

Effect of Simulated Intermittent Altitude on the Metabolic and Hematologic Parameters in Streptozotocin Induced Diabetic Rats

Faramoushi M^{1*}, Amir Sasan R¹, Sari Sarraf V¹, Karimi P²

1. Department of Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Neuroscience Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

* **Corresponding author:** Tel: +989144263813 Fax: +9804135419969 E-mail: faramoushi@tabriziau.ac.ir

Received: Sep 3, 2015 Accepted: Nov 17, 2015

ABSTRACT

Background & objectives: Type II diabetes is a metabolic disorder accompanied with insulin resistance of the whole body cells and is considered be the fifth cause of death in the world. Adaptation to altitude can lead to tolerance to many diseases. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of simulated intermittent altitude on the metabolic and hematologic parameters and liver function in streptozotocin induced diabetic rats.

Methods: In the current experimental study, twenty four male Wistar rats weighing 220 ± 20 gr were randomly divided into three groups; normal control group (NC, n=8), diabetic control group (D, n=8) received fat diet for 2 weeks then were injected with streptozotocin (37 mg/kg) and diabetic+hypoxia group (D+H, n=8) including diabetic rat exposed to chronic intermittent hypoxia ($PiO_2 \approx 106$ mm Hg, simulated altitude ≈ 3400 m, 14% oxygen for 8 weeks). Diabetic, hematologic and lipid parameters as well as ALT and AST activities were measured in peripheral blood.

Results: Our findings showed that intermittent hypoxia significantly decreased serum total cholesterol, LDL, VLDL and triglyceride in D+H group compared to D group ($p < 0.05$). Serum levels of fasting blood glucose and homeostatic model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) index and ALT were decreased in D+H group vs. D group ($p < 0.05$). Also, hemoglobin and hematocrite level increased in D+H group in comparison to D group ($p < 0.05$). No significant difference was detected in red blood cell count in D+H vs. D group.

Conclusion: Based on resultant data, it seems that intermittent exposure to hypoxia (simulated to chronic and intermittent lodgement in altitude) can be used to control of type 2 diabetes by increasing hemoglobin, decreasing insulin resistance and improving liver function as well as lipid parameters.

Keywords: Altitude; Blood Glucose; Hematology; Wistar Rats; Type II Diabetes.

تأثیر ارتفاع متناوب شبیه‌سازی شده بر شاخص‌های متابولیک و هماتولوژیک موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

مهدی فراموشی^{۱*}، رامین امیر ساسان^۱، وحید ساری صراف^۱، پوران کریمی^۲

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۴۴۲۶۳۸۱۳ فاکس: ۰۴۱۳۵۴۱۹۹۶۹ پست الکترونیک: m.faramoushi@tabriziau.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: دیابت نوع دو، یک اختلال متابولیکی توام با مقاومت انسولینی سلول‌های کل بدن است و پنجمین عامل مرگ و میر در جهان به شمار می‌رود. از طرفی سازگاری با ارتفاع مرگ و میر ناشی از برخی بیماری‌های مزمن را کاهش می‌دهد، بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر ارتفاع متناوب شبیه‌سازی شده بر شاخص‌های متابولیک، هماتولوژیک و عملکرد کبدی موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (وزن اولیه 220 ± 20 گرم) به طور تصادفی در سه گروه ۸ تایی: گروه کنترل سالم ($NC, n=8$)، گروه کنترل دیابتی ($D, n=8$) (دریافت کننده $37mg/kg$ استرپتوزوتوسین بعد از ۲ هفته تغذیه با غذای چرب) و گروه دیابتی + هیپوکسی ($D+H, n=8$) شامل دیابتی‌های تیمار شده در شرایط هیپوکسی متناوب (۱۴٪ معادل فشار اکسیژن 10.6 میلی‌متر جیوه و مشابه ارتفاع 3400 متر و به مدت هشت هفته) تقسیم شدند سپس شاخص‌های دیابتی، خونی و متابولیسم لیپیدی و نیز آنزیم‌های کبدی آسپارات آمینو ترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز در خون محیطی رت‌ها اندازه گیری گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که هیپوکسی متناوب، سطح سرمی کلسترول تام، LDL و $VLDL$ تری گلیسیرید را بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش داده است. همچنین قرار گرفتن در معرض هیپوکسی متوسط متناوب موجب کاهش معنی‌دار در سطح گلوکز ناشتا و شاخص مقاومت انسولینی $HOMA-IR$ و ALT شد ($p < 0.05$)؛ اما تغییر معنی‌داری در شاخص حساسیت به انسولین ($QUICKI$) و AST ($p = 0.28$) در بین دو گروه دیابتی دیده نشد. همچنین میزان هموگلوبین و هماتوکریت در گروه دیابتی هیپوکسی نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌دار نشان داد، اما تفاوت شمارش گلبول‌های قرمز بین گروه کنترل دیابتی و هیپوکسی دیابتی معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که هیپوکسی متناوب (مشابه استقرار در ارتفاعات بطور مزمن و متناوب) با افزایش ظرفیت ساخت هموگلوبین، کاهش مقاومت انسولینی و نیز بهبود وضعیت کبدی می‌تواند در کنترل دیابت نوع دو موثر واقع شود.

واژه‌های کلیدی: ارتفاع، گلوکز خون، هماتولوژی، موش صحرایی، دیابت نوع دو

دریافت: ۹۴/۶/۱۲ پذیرش: ۹۴/۸/۲۶

مقدمه

دیابت نوع دو، یک اختلال متابولیکی است که با مقاومت انسولینی کل بدن همراه می‌باشد و پنجمین عامل مرگ و میر در جهان بعد از بیماری‌های عفونی، قلب و عروق، سرطان و تروما به شمار

می‌آید [۱]. در این بیماری به دلیل اختلال در متابولیسم چربی و افزایش میزان لیپیدهای خون، خطر ابتلا به بیماری قلبی عروقی و آترواسکلروز افزایش می‌یابد [۲]. از طرفی دیابت نوع دو شاخص‌های هماتولوژیک را نیز دچار اختلال می‌کند

