین فسفات (Creatine phosphate) و اکسیداسیون اسید لاکتیک (حذف لاکتات) نقش مهمی دارد (۲۳). به عبارت دیگر، HIIT سوخت و ساز را به سمت هوازی سوق می‌دهد و منجر به افزایش ظرفیت آن می‌شود (۲۳).



شکل ۱. نمایی شماتیک از پروتکل تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) High intensity interval training

پس از انجام آخرین تکرار اینتروال با شدت بالا، موش‌های صحرایی به مدت ۵ دقیقه با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد سرعت پیشینه، سرد کردن را انجام دادند. تعداد تکرار اینتروال با شدت بالا با توجه به هفته تمرینی موش‌های صحرایی تعیین گردید؛ به صورتی که در هفته اول دو تکرار اینتروال با شدت بالا، هفته دوم چهار تکرار اینتروال با شدت بالا، هفته سوم شش تکرار اینتروال با شدت بالا و از ابتدای هفته چهارم به بعد شامل هشت تکرار اینتروال با شدت بالا اجرا شد. از این رو، زمان کل تمرین شامل تکرار اینتروال با شدت بالا و با شدت پایین به همراه گرم کردن و سرد کردن به طور میانگین در هفته اول ۱۶ دقیقه، در هفته دوم ۲۴ دقیقه، هفته سوم ۳۲ دقیقه و از ابتدای هفته چهارم به بعد ۴۰ دقیقه بود (۱۸). همچنین، جهت مصرف مکمل NMN، با توجه به وزن موش‌ها، ابتدا ۲ گرم مکمل در ۴/۸ سی‌سی PBS حل شد و سپس ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن مکمل (۰/۳ سی‌سی از محلول) به صورت صفاقی با سرنگ یک سی‌سی (نیدل شماره ۲) (۲۱) به نمونه‌ها تزریق گردید. از آنجا که تزریقات باید به صورت روزانه صورت می‌گرفت و بیهوشی روزانه باعث بروز عوارض جانبی و تداخل با نتایج مطالعه بود، در روزهای تزریق، دو تا سه ساعت پس از انجام تمرینات، موش‌ها به طور کامل به وسیله رستیرین مهار می‌شدند و محلول با استفاده از نیدل سایز ۲ به آرامی به صفاق تزریق گردید

جمع‌آوری نمونه: ۲۴ ساعت پس از آخرین تجویز، حیوانات با استفاده از مخلوطی از کتامین ۱۰ درصد (شرکت Bremer Pharma، آلمان) (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلیزین (شرکت Kela، بلژیک) (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش و با شکستن گردن، قربانی و سپس تشریح شدند. ابتدا سینه حیوان باز شد و قلب بلافاصله برداشته شد و وزن آن با استفاده از ترازوی دیجیتال Sartorius (مدل CPA224S، آلمان) ثبت گردید. قلب از وسط به دو قسمت تقسیم گردید؛ یک قسمت از آن برای تخمین شاخص‌های بیوشیمیایی بافت شامل MDA و PC در نظر گرفته شد و قسمت دیگر جهت انجام آزمایش بیان ژن بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در زمان انجام آزمایش از فریزر خارج گردید.

تخمین شاخص‌های بیوشیمیایی بافت قلب در PBS (Cat No: DB0011، شرکت DNAbiotech، تهران، ایران) ۵۰ میلی‌مولار سرد (pH = ۷/۴) هموزنه

موش‌های صحرایی در قفس‌های پلی‌پروپیلن در دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰ تا ۵۰ درصد با چرخه نوری/ تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند و به آن‌ها غذای استاندارد و آب آشامیدنی با دسترسی آزاد داده شد. مطالعه طبق راهنمای کمیته کشوری اخلاق در پژوهش‌های زیستی برای استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

مواد شیمیایی

NMN از شرکت Xi'an Prilus Biology Engineering Co. Ltd (چین)، EINECS No.:214-136-5، MF:C11H15N2O8P، درجه خلوص: ۹۹ درصد) خریداری شد. تمام مواد شیمیایی و معرف‌های دیگر مورد استفاده در تحقیق حاضر از شرکت Sigma-Aldrich (St. Louis، MO، آمریکا) و PBS (محلول ۰/۹ درصد کلرید سدیم قابل تزریق) از شرکت دارویی شهید قاضی (تبریز، ایران) خریداری گردید.

طراحی مطالعه

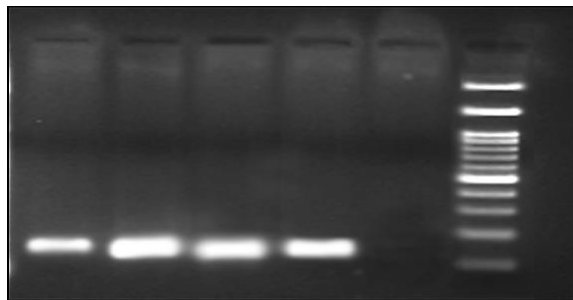
الف. محاسبه حداکثر سرعت: میانگین حداکثر سرعت حیوان جهت تعیین حداکثر اکسیژن مصرفی بر اساس آزمون فزاینده Bedford و همکاران (۲۲) محاسبه شد. برای محاسبه حداکثر اکسیژن مصرفی، از یک دستگاه تردمیل مخصوص موش‌های صحرایی (شرکت فنی مهندسی کیمیا کهربای مبین، تهران، ایران، کد محصول: ۳۲۵۸۸) استفاده گردید. ابتدا موش‌های صحرایی به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه گرم کردند و سپس به مدت سه دقیقه با سرعت ۱۲ متر بر دقیقه دوییدند. پس از آن، به ازای هر سه دقیقه، دو متر بر دقیقه به سرعت دوییدن حیوانات اضافه گردید تا زمانی که موش‌های صحرایی به واماندگی برسند (واماندگی به حالتی اطلاق می‌گردد که موش‌ها در فاصله کمتر از یک دقیقه سه بار متوالی به انتهای نوار گردان برخورد می‌کردند و دیگر قادر به ادامه تمرین نبودند). در تمام مراحل شیب تردمیل برابر با صفر بود. در هر مرحله از آزمون که حیوان دیگر قادر به ادامه کار نبود، سرعت در آن مرحله، معادل سرعت حیوان در حداکثر اکسیژن مصرفی در نظر گرفته شد (۲۲).

