اثر هشت هفته تمرین هوازی پیوسته بر بیان پروتئین VEGFA و بیان ژن گیرنده‌های VEGFR1/2 و eNOS در سلول قلبی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع دو

دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۷ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۶

فاطمه نورایی[۱]، مقصود پیری[۲*]، محمد علی آذربایجانی[۲]، مریم دلفان[۳]

۱. دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران ۲. استاد فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران ۳. استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده علوم ورزشی دانشگاه الزهرا (س)، تهران، ایران

چکیده

مقدمه و هدف: دیابت نوع دو به عنوان یک عامل زمینه‌ساز برای بیماری قلبی به شمار می‌رود و سهم عمده‌ای در مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی- عروقی دارد. هدف از انجام این مطالعه، تأثیر یک دوره تمرین هوازی پیوسته بر بیان پروتئین VEGFA و بیان ژن eNOS و گیرنده‌های VEGFR1/2 در سلول قلبی موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو بود.

روش کار: تعداد ۱۸ سر موش صحرایی به‌صورت تصادفی به ۳ گروه ۶ تایی، کنترل سالم، کنترل دیابتی، تمرین تداومی هوازی تقسیم شدند. پس از یک دوره تمرین ۸ هفته‌ای، بیان ژن‌های eNOS، VEGFR1 و VEGFR2 و پروتئین VEGFA در سلول قلبی بطن چپ قلب موش‌های صحرایی به ترتیب با تکنیک‌های RealTime-PCR و Western Blot بررسی شد. سطوح انسولین، سطح گلوکز و شاخص مقاومت به انسولین مورد سنجش قرار گرفتند. جهت تعیین معنادار بودن اختلاف گروه‌های پژوهش از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه در سطح معناداری $p<۰/۰۵$ استفاده شد.

یافته‌ها: یافته‌های تحقیق نشان داد که بیان پروتئین VEGFA بین گروه تمرین پیوسته هوازی با کنترل تفاوت معناداری دارد ($p<۰/۰۵$). در بیان ژن eNOS بین دو گروه تمرینی تداومی با کنترل دیابتی تفاوت معنادار مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). مقادیر تغییرات بیان ژنی VEGFR1/2 نسبت به گروه تمرین دیابتی تنظیم مثبت و افزایشی داشت. همچنین بین سطوح انسولین، گلوکز و مقاومت به انسولین در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری وجود داشت ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد تأثیر ۸ هفته تمرینات هوازی پیوسته بر بیان پروتئین VEGFA و بیان ژن eNOS و ژن‌های گیرنده‌های تیروزین کیناز در سلول قلبی موش‌های صحرایی دیابتی شده، مؤثر است و احتمالا می‌تواند به عنوان یک روش مداخله‌ای تأثیرگذار مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: تمرین تداومی، VEGFA، eNOS، سلول قلبی، گیرنده‌های VEGFR1/2، دیابت نوع دو

* **نویسنده مسئول:** استاد فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

ایمیل: m.peeri@iauctb.ac.ir **تلفن:** ۰۹۱۲۱۱۲۴۴۳۴ **نمابر:** ۰۲۱۲۲۴۸۱۶۲۲

مقدمه

به‌دنبال افزایش قند خون مزمن ناشی از دیابت نوع دو، آسیب‌های جدی در عروق قلبی بزرگ و کوچک ایجاد می‌شود و منجر به نارسایی و عملکرد نادرست اندام‌های مختلف ازجمله خود قلب می‌شود. بنابراین، دیابت نوع دو در بیماران با زمینه بیماری‌های قلبی و عروقی موجب ۶۵٪ مرگ‌ومیر سالیانه در جهان می‌شود (۱). نوع دو دیابت ملیتوس یکی از بیماری‌های رایج متابولیکی است که خیلی از بافت‌ها و به‌طور برجسته دیواره عروق را درگیر می‌کند (۲). این تغییرات به‌طور قابل ملاحظه‌ای مهم‌ترین عامل ایجاد آنژیوژنیس غیرطبیعی (پاتولوژیک) است که از یک طرف باعث افزایش آنژیوژنز در اندام‌هایی مانند کلیه و چشم می‌شود و از طرف دیگر موجب مهار آنژیوژنز در قلب و عروق محیطی می‌شود (۳). بر اساس بسیاری مطالعات دیابت سبب کاهش آنژیوژنز و تشکیل عروق جانبی در قلب انسان و مدل‌های حیوانی می‌شود، که این عوامل باعث کاهش پرفیوژن و خون‌رسانی به میوکارد و افزایش مرگ‌ومیر می‌شود (۳، ۴).