[۳]. پروکسیداسیون لیپیدی ناشی از استرس اکسیداتیو دیابتی موجب همولیز گلبول‌های قرمز و آنمی می‌گردد که معمولاً با کاهش حجم گلبول‌های قرمز همراه است. گلیکوزیلاسیون^۱ غیرطبیعی هموگلوبین که با کاهش سیالیت غشا در ارتباط است، در خون محیطی افراد دیابتی می‌تواند به پروتئین‌های غشای گلبول‌های قرمز آسیب وارد کند. در بیماری دیابت کنترل نشده، گلبول‌های قرمز دچار چسبندگی زیاد به اندوتلیوم عروقی می‌شوند و خطر توسعه پلاک آتروسکلروتیک را چند برابر می‌کنند [۲]. اختلال در گلبول‌های قرمز و هماتوکریت موجب کاهش اکسیژن‌رسانی مناسب به اندام‌های مختلف می‌شود، از طرفی ویسکوزیته خون نیز به دلیل افزایش اسمولاریته خون بالا رفته که به نوبه خود جریان خون را مختل می‌کند [۴]. در حال حاضر درمان اصلی و موثر برای دیابت، استفاده از انسولین و یا داروهای با کارکرد کاهش گلوکز می‌باشند. بیشتر این ترکیبات در کنار اثرات درمانی دارای عوارض نامطلوبی مانند افزایش ذخایر چربی، شوک هیپوگلیسمی و تحلیل رفتن بافت چربی در محل تزریق هستند و در درازمدت اثربخشی خود را از دست می‌دهند. بنابراین درمان‌های جایگزین با عوارض جانبی کمتر، می‌تواند راهکار مناسبی باشد [۵]. هیپوکسی متوسط متناوب که ارتفاعی تا حدود ۳۰۰۰ متر را شبیه‌سازی می‌کند و یک عامل موثر و مفید در سلامت قلبی عروقی به شمار می‌آید [۶]. از نظر بیولوژیکی نقش فاکتور القاشده با هیپوکسی (HIF^۲) در کاهش مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی عروقی در ارتفاع شناخته شده است. HIF-1 یک تنظیم‌کننده کلیدی در فرایندهای موثر بر سیستم‌های قلبی-عروقی و عروقی مغزی مانند متابولیسم لیپیدها، تولید گلبول قرمز و آپوپتوز می‌باشد [۷]. سازگاری به ارتفاع منجر به پایین آمدن

فشارخون سیستولیک و دیاستولیک می‌شود و توضیحی بر سطح پایین‌تر کلسترول لیپوپروتئین‌های آتروژنیک (C-LDL) افراد بومی ارتفاع بالا نسبت به افراد نواحی پست‌تر می‌باشد. بر اساس این شواهد به نظر می‌رسد که هیپوکسی متناوب بتواند در جلوگیری از توسعه عوارض قلبی عروقی دیابتی‌ها نقش موثری ایفا کند [۷]. شرایط هیپوکسی در ارتفاع با افزایش ترشح اریتروپوئین^۳ از کلیه موجب افزایش هماتوکریت و هموگلوبین می‌گردد [۸]. افزایش هماتوکریت موجب افزایش ویسکوزیته خون می‌شود و نیز افزایش مقاومت سیستمی و ریوی را موجب می‌گردد. البته قرار گرفتن در معرض هیپوکسی بسته به حاد یا مزمن بودن شرایط، منتج به هر دو نتیجه منفی و مثبت در میان انسان‌ها و حیوانات می‌شود. از نتایج مثبت قرار گرفتن مزمن در ارتفاع و زندگی در آن، محافظت قلبی و عروقی می‌باشد [۹]. ارتباط بین هیپوکسی در سیستم قلبی تنفسی و گلوکز خون پیچیده بوده و نیاز به مطالعات بیشتری دارد. یک حدس این است که هیپوکسی متوسط و البته متناوب می‌تواند بازتاب‌های قلبی تنفسی و غلظت گلوکز را بهبود ببخشد که نتیجه آن کاهش فعالیت سمپاتیکی و بهبود اکسیژن‌گیری در بافت‌ها است که نهایتاً به مصرف بهتر گلوکز خون منتهی می‌شود. البته هیپوکسی شدید و طولانی ممکن است با ایجاد ROS^۴ همراه باشد [۹]. وورس و همکاران^۵ ارتباط منفی بین ارتفاع و مرگ‌ومیر را در چندین شهر بزرگ بالای ۱۶۵۰ متری آمریکا تأیید کردند [۱۰]. در سوئیس میزان مرگ‌ومیر ناشی از بیماری قلبی در ارتفاع بالای ۱۵۰۰ متر در میان زنان و مردان دیابتی نسبت به افراد ساکن در نواحی پست‌تر کاهش معنی‌داری داشته است [۱۱]. مطالعات قبلی نشان داد که قرار گرفتن رت‌های تمرین کرده در شرایط

^۳ Erythropoietin^۴ Reactive Oxygen Species^۵ Voors^۱ Glycosylation^۲ Hypoxia Inducible Factor

هیپوکسی (۱۵-۱۴٪ اکسیژن) و شبیه سازی شده با ارتفاع موجب بهبود کارکرد قلب می شود. این مورد با افزایش ۷۰ درصدی برداشت گلوکز توسط عضلات تأیید شده بود [۶]، علاوه بر این ارتفاع اثر محافظتی بر بیماری های قلبی عروقی و بیماری های مزمن ریوی داشته و نیز در مرگ و میر ناشی از سرطان و سایر بیماری ها عامل پیشگیری کننده است [۹]. سازوکار اثر آن به طور قابل توجهی هنوز ناشناخته و قابل بحث است و فقط مقالات اندکی در مورد تأثیرات ارتفاع بر شیوع مرگ و میر ناشی از بیماری های شایع قلبی عروقی و دیابت وجود دارد [۹]. در حال حاضر تأثیر ارتفاع بر بیماران دیابتی نوع دو کمتر بررسی شده است؛ در ایران نیز تحقیقات بسیار اندکی در مورد تأثیر ارتفاع شبیه سازی شده بر شاخص های متابولیکی و هماتولوژی در دیابتی ها انجام شده و انجام تحقیق در این مورد می تواند یک شناخت بهتر از فرایندهای سازشی با ارتفاع را فراهم کند. بنابراین فرض ما این است که هیپوکسی متناوب مزمن که ارتفاع حدود ۳۴۰۰ متری را شبیه سازی می کند، ممکن است متابولیسم گلوکز و چربی را تحت تأثیر قرار دهد و تغییراتی در شاخص های خونی ایجاد نماید. پس هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ارتفاع متناوب شبیه سازی شده بر شاخص های متابولیکی و هماتولوژی موش های صحرایی دیابتی شده نوع دو با استرپتوزوتوسین^۱ می باشد.