ب. برنامه تمرینی: پروتکل HIIT شامل سه قسمت گرم کردن (۵ دقیقه)، تمرین شامل تکرارهای اینتروال ۲ دقیقه‌ای (۲ × ۲) (به همراه یک دوره بازیابی فعال (Active recovery) ۲ دقیقه‌ای بین هر اینتروال) و سرد کردن (۵ دقیقه) بود. موش‌های صحرایی ابتدا با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد پیشینه به مدت ۵ دقیقه بر روی نوارگردان گرم کردند. تمرین تناوبی شامل ترکیب تکرارهای اینتروال با شدت بالا و شدت پایین بود. تکرار اینتروال با شدت بالا شامل ۲ دقیقه با شدت ۸۰ درصد پیشینه در هفته اول، ۹۰ درصد پیشینه در هفته دوم، ۱۰۰ درصد پیشینه در هفته سوم و ۱۱۰ درصد سرعت پیشینه از ابتدای هفته چهارم تا پایان تمرین و تکرار اینتروال با شدت پایین (اینتروال بازیابی) شامل ۲ دقیقه با شدت ۵۰ درصد پیشینه بود (شکل ۱).

این برنامه بر اساس پروتکل تمرینی مورد استفاده در مطالعات پیشین (۲۲)، بر روی موش‌های صحرایی دارای اختلالات متابولیک طراحی شد و تمرینات بر اساس توان هوازی و توانایی موش‌های صحرایی در انجام تمرین که به صورت هفتگی مورد بررسی قرار گرفت، برنامه‌ریزی گردید. شواهد نشان می‌دهد که اگر زمان ریکاوری بین وهله‌های شدید کاهش یابد، سهم گلیکولیز نیز برای تأمین انرژی کاهش پیدا می‌کند و در نتیجه، سوخت و ساز هوازی برای جبران این کسر انرژی افزایش پیدا می‌کند. سوخت و ساز هوازی در طول دوره‌های

(۱۰ درصد وزنی/ حجمی) و سپس با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتی‌فیوژ شد و از مایع رویی برای سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی استفاده گردید. غلظت پروتئین با استفاده از دستورالعمل Bedford و همکاران به دست آمد (۲۲).

اندازه‌گیری لیپید پراکسیداسیون بافت قلب: جهت بررسی لیپید پراکسیداسیون، میزان MDA مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بدین ترتیب، به یک میلی‌لیتر هموزنه ۱۰ درصد وزنی/ حجمی بافت قلب (در PBS)، ۰/۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۱۰ درصد (CAS No: 76-03-9، Catalog No: T6399، فرمول مولکولی: C₂HCl₃O₂ Sigma-Aldrich شرکت (MO, St. Louis, آمریکا) اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتی‌فیوژ شد. به مایع رویی، ۱ میلی‌لیتر تیوباربیئوریک اسید ۰/۶۷ درصد (Catalog No: 7-52-67)، فرمول مولکولی: C₁₀H₈N₄O₂، شرکت Merck (آلمان) اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری در حال جوش قرار داده شد. سپس جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV-3600 Plus، شرکت Shimadzu، ژاپن) قرائت شد. جهت رسم منحنی استاندارد MDA، غلظت‌های مختلفی از ۱۰۳۰۳-۱ تا ۱۰۵۷۹۷ (کد: ۸۰۵۷۹۷، فرمول خطی: C₁₁H₂₄O₄، شرکت Merck، آلمان) بر حسب نانومولار ساخته شد (۲۴). غلظت MDA به صورت نانومول بر میلی‌گرم پروتئین بیان می‌شود.



شکل ۲. بررسی محصول واکنش Polymerase chain reaction (PCR) مربوط به تکثیر ژن‌های مربوط با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد

تجزیه و تحلیل کمی داده‌ها با استفاده از رابطه ۱ انجام شد. رابطه ۱: تحلیل بیان ژن‌ها

$$R = E \Delta Ct / \Delta Ct \text{ هدف ژن} / E \Delta Ct \text{ ژن کنترل داخلی}$$

در این رابطه، ابتدا منحنی استاندارد، کارایی (Efficiency) و اختلاف ΔCt ژن‌های مرجع به ژن‌های هدف محاسبه گردید و سپس افزایش یا کاهش بیان ژن در گروه‌های درمانی با مقایسه با گروه شاهد محاسبه شد (۲۸). پرایمرهای استفاده شده در پژوهش حاضر در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

پرایمر	مجموعه پرایمر	اندازه تولید شده
SOD	F: GAATTGCCGATGTACGTCG R: GTAGAAAAGTGGGGAGGAT	bp
GPX	GTGTACCAGTCCGGGTAT F: R: CCAAAAATGCGTTAAACCG	bp

SOD: Superoxide dismutase; GPX: Glutathione peroxidase

تعیین میزان PC: محتوای PC با جداسازی ترکیبات اضافی کربونیل با استفاده از 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) (شرکت Merck، آلمان) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، مقداری از هموزنه بافتی (۰/۵ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر) به حجم مساوی (۰/۵ میلی‌لیتر) از DNPH ۰/۱ درصد اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. این واکنش با افزودن یک میلی‌لیتر Tricyclic antidepressants (TCA) ۲۰ درصد خاتمه یافت و پروتئین نمونه رسوب کرد. پروتئین با سانتی‌فیوژ ۱۰ هزار دور در دقیقه متراکم و مایع رویی دور ریخته شد. DNPH ترکیب نشده اضافی سه بار با استفاده از محلول استات اتیل/ اتانول (۱:۱) (فرمول مولکولی: C₄H₈O₂، Cas Number: 141-78-6، شرکت Merck، آلمان) استخراج گردید. سپس پروتئین سلولی بازیافت شده در زیر جریان نیتروژن خشک و در ۱ میلی‌لیتر محلول بافر تریس گوانیدین-HCl (۸ مولار، pH = ۷/۲) حل شد. محلول هیدرازون‌های حاصل در ۳۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. غلظت PC بر حسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (۲۵).