نیتریک اکساید (NO)، که از نیتریک اکساید سنتتاز eNOS تولید می‌شود از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های تحریکی آنژیوژنز است و سبب گشاد شدن رگ‌ها، ممانعت از انباشت پلاکت‌ها و لکوسیت‌ها در دیواره آندوتلیالی می‌شود (۵). مطالعات صورت گرفته نشان داده که فقدان eNOS در موش‌ها موجب کاهش تکثیر کاردیومیوسیت‌ها و به تأخیر افتادن بلوغ قلب در نوزادان می‌شود. NO۶ تولیدشده توسط eNOS در شرایط فیزیولوژیک موجب افزایش ریلکسیشن دیاستولیک و کاهش اکسیژن مصرفی در میوسیت‌های قلبی می‌شود (۷). علاوه بر این، گزارش شده‌است که کمبود eNOS در بافت قلب منجر به مختل شدن فرآیند آنژیوژنز میوکارد می‌شود. VEGF تکثیر و تمایز سلول‌های آندوتلیال را تحریک می‌کند. نفوذپذیری عروق را افزایش می‌دهد و از آپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی) سلول‌های آندوتلیال جلوگیری می‌کند و اتساع رگ‌های خونی را تنظیم می‌نماید. (VEGF8) یک فاکتور پیش آنژیوژنیس است که چندین زیر مجموعه از جمله VEGFA دارد که یک فاکتور مؤثر در تثبیت عروقی در مرحله پیش رویانی می‌باشد که از دیواره عروقی در این مرحله حمایت می‌کند و موجب ارتقاء آندوتلیال عروقی می‌شود (۹).

با توجه به مطالعات انجام‌شده در بین فاکتورهای پیش‌ساز آنژیوژنیس، فاکتور رشد آندوتلیوم عروقی VEGFA بزرگ‌ترین فاکتور رشد تنظیم‌کننده عروقی در نظر گرفته شده‌است (۱۰). نتیجه پژوهشی حاکی از آن است که در حیوانات دیابتیک مانند انسان‌ها بیان ژن VEGFA مختل می‌شود و این عقیده را که ارتباط بین افزایش چربی و مقاومت به انسولین، آسیب‌های ناشی از هایپرلیپیدمی در ارگان‌ها خصوصا قلب می‌شود (۱۱، ۱۲). تمایل بسیار زیاد دو گیرنده تیروزین کیناز به VEGF در فرآیند آنژیوژنز عروق قلبی تأیید شده‌است (۱۳). شبه تیروزین کیناز ۱ fms(flt-1) یا Fms-like tyrosine kinase 1 که VEGFR1 نیز نامیده می‌شود؛ تیروزین کیناز ۱ کبد جنینی Fetal liver kinase 1 (flk-1) به عنوان VEGFR2 نیز شناخته شده‌است. در میان گیرنده‌های VEGF، گیرنده فاکتور رشد اندوتلیالی VEGFR2 مهم‌ترین انتقال‌دهنده اثرات VEGF است که در عروق باعث تنظیم، تکثیر، مهاجرت، افزایش حیات و افزایش نفوذپذیری می‌گردد. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند مسیر پیام‌دهی HIF-1α/VEGF/VEGFR درگیر در تکثیر سلول اندوتلیال، تمایز، مهاجرت و نیز نفوذپذیری عروقی می‌باشد (۱۳). در مطالعه‌ای بر روی ۲۰ بیمار دیابتی که تحت جراحی بایپس سرخرگ کرونر قرارگرفته بودند، افزایش بیان VEGF و کاهش بیان سطوح گیرنده‌های VEGFR1 و VEGFR2 در میوکارد بیماران دیابتی با بیماران غیر دیابتی مشاهده شد (۱۳، ۱۴).

امروزه فعالیت ورزشی منظم به عنوان یک شیوه غیر دارویی و نوعی درمان مکمل در نارسایی قلبی با علل مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات بالینی نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی بلندمدت با شدت متوسط تغییر ساختاری غیر طبیعی قلب را کاهش می‌دهد؛ به‌طوری‌که ورزش طولانی مدت ظرفیت عملکردی و کیفیت زندگی را در نارسایی مزمن قلبی بهبود می‌بخشد (۱۵). همچنین ورزش‌های هوازی با شدت بالا می‌تواند تأثیرات مفیدی شبیه تمرین هوازی با شدت متوسط داشته باشد و منجر به ارتقاء سطح عملکرد قلبی و عروقی در جمعیت‌های مختلف می‌شود و همچنین منجر به تنظیم گلوکز و حساسیت به انسولین می‌شود (۱۶). مطالعات نشان دادند که تمرینات ورزشی موجب افزایش حساسیت به انسولین می‌شود. به دنبال این افزایش فاکتور رشد داخل عروقی VEGFA که موجب افزایش آنژیوژنیس می‌شود (۱۷). ظرفیت هوازی و کنترل گلایسمیک به دنبال تمرین ورزشی در دیابت نوع دو ثابت شده‌است. همچنین به دنبال تمرین‌های داوطلبانه به‌طور قابل چشمگیری افزایش در سطح VEGFA به وجود می‌آید که

در این تمرینات به دنبال القاء هایپوکسی موجب تولید VEGFA می‌شود. تمرین ورزشی در واقع موجب افزایش تجمع پروتئین HIF-œ که در هسته جایگزین می‌شود و HIF-α ژن‌های هدف نظیر VEGFR1/2 و VEGF را فعال می‌کند (۱۸). نتایج مطالعات دیگر نشان داد که در انواع سلول‌های پیچیده شامل کاردیومیوسیت‌های قلبی به دنبال تمرین ورزشی و افزایش ترشح انسولین می‌تواند بیان ژن‌های VEGF و VEGFRs را افزایش دهد و منجر به فعال‌کردن گذرگاه‌های کیناز PI3/AKT شود (۱۹). VEGFA از میان مکانیسم‌های وابسته به سنتز نیتریک اکساید eNOS و کیناز PI3/AKT اندوتلیال عروقی، موجب فعال‌شدن، تکثیر و ابقای عروق می‌شود (۱۷). با توجه به اینکه نتایج ضد و نقیضی در ارتباط با نقش فعالیت ورزشی در تغییرات فاکتورهای اندوتلیال عضله قلب در بیماران دیابتی مطرح است و نیز با توجه به مطالعات محدود در مورد نقش همزمان eNOS، VEGFA و گیرنده‌های تیروزین کیناز در سلول‌های قلبی موش‌های صحرایی دیابتی، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر یک دوره تمرین هوازی پیوسته بر بیان پروتئین VEGFA و بیان ژن‌های eNOS، VEGFR1 و VEGFR2 در سلول قلبی موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ انجام شد.

