

Diyabetik Kardiyomiyopatide Kronik İlimli Egzersizin İskemi - Reperfüzyon Hasarına Etkisi

Effect of Chronic Moderate Intensity Exercise on Ischemia - Reperfusion Injury in Diabetic Cardiomyopathy

© Fırat Akat¹, © Göktuğ Ömercioğlu¹, © Hakan Fıçıcılar¹, © Hasan Çalışkan², © Metin Baştuğ¹

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

Öz

Amaç: Diyabet hiperglisemi ile karakterize yaygın metabolik bir rahatsızlıktır. Diyabetiklerde kalp, iskem/reperfüzyon (I/R) hasarına karşı daha hassas hale gelmektedir. Kalpte meydana gelen bu bozulmanın nedeninin diyabete bağlı oksidatif stres artışı olduğu düşünülmektedir. Uygun şiddet ve sıklıkta uygulanan egzersiz oksidatif stresi azaltmakta ve I/R hasarına karşı koruyucu etki göstermektedir. Çalışmamızda kronik ilimli egzersizin diyabette I/R hasarı ve oksidatif stres üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 10 haftalık erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır (n=36). Hayvanlar rastgele dört gruba ayrılmıştır: Kontrol (K), Egzersiz (EX), Diyabet (DM), Diyabet+Egzersiz (DM+EX). Tip 1 diyabet streptozotosin (50 mg/kg) enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. Hayvanlara artımlı yük testi uygulanarak maksimum egzersiz kapasiteleri (MEK) belirlenmiştir. Hayvanlar MEK değerlerinin %70'ine denk gelecek şekilde günde 45 dakika haftada 5 gün olacak şekilde 12 hafta boyunca egzersiz yapmışlardır. Hayvanların kalpleri Langendorff düzeneğine alınmış 30 dakika global iskem/120 dakika reperfüzyon uygulanmıştır. Sol ventrikül gelişimsel basıncı, kalp hızı, hız-basınç çarpımı parametreleri ölçülmüştür. Alınan plazma ve sol ventrikül örneklerinde total oksidan ve antioksidan status, tiyol disülfid düzeyi ölçümleri yapılmıştır.

Bulgular: Kalp ağırlığı/Vücut ağırlığı verileri incelendiğinde diyabetik hayvanlarda diyabete bağlı hipertrofi geliştiğini, egzersizin hipertrofiyi engelleyemediği anlaşılmıştır. DM grubunda kontrole göre iskem sonrası toparlanma cevabında bozulma görülmüştür. EX grubunda iskemiye tolerans K grubuna göre artarken, DM+EX grubunda K ve DM grubuna göre anlamlı derecede daha kötü toparlanma cevabı gözlenmiştir. Hem plazma hem de sol ventrikül dokusunda ölçülen oksidatif stres verilerinde herhangi bir anlamlı değişime rastlanmamıştır.

Sonuç: Kullanılan egzersiz protokolünün diyabetin yol açtığı I/R hassasiyetini daha da ilerlettiği anlaşılmaktadır. Non-diyabetik hayvanlarda uygulanan egzersizin kardiyoprotektif etkinliği gözlenirken, diyabetik hayvanlara uygun bir protokol olmadığı anlaşılmıştır. Oksidatif strese anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir. İlerleyen çalışmalarda örneklem genişliğinin büyütülmesi ve daha düşük egzersiz şiddeti ile çalışılması ile değerli sonuçlar elde edilebilir.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Egzersiz, Oksidatif Stres, İskem/Reperfüzyon

Abstract

Objectives: Diabetes is a common metabolic disorder characterized by hyperglycemia. In diabetics, the heart becomes more susceptible to ischemia/reperfusion (I/R) injury. The reason for this deterioration in the heart is oxidative stress increase due to diabetes. Exercise applied at appropriate intensity and frequency reduces oxidative stress and has a protective effect against I/R damage. In our study, the effects of chronic moderate exercise on I/R damage and oxidative stress in diabetes were investigated.

Materials and Methods: Ten-week-old male Wistar albino rats were used in the study (n=36). Animals were randomly divided into four groups: Control (K), Exercise (EX), Diabetes (DM), Diabetes+Exercise (DM+EX). Type I diabetes was induced by injection of streptozotocin (50 mg/kg). The

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Fırat Akat

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Tel.: +90 541 292 00 85 E-posta: akatfirat@gmail.com ORCID ID: orcid.org/0000-0003-1609-6847

Geliş Tarihi/Received: 25.02.2022 Kabul Tarihi/Accepted: 12.04.2023

©Telif Hakkı 2023 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.



Abstract

exercise capacity (MEC) was determined by applying the incremental load test. Animals exercised 45 minutes/day, 5 days/week, for 12 weeks, corresponding to 70% of their MEC. Hearts were removed and placed in the Langendorff apparatus and 30 minutes of global ischemia/120 minutes of reperfusion was applied. Left ventricular developmental pressure, heart rate, rate-pressure product parameters were measured. Total oxidant and antioxidant status, thiol disulfide levels were measured in the plasma and left ventricular samples.

Results: According to heart weight/body weight data, diabetes-induced hypertrophy developed in diabetic animals, and exercise could not prevent hypertrophy. The recovery after ischemia was impaired in the DM group, while it was increasing in the EX group compared to the K. A significantly worse recovery response was observed in the DM+EX group compared to the K and DM. No significant changes were found in the oxidative stress data both in the plasma and left ventricle samples.

Conclusion: Current exercise protocol increased diabetes-induced I/R sensitivity. While there was a cardioprotective effect in EX, the protocol was not a suitable protocol for diabetics. No significant change in oxidative stress was observed. In future studies, valuable results can be obtained by enlarging the sample size and preferring lower exercise intensity.

Key Words: Diabetes, Exercise, Oxidative Stress, Ischemia/Reperfusion

Giriş

Diabetes mellitus glikoz metabolizmasındaki bozukluklar, insülin etkinliği ve/veya salgısında meydana gelen değişimler nedeniyle kronik hiperglisemi ile kendini gösteren, sık rastlanan, metabolik bir hastalıktır (1). Günümüzde hareketsiz yaşam tarzı ve kötü beslenme alışkanlıkları nedeniyle diyabet hastalığı oldukça büyük bir toplum sağlığı problemi haline gelmiştir. 2030 yılı itibarıyla dünya çapında 366 milyon insanın diyabetik olacağı öngörülmektedir (2).

Diyabette kardiyovasküler komplikasyonlar en önemli morbidite ve mortalite nedenleri arasındadır (3). Diyabetik bireylerde kalp, iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarına karşı daha hassas hale gelmekte ve iskemi sonrası toparlanma cevabında azalmalar görülmektedir (4-7). Literatürde, I/R uygulaması sonrası, diyabetik hayvanların infarkt alanlarının kontrol hayvanlarına göre daha büyük olduğu gözlenmiştir (8). Streptozotosin (STZ) enjeksiyonu ile diyabet yapılan kemirgenlerde oksidatif stres artışına paralel I/R hasarı artışı saptanmış, antioksidan etkinliği bilinen maddelerin uygulanması I/R hasarında azalmaya neden olmuştur (7,9,10). Diyabetiklerde görülen I/R hasarındaki artışın en önemli nedeni artmış kronik, bazal oksidatif strestir (11).