روش کار

روش تحقیق حاضر از نظر شیوه جمع آوری داده ها از نوع تجربی و طرح پس آزمون با گروه کنترل بود و از نظر هدف پژوهش، بنیادی- کاربردی می باشد.

جامعه آماری و نمونه تحقیق

در این تحقیق از موش های صحرایی نر نژاد ویستار (n=۲۴) (انستیتو پاستور، تهران) با سن حدود ۳ ماهگی در محدوده وزنی ۲۲۰ الی ۲۴۰ گرم استفاده

گردید. ابتدا موش های صحرایی به طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم بندی شدند. کنترل سالم (NC)، دیابتی (D) و دیابتی + هیپوکسی (D+H)، که در هر گروه ۸ موش صحرایی قرار داشتند. تمام موش ها در آزمایشگاه حیوانات در یک محیط کم تنش (دمای °C ۲۲-۲۰، رطوبت ۵۰ درصد و کم سر و صدا) و سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته به صورت ۴ تایی در هر قفس قرار داده شدند. ضمناً حیوانات آزادانه به آب شرب شهری و غذای فشرده مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس) به مدت دو ماه و ۲ هفته دسترسی داشتند. به منظور ایجاد حالت سازش با محیط، تمامی مداخلات پس از گذشت حداقل دو هفته استقرار حیوانات در آزمایشگاه حیوانات به انجام رسید. فرایند کلی کار با موش های صحرایی در کمیته اخلاق کار با حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تبریز به تأیید رسید.

القای دیابت

بعد از گذشت ۲ هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، برای القای دیابت نوع دو، بعد از ۲ هفته تجویز غذای پرچرب (۵۰ درصد چربی، ۲۴/۵ درصد پروتئین، ۲۵ درصد کربوهیدرات و ۵/۰ درصد مواد معدنی و ویتامین ها) که توسط محققان و با همکاری شرکت کانی دام تهیه گردید، تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین (تهیه شده از شرکت سیگما آلدריך^۲) با دوز ۳۷mg/kg در بافر سیترات ۰/۱M (pH=۴/۵) بعد از ۶ ساعت ناشتایی به دو گروه کنترل دیابتی و هیپوکسی دیابتی انجام شد و برای گروه کنترل سالم نیز همان میزان بافر تزریق شد [۱۲]. ۷۲ ساعت بعد از تزریق دارو، نمونه خونی از ورید دمی موش ها گرفته شد و گلوکز ناشتای آن ها با استفاده از گلوکومتر قابل حمل بررسی شد. موش های صحرایی که گلوکز بالاتر از ۳۰۰ mg/dl داشتند به عنوان موش های دیابتی نوع دو وارد تحقیق شدند [۱۳]. به منظور کنترل وزن، وزن کشی

^۲ Sigma Alderich

^۱ Sterptozotocin(streptozocin)

تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بی هوش شدند و با شکافتن قفسه سینه و با کمک سرنگ از قلب آن‌ها مستقیم خون گیری به عمل آمد. نمونه‌های خونی در دو لوله جداگانه، یکی دارای ماده ضد انعقاد (EDTA) جهت تهیه خون کامل و دیگری فاقد EDTA برای تهیه سرم ریخته شدند. نمونه‌های بدون EDTA در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شده و سرم‌ها بعد از تشکیل لخته با استفاده از سانتریفوژ (PECO ساخت کشور ایران) با دور ۲۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه جداسازی شدند. سرم‌ها برای آنالیزهای بیوشیمیایی در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند.

آنالیزهای بیوشیمیایی

اندازه گیری میزان گلوکز ناشتای سرم بر حسب میلی گرم بر دسی لیتر توسط روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (زیست شیمی) انجام گردید. شاخص‌های لیپیدی شامل کلسترول تام خون، کلسترول HDL و تری گلیسیرید (TG) با استفاده از کیت‌های تجاری (زیست شیمی) اندازه گیری شد. میزان کلسترول LDL با استفاده از فرمول فریدوالد^۲ به صورت زیر محاسبه گردید. تمام اندازه‌ها بر حسب میلی گرم بر دسی لیتر می‌باشد [۱۶].

$$\text{LDL-C} = (\text{HDL-C} + \text{TG}/5) - \text{کلسترول تام}$$

همچنین کلسترول VLDL از فرمول زیر به دست آمد:

$$\text{VLDL-C} = \text{TG}/5$$

آنزیم‌های ترانس آمیناز شامل آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارات آمینو ترانسفراز جهت بررسی عملکرد کبد با استفاده از روش‌های کالری متری شرکت زیست شیمی اندازه گیری شد.

موش‌های صحرایی در ابتدا، وسط و انتهای تمرینات توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۱ گرم انجام شد.

اعمال ارتفاع شبیه سازی شده

هیپوکسی در نظر گرفته شده هشت هفته بطور متناوب و افزایشی بود که ارتفاع بالای ۳۴۰۰ متر را شبیه سازی می کرد. گروه دیابتی هیپوکسی به صورت تدریجی در طول شب (سیکل روشنایی) در داخل اتاقک هیپوکسی ایزوباریک^۱ ویژه حیوانات ساخت کشور استرالیا مدل (GO2 Altitude, Biomedtech, Australia Pty.Ltd, Melbourne) قرار داده می شدند (جدول ۱). بعد از اتمام زمان هیپوکسی (۸ تا ۱۲ ساعت در شبانه روز) به محل آزمایشگاه و کنار سایر گروه‌ها قرار می گرفتند. میزان اکسیژن اتاقک، ۱۴ درصد تنظیم شد که ارتفاع ۳۴۰۰ متری را شبیه سازی می کند (ارتفاع یا هیپوکسی متوسط و فشار اکسیژن حدود ۱۰۶ میلی متر حیوه) [۱۴، ۱۵]. دو گروه غیر هیپوکسی در محل آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز با مشخصات ارتفاع حدود ۱۱۰۰ متری و فشار سهمی اکسیژن ۱۵۹ میلی متر حیوه نگهداری می شدند که مبنای مقایسه قرار گرفتند.