روش کار

حیوانات

پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده که به شیوه میدانی و آزمایشگاهی انجام شد. مطالعه بر روی ۱۸ سر موش صحرایی نژاد ویستار (تهیه‌شده از موسسه تحقیقاتی رازی) با میانگین وزن ۱۰±۱۶۰ گرم، که به‌صورت تصادفی به ۳ گروه ۶ تایی، کنترل سالم، کنترل دیابتی و تمرین پیوسته هوازی شامل گروه کنترل: موش‌های سالم بدون تمرین پیوسته هوازی؛ گروه دیابت: موش‌های دیابتی بدون تمرین پیوسته هوازی و گروه دیابت+تمرین: موش‌های دیابتی با تمرین پیوسته هوازی تقسیم شدند انجام شد. همه اصول اخلاقی مطالعه، مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی و مطالعات انسانی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. تمام مراحل با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و مطالعات انسانی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با اخذ کد اخلاق انجام شد.

حیوانات در حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی ایران در قفس‌های جداگانه ساخته‌شده از جنس پلی‌اتیلن شفاف، در شرایط استاندارد حیوان‌های آزمایشگاهی (دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتیگراد، رطوبت ۵۰-۴۵ ٪، سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲) نگهداری شدند. در انستیتو رازی، به ازای هر ۴۵ کیلوگرم از پودر پلت استاندارد، ۰/۳٪ چربی حیوانی (حاصل از آب‌کردن دنبه گوسفند) و ۲۵٪ فروکتوز اضافه شد و سپس به شکل پلت استاندارد قالب زده شد.

القاء دیابت

هفت ماه بعد از تغذیه موش‌های صحرایی با پلت پر چرب و شیرین با اندازه‌گیری میزان قند خون ناشتا به‌وسیله گلوکومتر صفر-یک (ساخت ژاپن)، سطح گلوکز ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی‌شدن در نظر گرفته‌شد. موش-های صحرایی دیابتی، هیچ‌گونه درمان با انسولین در طول دوره پژوهش نداشتند.

ارزیابی توان هوازی

جهت ارزیابی توان هوازی حیوانات با استفاده از آزمون فزاینده Leonardo و همکاران (۲۰۰۷)، سرعت بیشینه در زمان رسیدن به حداکثر اکسیژن مصرفی محاسبه شد. شدت تمرین به این صورت که پس از ۳ دقیقه گرم‌کردن با سرعت ۵ متر بر دقیقه و شیب صفر درصد، سرعت نوار گردان هر ۲ دقیقه یک‌بار به میزان ۴ متر بر دقیقه افزایش یافت. حداکثر سرعت بیشینه زمانی بود که موش‌ها حداقل ۱/۳ دقیقه نتوانستند با سرعت ثابت بدوند و بلافاصله پس از آن با افزایش سرعت قادر به دویدن نبودند (۲۰). بر این اساس عنوان‌شده ارتباط بالایی بین سرعت نوار گردان و VCO2/VO2 موش‌ها وجود دارد (r=۰/۹۸ و p=۰/۰۰۰۵)، به طوری‌که می‌توان با استفاده از حداکثر سرعت در زمان واماندگی حداکثر اکسیژن مصرفی را پیش‌بینی کرد (۲۱)، بنابراین شدت توان هوازی مورد نظر با توجه به سرعت به‌دست‌آمده تنظیم شد. طبق اجرای برنامه تمرین روز ششم هر هفته VO2max گروه تمرین اندازه‌گیری شد و یک روز برای استراحت آنها در نظر گرفته شد.

پروتکل تمرین تداومی

هر گروه پروتکل مربوط به خود را پنج روز در هفته به مدت هشت هفته انجام دادند، روز ششم هر دو هفته یک بار، حداکثر اکسیژن مصرفی (VO2max) اندازه‌گیری شد. گروه کنترل در هیچ‌گونه برنامه فعالیت ورزشی شرکت نکردند، ولی برای ایجاد

شرایط کاملاً یکسان پنج بار در هفته به مدت ۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوار گردان بی‌حرکت قرار داده شدند. هر جلسه برنامه تمرین پیوسته استقامتی شامل مراحل زیر بود: ۱- سه دقیقه گرم کردن با ۳۰ ٪ سرعت بیشینه؛ ۲- دویدن با ۶۰ ٪ سرعت بیشینه‌ای که در انتهای هر هفته به‌دست‌آمده بود؛ ۳- سه دقیقه سرد کردن با ۳۰ ٪ سرعت بیشینه.