Oksidatif stres artışı, reaktif oksijen türevleri (ROS) adı verilen, hücrelerde oksidatif metabolizma sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerin artması veya bu radikalleri tamponlama görevi gören antioksidan enzim sistemlerinde meydana gelen bozulmalar nedeniyle gerçekleşir. Artmış oksidatif stres hücrenin yaşamsal faaliyetleri için kritik önemde olan proteinler, nükleik asitler gibi moleküllerin hasar görmesine neden olur (12). Diyabetik insan ve hayvan çalışmalarında oksidatif stresin hem doku düzeyinde hem de plazmada artış gösterdiği bildirilmektedir (6,13-16).

Düzenli yapılan egzersizin insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri bilinmektedir. Aerobik egzersiz, görece düşük şiddette sürdürülen ve enerji ihtiyacının temelde oksidatif süreçlerden

karşılandığı, anaerobik egzersiz ise maksimale yakın efor gerektiren, genellikle glikolitik metabolizmanın baskın olduğu egzersiz tipidir (17). Literatürde egzersizin I/R hasarını iyileştirici etkisi hem insan çalışmalarında hem de deney hayvanı modellerinde defalarca gösterilmiştir (18-22). Her ne kadar egzersizin I/R hasarı üzerindeki yararlı etkileri bilinse de sağlıklı veya kronik hastalığı olan (diyabetik, dislipidemik, hipertansif, vb.) gruplarda doğru egzersiz protokolünün belirlenmesi hala üzerinde araştırma yapılan bir alandır. Her ne kadar anaerobik egzersiz önkoşullama etkisi ile kardiyak ve metabolik süreçlerde potent bir etkiye sahip olsa da, kronik hastalığı olan gruplarda olumsuz etkilere neden olabilmektedir (23). Bu nedenle çalışmamızda orta şiddette egzersize karşılık gelen bir egzersiz protokolü seçilmiştir.

Çalışmamızın amacı STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda egzersizin kardiyak I/R hasarı üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda, 12 haftalık kronik, orta şiddette yapılan ve hayvanların maksimal egzersiz kapasitesine (MEK) göre planlanan koşu egzersizinin diyabetin yaratacağı kardiyak I/R hassasiyetini engelleyeceğini hipotezlenmektedir.

Egzersizin (egzersiz şiddeti, tipi ve yoğunluğuna bağlı olarak) genellikle antioksidan savunma sistemlerini güçlendirip, ROS'lerin üretimini azaltarak oksidatif stresi azalttığı bilinmektedir (24-26). Seçilen egzersiz protokolünün sıçanlarda oksidatif stresi azaltacağını ve bu azalmanın da I/R hasarında koruyucu bir etki göstereceği öngörülmektedir.

Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanları ve Etik Kurul İzni

Çalışmada erkek, yetişkin (10 haftalık), Wistar albino (*Rattus norvegicus*) cinsi sıçanlar kullanılmıştır (n=36). Hayvanlar, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiş, sabit sıcaklık (22-24 °C), ve nemin (%50-55), bulunduğu hayvan laboratuvarımızda 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde barındırılmıştır.

Hayvanların standart sıçan yemine ve musluk suyuna sınırsız (*ad libitum*) erişimleri sağlanmıştır. Hayvan kullanım izni ve deney protokollerinin etik ilkelere uygunluğu Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (karar no: 2017-4-25, tarih: 19/02/2016). Hayvanlara yapılan tüm işlemler ve verilerin sunumu ARRIVE Guidelines (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition) bildirgesine uygun olarak yapılmıştır (27).

Laboratuvara gelen hayvanlar bir haftalık adaptasyonun ardından hayvanlar rastgele dört gruba ayrılmışlardır. Gruplar:

1. Kontrol (K) (n=9).
2. Egzersiz (EX) (n=9).
3. Diyabet (DM) (n=9).
4. Diyabet + Egzersiz (DM+EX) (n=9).

Deneysel Tip 1 Diyabetin Oluşturulması

STZ (Sigma-Aldrich, Missouri, ABD, S0130-1G) 0,1 M sitrat tamponu (pH 4,5) içerisinde çözüldükten sonra tip 1 diyabet yapılacak hayvanlara 50 mg/kg dozunda intraperitoneal (*i.p.*) olarak enjekte edilmiştir (28). Enjeksiyonu takip eden 1, 3 ve 7. günlerde kuyruk ucundan ufak bir kesi yapılarak glikometre (On Call Plus Glucometer, Acon Labs Inc. ABD) ile kan glikozu ölçümü yapılmış, her üç ölçümü de 250 mg/dL ve üstü olan hayvanlar diyabet olarak kabul edilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Bu düzeyi sağlayamayan hayvanlar çalışma dışı bırakılmışlardır. Hayvanlar diyabet tanısını aldıktan bir hafta sonra (enjeksiyondan sonraki 7. gün) egzersiz programına alınmışlardır. Hayvanların kan şekeri ve vücut ağırlıkları düzenli olarak takip edilmiştir.

Artımlı Yük Testi ve Antrenman Programı

Antrenman programının başlangıcında egzersiz yapacak hayvanların MEK değerlerini belirlemek için artımlı yük testi uygulanmıştır (29). Artımlı yük testine hayvanlar düşük iş yükünde başlatılmış (5 m/dak ve 0° eğim), her üç dakikada bir hız 3 m/dakika veya eğim 2° artırılarak iş yükü artışı sağlanmıştır. Hayvanın elektriksel ve mekanik uyarıya rağmen devam etmeyi reddettiği iş yükü ilgili hayvanın MEK değeri olarak kabul edilmiştir. Antrenman programındaki egzersiz şiddeti her hayvan için kendi MEK değerinin %70'ine karşılık gelecek şekilde belirlenmiştir. Artımlı yük testi antrenman programının 3, 6 ve 9. haftalarında tekrarlanmış ve egzersiz şiddetleri yeni değerlere göre tekrar ayarlanmıştır. Antrenman programı süresince koşu bandının eğimi hep sabit tutulmuş (10°), egzersiz şiddetini değiştirmek için hayvanların koşu hızları artırılıp veya azaltılmıştır. Antrenman programı günde 45 dakika, haftada 5 gün olacak şekilde 12 hafta boyunca sürdürülmüştür. Günlük antrenmanın başında eğim ve hızın yavaş yavaş artırıldığı 7,5 dakikalık bir ısınma periyodu, antrenmanın sonunda ise aksine yavaş yavaş azaltıldığı 7,5 dakikalık bir soğuma periyodu uygulanmıştır.

Hayvanların Sakrifikasyonu

Son egzersiz seansından 24 saat sonra, ağırlık ve kan şekeri ölçülen hayvanlar sodyum tiopental (*i.p.*; 50 mg/kg) ile anestezi altına alınmış. Parmak kısırtma yanıtlarının kaybolması ile anestezi derinliğinin sağlandığı anlaşılmış, ardından, hayvanların göğüs kafesleri hızlıca açılarak kalpleri izole kalp fonksiyonu ve I/R çalışmasında kullanılmak üzere çıkartılmıştır. Göğüs kafesine dolan kan toplanarak kırmızı kapaklı tüpe alınmış, 5000 g, +4 °C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Elde edilen serum ileri analizler için -80 °C'de saklanmış, izole kalp fonksiyonu çalışmasında kullanılan kalp dokuları, çalışma sonrasında sıvı azot ile dondurularak -80 °C'de saklanmıştır.