جدول ۱. زمان بندی قرار گرفتن موش‌های صحرایی دیابتی در اتاقک

هیپوکسی در طول ۸ هفته		
هفته	مدت (ساعت)	ارتفاع شبیه سازی شده (متر)
اول	۴	۳۰۰۰
دوم	۸	۳۴۰۰
سوم	۱۰	۳۴۰۰
چهارم	۱۲	۳۴۰۰
پنجم	۱۲	۳۴۰۰
ششم	۱۲	۳۴۰۰
هفتم	۱۲	۳۴۰۰
هشتم	۱۲	۳۴۰۰

تهیه نمونه‌های خون

۲۴ ساعت بعد از اعمال هیپوکسی (به منظور از بین رفتن اثر حاد آن) موش‌های صحرایی به وسیله

^۱ Isobaric

^۲ Friedewald's

الایزا

غلظت انسولین ناشتا به روش الایزا با استفاده از کیت تجاری (Cat.NO:E0707Ra, Bioassay Technology Laboratory) ساخت کشور کره سنجیده شد. در این کیت از روش ساندویچ مستقیم استفاده شد. آنتی‌بادی پوشیده شده در چاهک از نوع مونوکلونال و آنتی‌بادی شناساگر از نوع پلی‌کلونال بود. سپس برای محاسبه مقاومت انسولینی از فرمول $HOMA-IR^1$ به صورت زیر استفاده گردید [۱۵].

$40.5 / [(میکرو واحد در میلی‌لیتر) غلظت انسولین ناشتا \times (میلی گرم در دسی لیتر) غلظت گلوکز ناشتا]$
= مقاومت انسولینی

اندازه‌گیری شاخص‌های خونی

شاخص‌های خونی با استفاده از لوله‌های خونی حاوی EDTA توسط دستگاه سل کانتر (مدل EXIGO VET, ساخت کشور سوئد) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از آمار توصیفی به صورت میانگین $\pm$ انحراف از میانگین و جداول (با استفاده از نرم‌افزار Excel-2013) استفاده شد. برای طبیعی بودن داده‌ها از آزمون کالموگراف اسمیرنف استفاده شد. برای بررسی تفاوت‌های درون گروهی و بین گروهی از طرح آزمون آنالیز واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تحت نرم‌افزار آماری SPSS-18 استفاده شد.

یافته‌ها

اثر هیپوکسی مزمن متناوب بر شاخص‌های گلیسمیک

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، میزان گلوکز ناشتا پس از ۸ هفته در گروه دیابت 40.5 ± 3.56 می‌باشد، ولی در گروه هیپوکسی دیابتی حدود ۳۱ درصد ($24.3/25 \pm 24/52$) کاهش یافت که نشان می‌دهد هیپوکسی، سطح گلوکز ناشتا را تا حدودی بهبود می‌بخشد ($p < 0.05$). تزریق استرپتوزوتوسین (STZ) موجب کاهش معنی‌دار سطوح انسولین در گروه‌های دیابتی و دیابتی هیپوکسی شد ($p < 0.05$). میانگین وزن موش‌ها در پایان تحقیق در هر دو گروه دیابت و دیابتی هیپوکسی افزایش نشان داده ولی نسبت به گروه کنترل سالم به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) در سطح پایین‌تری قرار گرفته است که ممکن است تأییدکننده القای درست دیابت نوع ۲ باشد. متعاقب تغییرات سطح گلوکز و انسولین ناشتا، شاخص مقاومت انسولینی ($HOMA-IR$) افزایش معنی‌داری در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم نشان داد. حساسیت انسولینی ($QUICKI$) از $1/118 \pm 0.12$ در گروه کنترل سالم به 0.92 ± 0.03 در گروه کنترل دیابت کاهش معنی‌دار یافته ($p < 0.05$) ولی در گروه دیابتی هیپوکسی کاهش کمتری مشاهده شد که معنی‌دار نبود (0.98 ± 0.04).

اثر هیپوکسی مزمن متناوب بر سطح فعالیت آنزیم‌های کبدی

آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) افزایش معنی‌داری در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم داشت و هیپوکسی به طور معنی‌داری موجب تعدیل این افزایش شد ($p < 0.05$). علیرغم افزایش سطح فعالیت آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) در اثر القاء دیابت، سطح فعالیت این آنزیم در اثر هیپوکسی کاهش نشان نداد ($p = 0.28$) (جدول ۲).

¹ Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance

جدول ۲. تأثیر هیپوکسی بر وزن و برخی شاخص‌های متابولیک در موش‌های صحرایی. یافته‌ها به صورت (میانگین $\pm$ انحراف معیار) ارائه شده است.

شاخص	کنترل سالم (N=8)	کنترل دیابت (N=8)	دیابت + هیپوکسی (N=8)
وزن اولیه (g)	۲۴۵/۷۵ $\pm$ ۶/۰۴	۲۴۶/۷۵ $\pm$ ۶/۸۴	۲۳۷/۱۶ $\pm$ ۵/۷۵
وزن نهایی (g)	۲۹۸/۱۲ $\pm$ ۳/۴۹	۲۷۴/۳۷ $\pm$ ۱۰/۰۷*	۲۶۹/۸۳ $\pm$ ۹/۵۰
گلوکز ناشتا (mg/dl)	۱۰۴/۶۸ $\pm$ ۵/۵۱	۳۵۶/۵۳ $\pm$ ۴۰/۱۵*	۲۴۳/۲۵ $\pm$ ۲۴/۵۲*#
انسولین ناشتا (μ U/L)	۵/۱۰ $\pm$ ۰/۱۴	۳/۴۴ $\pm$ ۰/۲۴*	۳/۶۸ $\pm$ ۰/۳۱
شاخص حساسیت انسولینی (QUICKI)	۱/۱۸ $\pm$ ۰/۱۲	۰/۹۲ $\pm$ ۰/۰۳*	۰/۹۸ $\pm$ ۰/۰۴
شاخص HOMA-IR	۱/۳۱ $\pm$ ۰/۰۸	۳/۵۲ $\pm$ ۰/۳۸*	۲/۱۴ $\pm$ ۰/۱۸#
آسپارات ترانسفراز (U/L)	۲۰۵/۵۰ $\pm$ ۹/۷۹	۲۳۳/۸۷ $\pm$ ۲۲/۶۶	۲۶۴/۶۶ $\pm$ ۱۹/۰۷
آلانین آمینو ترانسفراز (U/L)	۵۴/۶۲ $\pm$ ۳/۵۰	۱۳۵/۲۵ $\pm$ ۶/۳۸*	۷۹/۵۰ $\pm$ ۶/۲۹#

* تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل سالم ($p < ۰/۰۵$) و # تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل دیابتی ($p < ۰/۰۵$)

اثر هیپوکسی مزمن متناوب بر شاخص‌های لیپیدی

جدول ۳ نشان می‌دهد که بعد از القای دیابت طیف وسیعی از لیپیدها بطور معنی‌دار دچار افزایش می‌شوند. همانطور که دیده می‌شود هیپوکسی موجب تعدیل افزایش اکثر شاخص‌های لیپیدی در رت‌های گروه هیپوکسی دیابت شده است. کلسترول

HDL در گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌داری یافته ولی هیپوکسی مزمن متناوب این کاهش را تعدیل کرده است ($p < ۰/۰۵$). جالب‌تر اینکه میزان VLDL-Ch حتی از گروه کنترل سالم نیز پایین تر بود ($p < ۰/۰۵$).