جدول ۱. برنامه تمرین تداومی در مدت ۸ هفته

متغیر	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم
شدت تمرین(درصد)	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
زمان تمرین (min)	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۵۰	۵۵	۵۵
سرعت (m/min)	۱۸	۲۰	۲۲	۲۲	۲۴	۲۴	۲۶	۲۶

روش استخراج نمونه و سنجش ژن eNOS و VEGFR1/2

حدود ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین موش‌های صحرایی توسط تزریق درون صفاقی کتامین ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. سپس خون به‌طور مستقیم از بطن چپ حیوانات دریافت و در لوله‌های حاوی هپارین ریخته شد و به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ متر بر دقیقه در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس بافت بطن چپ بلافاصله استخراج و در نیتروژن منجمد و برای سنجش بیان ژن در فریزر ۸۰- نگه‌داری شد. جهت سنجش بیان ژن VEGFR1/2 و eNOS از روش Realtime-PCR با Premix Extaqit و از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل استفاده گردید. اندازه‌گیری مقدار بیان این ژن به‌صورت توأم با هریک از ژن‌ها به‌وسیله کیت Mir nasy mini Arceary kit (qiagene-ساخت آلمان) و طبق دستورالعمل Vandesompele و همکاران انجام شد (۲۲، ۲۳). برای استخراج RNA، میزان ۵۰ میلی‌گرم بافت منجمد قلب حیوان را هموژن و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، محلول RNA از آن استخراج شد، و با آنزیم DNaseI از هرگونه آلودگی به DNA و آنزیم‌های تخریب‌کننده RNA پاکسازی شد. از هرکدام از نمونه‌ها ۲ میکروگرم mRNA برای سنتز اولین رشته cDNA استفاده شد. مقدار نسبی بیان ژنی ژن‌های مورد مطالعه در قلب با کمک پرایمرهای اختصاصی آنها اندازه‌گیری شد. نسبت جذبی ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانوگرمی برای تمام نمونه‌های استخراج‌شده ۱/۸ تا ۲ بود. جهت بررسی کیفیت RNA استخراج‌شده از روش الکتروفروز و ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. قبل از سنجش cDNA برای اطمینان از نبود DNAدر نمونه استخراج‌شده DNAs treatment thermos scientific (ساخت آلمان) انجام شد. سنتز cDNA با کیت transe criptor first strand cDNA synthesis (roch-ساخت آلمان) انجام شد (۲۴).

برنامه Realtime-PCR به‌وسیله دستگاه Rotrogene 6000-corbet" ساخت آلمان انجام شد. این برنامه بر اساس (SYBER Green ampligon-ساخت دانمارک) با دور ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و بلافاصله ۴۰ چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه با پرایمر طراحی‌شده (ساخت نیکا زیست ژن ایران) انجام شد (۲۴).

سنجش گلوکز پلاسما به روش گلوکز اکسیداز (شرکت پارس آزمون) و اندازه‌گیری مقادیر انسولین از روش الایزا Crystal chem (ساخت کانادا) با ضریب تغییر ۰/۰۵ و حساسیت ml/dl ۵ بررسی گردید. شاخص مقاومت به انسولین به روش HOMA-IR با فرمول زیر اندازه‌گیری شد (۲۵):

HOMA-IR=BS (µU/mL) ×Insulin (microunit/lit) ÷22.5

جدول ۲. توالی پرایمری ژنهای مورد مطالعه

ژن		توالی پرایمر (′3 → ′5)
eNOS	Forward	AAGCCATATTTGCCTAAAG
	Reserve	AGCCTGCACATCTTCTC CTCTG
VEGRR1	Forward	GAGCGTGTGATCTTCCCTCTG
	Reserve	TCTGTTGCCTAA TCTC CGCACTC
VEGRR2	Forward	CTTCCCTCTGGAGCGTGTGAT
	Reserve	TGCCTAA TCTCCGCACTC TCTGT
GAPDH	Forward	AGCGTGTTCCCTCTG GGATCT
	Reserve	CGCACTC TCTGTTGCCTAA TCTC

استخراج پروتئین تام سلولی به روش Western Blot برای سنجش:VEGFA

استخراج پروتئین با روش برد فورد و جداسازی توسط ژل الکتروفروز پی آکریل آمید ۱۰٪ (SDSPAGE) بر اساس وزن مولکولی استفاده شد. برای تهیه استاندارد و تهیه رسم منحنی مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰ میکروگرم در میکرولیتر به‌وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر و در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. ساخت بافر نمونه X۲ ابتدا ۰/۵ میلی‌گرم سدیم، ۲ دسیل سولفات (SDS) در ۱/۲۵ میلی‌لیتر از بافر تریس در محیطی با PH برابر ۶/۸ حل شد. سپس مرکاپتواتانول به محلول اضافه و حجم نهایی با آب مقطر به میزان ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس پروتئین‌ها به مدت ۵۵ دقیقه در حرارت ۹۹ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد تا دناتوره و دارای شارژ منفی شدند. ژل در تانک حاوی بافر الکتروفروز قرار داده‌شد. پروتئین‌ها به‌وسیله سرنگ در چاهک اختصاصی ریخته شدند. الکتروفروز ابتدا با ولتاژ ۶۰ انجام شد. بعد از رسیدن نمونه‌ها به ژل جداکننده، ولتاژ به ۱۲۰ ولت افزایش یافت. زمان لازم بر اساس وزن مولکولی پروتئین‌ها بین ۱۰۰ تا ۱۲۰ دقیقه در نظر گرفته‌شد. جهت پیشگیری از اتصال غیر آنتی‌بادی به سایت‌های پروتئینی، جایگاه‌ها با محلول پروتئاز بلاک شدند. آنتی‌بادی‌های مخصوص در دو مرحله شامل ۱- آنتی‌بادی اولیه اختصاصی با غلظت ۰/۰۰۱ که نشان‌دار نبود به مدت ۱ شب به آهستگی مخلوط شد؛ ۲- آنتی‌بادی کونژوگه علیه آنتی‌بادی با غلظت ۰/۰۰۰۳ به مدت یک ساعت در دمای اتاق به‌آرامی مخلوط شد. غشاء با TBS-T در سه مرحله به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد. برای مشخص شدن پروتئین‌ها توسط آنتی‌بادی به تأثیر غلظت آنزیم به سوبسترا بر روی یک صفحه پلاستیکی در کاست ثابت به شکل فیلم‌های سیاه مشخص شدند (۲۶).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها در نرم‌افزار پریزم نسخه ۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. طبیعی بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک بررسی گردید. با توجه به معنادار نبودن این آزمون ($p<۰/۰۵$)، جهت تعیین معنادار بودن اختلاف بین گروه‌های پژوهش از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One Way-ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌های به دست‌آمده به صورت میانگین± انحراف معیار گزارش شدند.