İzole Kalp Fonksiyonu ve I/R

Langendorff düzeneğinde yapılan deneyler literatürdeki veriler ışığında tasarlanmıştır (30). Kısaca özetlemek gerekirse, hızlıca çıkartılan kalpler önceden karbojen ile gazlandırılmış (%95 O₂ ve %5 CO₂), buz üzerinde bekleyen, soğuk Krebs-Henseleit (mM: 119 NaCl, 4,8 KCl, 1,6 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 20 NaHCO₃, ve 10 glukoz, ve pH 7,4) çözeltisi içerisine alınmış, böylece soğunun yarattığı kardiyoplejik etkiden yararlanılarak kalplerin Langendorff düzeneğine bağlanana kadar geçen sürede gördüğü zarar en aza indirilmiştir. Kalp ağırlığı, düzeneğe bağlanmadan önce solüsyon içerisinde tartılmıştır. Ardından kalpler Langendorff düzeneğindeki ilgili kanüle aorttan bağlanmıştır. Langendorff sistemi içerisinde bulunan Krebs-Henseleit solüsyonu deney süresince karbojen (%95 O₂ ve %5 CO₂) ile gazlandırılmış ve sıcaklığı sabit sıcaklıkta (37 °C) tutulmuştur. Kalpler deney boyunca belirli bir hızda aorttan bağlanan kanül ile ters yönlü perfüze edilmişlerdir (retroperfüzyon).

Perfüzyon hızı kalbin yüzey alanına göre ilgili formül kullanılarak hesaplanmıştır (perfüzyon hızı=7,43 x kalp ağırlığı^{0,56}). Sol atrium dokusu kesilerek uzaklaştırılmış ve açılan yarıktan sol ventrikülün içerisine içi su dolu, ince bir tüpe bağlı elastik bir balon yerleştirilmiştir. Balon sol ventrikülün içerisine belirli bir basınç değerine kadar (=diastolik basınç ≈8-10 mmHg) şişirilerek, ventrikül duvarını sarması sağlanmıştır. Balona bağlı içi su dolu ince tüp ile elektronik bir basınçölçer (transducer) iletilen basınç değişimleri Biopac MP35 (Biopac Syst. CA, USA) sistemi ile dijital ortamda kayıt altına alınmıştır. Deneylere başlamadan önce kalp dokusunun stabilize olması için 20 dakika beklenmiştir.

Bazal (iskemi öncesi) kalp fonksiyonu kayıtlarının elde edilmesinin ardından kalbin perfüzyonu 30 dakika boyunca durdurularak global iskemi uygulaması yapılmıştır. Global iskeminin ardından 120 dakika boyunca reperfüzyon uygulaması yapılarak deney tamamlanmıştır. Elde edilen basınç değişimi grafiklerinde hem iskemi öncesi hem de iskemi sonrası çeşitli zaman noktalarında (15', 30', 45', 90' ve 120') veri analizler

yapılmıştır. Öncelikle grafiklerden sol ventrikül gelişimsel basıncı (LVDP) değerleri hesaplanmış, ardından bu değer o anki kalp hızıyla (HR) çarpılarak hız-basınç çarpımı (RPP) değeri elde edilmiştir. Bu işlemler hem iskemi öncesi hem de iskemi sonrasında (reperfüzyondaki) zaman noktaları için tekrarlanmıştır.

Oksidatif Stres Analizleri

Serum

Elde edilen serumlardan toplam antioksidan durumu (TAS), toplam oksidan durumu (TOS) ve Tiyol disülfid parametreleri analiz edilmiştir.

Oksidatif stres indeksi (OSI) değerleri $\%OSI = [(TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}) / (TAS, \mu\text{mol Trolox equivalent/L})] \times 100$ formülü ile hesaplanmıştır. Analizler kolorimetrik prensiplere göre çalışan kitler ile yapılmış, analizlerde üreticinin talimatnamesi takip edilmiştir (Rel Assay Diagnostics Gaziantep, Türkiye).

Kalp dokusu

Kalp dokusu örnekleri sol ventrikülün lateral duvarının orta 1/3'lük kısmından alınmıştır. Donuk olarak saklanan dokulardan alınan yaklaşık 100 mg'lık, bir parça içerisi azot dolu havanın içerisine konulmuş. çözümlenmesine izin verilmeden tokmak ile ezilerek küçük parçalara ayrılmıştır. Ardından doku parçaları özel bir tüpün içerisine alınarak üzerlerine 1:5 oranında homojenizasyon tamponu (0,1 M Phosphate-Buffered Saline) eklenmiştir. Karışım teflon uçlu özel bir homojenizatör (Glas-Col LLC, Homogenizer; IN, USA) yardımıyla homojenize edilmiş, ardından 5000 g, +4 °C'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak saklanmış pellet atılmıştır. Ayrılan homojenizatlar hücre zarlarının ileri düzeyde parçalanabilmesi için son bir aşama olarak sonikatör (Fisher Scientific Sonic Dismembrator 550 New Hampshire, USA) yardımıyla buz üzerinde degrade edilmiştir. Son ürünlerde TAS ve TOS

parametreleri yukarıda belirtilen yöntemlerle incelenmiş ve OSI değerleri hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için GraphPad Prism (GraphPad Prism for Windows v5 2007) yazılımı kullanılmıştır. Öncelikle tüm parametreler için veri setlerine Shapiro-Wilk testi uygulanarak verilerin normal dağılım gösterip göstermediği tespit edilmiş, elde edilen sonuçlar ışığında parametrik test varsayımlarının sağlandığı kanaati olduğu için çoklu karşılaştırmalarda One Way ANOVA testi tercih edilmiştir. Farkın tespiti halinde post-hoc analizler için Tukey testi kullanılmıştır. Reperfüzyon boyunca elde edilen RPP değerleri iki yönlü varyans analizi (Repeated Measures ANOVA) ile karşılaştırılmıştır. Veriler ortalama (\bar{x}) \pm standart sapma (SS) olarak sunulmuş, $p < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

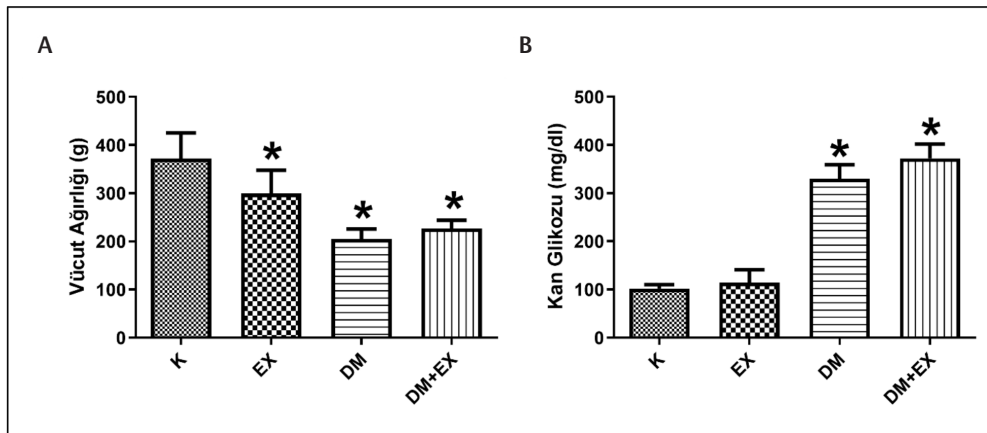
Bulgular

Deney Hayvanı Takip Verileri

Hayvanların sakrifikasyon öncesi vücut ağırlığı ve kan glikozu değerleri Şekil 1 ve Tablo 1'de verilmiştir.