جدول ۳. تأثیر هیپوکسی بر پروفایل لیپیدی در موش‌های صحرایی. یافته‌ها به صورت (میانگین $\pm$ انحراف معیار) ارائه شده است

شاخص	کنترل (N=8)	دیابت (N=8)	دیابت + هیپوکسی (N=8)
تری گلیسیرید (mg/dl)	۵۰/۸۷ $\pm$ ۱/۹۷	۵۷/۳۷ $\pm$ ۲/۶۶*	۴۹/۱۶ $\pm$ ۱/۷۷#
کلسترول تام (mg/dl)	۶۷/۱۲ $\pm$ ۱/۳۱	۷۶/۰۰ $\pm$ ۱/۷۹*	۶۸/۶۶ $\pm$ ۲/۱۰#
LDL-Ch (mg/dl)	۱۷/۴۵ $\pm$ ۱/۱۹	۳۵/۷۰ $\pm$ ۲/۱۴*	۳۱/۷۰ $\pm$ ۰/۹۵#
HDL-Ch (mg/dl)	۳۹/۵۰ $\pm$ ۰/۸۱	۳۲/۸۲ $\pm$ ۰/۷۱*	۳۵/۷۰ $\pm$ ۰/۹۵*#
VLDL-Ch (mg/dl)	۱۰/۳۵ $\pm$ ۰/۸۲	۱۰/۹۷ $\pm$ ۰/۶۸	۷/۵۰ $\pm$ ۰/۵۹*#

* تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل سالم ($p < ۰/۰۵$) و # تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل دیابتی ($p < ۰/۰۵$)

اثر هیپوکسی مزمن متناوب بر میزان برخی از شاخص‌های هماتولوژیک

جدول ۴ نشان می‌دهد شمارش گلبول‌های سفید در گروه کنترل دیابتی ($۶/۱۲ \pm ۰/۸۲$) در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور معنی‌داری افزایش داشته است، ولی در گروه دیابتی هیپوکسی ($۳/۷۸ \pm ۰/۴۸$) نسبت به گروه کنترل سالم ($۳/۲۵ \pm ۰/۲۰$) افزایش معنی‌دار نبوده است. تعداد گلبول‌های قرمز در هر دو گروه دیابتی و دیابتی هیپوکسی کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم داشته است، اما مقایسه

شمارش گلبول‌های قرمز بین دو گروه کنترل دیابتی و هیپوکسی دیابتی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($p = ۰/۱۱$). بر اساس نتایج بدست آمده میزان هموگلوبین و هماتوکریت در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش معنی‌داری داشته است ($p < ۰/۰۵$). هشت هفته اعمال هیپوکسی متناوب باعث افزایش معنی‌دار در میزان هموگلوبین و هماتوکریت در گروه هیپوکسی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شده است ($p < ۰/۰۵$).

جدول ۴. تأثیر هیپوکسی مزمن متناوب بر میزان برخی از شاخص‌های هماتولوژیک گروه‌های مورد بررسی. یافته‌ها به صورت (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

ارائه شده است

شاخص	کنترل (N=8)	دیابت (N=8)	دیابت + هیپوکسی (N=8)
WBC($10^9/L$)	$3/25 \pm 0/20$	$6/12 \pm 0/82^*$	$3/78 \pm 0/48^{\#}$
HCT(%)	$38/34 \pm 0/77$	$33/51 \pm 0/61^*$	$40/83 \pm 0/83^{\#}$
Hb (g/dl)	$12/76 \pm 0/25$	$11/18 \pm 0/20^*$	$13/61 \pm 0/27^{\#}$
RBC($10^{12}/L$)	$7/03 \pm 0/24$	$6/11 \pm 0/25^*$	$5/46 \pm 0/4600^*$

WBC: گلبول سفید، HCT: هماتوکریت، Hb: هموگلوبین، RBC: گلبول قرمز.

* تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل سالم ($p < 0/05$) و $\#$ تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل دیابتی ($p < 0/05$)

بحث

در مطالعه حاضر، تزریق استرپتوزوتوسین موجب کاهش قابل توجه در سطوح انسولین و افزایش بیش از دو برابری در سطح گلوکز ناشتا در گروه دیابتی و دیابتی هیپوکسی شده است. این نتایج تأییدکننده القای درست دیابت نوع ۲ می‌باشد. این یافته با یافته‌های ژوریا^۱ و همکاران و شیردل و همکاران نیز همسو می‌باشد [۱۷، ۱۸]. در ضمن توزین رت‌ها در انتهای مطالعه نشان داد که گروه‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم وزن‌گیری کمتری داشتند که می‌تواند مرتبط با کاهش انسولین ناشتا باشد. انسولین به عنوان یک هورمون آنابولیک در ساخت عضله و مهار لیپولیز نقش کلیدی دارد [۵]. در پژوهش انجام‌شده توسط اوو^۲ و همکاران، رت‌های دیابتی شده نرخ متابولیسم پایه (BMR^3) بالاتری در مقایسه با گروه کنترل داشتند. افزایش BMR در گروه دیابتی به افزایش تجزیه لیپیدها و پروتئین‌ها نسبت داده می‌شود [۱۹]. از این رو کاهش وزن گروه‌های دیابتی می‌تواند متأثر از اثرات گفته شده باشد.