نتایج

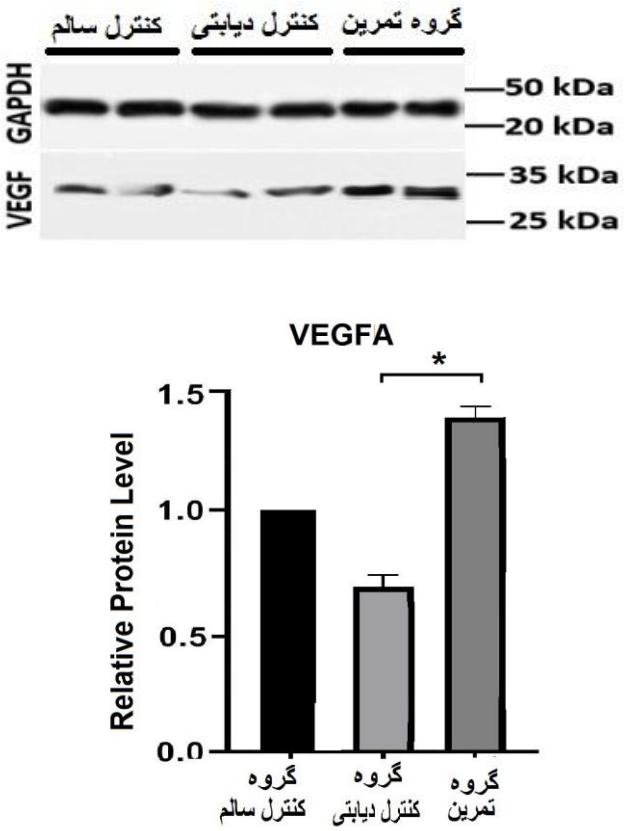
میانگین گلوکز پلاسما، انسولین پلاسما و شاخص HOMA در هر دو گروه تمرین پیوسته و گروه‌های کنترل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میانگین تغییرات گلوکز، تفاوت معناداری را در گروه تمرین پیوسته نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان می‌دهد ($p<۰/۰۵$). میانگین تغییرات مقادیر پلاسمایی انسولین نیز در گروه تمرین پیوسته نسبت به گروه کنترل دیابتی تفاوت معناداری را نشان داد ($p\leq۰/۰۱$). تغییرات شاخص HOMA-IR که نشان‌دهنده میزان مقاومت به انسولین است در گروه تمرین پیوسته نسبت به گروه کنترل دیابتی معنادار گزارش شد ($p<۰/۰۵$). تغییرات مقادیر گلوکز، انسولین و مقاومت به انسولین در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم نیز معنادار بود ($p\leq۰/۰۵$) که در جدول ۳ مشخص است. طبق اطلاعات به دست‌آمده، افزایش بیان ژن eNOS تفاوت معناداری را در گروه تمرین پیوسته نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان داد ($p\leq۰/۰۱$). افزایش مقادیر بیان ژن VEGFR1 در

گروه تمرین نسبت به گروه کنترل دیابتی معنادار بود (p<۰/۰۵) و کاهش مقادیر تغییرات بیان ژنی VEGFR1 در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم نیز معنادار بود (p≤۰/۰۱). افزایش مقادیر بیان ژن VEGFR2 در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل دیابتی معنادار بود (p<۰/۰۵). همین‌طور سیر افزایشی سنتز پروتئین VEGFA در گروه تمرین پیوسته نسبت به گروه کنترل دیابتی معنادار گزارش شد (p<۰/۰۵). در شکل ۱ باند سنتز پروتئین VEGFA توسط روش وسترن بلات ارائه شده‌است. در شکل‌های ۱ و ۲ مقادیر بیان ژن VEGEFR1/2eNOS و پروتئین VEGFA برای هر یک از نمونه‌ها در گروه‌های پژوهش ارائه شده‌است.