Vücut ağırlığı gruplar arasında fark göstermektedir [$F_{(3,24)}=23,20$; $p < 0,0001$]. EX, DM ve DM+EX grubundaki hayvanların vücut ağırlıkları kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). DM ile DM+EX grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Kan glikozu değerleri gruplar arasında anlamlı fark göstermektedir [$F_{(3,17)}=164,7$; $p < 0,0001$]. Diyabetik gruplardaki (DM ve DM+EX) kan glikozu değerleri kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). DM ve DM+EX grupları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$).



Şekil 1: Hayvan takip parametreleri. Sakrifikasyonun hemen öncesinde yapılan, A) vücut ağırlığı ölçümü (n: K=7; EX=9; DM=6; DM+EX=6), B) Kan glikozu ölçümü (n: K=5; EX=6; DM=5; DM+EX=5) değerleri (*: $p < 0,05$ vs. kontrol) ($\bar{x} \pm SS$)

K: Kontrol, EX: Egzersiz, DM: Diabetes mellitus, DM+EX: Diyabet + Egzersiz, SS: Standart sapma

Kardiyak Hipertrofi (KA/VA)

Hayvanların ıslak kalp ağırlıkları ve kardiyak hipertrofiyi gösteren kalp ağırlığı/vücut ağırlığı $\times 10^3$ (KA/VA) değerleri Şekil 2'de verilmiştir. Kalp ağırlığı ve KA/VA değerleri gruplar arasında fark göstermektedir [sırasıyla $F_{(3,17)}=6.365$; $p=0,0043$ ve $F_{(3,17)}=7.768$; $p=0,0018$]. Diyabetik gruplardaki (DM ve DM+EX) hayvanların kalp ağırlıkları kontrole göre düşük bulunurken, KA/VA değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). Her iki parametre için de hem DM ve DM+EX grupları arasında hem de K ve EX grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

İzole Kalp Fonksiyonu ve İskemi-Reperfüzyon

Hayvanların bazal fonksiyon (iskemi öncesi) parametreleri incelenmiş Tablo 2'de sunulmuştur. LVDP, HR ve RPP değerleri gruplar arasında anlamlı fark göstermemiştir [sırasıyla, $F_{(3,16)}=0,95$; $p=0,4399$ $F_{(3,16)}=2,84$ $p=0,0712$; $F_{(3,15)}=1.147$ $p=0,3624$].

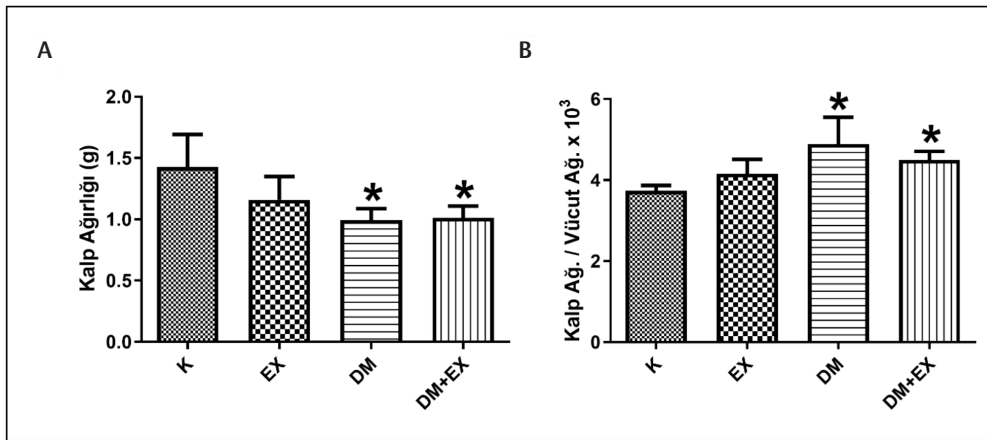
Deney boyunca kaydedilen hız-basınç çarpımı (RPP) değerleri Şekil 3'te verilmiştir.

RPP değerleri gruplar arasında iki yönlü varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. Analiz sonucuna göre gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir [$F_{(3,16)}=13,25$; $p=0,0001$]. EX grubu ortalamaları K grubuna göre yüksek seyretmekle birlikte, bu fark sadece 15. dakikada anlamlılık göstermiştir ($p<0,05$). DM grubu kontrol grubu ortalamalarına yakın seyretmiş ancak 120. dakikada kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük RPP değerleri kaydedilmiştir ($p<0,05$). DM+EX grubu RPP değeri açısından tüm zaman noktalarında en kötü grup olmuştur. 30, 45, 90 ve 120. dakikalarda kontrole göre anlamlı derecede düşük RPP fonksiyon değerlerine sahiptir ($p<0,05$). Ayrıca, reperfüzyonun ilk yarısında (10, 15 ve 30. dakikalarda) DM+EX grubu DM grubundan da istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük RPP değerleri göstermiştir ($p<0,05$).

Tablo 1: Deney hayvanı takip verilerini içeren tablo ($\bar{x} \pm SS$)

	K	EX	DM	DM+EX
Vücut Ağırlığı (g)	372,10 \pm 52,98	299,60 \pm 48,36	204,70 \pm 48,36	226,80 \pm 17,29
Kalp Ağırlığı (g)	1,43 \pm 0,27	1,16 \pm 0,19	0,99 \pm 0,01	1,01 \pm 0,09
Kalp/Vücut Ağırlığı*	3,74 \pm 0,13	4,15 \pm 0,36	4,89 \pm 0,66	4,50 \pm 0,21
Kan glikozu (mg/dL)	101,80 \pm 8,23	114,30 \pm 26,59	329,60 \pm 29,36	372,40 \pm 29,59

*Kalp/Vücut Ağırlığı=KA/VA $\times 10^3$
K: Kontrol, EX: Egzersiz, DM: Diabetes mellitus, DM+EX: Diyabet + Egzersiz, SS: Standart sapma



Şekil 2: Kardiyak hipertrofiyi takip etmek için yapılan ölçümler. A) Kalp ağırlığı (ıslak), B) Hayvanlarının ıslak kalp ağırlıklarının terminal vücut ağırlığına bölünmesi ile elde edilen (KA/VA) değerleri (*: $p<0,05$ vs. Kontrol) (n: K=5, EX=6, DM=5, DM+EX=5) ($\bar{x} \pm SS$)

KA/VA: Kalp ağırlığı/vücut ağırlığı, K: Kontrol, EX: Egzersiz, DM: Diabetes mellitus, DM+EX: Diyabet + Egzersiz, SS: Standart sapma