تعیین میزان بیان ژن‌های SOD و GPX: بافت‌های قلب تا جداسازی کامل RNA، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. RNA کل با استفاده از محلول RNX Plus™ (شرکت سیناژن، ایران، کد کیت: EX6101) طبق دستورالعمل شرکت سازنده از بافت قلب جداسازی گردید. غلظت RNA جدا شده با تعیین میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه نانو دراپ (Fisher Scientific، NanoDrop Technologies، Wilmington, DE) آمریکا) مشخص شد. سپس سنتز cDNA (cDNA synthesis Kit، lot: cat: yt4500، 201905، شرکت یکتا تجهیز آزمایش، تهران، ایران) طبق روش Han و همکاران (۲۶) صورت گرفت.

بیان نسبی ژن‌های SOD و GPX با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (Real-time Polymerase chain reaction) یا SYBR® Green Master Mix (Real-time PCR) و ۵/۵ میکرولیتر SYBR® Green Master Mix

جدول ۲. میانگین سطوح شاخص‌های استرس اکسیداتیو- آنتی‌اکسیدان در گروه‌های مورد بررسی

گروه‌ها	MDA (نانومول بر میلی‌گرم)	PC (نانومول بر میلی‌گرم)	SOD (بیان ژن)	GPX (بیان ژن)
شاهد پیش‌آزمون	۳۵/۰۶ ± ۳/۱۷	۳۸/۳۶ ± ۴/۰۹	۵/۹۲ ± ۱/۱۸	۷/۳۸ ± ۱/۹۱
شاهد	۳۷/۵۵ ± ۴/۴۹	۴۲/۹۵ ± ۵/۹۳	۵/۵۵ ± ۱/۶۲	۶/۳۱ ± ۱/۰۴
شم	۳۸/۱۲ ± ۲/۳۸	۳۹/۹۷ ± ۶/۱۰	۵/۰۸ ± ۱/۱۴	۷/۲۰ ± ۱/۲۰
HIIT	۳۳/۸۹ ± ۳/۴۰	۳۲/۷۱ ± ۵/۲۸	۷/۸۶ ± ۲/۲۴	۹/۵۰ ± ۱/۵۶
NMN	۲۹/۰۲ ± ۵/۲۵	۳۴/۲۵ ± ۳/۰۶	۸/۱۹ ± ۱/۹۱	۸/۹۲ ± ۱/۶۶
HIIT + NMN	۲۱/۰۹ ± ۳/۰۶	۲۶/۰۹ ± ۴/۷۰	۸/۵۵ ± ۱/۰۲	۱۰/۳۲ ± ۱/۵۷
شاهد پیش‌آزمون	۳۵/۰۶ ± ۳/۱۷	۳۸/۳۶ ± ۴/۰۹	۵/۹۲ ± ۱/۱۸	۷/۳۸ ± ۱/۹۱

داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

MDA: Malondialdehyde; PC: Protein carbonyl; SOD: Superoxide dismutase; GPX: Glutathione peroxidase; HIIT: High intensity interval training; NMN: Nicotinamide mononucleotide

شم افزایش مختصری نسبت به گروه شاهد پیش‌آزمون داشت، اما در کل بین گروه شاهد پیش‌آزمون با گروه‌های شاهد و شم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$). کاهش MDA در گروه‌های HIIT، NMN و NMN + HIIT در مقایسه با گروه‌های شاهد پیش‌آزمون، شاهد و شم مشاهده گردید. این کاهش در گروه‌های NMN + HIIT و NMN به صورت معنی‌دار بود ($P < 0.001$). بیشترین کاهش MDA در گروه NMN + HIIT گزارش شد ($P < 0.001$) (جدول ۳).

نتایج بررسی میزان PC در بافت قلب: بررسی میزان PC در گروه‌های مختلف نشان داد که گروه شاهد و شم افزایش مختصری نسبت به گروه شاهد پیش‌آزمون داشتند، اما این افزایش چشمگیر نبود و اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد پیش‌آزمون با گروه‌های شاهد و شم مشاهده نشد ($P > 0.05$). میزان PC در گروه HIIT نسبت به گروه شاهد، در گروه NMN + HIIT نسبت به گروه‌های شاهد پیش‌آزمون و شاهد و در گروه NMN + HIIT نسبت به گروه‌های شاهد پیش‌آزمون، شاهد و شم کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). بیشترین کاهش PC در گروه NMN + HIIT گزارش گردید (جدول ۴).

جزئیات تحقیق حاضر با کد اخلاق IR.GERUMS.REC.1398.1085، به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گراش رسید. همچنین، پژوهش با رعایت استانداردهای اخلاق انجام شده است. شرایط نگهداری حیوانات بر اساس دستورالعمل نگهداری از موش‌های صحرایی به صورت استاندارد رعایت شد و قربانی کردن حیوانات با روش اخلاقی صورت گرفت (۲۹). داده‌ها در نرم‌افزار Prism (Vesrion 5, Graphpad, Canada) تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمام مقایسه‌های آماری با استفاده از آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. $P \leq 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین وزن موش‌ها 20 ± 220 گرم بود. نتایج حاصل از بررسی سطح شاخص‌های استرس اکسیداتیو (MDA، PC) و بیان ژن SOD و GPX جهت ارزیابی اثرات HIIT و مصرف مکمل NMN در بافت قلب موش‌های صحرایی در جدول ۲ ارائه شده است.

نتایج بررسی میزان MDA در بافت قلب: در رابطه با MDA، گروه شاهد و

جدول ۳. دامنه اطمینان و مقایسه معنی‌داری گروه‌ها در آزمون One-way ANOVA در مورد شاخص (MDA) Malondialdehyde

MDA (نانومول بر میلی‌گرم)	گروه‌ها	شاهد	شاهد	شم	HIIT	NMN	+ NMN HIIT
میانگین ± انحراف معیار	شاهد پیش‌آزمون	۳۸/۳۶ ± ۴/۰۹	۴۲/۹۵ ± ۵/۹۳	۳۹/۹۷ ± ۶/۱۰	۳۲/۷۱ ± ۵/۲۸	۳۴/۲۵ ± ۳/۰۶	۲۶/۰۹ ± ۴/۷۰
۹۵ درصد دامنه اطمینان تفاوت بین گروه‌ها	شاهد	-۸/۰۹۲-۳/۱۲۲	-۶/۱۷۷-۵/۱۲۲	-۱/۳۷۷-۹/۸۳۷			
	شم	-۸/۶۶۲-۲/۵۵۲	-۱/۹۴۷-۹/۲۶۷	-۳/۴۹۳-۱۴/۷۱۰			
	HIIT	-۴/۴۳۲-۶/۷۸۲	-۲/۹۲۳-۱۴/۱۴۰	۰/۱۱۴۲-۲۲/۶۴۰			
	NMN	۰/۴۳۷-۱۱/۶۵۰	۰/۱۰۸۵۰-۲۲/۰۷۰				
	HIIT + NMN	۸/۳۶۶-۱۹/۵۸۰					
مقدار P (تفاوت بین گروه‌ها)	شاهد پیش‌آزمون						
	شاهد	> ۰/۹۹۹					
	شم	۰/۶۸۸	> ۰/۹۹۹				
	HIIT	۰/۲۲۵	۰/۵۰۶	> ۰/۹۹۹			
	NMN	۰/۰۳۷	۰/۰۱۵	۰/۰۲۰	> ۰/۹۹۹		
	HIIT + NMN	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