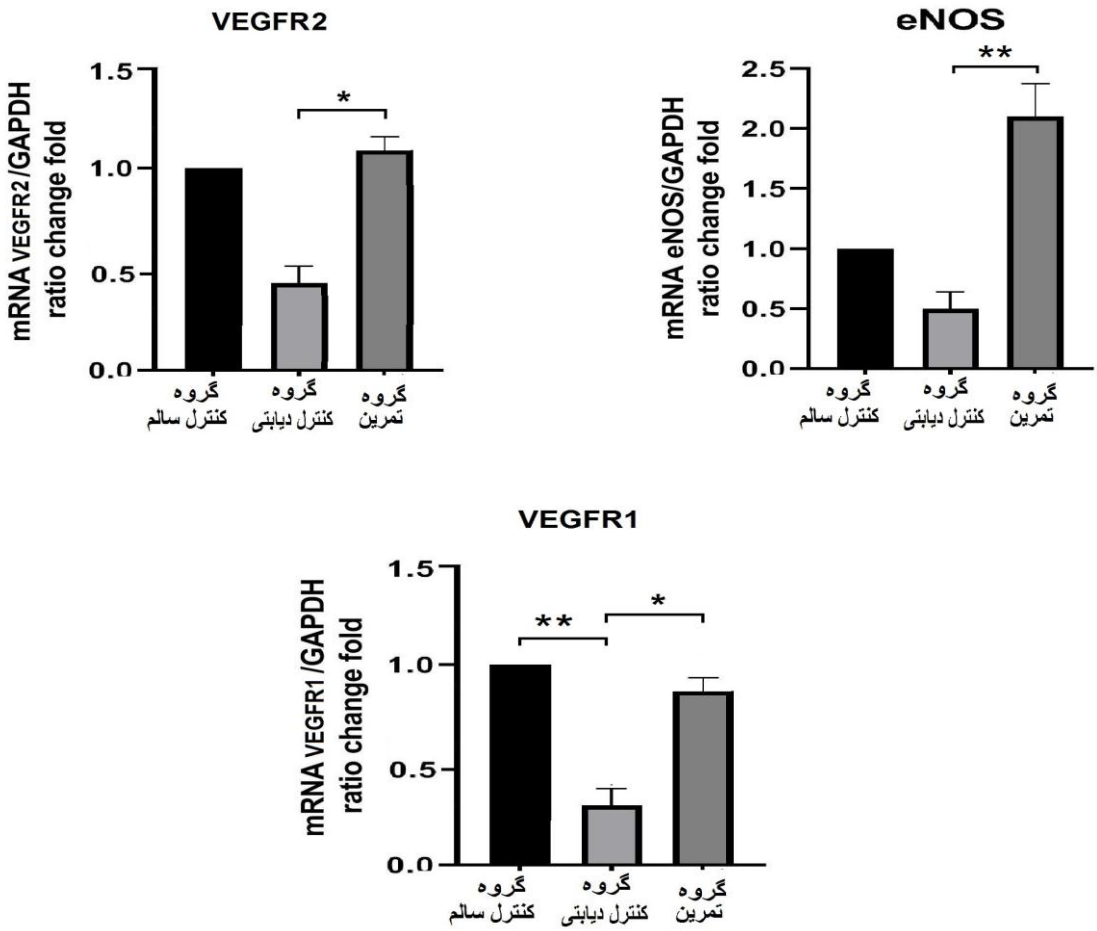
جدول۳. میانگین گلوکز پلاسما، انسولین پلاسما و شاخص مقاومت به انسولین

متغیر	گروه کنترل سالم	گروه کنترل دیابتی	گروه تمرین پیوسته
گلوکز (میلی‌گرم/ دسی‌لیتر)	۹۱ ±۱۰	۳۰۵/۵۰ ±۱۰/۳۰ **	۱۹۷/۸۳ ±۱۸/۰۳*
انسولین (میلی‌گرم/ دسی‌لیتر)	۴/۴۳ ±۱/۵۹	۸/۵۶۵ ±۰/۱۱*	۵/۶۹۳ ±۰/۰۸**
شاخص HOMA-IR	۱/۷۳ ±۰/۷۰	۶/۴۳۵ ±۰/۱۹**	۲/۷۸۲ ±۰/۲۶*

* نشانه معناداری نسبت به کنترل دیابتی. **معناداری نسبت به گروه کنترل سالم. p<۰/۰۵* ، p<۰/۰۱**، p<۰/۰۰۱***



شکل۱. باندهای نمایان شده سنتز پروتئین از روش وسترن بلات. نمودار پایین، تغییرات بیان پروتئین VEGFA در گروه تمرین و کنترل دیابتی و سالم (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل سالم). p<۰/۰۵*، p<۰/۰۱**، p<۰/۰۰۱***



شکل ۲. تغییرات بیان ژنی در گروه‌های موردمطالعه (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل سالم)، p<۰/۰۵*، p<۰/۰۱**، p<۰/۰۰۱***

بحث

نتایج مطالعه نشان داد هشت هفته تمرین پیوسته، مقادیر گلوکز و انسولین پلاسما را نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش می‌دهد و به تبع از آن، شاخص مقاومت به انسولین را پس از یک دوره تمرین در گروه تمرین نسبت به گروه بی‌تمرین دیابتی کاهش می‌دهد. در همین راستا پژوهشگران معتقدند تمرینات ورزشی موجب بهبود جذب گلوکز به‌وسیله افزایش حساسیت به انسولین در عضلات اسکلتی و بافت‌های چربی می‌شود (۲۷–۲۹) و نیز افزایش جریان بیشتر خون ناشی از افزایش نیتریک اکساید و سایر عوامل گشادکننده عروقی که بر اثر فعالیت ورزشی فعال می‌شوند (۳۰) اتصال انسولین را به گیرنده‌های GLUT4 تسهیل می‌کند و مقاومت به انسولین را کاهش می‌دهد. شواهدی وجود دارد که بافت قلب به دنبال تمرینات ورزشی هوازی می‌تواند با افزایش برداشت و بهبود متابولیسم گلوکز، مقادیر پلاسمایی گلوکز را کاهش دهد (۳۱).