Tablo 2: Hayvanların bazal (iskemi öncesi) kalp fonksiyonu parametreleri ($\bar{x} \pm SS$)

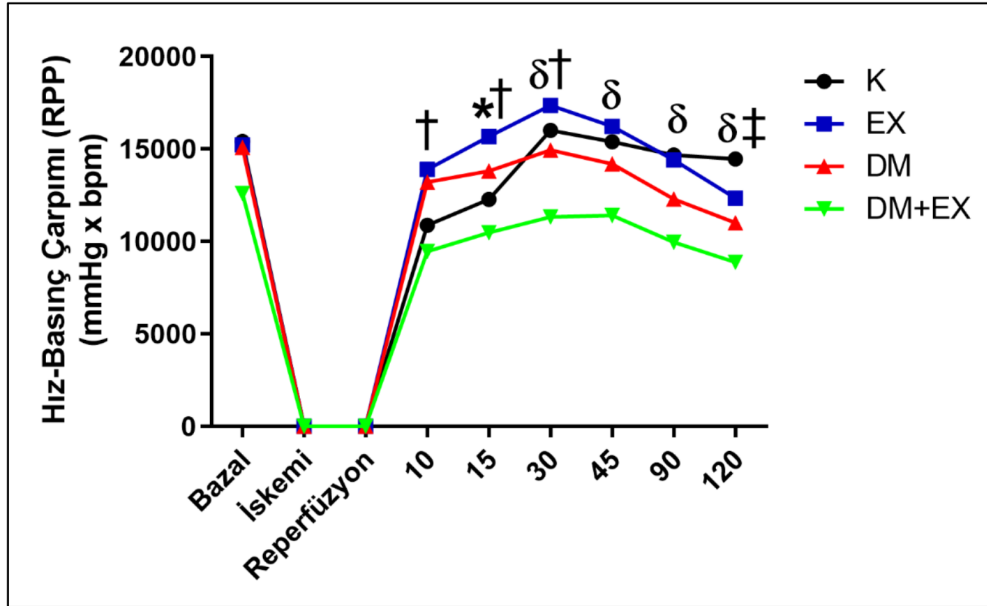
	K	EX	DM	DM+EX
LVDP (mmHg)	70,05 \pm 16,65	75,74 \pm 15,76	62,35 \pm 12,87	64,56 \pm 8,64
HR (mmHg)	223,20 \pm 30,39	197,20 \pm 28,62	244,80 \pm 36,66	197,3 \pm 24,27
RPP $\times 10^{-3}$ (mmHg/sn)	15,41 \pm 2,66	15,23 \pm 2,89	15,10 \pm 2,89	12,60 \pm 0,86

LVDP: Sol ventrikül gelişimsel basıncı, HR: Kalp hızı, RPP: Hız-basınç çarpımı, K: Kontrol, EX: Egzersiz, DM: Diabetes mellitus, DM+EX: Diyabet + Egzersiz, SS: Standart sapma

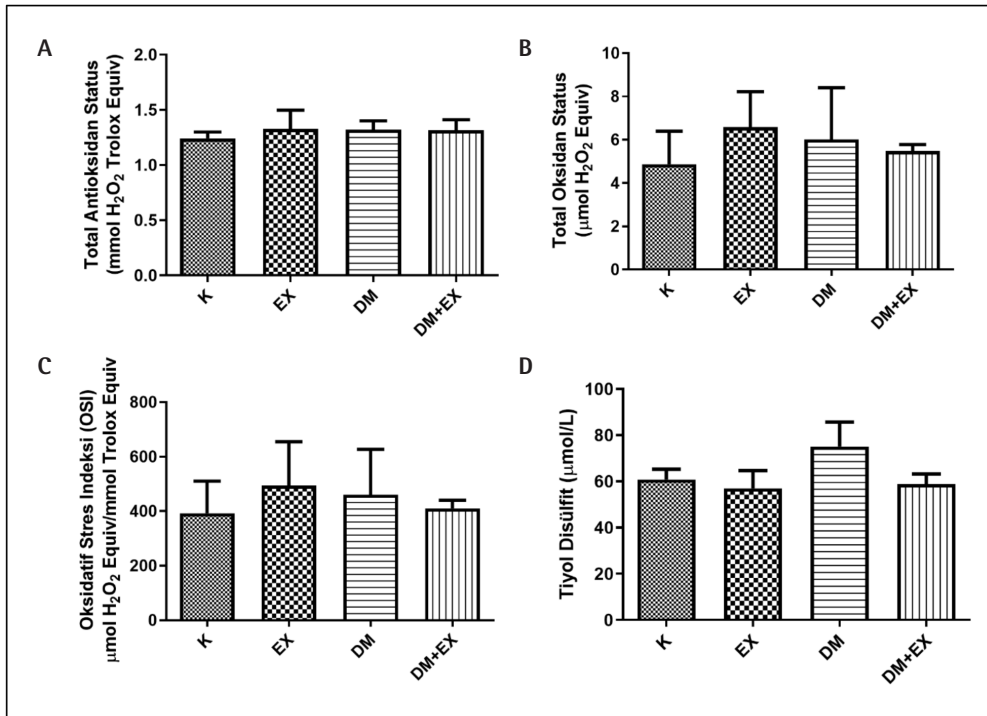
Oksidatif Stres Analizleri

Hayvanların plazma TAS, TOS, OSI ve plazma tiyol disülfid değerleri Şekil 4'te, sol ventrikülde doku örneklerindeki TAS, TOS ve OSI değerleri Şekil 5'te verilmiştir.

Plazma verileri incelendiğinde TAS, TOS, OSI ve tiyol disülfid parametreleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark gözlemlenmemiştir [sırasıyla $F_{(3,24)}=0,8429$; $p=0,4838$; $F_{(3,20)}=1,357$; $p=0,2846$; $F_{(3,20)}=0,8077$; $p=0,5044$ ve $F_{(3,21)}=1,150$; $p=0,3520$].



Şekil 3: Tüm deney boyunca kaydedilen RPP verileri ($p<0,05$ *: K vs. EX; †: K vs. DM; δ: K vs. DM+EX; ‡: DM vs. DM+EX) (n: K=5; EX=5; DM=5; DM+EX=4)
K: Kontrol, EX: Egzersiz, DM: Diabetes mellitus, DM+EX: Diyabet + Egzersiz



Şekil 4: Plazmada ölçülen oksidatif stres parametreleri. A) Toplam antioksidan durumu (n: K=7, EX=9, DM=6, DM+EX=6), B) toplam oksidan durumu (n: K=7, EX=7, DM=5, DM+EX=5), C) Oksidatif stres indeksi (n: K=7, EX=7, DM=5, DM+EX=5), D) Tiyol disülfid (n: K=7, EX=8, DM=5, DM+EX=5) (\bar{x} + SS)
K: Kontrol, EX: Egzersiz, DM: Diabetes mellitus, DM+EX: Diyabet + Egzersiz, SS: Standart sapma

Sol ventrikül doku örneklerinde TAS, TOS ve OSI parametreleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark gözlemlenmemiştir [sırasıyla $F_{(3,17)}=3.091$; $p=0,0549$; $F_{(3,16)}=1.438$; $p=0,2687$ ve $F_{(3,15)}=2.995$; $p=0,0641$].