$P < 0.001$, $P < 0.05$ *

MDA: Malondialdehyde; HIIT: High intensity interval training; NMN: Nicotinamide mononucleotide

جدول ۴. دامنه اطمینان و مقایسه معنی داری گروه‌ها در آزمون One-way ANOVA در مورد شاخص Protein carbonyl (PC)

PC (نانومول بر میلی گرم)	گروه‌ها	شاهد پیش آزمون	شاهد	شم	HIIT	NMN	+ NMN HIIT
میانگین \pm انحراف معیار		۳۸/۳۶ \pm ۴/۰۹	۴۲/۹۵ \pm ۵/۹۳	۳۹/۹۷ \pm ۶/۱۰	۳۲/۷۱ \pm ۵/۳۸	۳۴/۲۵ \pm ۳/۰۶	۲۶/۰۹ \pm ۴/۷۰
۹۵ درصد دامنه	شاهد پیش آزمون						
اطمینان تفاوت بین گروه‌ها	شاهد	-۱۲/۶۶۰ - ۳/۲۱۰	-۵/۷۶۴ - ۱۱/۷۱۰				
	شم	-۱۰/۳۵۰ - ۷/۱۲۴	*۱۹/۹۲۵ - ۴/۰۵۵				
	HIIT	-۳/۰۸۹ - ۱۴/۳۹۰	*۲۳/۶۱۵ - ۷/۷۴۵		-۱۰/۲۸۰ - ۷/۱۹۹		
	NMN	*۱۸/۸۹۰ - ۳/۰۲۰	*۲۳/۶۱۵ - ۷/۷۴۵		-۳/۰۱۴ - ۱۴/۴۶۰		
	HIIT + NMN	*۱۳/۵۲۵ - ۲۱/۰۰۰	*۸/۱۱۵ - ۲۵/۵۹۰		-۲/۱۲۵ - ۱۵/۳۵۰	*-۰/۵۸۵ - ۱۶/۸۹۰	
مقدار P (تفاوت بین گروهی)	شاهد پیش آزمون	> .۰/۹۹۹					
	شاهد		۰/۳۴۰				
	شم	۰/۹۴۸		> .۰/۹۹۹			
	HIIT	۰/۱۰۱		۰/۳۲۲	> .۰/۹۹۹		
	NMN	* .۰/۰۰۲		* .۰/۰۰۱			
	HIIT + NMN	* .۰/۰۰۱		* .۰/۰۰۱		> .۰/۹۹۹	

P < .۰۰۵*

PC: Protein carbonyl; HIIT: High intensity interval training; NMN: Nicotinamide mononucleotide

پیش‌آزمون، شاهد و شم افزایش معنی‌داری داشت ($P < .۰۰۵$). بیشترین افزایش میزان بیان ژن GPX در گروه NMN + HIIT مشاهده شد ($P < .۰۰۵$) (جدول ۴).

بحث

افزایش سن، افزایش رادیکال‌های آزاد را به همراه دارد که منجر به بروز استرس اکسیداتیو و آسیب ماکرومولکول‌ها می‌گردد (۳۰). استرس اکسیداتیو شرایطی است که در آن تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و سطح آنتی‌اکسیدان‌ها به طور قابل توجهی مختل می‌شود. این رادیکال‌ها به ماکرومولکول‌های سلولی از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واقع در غشای سلول، سیتوزول و هسته حمله می‌کند و در نهایت، منجر به آسیب سلول می‌شود (۳۱).

نتایج بررسی میزان بیان ژن SOD در بافت قلب: نتایج Real-time PCR

حاکم از آن بود که میزان بیان ژن SOD در گروه شاهد و شم نسبت به گروه شاهد پیش‌آزمون کاهش یافت، اما این کاهش به صورت معنی‌دار نبود ($P > .۰۰۵$). در گروه‌های HIIT، NMN + HIIT و NMN بیان ژن SOD در مقایسه با گروه شاهد پیش‌آزمون و گروه شاهد افزایش یافت که معنی‌دار نبود ($P > .۰۰۵$). همچنین، بین سه گروه درمانی گروه‌های HIIT، NMN و HIIT + NMN اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > .۰۰۵$) (جدول ۵).

نتایج بررسی میزان بیان ژن GPX در بافت قلب: نتایج در این زمینه نشان

داد که با وجود کاهش میزان GPX در گروه شاهد و شم در مقایسه با گروه شاهد پیش‌آزمون، میزان این کاهش معنی‌دار نبود ($P > .۰۰۵$). در گروه‌های HIIT و HIIT + NMN، بیان ژن GPX در مقایسه با گروه‌های شاهد

جدول ۵. دامنه اطمینان و مقایسه معنی داری گروه‌ها در آزمون One-way ANOVA در مورد شاخص Superoxide dismutase (SOD)