میزان گلوکز ناشتا در گروه هیپوکسی دیابتی پس از ۸ هفته تحمل هیپوکسی متناوب به صورت قابل توجهی کاهش یافت. همزمان با آن میزان شاخص

مقاومت انسولینی (HOMA-IR) که بعد از القاء

دیابت افزایش داشت؛ با هیپوکسی متناوب به مدت هشت هفته به طور چشمگیری تعدیل شد. علیرغم کاهش مقاومت انسولینی در اثر هیپوکسی، شاخص حساسیت به انسولین تغییر معنی‌دار نشان نداد. این یافته‌ها با نتایج تحقیق دیون والد^۴ و همکاران همسو می‌باشد [۶]. این تغییرات نشان‌دهنده کنترل نسبی دیابت می‌باشند که به دنبال افزایش برداشت گلوکز با هیپوکسی اتفاق می‌افتد. این یک نتیجه کاربردی قابل توجه بوده و البته مطالعات کمی در این زمینه انجام شده است. ارتباط دادن هیپوکسی متناوب و تغییرات میزان گلوکز خون سخت است و به مطالعات بیشتری نیاز دارد ولی آنچه واضح است این است که در شرایط هیپوکسی متناوب، سازگاری بافتی سلول با شرایط دیابتی بیشتر می‌شود [۱۹]. ممکن است هیپوکسی متناوب با افزایش انتقال‌دهنده‌های گلوکز میزان برداشت گلوکز بافت‌ها را بهبود بخشد، البته دیده شده که هیپوکسی فعالیت سمپاتیکی را کاهش می‌دهد و از این راه نیز موجب مصرف گلوکز بیشتر می‌شود [۶]. از طرف دیگر انسولین، ورزش و هیپوکسی محرک‌های اصلی بسیج $GLUT4^5$ به غشای سلول عضلانی می‌باشند. $GLUT4$ اصلی‌ترین ایزو فرم انتقال‌دهنده گلوکز در قلب و عضلات می‌باشد و هیپوکسی سیگنالینگ انتقال $GLUT4$ را

¹ Zguira

² Owu

³ Basal Metabolism Rate

⁴ Duennwald

⁵ Glucose Transporter 4

تحریک می‌کند و جذب گلوکز کل بدن را بالا می‌برد. هیپوکسی باعث افزایش انتقال GLUT4 به سطح غشای پلاسمایی از دو راه می‌شود: اول، انرژی مورد نیاز برای انقباض عضله از طریق تبدیل ATP به ADP و AMP تأمین می‌شود و افزایش سطوح AMP، یک پروتئین کیناز (AMPK)^۱ را فعال می‌کند که به عنوان گیرنده انرژی سلولی شناخته می‌شود. AMPK انتقال GLUT4 را از طریق دو پروتئین پایین‌دستی AS160 و PKC^۲ تحت تأثیر قرار می‌دهد. بر خلاف انسولین که اگزوسیتوز GLUT4 را به هنگام افزایش گلوکز پلاسما تسریع می‌کند، AMPK در هنگام کاهش سطوح انرژی بدن، اندوسیتوز GLUT4 را کاهش می‌دهد تا هزینه انرژی سلولی با تحریک جذب گلوکز برای اکسیداسیون تأمین شود. با افزایش حساسیت انسولینی یا افزایش GLUT4 در سطح غشای سلولی برداشت گلوکز از خون بیشتر می‌شود [۲۰].

دوم: هیپوکسی و انقباض عضلانی موجب رهاسازی کلسیم از شبکه اندوپلاسمیک به سیتوپلاسم شده و با تحریک پیامبر ثانویه (کلسیم کالمودولین) موجب فعال‌سازی احتمالی aPKC شده و مستقل از AMPK جذب گلوکز به درون سلول را افزایش می‌دهد، اما هنوز به طور کامل شناخته‌شده نیست [۲۱، ۲۲]. فعال‌شدن AMPK و کلسیم کالمودولین، موجب انتقال GLUT4 به سطح غشا شده و جذب گلوکز را افزایش می‌دهد، به عبارت دیگر حساسیت انسولینی بالاتر رفته و قند خون ناشتا، همانطور که در یافته‌های این تحقیق نیز مشاهده شد، کاهش معنی‌داری پیدا کرد.

سطح فعالیت سرمی آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) به عنوان شاخص عملکردی کبد در دیابت، افزایش می‌یابد و در این تحقیق علاوه بر تأیید این مطلب در

گروه کنترل دیابتی نیز مشاهده شده است که هیپوکسی متناوب سطح فعالیت سرمی این آنزیم را به طور معنی‌داری نسبت به گروه دیابتی کاهش داده است. دیابت نوع ۲ موجب افزایش اتکای بیش از حد به متابولیسم چربی‌ها می‌شود. در نتیجه میزان غلظت کلسترول تام، LDL-Ch، VLDL-Ch و تری‌گلیسرید در دیابت بالا می‌رود که در این تحقیق نیز مشاهده شد. غلظت کلسترول تام، LDL-Ch و VLDL-Ch تری‌گلیسرید در گروه هیپوکسی در مقایسه با گروه دیابتی به طور معنی‌داری پایین‌تر بود و HDL-Ch بعد از القای دیابت کاهش معنی‌داری یافت، ولی هیپوکسی متناوب موجب تعدیل این کاهش گردید (جدول ۳). جالب‌تر اینکه میزان VLDL-Ch حتی از گروه کنترل سالم نیز پایین‌تر بود ($p < 0.05$). این نتایج با یافته‌های لیپل^۳ و همکاران همسو می‌باشد، ولی برخی تحقیقات نیز نشان داده‌اند که قرار گرفتن در ارتفاع، تغییر معنی‌داری در پروفایل لیپیدی نمی‌گذارد و یا حتی اثرات زیان‌باری دارد. که علت آن را می‌توان به ۱- متفاوت بودن نمونه‌ها؛ ۲- متفاوت بودن سطح ارتفاع؛ و ۳- مدت قرارگیری در هیپوکسی در این تحقیقات نسبت داد [۲۳، ۲۴]. بنابراین در این تحقیق هیپوکسی تدریجی و متناوب در نظر گرفته شد که ارتفاع ۳۴۰۰ متری را شبیه‌سازی می‌کند. مزیت این نوع ارتفاع این است که نه خیلی بالا است تا منجر به افزایش استرس‌های اکسایشی شود، نه خیلی پایین است که تأثیرگذاری کمتری داشته باشد. همچنین به دلیل متناوب بودن، رت‌ها بهتر می‌توانستند سازگار شوند [۶]. دلایل دقیق تأثیر هیپوکسی بر متابولیسم چربی و گلوکز هنوز ناشناخته‌اند ولی نتیجه به دست آمده در این تحقیق را می‌توان به بهبود متابولیسم گلوکز (به دلیل افزایش میزان GLUT4) و کاهش احتمالی اتکا به متابولیسم لیپیدها در هیپوکسی ارتباط داد [۲۱]. در شرایط هیپوکسی سلول متابولیسم چربی‌ها را کاهش

^۱ 5'-Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase

^۲ Atypical Protein Kinase C

^۳ Lippl

می‌دهد و به متابولیسم گلیکولیز بی‌هوازی روی می‌آورد [۹]. آثار سازگاری به ارتفاع می‌تواند توضیحی در پایین بودن کلسترول و لیپوپروتئین کم چگال (LDL) نسبت به گروه کنترل باشد [۲۵]. برخی تحقیقات نیز نشان داده‌اند که هیپوکسی با ترشح لپتین موجب کاهش اشتها شده است [۲۶].