Tartışma

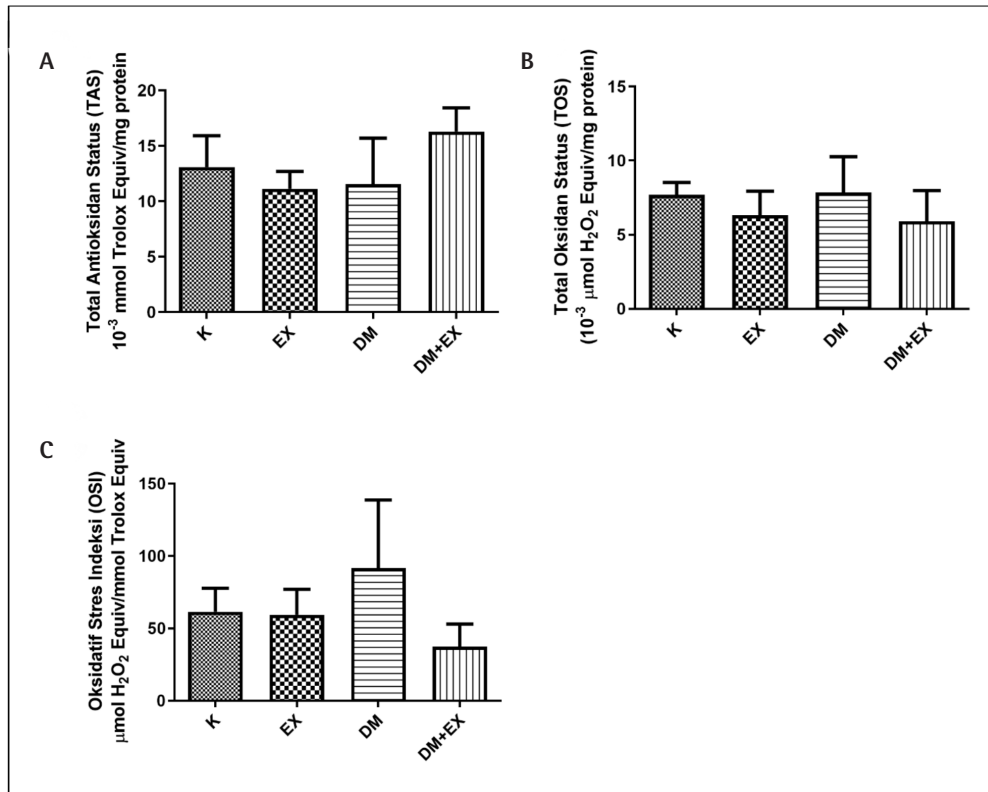
Çalışmamızda, diyabetik hayvanlara 12 hafta boyunca uygulanan, orta şiddette, kronik egzersizin diyabetik kalpte gelişen I/R hassasiyetini azaltmadığı, aksine iskemi sonrası toparlanma cevabında istatistiksel olarak anlamlı derecede bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir. Egzersiz diyabetik olmayan hayvanlarda I/R'ye karşı direnç artışına neden olurken diyabetiklerde tam tersi yönde bir etki yapmıştır. Elde edilen sonuçlar, uygulanan egzersiz protokolünün diyabetli popülasyon için uygun olmadığını düşündürmektedir.

Fonksiyonel değişimlerin altında yatan mekanizmaları açıklamak adına hayvanlara ait kalp dokusu ve plazmalarda, diyabetteki I/R hasarı artışının ve aynı zamanda egzersizin sağladığı kardiyoproteksiyonun en önemli modülatörü olan oksidatif stres parametreleri incelenmiş gruplar arasında herhangi anlamlı bir değişime rastlanmamıştır.

Uyguladığımız antrenman programı sağlıklı hayvanlarda vücut ağırlığında azalmaya neden olmuştur. Egzersizin enerji

tüketimini artıracacağı düşünüldüğünde elde edilen sonuçların genel bilgi ile uyumlu olduğu düşünülmektedir. Önceki çalışmalarda elde edilen veriler ışığında, tip 1 diyabet modelinde hayvanların hızlı bir şekilde kilo kaybetmeleri beklenir (31). Diyabetik gruplarda (DM ve DM+EX) kontrole göre anlamlı bir kilo kaybı gözlenmektedir. Kan glikozu verileri incelendiğinde diyabetik hayvanların (DM ve DM+EX) kan glikozu düzeylerinin diyabetik olmayanlara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmektedir. Kan glikozu ve vücut ağırlığı verileri birlikte değerlendirildiğinde tip 1 diyabet modelinin sorunsuz şekilde gerçekleştirildiği anlaşılmaktadır. Egzersiz uygulaması diyabetik hayvanlarda herhangi bir ağırlık değişimine neden olmamıştır ayrıca hem sağlıklı hem de diyabetik hayvanlarda kan glikozu düzeylerine önemli bir etki yapmamıştır. Seçtiğimiz diyabet modelinde STZ uygulamasının pankreasta kalıcı hasara neden olduğu bilinmektedir (32). Bu nedenle hasar oluştuktan sonra uygulanan egzersiz protokolü kan şekeri veya vücut ağırlığı düzeylerini etkilememiştir.

Devereux ve ark.'nın (33) 2000 yılında çok sayıda katılımcı ile gerçekleştirdikleri Strong Heart Study isimli epidemiyolojik çalışma, diyabetik bireylerde sol ventrikül kütlelerinin ve duvar kalınlığının sağlıklı kontrollere göre anlamlı derece fazla olduğu göstermiştir. Çok sayıda katılımcı ile gerçekleştirilen bir diğer çalışma Framingham Heart Study isimli epidemiyolojik çalışma



Şekil 5: Sol ventrikül doku örneklerinde ölçülen oksidatif stres parametreleri. A) Toplam antioksidan durumu (n: K=6, EX=6, DM=5, DM+EX=4), B) toplam oksidan durumu (n: K=6, EX=5, DM=5, DM+EX=4), C) Oksidatif stres indeksi (n: K=5, EX=5, DM=4, DM+EX=4) (\bar{x} + SS)

K: Kontrol, EX: Egzersiz, DM: Diabetes mellitus, DM+EX: Diyabet + Egzersiz, SS: Standart sapma

da aynı sonuçlara ulaşmış, bozulmanın diyabetin derecesi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (34). Benzer şekilde STZ uygulaması ile diyabet yapılan sıçanlarda da kardiyak hipertrofinin gelişimi çeşitli yayınlarda, çeşitli tekniklerle gösterilmiştir (35-37). Çalışmamızda diyabet gruplarında görülen KA/VA oranındaki anlamlı artış diyabetik hayvanlarda kardiyak hipertrofinin gelişimine işaret etmektedir, bu bulgu literatür ile uyumludur. Öncül hipotezimizin aksine, egzersiz uygulaması diyabetiklerde hipertrofiyi engelleyici bir etkide bulunmamıştır.