SOD (نانومول بر میلی گرم)	گروه‌ها	شاهد پیش آزمون	شاهد	شم	HIIT	NMN	+ NMN HIIT
میانگین \pm انحراف معیار		۵/۹۲ \pm ۱/۱۸	۵/۵۵ \pm ۱/۶۲	۵/۰۸ \pm ۱/۱۴	۷/۸۶ \pm ۲/۲۴	۸/۱۹ \pm ۱/۹۱	۸/۵۵ \pm ۱/۰۲
۹۵ درصد دامنه	شاهد پیش آزمون						
اطمینان تفاوت بین گروه‌ها	شاهد	-۳/۲۲۲ - ۳/۹۵۲	-۳/۱۰۸ - ۴/۰۶۵				
	شم	-۲/۷۴۳ - ۴/۴۲۰	-۵/۸۷۷ - ۱/۲۹۷				
	HIIT	-۵/۵۱۲ - ۱/۶۶۲	-۵/۸۷۷ - ۱/۲۹۷		-۳/۹۲۸ - ۳/۲۴۵		
	NMN	-۵/۸۵۳ - ۱/۳۲۰	-۶/۲۱۸ - ۰/۹۵۵		-۶/۶۹۷ - ۰/۴۷۶		
	HIIT + NMN	-۵/۳۷۷ - ۱/۷۹۷	-۵/۷۴۲ - ۱/۴۳۲		-۳/۴۵۲ - ۳/۷۲۲	-۳/۱۱۰ - ۴/۰۶۳	
مقدار P (تفاوت بین گروهی)	شاهد پیش آزمون	> .۰/۹۹۹					
	شاهد		۰/۷۶۶				
	شم	۰/۴۲۹		> .۰/۹۹۹			
	HIIT	۰/۳۵۹		> .۰/۹۹۹	> .۰/۹۹۹		
	NMN	۰/۱۸۱		> .۰/۹۹۹			
	HIIT + NMN	۰/۴۶۶		> .۰/۹۹۹		> .۰/۹۹۹	

SOD: Superoxide dismutase; HIIT: High intensity interval training; NMN: Nicotinamide mononucleotide

جدول ۶. دامنه اطمینان و مقایسه معنی‌داری گروه‌ها در آزمون One-way ANOVA در مورد شاخص (GPX) Glutathione peroxidase

GPX (نانومول بر میلی‌گرم)	گروه‌ها	شاهد	شاهد	شم	HIIT	NMN	+ NMN HIIT
میانگین \pm انحراف معیار		۷/۳۸ \pm ۱/۹۱	۶/۳۱ \pm ۱/۰۴	۷/۲۰ \pm ۱/۲۰	۹/۵۰ \pm ۱/۵۶	۸/۹۲ \pm ۱/۶۶	۱۰/۳۲ \pm ۱/۵۷
۹۵ درصد دامنه اطمینان تفاوت بین گروه‌ها	شاهد پیش‌آزمون						
	شاهد	-۱/۶۰۲-۳/۷۵۲					
	شم	-۲/۴۹۷-۲/۸۵۷	-۳/۵۷۲-۱/۷۸۲				
	HIIT	-۴/۷۹۵-۰/۵۵۸	-۵/۸۷۰-۰/۵۱۶	-۴/۹۷۵-۰-۳۷۸			
	NMN	-۴/۲۱۴-۱/۱۴۰	-۵/۲۸۹-۰/۰۶۵	-۴/۳۹۴-۰/۰۹۶۰	-۲/۰۹۵-۳/۲۵۹		
	HIIT + NMN	- -/۲۶۱	-۶/۶۹۰ - ۱-۳۳۶	-۵/۷۹۵-۰-۰/۴۴۰	-۳/۴۹۷-۱/۸۵۷	-۴/۰۷۹-۱/۲۷۵	
مقدار P (تفاوت بین گروهی)	شاهد پیش‌آزمون						
	شاهد	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹				
	شم	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹	۰/۳۴۸			
	HIIT	۰/۱۵۸	۰/۰۱۷	> ۰/۹۹۹			
	NMN	۰/۷۰۶	۰/۰۹۲	> ۰/۹۹۹			
	HIIT + NMN	۰/۰۱۵	۰/۰۰۱	* ۰/۰۳۶	> ۰/۹۹۹	> ۰/۹۹۹	

* P < ۰/۰۵

GPX: Glutathione peroxidase; HIIT: High intensity interval training; NMN: Nicotinamide mononucleotide

از گروه‌های مداخله‌ای مستقل، موجب افزایش سطوح SOD و GPX و کاهش MDA و PC در بافت قلب موش‌های صحرایی گردید. بیشترین افزایش میزان بیان ژن SOD و GPX و بیشترین کاهش میزان بیان ژن MDA و PC در گروه ترکیبی که به صورت همزمان تحت مداخله HIIT و تجویز مکمل NMN قرار گرفته بود مشاهده شد.

تجویز مکمل NMN و انجام HIIT، بیان ژن SOD و GPX را افزایش داد. این یافته نشان می‌دهد که کاهش استرس اکسیداتیو شاید به دلیل افزایش مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی باشد که با نتایج تحقیق Hellsten و همکاران همسو بود. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که هشت هفته تمرین، منجر به افزایش قابل توجه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان عضله اسکلتی شد (۳۶).

علاوه بر این، یافته‌های به دست آمده از این فرضیه حمایت می‌کند که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در اختلال عملکرد قلبی مرتبط با سن دارد و نشان می‌دهد که کاهش استرس اکسیداتیو، ممکن است مکانیسم اصلی باشد که NMN و HIIT از این راه اثرات مفید خود را در حیوانات پیر اعمال می‌کنند. این مشاهدات با نتایج پژوهش de Picciotto و همکاران (۱۸) همخوانی داشت. در آزمایش آن‌ها، موش‌های C57Bl/6 به مدت ۸ هفته مکمل NMN (با دز ۳۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم در روز) را در آب آشامیدنی دریافت کردند. de Picciotto و همکاران به این نتیجه رسیدند که مکمل NMN، فعالیت SIRT1 را بازیابی و با کاهش استرس اکسیداتیو، کاهش عملکرد عروقی مربوط به سن را معکوس می‌کند. این اثرات با بهبود فراهم زیستی NO، کاهش استرس اکسیداتیو و طبیعی‌سازی پروتئین‌های ساختاری دیواره عروق همراه بود (۱۸).

در مطالعه دیگری، Bogdanis و همکاران، اثرات کوتاه مدت HIIT را بر روی استرس اکسیداتیو و وضعیت آنتی‌اکسیدانی بررسی کردند و دریافتند که انجام سه هفته HIIT، منجر به کاهش نشانگرهای استرس اکسیداتیو و افزایش سطح آنتی‌اکسیدان می‌شود (۷). به نظر می‌رسد HIIT به عنوان شیوه جدیدی از تمرینات استقامتی به مدت طولانی، موجب سازگاری‌های افزایش بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، بهبود متابولیسم سلول و افزایش طول عمر سلول می‌گردد (۳۷).