شاخص‌های خونی^۱ در دیابت ملیتوس اغلب دچار اختلال می‌شوند. از جمله این پارامترها می‌توان به هماتوکریت، پروتئین‌های پلاسما، تراکم گلبول قرمز و تغییر شکل آن‌ها اشاره کرد [۳]. کاهش در تعداد گلبول‌های سفید و قرمز بعد از القای دیابت نشانه آنمی دیابتی است که در مطالعات مشابه دیگر نیز دیده شده است [۳]. در این مطالعه شمارش گلبول‌های سفید در گروه هیپوکسی دیابتی به سطح گروه کنترل سالم نزدیک‌تر شد که بهبود وضعیت التهابی را نشان می‌دهد که معمولاً در کنترل دیابت دیده می‌شود [۶]. هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش معنی‌داری یافت ($p < 0.05$). محمدی و همکاران نیز نشان دادند که این شاخص‌ها در رت‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معنی‌داری می‌یابد [۲۷]. نتیجه این کاهش، می‌تواند اختلال و پایین‌آمدن سطح حمل‌ونقل اکسیژن و عفونت‌های مکرر باشد [۲۷]. ولی میزان هموگلوبین و هماتوکریت در گروه هیپوکسی دیابتی افزایش قابل‌توجه داشت و این افزایش را می‌توان ناشی از القای آنزیم دلتا آمینو لوولنیک اسید رداکتاز^۲ به عنوان آنزیم کلیدی در ساخت هم^۳، توسط هیپوکسی دانست، ماده اخیر در ساخت پروتوپورفیرین^۴ به عنوان پیش ساز هم شناخته می‌شود [۲۸]. این نتیجه

با یافته‌های بیسواز^۵ و همکاران همسو می‌باشد [۲۹]. همچنین سیمسون^۶ و همکاران نشان دادند که HIF^۷ موجب افزایش غلظت هموگلوبین در میان ساکنین ارتفاع بالا نسب به افراد بومی سطح دریا می‌شود [۳۰]. اما علیرغم افزایش در میزان هموگلوبین، شمارش گلبول‌های قرمز در میان گروه کنترل دیابتی و هیپوکسی دیابتی تفاوت معنی‌دار نشان نداد. در افراد سالم انتظار می‌رود که با افزایش هیپوکسی به دلیل آزادشدن اریتروپوئین و افزایش فاکتور القاشونده با هیپوکسی (HIF-1) میزان ساخت گلبول‌ها و به دنبال آن تعداد گلبول‌ها افزایش یابد. اما در رت‌های دیابتی HIF-1 دچار نقص می‌شود [۳۱] و نهایتاً اریتروپوئین نمی‌تواند موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز شود. از طرف دیگر بطور همزمان هموگلوبین گلیکولیزه در دیابت و پروکسیداسیون چربی‌ها در دیابت موجب همولیز گلبول‌های قرمز و آنمی می‌گردد [۲۷]. این مطلب در نتایج گروه هیپوکسی+دیابت که هموگلوبین بالا و شمارش کمتر RBC داشتند، تأیید شد. با این تفاسیر به نظر می‌رسد قرارگرفتن در معرض هیپوکسی می‌تواند در میزان ساخت هموگلوبین تأثیر داشته باشد. با توجه به عدم تغییر در تعداد گلبول‌های قرمز نسبت به گروه کنترل دیابتی نمی‌توان اذعان کرد که هیپوکسی مزمن متناوب در تعدیل برخی اختلالات شاخص‌های خونی در دیابتی‌ها می‌تواند اثرگذار باشد. در ضمن به دلیل اینکه تحقیقات در مورد تأثیر ارتفاع بر دیابتی‌ها اندک است و به جرئت می‌توان گفت این تحقیق در ایران برای اولین بار انجام گرفته است، لذا اظهارنظر در خصوص همسوبودن یا ناهمسوبودن و دلایل آن بسیار مشکل است.

¹ Hemorheological

² Δ -ALA reductase

³ Heme

⁴ Protoporphyrin

⁵ Biswas

⁶ Simonson

⁷ Hypoxia Inducible Factor

نتیجه‌گیری

قرار گرفتن در معرض هیپوکسی متوسط به طور متناوب و مزمن موجب کنترل شاخص‌های دیابتی در موش‌های صحرایی دیابتی شد. همچنین به نظر می‌رسد ارتفاع با افزایش میزان متابولیسم گلوکز موجب اتکای کمتر به متابولیسم چربی شده و شاخص‌های لیپیدی سرم خون را تعدیل کرده است. اما در رابطه با شاخص‌های خونی علیرغم افزایش معنی‌دار هموگلوبین و هماتوکریت در گروه هیپوکسی دیابتی، تعداد گلبول‌های قرمز نسبت به

گروه کنترل دیابتی در هیپوکسی افزایش نداشت که نیاز به مطالعات بیشتر احساس می‌شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر از ریاست محترم دانشکده تربیت بدنی دانشگاه تبریز و مسئولین آزمایشگاه علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تبریز که در انجام این تحقیق کمال همکاری و حمایت را انجام دادند. این مقاله مستخرج از رساله مهدی فراموشی، دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزشی دانشکده تربیت بدنی دانشگاه تبریز می‌باشد.