Diyabetin kalpte I/R hasarına karşı hassasiyeti artırdığı bilinmektedir (4,5). Ek olarak, deneysel çalışmalarda da benzer veriler elde edilmiştir. Qiu ve ark. (8) STZ enjeksiyonu ile diyabet oluşturdukları sıçanlarda koroner arter ligasyonu ile I/R uygulaması yapmışlar ve diyabetik hayvanlarda infarkt alanın kontrollere göre daha büyük olduğunu göstermişlerdir. Sunulan sonuçlar benzer tasarımla gerçekleştirilen hayvan çalışmalarını desteklenmektedir (6,7).

Çalışmamızda diyabet ile kontrol arasındaki fark reperfüzyonun sonunda anlamlılık kazanmıştır. Uyguladığımız iskemi süresi ılımlı iskemi olarak kabul edilen bir uzunluktur. DM ve K arasında toparlanma cevabının tüm zaman noktalarında belirgin bir şekilde ayrılmaması iskeminin düzeyi ile açıklanabilir. Literatürde tersi yönde sonuçlara da rastlamak mümkündür. Gurel ve ark. (38) 1 aylık tip 1 diyabet uygulamasını takiben uyguladıkları global I/R protokolünde diyabetin kardiyoprotektif bir fenotip ortaya çıkardığını öne sürmüşlerdir. İlerleyen çalışmalarda iskemi süresinin artırılması veya global iskemi yerine koroner arter ligasyonu protokollerinin uygulanması iki grup arasındaki farkı belirginleştirebilir. Ancak yine de seçtiğimiz diyabet modelinin miyokart düzeyinde yol açtığı I/R hassasiyet artışının reperfüzyonunun ilerleyen dönemlerine yansıdığı anlaşılmaktadır.

Uygulanan egzersiz protokolü diyabetik olmayan hayvanlarda I/R hasarına karşı direnci artırmıştır. Bu sonuçlar uyguladığımız protokolün kardiyoprotektif karakterine işaret etmektedir. Literatürde de çeşitli şiddet ve sürelerde uygulanan egzersizin I/R hasarına karşı koruyucu etkileri gösterilmiştir (39-41). Bununla birlikte, seçilen egzersiz protokolünün kişisel özelliklere uygun olması egzersizin olumlu etkilerinin gözlenmesi için olmazsa olmaz bir şarttır. Yanlış planlanan egzersiz protokolü istenen yararlı etkileri göstermekten ziyade zarar verici olabilir. Komatsu ve ark. (42) diyabetik bireylerin sağlıklı insanlara göre daha düşük egzersiz kapasitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle, çalışmamızda tüm hayvanlara aynı egzersiz protokolünü uygulamak yerine, hayvanların MEK değerleri ölçülerek egzersiz programı bu değerlere göre düzenlenmiştir. Ancak MEK değerleri açısından diyabetik ve diyabetik olmayan hayvanlar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır (veriler sunulmamıştır). Çalışmamızda MEK değerinin %70'ine denk gelecek ılımlı bir egzersiz protokolü seçilmiştir. Ancak diyabetik

hayvanlarda bu uygulamanın iskemi sonrası toparlanma cevabını daha da kötü hale getirdiği anlaşılmaktadır. Seçilen egzersiz protokolünün sağlıklı hayvanlara uygulanması yarar sağlarken, aynı protokolün diyabetli hayvanlara zarar verdiği ortaya çıkmaktadır. İlerleyen çalışmalarda diyabetli hayvanlara daha düşük şiddetli bir egzersiz protokolünün uygulanmasının daha doğru olacağını düşünmekteyiz. Ek olarak, çalışmamızda kullanılan egzersiz kapasitesi ölçüm yöntemi dolaylı (indirekt) bir yöntemdir. Teknik yetersizliklerden dolayı egzersiz kapasitesi ölçümlerinde hayvanların solunum gazları ve kalp hızlarını takip etmeye olanak sağlayan metabolik koşu bantları kullanılmamıştır. Bu koşu bantlarının kullanımı ile ölçülen maksimum oksijen tüketim kapasitesi (Vo_{2max}) değeri egzersiz şiddetinin belirlenmesinde kullanılan altın standarttır. İlerleyen çalışmalarda bu tarz cihazların kullanımı ile diyabetik ve diyabetik olmayan hayvanların arasında kapasite farklarına rastlanabilir ve daha doğru egzersiz protokolleri planlanabilir.

Oksidatif stres ile ilgili ölçülen parametreler incelendiğinde istatistiksel açıdan gruplar arasında anlamlı bir fark görülmediği anlaşılmaktadır. Her ne kadar kalp dokusundaki OSI değerleri ve plazmadaki tiyol disülfid parametrelerinde diyabet grubunda bir artış trendi görülse de grup içi varyasyonun yüksekliği nedeniyle bu farklar anlamlılık kazanmamıştır. ROS oldukça hızlı bozunmaya uğrayan moleküller olduğundan örnekler arasındaki ihmal edilebilecek düzeyde küçük farklılıklar sonuçlara geniş varyasyonlar olarak yansımaktadır. İlerleyen çalışmalarda diyabet süresinin değiştirilmesi ve başka oksidatif stres parametrelerinin eklenmesi yerinde olacaktır. Bu nedenle ROS ile yapılan ölçümlerde örnek sayısının fazlalığı diğer ölçümlere göre daha kritik hale gelmektedir. Ancak çalışmamızda bu ölçümlerdeki örnek sayısı görece az sayıda kalmaktadır. Örnek sayısının azlığı çalışmamızın en önemli kısıtlılıklarından birisini teşkil etmektedir. İlerleyen çalışmalarda aynı testlerin daha büyük örneklemelerde çalışılmasının daha güçlü veriler ortaya çıkaracağını düşünmekteyiz.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Elbette diyabet ve egzersiz organizmanın tamamına yayılan etkileri ile birçok moleküler yolağı aynı anda, oksidatif stresten bağımsız olarak etkilemektedir. Diyabetin yol açtığı proenflamatuvar etkilerin I/R hasarını artırdığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (8). Diyabette kalp dokusunda hücre içi kalsiyum homeostazisi parametrelerinde meydana gelen değişimler de I/R hassasiyetinin artışında önemli yere sahiptir (43). Son olarak, egzersizin kalp dokusunda damarlanmayı artırdığı ve bu adaptasyonun I/R hasarında koruyucu etki yaptığı bilinmektedir (39). Çalışmamızda bu parametrelerin incelenmemiş olması çalışmamızın kısıtlılıkları arasındadır.

Sonuç

Sağlıklı ve hasta popülasyonlar için planlanan antrenmanların şiddet, süre ve sıklığının belirlenmesi çalışmaları toplum sağlığı açısından oldukça önemli bir araştırma alanıdır. Aynı zamanda ortaya çıkan yararlı veya zararlı etkilerin altında yatan moleküler mekanizmaların belirlenmesi egzersiz fiziolojisi bilgimize değerli katkılar yapmaya adaydır. Gelecekteki çalışmalarda Vo_{2max} değerlerinin ölçümü ile daha kapsamlı çalışmaların yapılması bu alanın gelişimi için önem arz etmektedir.

Teşekkür

Belirtilmesi gereken herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır. Sunulan çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (AÜ BAP) tarafından desteklenmiştir (proje no: 17L0230013).

Etik

Etik Kurul Onayı: Hayvan kullanım izni ve deney protokollerinin etik ilkelere uygunluğu Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (karar no: 2017-4-25, tarih: 19/02/2016).