در مطالعه حاضر از ترکیب فروکتوز و چربی برای القای دیابت نوع دو استفاده شد. مطالعات صورت گرفته نشان داده‌اند که مصرف فروکتوز با افزایش فشار خون، مقاومت به انسولین و تنظیم کاهشی بیان eNOS همراه است و در مقابل بیش بیانی eNOS به‌صورت معناداری مانع افزایش فشارخون و مقاومت به انسولین ناشی از فروکتوز می‌شود (۳۲). در مطالعه حاضر نیز تنظیم افزایشی بیان eNOS در بافت قلب با کاهش سطوح انسولین و گلوکز و مقاومت به انسولین همراه بود. در مجموع، این یافته‌ها نشان می‌دهد که مقاومت به انسولین و دیابت تا حدودی به‌واسطه اختلال در عملکرد اندوتلیال و به صورت بالقوه توسط تغییر بیان eNOS و تولید NO مشخص می‌شوند. با وجود این، نتایج تحقیقات در رابطه با تغییرات بیان eNOS متناقض است. برای مثال Jesmin و همکاران دریافتند که بیان eNOS در قلب موش‌های صحرایی دیابتی شده با

STZ دو هفته بعد از القای دیابت به صورت معناداری افزایش می‌یابد که بیانگر نقش مخرب eNOS در بافت قلب است (۳۳). با وجود این، برخی محققان کاهش بیان eNOS در بافت قلب را سه هفته بعد از القای دیابت با STZ نشان دادند (۳۴) و برخی دیگر نیز عدم تغییر مسیر NO را بعد از القای دیابت گزارش کرده‌اند (۳۵). Jesmin و همکاران تأثیر تمرین هوازی بر تغییرات سطوح سرمی برخی شاخص‌های تحریکی و مهاری آنژیوژنز در دیابت نوع دو بررسی کردند، نتایج آنها نشان داد که سطوح سرمی نیتریک اکساید و فاکتور رشد آندوتلیال عروقی افزایش معنادار و گلوکز ناشتا کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل داشته که در این زمینه همسو با تحقیق کنونی می‌باشد. این یافته‌های متناقض را می‌توان به مواردی از قبیل استفاده از نژادهای مختلف حیوانات بررسی‌شده، طول متفاوت دوره اعمال مداخله و همچنین تفاوت در روش دیابتی کردن نسبت داد (۳۳). همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که در فعالیت ورزشی فشارهای مکانیکی تولیدی ناشی از عضلات و تنش برشی باعث تحریک و افزایش eNOS و در نتیجه آزادسازی NO می‌شود و متعاقب آن تحقیقات زیادی هم در این زمینه نشان داده‌اند که NO در فعال‌سازی سیگنالی VEGF و گیرنده‌های تیروزین کینازی VEGFR1/2 نقش کلیدی ایفا می‌کند. همچنین این احتمال وجود دارد که کشش سلول‌های اندوتلیال باعث تجزیه غشای پایه و ماتریکس برون سلولی شده و شرایط لازم آنژیوژنز را تسهیل می‌کند (۳۰). در مطالعه‌ای دیگر که Wagner و همکاران انجام دادند، نشان دادند که تمرینات منظم هوازی موجب افزایش بیان ژن VEGF-A که مهم‌ترین فاکتور پیش آنژیوژنیز است، می‌شود که خود موجب کنترل گلایسمیک و بهبود حساسیت به انسولین می‌شود (۳۶). در مطالعه حاضر مقادیر VEGFR1/2 تنظیم مثبت و افزایشی داشت. Li و همکاران نشان دادند که ۶ هفته تمرین هوازی دویدن بر روی چرخ سبب افزایش بیان ژن VEGFR2 موش‌های صحرایی سالم شد (۱۴) که با نتایج مطالعه‌ی حاضر هم‌راستا بود. Kivela و همکاران به بررسی اثر یک جلسه تمرین دویدن روی تریدمیل به مدت ۶۰ دقیقه بر روی بیان پروتئین VEGFR2 موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو پرداختند. بیان پروتئین VEGFR2 در گروه تمرین استقامتی تغییری نشان نداد، اما در گروه سالم افزایش معناداری یافته بود (۳۷) که مخالف با نتایج مطالعه حاضر بود. عدم تغییر بیان پروتئین VEGFR2 بر اثر تمرین استقامتی شاید به دلیل کوتاه بودن دوره تمرینی باشد. طبق نتایج مطالعات پیشین، احتمالا به دلیل اثر دیابت نوع دو بر کاهش فسفوریلاسیون AKT و بیان پروتئین eNOS، کاهش بیان ژن و پروتئین VEGFR2 در گروه تمرین رخ داده‌است. مکانیسم اثر تمرین بر افزایش مقادیر VEGEFR1/2 را به کاهش مقاومت به انسولین، گلوکز، افزایش فسفوریلاسیون AKT و بیان پروتئین eNOS که از مسیرهای سیگنالی مهم مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیالی نسبت داده‌اند (۱۳).