بدن پستانداران انواع مختلفی از آنتی‌اکسیدان برای مقابله با رادیکال‌های آزاد، حفظ تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها و جلوگیری از استرس اکسیداتیو می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند SOD، GPX و کاتالاز، اولین خط دفاع بدن در برابر آسیب اکسیداتیو هستند (۳۳، ۳۲). بیماری‌های قلبی دارای مکانیسم پاتوفیزیولوژیک ناهمگون هستند. نتایج پژوهشی نشان داد که بسیاری از بیماری‌های قلبی با تولید بیش از حد ROS مرتبط است. بنابراین، افزایش استرس اکسیداتیو به عنوان یک علت بالقوه در نظر گرفته می‌شود (۳۴).

در شرایط عادی، متابولیسم هوازی قلب با تولید مداوم پراکسیدان‌هایی مانند ROS همراه است که توسط سیستم آنتی‌اکسیدان‌های قلب غیر فعال می‌شوند. در شرایط استرس اکسیداتیو، تولید بیش از حد ROS باعث پراکسیداسیون لیپید و تولید MDA و در نتیجه، آسیب به بافت قلب می‌شود (۳۵).

ارگان‌های هوازی دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی یکپارچه‌ای شامل آنزیمی و غیر آنزیمی هستند. از جمله آنتی‌اکسیدان‌های اصلی آنزیمی قلب می‌توان به SOD، GPX و کاتالاز اشاره کرد. آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل ویتامین‌ها (شامل C و E)، بتاکاروتن، اسید اوریک و Glutathione (GSH) می‌باشد (۵). با افزایش سن، کاهش کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی و عدم توانایی آن در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، موجب راه‌اندازی موتاسیون DNA میتوکندریایی و هسته می‌شود و احتمال بروز CVD را افزایش می‌دهد (۳۶). افزایش برخی از نشانگرهای زیستی مانند MDA و کاهش ترکیبات آنتی‌اکسیدان و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، وجود استرس اکسیداتیو را نشان می‌دهد.

در مطالعه حاضر برای تأیید اثر HIIT و مکمل NMN در کاهش استرس اکسیداتیو، برخی شاخص‌های مربوط به استرس اکسیداتیو از جمله بیان ژن SOD و GPX و همچنین، سطوح MDA و PC در بافت قلب اندازه‌گیری گردید و نتایج نشان داد که افزایش سن در حیوانات شاهد با افزایش در هر دو ماده MDA و PC و کاهش بیان ژن‌های SOD و GPX همراه است. تجویز مکمل NMN و انجام HIIT، منجر به تغییرات چشمگیری در وضعیت آنتی‌اکسیدانی بافت قلب شد. تمرین HIIT و مصرف مکمل NMN در هر یک

واحد مرودشت که در انجام این مطالعه با ما همکاری داشته اند سپاس و قدردانی می‌نماییم.

نقش نویسندگان

سکینه طاهری، طراحی و ایده‌پردازی مطالعه، جذب منابع مالی برای انجام مطالعه، خدمات پشتیبانی و اجرایی و علمی مطالعه، فراهم کردن تجهیزات و نمونه‌های مطالعه، جمع‌آوری داده‌ها، تنظیم دست‌نوشته، ارزیابی تخصصی دست‌نوشته از نظر مفاهیم علمی، تأیید دست‌نوشته نهایی جهت ارسال به دفتر مجله، مسؤلیت حفظ یکپارچگی فرایند انجام مطالعه از آغاز تا انتشار و پاسخگویی به نظرات داوران، سجاد ارشدی، طراحی و ایده‌پردازی مطالعه، خدمات پشتیبانی و اجرایی و علمی مطالعه، تحلیل و تفسیر نتایج، خدمات تخصصی آمار، تنظیم دست‌نوشته، ارزیابی تخصصی دست‌نوشته از نظر مفاهیم علمی، تأیید دست‌نوشته نهایی جهت ارسال به دفتر مجله، مسؤلیت حفظ یکپارچگی فرایند انجام مطالعه از آغاز تا انتشار و پاسخگویی به نظرات داوران، عبدالعلی بنایی‌فر، خدمات پشتیبانی و اجرایی و علمی مطالعه، تحلیل و تفسیر نتایج، خدمات تخصصی آمار، تنظیم دست‌نوشته، ارزیابی تخصصی دست‌نوشته از نظر مفاهیم علمی، تأیید دست‌نوشته نهایی جهت ارسال به دفتر مجله، مسؤلیت حفظ یکپارچگی فرایند انجام مطالعه از آغاز تا انتشار و پاسخگویی به نظرات داوران را بر عهده داشتند.

منابع مالی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه مقطع دکتری فیزیولوژی ورزشی با شماره 1414861699009541400162425323 و کد اخلاق IR.GERUMS.REC.1397.1085 می‌باشد و با حمایت مالی شخصی تنظیم گردید. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب در جمع‌آوری داده‌ها، تحلیل و گزارش آن‌ها، تنظیم دست‌نوشته و تأیید نهایی مقاله برای انتشار اعمال نظر نداشت.

تعارض منافع

نویسندگان دارای تعارض منافع نمی‌باشند. دکتر سجاد ارشدی از سال ۱۳۹۰ به عنوان هیأت علمی و از سال ۱۳۹۳ به عنوان استادیار در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب مشغول به فعالیت می‌باشد. دکتر عبدالعلی بنایی‌فر از سال ۱۳۸۱ به عنوان هیأت علمی و از سال ۱۳۹۵ به عنوان دانشیار در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب مشغول به فعالیت می‌باشد. دکتر وحید ایمانی‌پور از سال ۱۳۸۴ به عنوان هیأت علمی و از سال ۱۳۹۶ به عنوان استادیار در دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند مشغول به فعالیت می‌باشد. سکینه طاهری از سال ۱۳۹۵ به عنوان دانشجوی مقطع دکتری فیزیولوژی ورزشی در دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب مشغول به تحصیل می‌باشد.