References

- 1- Dey L, Attele AS. Type 2 diabetes. Tradit Chinese Med. 2011 Feb; 231(1):1-16.
- 2- Tamariz LJ, Young JH, Pankow JS, Yeh HC, Schmidt MI, Astor B, et al. Blood viscosity and hematocrit as risk factors for type 2 diabetes mellitus: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Am J Epidemiol. 2008 Oct; 168(10):1153-1160.
- 3- Cho YI, Mooney MP, Cho DJ. Hemorheological disorders in diabetes mellitus. J diabetes Sci Technol. 2008 Nov; 2(6):1130-1138.
- 4- Boulton AJM, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. Diabetes Care 2004 Oct; 27(6):1458-1486.
- 5- Shamsi M, Sharifirad G, Kachoyee A, Hassanzadeh A. Influence of walking training on haemoglobin glucosile and fasting blood sugar levels in women with type 2 diabetes. Koomesh. 2010 Feb; 11(2):99-105. [Full text in persian].
- 6- Duennwald T, Gatterer H, Groop PH, Burtscher M, Bernardi L. Effects of a single bout of interval hypoxia on cardiorespiratory control and blood glucose in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2013 Aug; 36(8):2183-2189.
- 7- Heather LC, Clarke K. Metabolism, hypoxia and the diabetic heart. J Mol Cell Cardiol. 2011 Jan; 50(4):598-605.
- 8- Brookhart MA, Schneeweiss S, Avorn J, Bradbury BD, Rothman KJ, Fischer M, et al. The effect of altitude on dosing and response to erythropoietin in ESRD. J Am Soc Nephrol. 2008 Jan; 19(7):1389-1395.
- 9- Burtscher M. Effects of living at higher altitudes on mortality, a narrative review. Aging Dis. 2014 Dec; 5(4):274-280.
- 10- Voors AW, Johnson WD. Altitude and arteriosclerotic heart disease mortality in white residents of 99 of the 100 largest cities in the United Stats. J Chronic Dis. 1979 Feb; 32(1):157-162.
- 11- Faeh D, Gutzwiller F, Bopp M. Lower mortality from coronary heart disease and stroke at higher altitudes in Switzerland. Circulation. 2009 Aug; 120(2):495-501.
- 12- Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, 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 May; 52(4):313-320.
- 13- Monazzami A, Rajabi H, Omidfar K, Mostafaie A. Enduraence traning increases skeletal muscle NA/H⁺ exchanger1 (NHE1) and NA/HCO₃ CO-Transporter1 (NBC1) gene expressions in type2 diabetic rat. Iran J Diabetes Metab. 2014 Autumn; 13(5):400-412. [Full text in persian].
- 14- Azali Alamdari K, Rohani H. Effects of normobaric and hypobaric endurance training on metabolic risk factors in midlife men. Iran J Endocrinol Metab. 2015 Summer; 17(2):113-123 [Full text in persian].

- 15- Mackenzie R, Maxwell N, Castle P, Elliott B, Brickley G, Watt P. Intermittent exercise with and without hypoxia improves insulin sensitivity in individuals with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jan; 97(4):546-555.
- 16- Mohamad HE, Askar ME, Hafez MM. Management of cardiac fibrosis in diabetic rats; the role of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gamma) and calcium channel blockers (CCBs). *Diabetol Metab Syndr*. 2011 Feb; 3(1):1-12.
- 17- Zguira MS, Vincent S, Le Douairon Lahaye S, Malarde L, Tabka Z, Saïag B. Intense exercise training is not effective to restore the endothelial NO-dependent relaxation in STZ- diabetic rat aorta. *Cardiovasc Diabetol*. 2013 Jan; 12(32):1-8.
- 18- Shirdel Z, Mirbadalzadeh R, Madani H. Antidiabetic and antilipidemic effect of ginger in alloxan monohydrate diabetic rats in comparison with glibenclamide. *Iran J Diabetes Lipid Disord*. 2009 Spring; 9(1):7-15. [Full text in persian].
- 19- Owu DU, Antai AB, Udofia KH, Obembe AO, Obasi KO, Eteng MU. Vitamin C improves basal metabolic rate and lipid profile in alloxan-induced diabetes mellitus in rats. *J Biosci*. 2006 Aug; 31(1):575-579.
- 20- Charles Tipton M. *ACSM s advanced exercise physiology*; American college of sports medicine, New York: Lippincott Williams & Wilkins. 2006;120-139.
- 21- Chen YC, Lee SD, Ho LT, Kuo CH. The effects of altitude training on the AMPK-related glucose transport pathway in the red skeletal muscle of both lean and obese zucker rats. *High Alt Med Biol*. 2011 Nov; 12(4):371-378.
- 22- Gerald P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Aug; 106(8):1319-1331.
- 23- Schobersberger W, Schmid P, Lechleitner M, Von Duv-illard SP, Hörtnagl H, Gunga HC, et al. The effects of moderate altitude (1,700 m) on cardiovascular and metabolic variables in patients with metabolic syndrome. *Eur J Appl Physiol*. 2003 Feb; 88(3):506-514.
- 24- Li J, Grigoryev DN, Ye SQ, Thorne L, Schwartz AR, Smith PL, et al. Chronic intermittent hypoxia upregulates genes of lipid biosynthesis in obese mice. *J Appl Physiol*. 2005 Jul; 99(5):1643-1648.
- 25- Lippel FJ, Neubauer S, Schipfer S, Lichter N, Tufman A, Otto B et al. Hypobaric hypoxia causes body weight reduction in obese subjects. *Obes. (Silver Spring)*. 2010 Apr; 18(2):675-681.
- 26- Zaccaria M, Ermolao A, Bonvicini P, Travain GV, Varnier M. Decreased serum leptin levels during prolonged high altitude exposure. *Eur J Appl Physiol*. 2004 Apr; 92(4):249-253.
- 27- Mohammadi M, Mazloomi SM, Tanideh N, Zadeh AR. The effects of probiotic soymilk fortified with Omega-3 on blood glucose, lipid profile, haematological and oxidative stress, and inflammatory parameters in streptozotocin nicotinamide-induced diabetic rats. *J Diabetes Res*. 2015 Mar; 2015(2):1-9.
- 28- Poleshko AG, Lobanok ES, Mezhevnikina LM, Fesenko EE, Volotovskii ID. The process of heme synthesis in bone marrow mesenchymal stem cells cultured with fibroblast growth factor bFGF and under hypoxic conditions. *Biophysics (Oxf)*. 2014 Feb; 59(6):913-917.
- 29- Biswas H, Saha R, Biswas N. Hematologic and body fluid changes during simulated high altitude exposure in naproxen-treated rats. *Japanese J Biol*. 1996 Feb; 46(5):67-73.
- 30- Simonson TS, Huff CD, Witherspoon DJ, Prchal JT, Jorde LB. Adaptive genetic changes related to hemoglobin concentration in native high altitude Tibetans. *Exp Physiol*. 2015 Nov; 100(1):1263-1268.
- 31- Thangarajah H, Vial IN, Grogan RH, Yao D, Shi Y, Januszyk M, et al. HIF-1 α dysfunction in diabetes. *Cell Cycle*. 2010 Jan; 9(1):75-79.