Hasta Onayı: Hayvan deneyi çalışmasıdır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu içinden ve dışından olan kişiler tarafından değerlendirildi.

Yazarlık Katkıları

Konsept: F.A., G.Ö., H.F., H.Ç., M.B., **Dizayn:** F.A., G.Ö., H.F., H.Ç., M.B., **Analiz veya Yorumlama:** F.A., G.Ö., H.F., H.Ç., M.B., **Literatür Arama:** F.A., G.Ö., H.F., H.Ç., M.B., **Yazan:** F.A., G.Ö., H.F., H.Ç., M.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Sunulan çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (AÜ BAP) tarafından desteklenmiştir (proje no: 17L0230013).

Kaynaklar

- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2009;32:562-567.
- Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002;287:2570-2581.
- Miki T, Itoh T, Sunaga D, et al. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:67.
- Whittington HJ, Babu GG, Mocanu MM, et al. The diabetic heart: too sweet for its own good? *Cardiol Res Pract*. 2012;2012:845698.
- Bi F, Xu Y, Chen G, et al. Anti-inflammatory and Anti-endoplasmic reticulum stress Effects of catalpol Against myocardial ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *An Acad Bras Cienc*. 2020;92:e20191148.
- Zhang B, Zhai M, Li B, et al. Honokiol Ameliorates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Type 1 Diabetic Rats by Reducing Oxidative Stress and Apoptosis through Activating the SIRT1-Nrf2 Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:3159801.
- Qiu Z, Lei S, Zhao B, et al. NLRP3 Inflammasome Activation-Mediated Pyroptosis Aggravates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Diabetic Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:9743280.
- Chien CY, Wen TJ, Cheng YH, et al. Diabetes Upregulates Oxidative Stress and Downregulates Cardiac Protection to Exacerbate Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9:679.
- Yu LM, Dong X, Xue XD, et al. Melatonin attenuates diabetic cardiomyopathy and reduces myocardial vulnerability to ischemia-reperfusion injury by improving mitochondrial quality control: Role of SIRT6. *J Pineal Res*. 2021;70:e12698.
- Lejay A, Fang F, John R, et al. Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;91:11-22.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17:24-38.
- Luc K, Schramm-Luc A, Guzik TJ, et al. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. *J Physiol Pharmacol*. 2019;70:809-824.
- Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta*. 2004;346:161-170.
- Kapucu A. Crocin ameliorates oxidative stress and suppresses renal damage in streptozotocin induced diabetic male rats. *Biotech Histochem*. 2021;96:153-160.
- Rathinam A, Pari L, Venkatesan M, et al. Myrtenal attenuates oxidative stress and inflammation in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Arch Physiol Biochem*. 2022;128:175-183.
- Farrell PA, Joyner MJ, Caiozzo V. *ACSM's advanced exercise physiology*. 2nd ed. Wolters Kluwer Health Adis (ESP); 2011.
- Otaka N, Shibata R, Ohashi K, et al. Myonectin Is an Exercise-Induced Myokine That Protects the Heart From Ischemia-Reperfusion Injury. *Circ Res*. 2018;123:1326-1338.
- Shi J, Bei Y, Kong X, et al. miR-17-3p Contributes to Exercise-Induced Cardiac Growth and Protects against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Theranostics*. 2017;7:664-676.
- Parry TL, Starnes JW, O'Neal SK, et al. Untargeted metabolomics analysis of ischemia-reperfusion-injured hearts ex vivo from sedentary and exercise-trained rats. *Metabolomics*. 2018;14:8.
- Hou Z, Qin X, Hu Y, et al. Longterm Exercise-Derived Exosomal miR-342-5p: A Novel Exerkine for Cardioprotection. *Circ Res*. 2019;124:1386-1400.
- Crisafulli A, Pagliaro P, Roberto S, et al. Diabetic Cardiomyopathy and Ischemic Heart Disease: Prevention and Therapy by Exercise and Conditioning. *Int J Mol Sci*. 2020;21:2896.
- Ferrioli E, Pessanha FP, Marchesi JC. Diabetes and exercise in the elderly. *Med Sport Sci*. 2014;60:122-129.
- Farzanegi P, Dana A, Ebrahimpoor Z, et al. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. *Eur J Sport Sci*. 2019;19:994-1003.
- de Sousa CV, Sales MM, Rosa TS, et al. The Antioxidant Effect of Exercise: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med*. 2017;47:277-293.
- Radák Z, Asano K, Inoue M, et al. Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1996;72:189-194.
- Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Exp Physiol*. 2020;105:1459-1466.
- Rodrigues B, Pucheret P, Battell ML, et al. Streptozotocin-induced diabetes: induction, mechanism(s), and dose dependency. *Routledge*; 2018. p. 3-17.
- Astorino T, Baker J, Dalleck L, et al. Prescription of aerobic exercise training based on the incremental load test: a model of anaerobic threshold for Rats. *Journal of Exercise Physiology*. 2012;15:45-52.
- Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szela A, et al. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2007;55:113-126.

31. Caliskan H, Akat F, Omercioglu G, et al. Aerobic exercise has an anxiolytic effect on streptozotocin induced diabetic rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2020;80:245-255.
32. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2005;22:359-370.
33. Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, et al. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. *Circulation*. 2000;101:2271-2276.
34. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol*. 1974;34:29-34.
35. Li H, Yao W, Irwin MG, et al. Adiponectin ameliorates hyperglycemia-induced cardiac hypertrophy and dysfunction by concomitantly activating Nrf2 and Brg1. *Free Radic Biol Med*. 2015;84:311-321.
36. Han Q, Liu Q, Zhang H, et al. Simvastatin Improves Cardiac Hypertrophy in Diabetic Rats by Attenuation of Oxidative Stress and Inflammation Induced by Calpain-1-Mediated Activation of Nuclear Factor- κ B (NF- κ B). *Med Sci Monit*. 2019;25:1232-1241.
37. Chang KC, Hsu KL, Tseng CD, et al. Aminoguanidine prevents arterial stiffening and cardiac hypertrophy in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Br J Pharmacol*. 2006;147:944-950.
38. Gurel E, Ustunova S, Kapucu A, et al. Hexokinase cellular trafficking in ischemia-reperfusion and ischemic preconditioning is altered in type I diabetic heart. *Mol Biol Rep*. 2013;40:4153-4160.
39. Liao Q, Qu S, Tang LX, et al. Irisin exerts a therapeutic effect against myocardial infarction via promoting angiogenesis. *Acta Pharmacol Sin*. 2019;40:1314-1321.
40. Parra VM, Macho P, Sánchez G, et al. Exercise preconditioning of myocardial infarct size in dogs is triggered by calcium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;65:276-281.
41. Quindry JC, Hamilton KL, French JP, et al. Exercise-induced HSP-72 elevation and cardioprotection against infarct and apoptosis. *J Appl Physiol* (1985). 2007;103:1056-1062.
42. Komatsu WR, Gabbay MA, Castro ML, et al. Aerobic exercise capacity in normal adolescents and those with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. 2005;6:145-149.
43. Lacombe VA, Viatchenko-Karpinski S, Terentyev D, et al. Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R1787-R1797.