نتایج چندین تحقیق نشان داده است که افزایش سن، باعث کاهش NAD^+ می‌شود و ارگانسیم را مستعد ابتلا به طیف وسیعی از بیماری‌های مزمن و شرایط پاتولوژیک مرتبط با افزایش سن می‌کند (۳۸، ۱۷). شواهد محکمی وجود دارد که بازیابی سطح NAD^+ سلولی در حیوانات مسن با استفاده از پیش‌سازهای NAD^+ ، باعث اثرات ضد افزایش سن قوی و معکوس کردن عوارض مربوط به سن می‌شود (۱۷). Kiss و همکاران با انجام پژوهشی به این نتیجه رسیدند که کاهش وابسته به سن NAD^+ می‌تواند توسط مکمل‌های NMN به عنوان پیش‌ساز ماده NAD^+ جبران شود. آن‌ها دریافتند که افزایش وابسته به سن در تولید H_2O_2 با تجویز مکمل NMN، کاهش می‌یابد. همچنین، می‌تواند استرس اکسیداتیو میتوکندریایی مربوط به سن را کاهش دهد (۱۷). همچنین، نتایج مطالعات اخیر نشان داد که استفاده از مکمل NMN، موجب افزایش SIRT1، NAD^+ و کاهش استرس اکسیداتیو در بافت قلب می‌گردد (۱۷).

محدودیت‌ها

با توجه به نوع تحقیق، کنترل اضطراب و استرس وارد بر حیوانات در حین تمرین که احتمالاً بر متغیرهای پژوهش حاضر تأثیر می‌گذارد، به طور کامل امکان‌پذیر نبود. با توجه به پیچیدگی سیستم آنتی‌اکسیدانی - استرس اکسیداتیو، به نظر می‌رسد عدم اندازه‌گیری شاخص‌های آسیب DNA و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (Total Antioxidant Capacity یا TAC)، از محدودیت‌های این مطالعه باشد. از این‌رو، پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات آینده، شاخص‌های استرس اکسیداتیو بیشتری اندازه‌گیری شود.

پیشنهادها

به منظور تکمیل پژوهش حاضر، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده آثار این دو مداخله بر بافت‌های دیگر بدن موش همچون بافت‌های عضلانی، مغز و کبد بررسی شود. با توجه به این که نتایج تحقیق حاضر نشان داد تمرین HIIT و مصرف مکمل NMN موجب افزایش سطوح SOD، GPX و کاهش سطوح MDA و PC در بافت قلب موش‌های صحرایی می‌شود، پیشنهاد می‌گردد جهت بهبود عملکرد آنتی‌اکسیدانی در بافت قلب، از تمرین HIIT و مصرف مکمل مشابه با پژوهش حاضر استفاده گردد. همچنین، پیشنهاد می‌شود همین مطالعه بر روی موش‌های مسن بالای ۲ سال انجام گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تجویز مکمل NMN و HIIT به مدت ۸ هفته، استرس اکسیداتیو مرتبط به سن را در بافت قلب کاهش داد. علاوه بر این، تجویز هم‌زمان مکمل NMN و HIIT، بیشترین تأثیر را در کاهش استرس اکسیداتیو داشت. از این‌رو، به نظر می‌رسد انجام HIIT و مکمل NMN به طور جداگانه و از مسیرهای متفاوت، منجر به بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانها در بافت قلب می‌گردد. در مجموع، مکمل NMN با خواص آنتی‌اکسیدانی و HIIT با ایجاد تعادل پراکسیدان و آنتی‌اکسیدان، استرس اکسیداتیو مربوط به سن را در بافت قلب کاهش داد.

تشکر و قدردانی

از کارکنان محترم مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی

References

1. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5(5): 557-61.
2. Salisbury D, Bronas U. Reactive oxygen and nitrogen species: Impact on endothelial dysfunction. *Nurs Res* 2015; 64(1): 53-66.
3. Kalantari H, Forouzandeh H, Khodayar MJ, Siahpoosh A, Saki N, Kheradmand P. Antioxidant and hepatoprotective effects of Capparis spinosa L. fractions and Quercetin on tert-butyl hydroperoxide- induced acute liver damage in mice. *J Tradit Complement Med* 2018; 8(1): 120-7.
4. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018; 13: 757-72.
5. Sergiev PV, Dontsova OA, Berezkin GV. Theories of aging: an ever-evolving field. *Acta Naturae* 2015; 7(1): 9-18.
6. Aronow WS. Heart disease and aging. *Med Clin North Am* 2006; 90(5): 849-62.
7. Bogdanis GC, Stavrinou P, Fatouros IG, Philippou A, Chatzinikolaou A, Draganidis D, et al. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food Chem Toxicol* 2013; 61: 171-7.
8. Freitas DA, Rocha-Vieira E, Soares BA, Nonato LF, Fonseca SR, Martins JB, et al. High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. *Physiol Behav* 2018; 184: 6-11.
9. Farinha JB, Ramis TR, Vieira AF, Macedo RCO, Rodrigues-Krause J, Boeno FP, et al. Glycemic, inflammatory and oxidative stress responses to different high-intensity training protocols in type 1 diabetes: A randomized clinical trial. *J Diabetes Complications* 2018; 32(12): 1124-32.
10. Henke E, Oliveira VS, Silva IMd, Schipper L, Dorneles G, Elsner VR, et al. Acute and chronic effects of High Intensity Interval Training on inflammatory and oxidative stress markers of postmenopausal obese women. *Transl Sports Med* 2018; 1(6): 257-64.
11. Mitranun W, Deerochanawong C, Tanaka H, Suksom D. Continuous vs interval training on glycemic control and macro- and microvascular reactivity in type 2 diabetic patients. *Scand J Med Sci Sports* 2014; 24(2): e69-e76.
12. Wisloff U, Stoylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum O, Haram PM, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: A randomized study. *Circulation* 2007; 115(24): 3086-94.
13. Inaba Y, Chen JA, Bergmann SR. Prediction of future cardiovascular outcomes by flow-mediated vasodilatation of brachial artery: a meta-analysis. *Int J Cardiovasc Imaging* 2010; 26(6): 631-40.
14. Akbari H, Maleki MJ, Ravasi AA, Kordi MR, Dizagi A, Miri M, et al. The effect of an endurance training period with cellular Anti-aging purpose on telomerase enzyme activity in cardiac tissue and peripheral blood lymphocytes in male rats. *J Med Counc I R Iran* 2021; 31(4): 389-96. [In Persian].
15. Akbari Bokani H, Ravasi AA, Akbari MR. The effect of a endurance training period with cellular anti-aging purpose on telomerase enzyme content in cardiac tissue and peripheral blood lymphocytes in rats. *Sport Physiology and Management Investigations* 2017; 9(3): 127-41. [In Persian].
16. Mitchell SJ, Bernier M, Aon MA, Cortassa S, Kim EY, Fang EF, et al. Nicotinamide Improves Aspects of Healthspan, but Not Lifespan, in Mice. *Cell Metab* 2018; 27(3): 667-76.
17. Kiss T, Balasubramanian P, Valcarcel-Ares MN, Tarantini S, Yabluchanskiy A, Csipo T, et al. Nicotinamide mononucleotide (NMN) treatment attenuates oxidative stress and rescues angiogenic capacity in aged cerebrovascular endothelial cells: a potential mechanism for the prevention of vascular cognitive impairment. *Geroscience* 2019; 41(5): 619-30.
18. de Picciotto NE, Gano LB, Johnson LC, Martens CR, Sindler AL, Mills KF, et al. Nicotinamide mononucleotide supplementation reverses vascular dysfunction and oxidative stress with aging in mice. *Aging Cell* 2016; 15(3): 522-30.
19. Bogan KL, Brenner C. Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: A molecular evaluation of NAD+ precursor vitamins in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 2008; 28: 115-30.
20. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med* 2013; 4(6): 624-30.
21. Uddin GM, Youngson NA, Doyle BM, Sinclair DA, Morris MJ. Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation ameliorates the impact of maternal obesity in mice: comparison with exercise. *Sci Rep* 2017; 7(1): 15063.
22. Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Oppliger RA, Gisolfi CV. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1979; 47(6): 1278-83.

23. Linossier MT, Denis C, Dormois D, Geysant A, Lacour JR. Ergometric and metabolic adaptation to a 5-s sprint training programme. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1993; 67(5): 408-14.
24. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-10.
25. Goudarzi M, Kalantari H, Rezaei M. Glyoxal toxicity in isolated rat liver mitochondria. *Hum Exp Toxicol* 2018; 37(5): 532-9.
26. Han N, Shin JH, Han KH. An on-chip RT-PCR microfluidic device, that integrates mRNA extraction, cDNA synthesis, and gene amplification. *Rsc Advances*. 2014; 4(18): 9160-5.
27. Ghorbanalipoor S, Ajami A, Rafiei AR, Taghvaei T, Paylakhi SH, Hosseini V. Expression of interleukin 11 (IL-11) in benign and malignant lesions of the gastric mucosa. *J Mazand Univ Med Sci* 2011; 21(84): 2-11. [In Persian].
28. Namjoo E, Shekari M, Piruozi A, Forouzandeh H, Khalafkhany D, Vahedi A, et al. Haloperidol's effect on the expressions of TGFB, NT-3, and BDNF genes in cultured rat microglia. *Basic Clin Neurosci* 2020; 11(1): 49-58.
29. Gorska P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. *Med Sci Monit* 2000; 6(1): 171-80.
30. Rebelo-Marques A, De Sousa LA, Andrade R, Ribeiro CF, Mota-Pinto A, Carrilho F, et al. Aging hallmarks: The benefits of physical exercise. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9: 258.
31. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 2008; 4(2): 89-96.
32. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem* 2006; 97(6): 1634-58.
33. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1): 47-95.
34. Senoner T, Dichtl W. Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target? *Nutrients* 2019; 11(9): 2090.
35. Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian J Biochem Biophys* 2009; 46(6): 421-40.
36. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012; 5(1): 9-19.
37. Hellsten Y, Apple FS, Sjodin B. Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 1996; 81(4): 1484-7.
38. Csiszar A, Tarantini S, Yabluchanskiy A, Balasubramanian P, Kiss T, Farkas E, et al. Role of endothelial NAD(+) deficiency in age-related vascular dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019; 316(6): H1253-H1266.

The Attenuating Effect of High-Intensity Interval Training and Nicotinamide Mononucleotide Supplementation on Aging-Related Oxidative Stress in Rat's Heart Tissue

Sakineh Taheri¹, Sajad Arshadi², Abdolali Banaeifar³, Vahid Imanipour⁴

Original Article

Abstract

Introduction: Numerous studies have shown attenuating effects of nicotinamide mononucleotide (NMN) and high-intensity interval exercise (HIIT) training on reducing oxidative stress. Therefore, in the present study, we evaluated the effect of HIIT and NMN supplementation on the oxidative stress markers in cardiac tissue of rats.

Materials and Methods: 48 sprague dauli rats with an average age of 8 to 10 months were randomly divided into 6 groups of pretest control, control, sham (normal saline), HIIT, NMN supplementation, and combination (HIIT + NMN). The HIIT and combination groups performed HIIT on the treadmill for 8 weeks, 3 sessions per week. NMN with a dose of 500 mg per kilogram body weight was administered intra-peritoneally in the NMN and combination groups. 24 hours after the last training and NMN administration, the animals were sacrificed, and their hearts were removed for evaluating oxidative stress factors [malondialdehyde (MDA), protein carbonyl (PC), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx)]. One-way ANOVA test was used for statistical analysis.

Results: The expression of GPx gene in the groups receiving NMN, HIIT, and combination was significantly higher compared to the pretest control, control, and sham groups ($P < 0.050$). Moreover, the levels of MDA and PC were lower in NMN, HIIT, and combination groups compared to the pre-test control, control, and sham ($P < 0.050$). The highest reduction was seen in the combination group ($P < 0.001$).

Conclusion: It seems that regular consumption of NMN and/or HIIT may attenuate oxidative stress in the cardiac tissue; however, combinations of NMN and HIIT significantly improves the effects of sole interventions.

Keywords: Nicotinamide mono nucleotide; High-intensity interval exercise; Oxidative stress

Citation: Taheri S, Arshadi S, Banaeifar A, Imanipour V. **The Attenuating Effect of High-Intensity Interval Training and Nicotinamide Mononucleotide Supplementation on Aging-Related Oxidative Stress in Rat's Heart Tissue.** J Res Rehabil Sci 2021; 16: 310-20.

Received date: 27.11.2020

Accept date: 29.12.2020

Published: 04.01.2021

1- PhD Student, Department of Exercise Physiology, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Sajad Arshadi; Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; Email: S_arshadi@azad.ac.ir