نتیجه‌گیری

بخشی از اثرات مثبت تمرین پیوسته هوازی در وضعیت دیابت، ناشی از بهبود عملکرد آندوتلیال عروقی و افزایش بیان eNOS در بافت‌های مختلف از جمله قلب است که ممکن است با بهبود عملکرد قلب و همچنین مقابله با اثرات پاتولوژیک دیابت بر قلب نیز همراه باشد و به طور کلی با توجه به نتایج تحقیق حاضر، انجام تمرینات پیوسته در آنژیوژنز قلبی-عروقی حیوانات دیابتیک نوع دو مؤثر بوده و در مجموع می‌توان عنوان کرد که تمرین پیوسته هوازی احتمالا تأثیر مثبتی بر آبشار سیگنالینگ آنژیوژنز در قلب موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو داشته باشد. با این حال هنوز به مطالعات گسترده‌تری نیاز است تا بتوان به نتایج قطعی‌تر دست یافت. از محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم دسترسی به نمونه‌های انسانی و نیز عدم استفاده از سایر فاکتورهای مرتبط با آبشار آنژیوژنز میوکارد بود. پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده به طراحی سایر برنامه‌های تمرینی بپردازد و به مقایسه تمرینات تناوبی با شدت‌های مختلف در بیان و سنتز پروتئین‌های مرتبط با عروق اندوتلیال قلب و سلول قلبی پرداخته شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب رساله دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی با کد اخلاق IR.SBMU.RETECH.1395.883 مصوب و انجام شده‌است. بدینوسیله نویسندگان از همکاران محترم در آزمایشگاه حیوانات و آزمایشگاه سلولی مولکولی تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارضی در منافع ندارند.

References

1. Turner R, Holman R, Matthews D, Bassett P, Coster R, Stratton I, et al. Hypertension in diabetes study (Hds). 1. Prevalence of hypertension in newly presenting Type-2 diabetic-patients and the association with risk-factors for cardiovascular and diabetic complications. Journal of Hypertension. 1993;11(3).
2. Hwang MH, Kim S. Type 2 diabetes: endothelial dysfunction and exercise. Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry. 2014;18(3):239.
3. Hadi H, Gaeini A, Motamedi P, Rajabi H. The effect of aerobic training on VEGF expression in diabetic rats. Medical Journal of Tabriz University Medical Sciences Health Services. 2017;39(5):81-90. (in Persian)
4. Carmeliet P, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. Thrombosis and Haemostasis. 2001;86(1):289-97.
5. Tang K, Xia FC, Wagner PD, Breen EC. Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. Respiratory Physiology and Neurobiology. 2010;170(1):16-22.
6. Lepic E, Burger D, Lu X, Song W, Feng Q. Lack of endothelial nitric oxide synthase decreases cardiomyocyte proliferation and delays cardiac maturation. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2006;291(6):C1240-C6.
7. Betz B, Schneider R, Kress T, Schick MA, Wanner C, Sauvant C. Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury. PPAR Research. 2016;2012.
8. Ramezani A. Adaptation in response of excitation and inhibition factors of angiogenesis after 4 weeks of progressive resistant training in sedentary men. The Horizon of Medical Sciences. 2016;22(4):267-74. (in Persian)
9. Shoeibi S, Mozdziak P, Mohammadi S. Important signals regulating coronary artery angiogenesis. Microvascular Research. 2018;117:1-9. (in Persian)
10. Egginton S. Invited review: activity-induced angiogenesis. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology. 2009;457(5):963.
11. Fernandes T, Gomes-Gatto CV, Pereira NP, Alayafi YR, das Neves VJ, Oliveira EM. NO signaling in the cardiovascular system and exercise. Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment; 2017. 211-45.
12. Collaborative E. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). British Medical Journal. 2004;328(7433):189.
13. Vali Zadeh S, Motamedi P, Karami H, Rajabi H. The effects of endurance training on gene expression of VEGF and VEGFR2 of cardiac tissue in Type 2 diabetic male wistar. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2018;21(6):107-18. (in Persian)
14. Lee HJ. Exercise training regulates angiogenic gene expression in white adipose tissue. Journal of Exercise Rehabilitation. 2018;14(1):16.
15. Sirish P, Li N, Liu JY, Lee KSS, Hwang SH, Qiu H, et al. Unique mechanistic insights into the beneficial effects of soluble epoxide hydrolase inhibitors in the prevention of cardiac fibrosis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(14):5618-23.
16. Alizadeh M, Asad MR, Faramarzi M, Afroundeh R. Effect of eight week high intensity interval training on omentin-1 gene expression and insulin-resistance in diabetic male rats. Annals of Applied Sport Science. 2017;5(2):29-36. (in Persian)
17. Ghorbanzadeh V, Mohammadi M, Dariushnejad H, Chodari L, Mohaddes G. Effects of crocin and voluntary exercise, alone or combined, on heart VEGF-A and HOMA-IR of HFD/STZ induced type 2 diabetic rats. Journal of Endocrinological Investigation. 2016;39(10):1179-86. (in Persian)
18. Kivela R, Silvennoinen M, Touvra AM, Maarit Lehti T, Kainulainen H, Vihko V, et al. Effects of experimental type 1 diabetes and exercise training on angiogenic gene expression and capillarization in skeletal muscle. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. 2006;20(9):1570-2.
19. Chou E, Suzuma I, Way KJ, Opland D, Clermont AC, Naruse K, et al. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin resistant and diabetic States: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. Circulation. 2002;105(3):373-9.
20. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhaes-de-Castro R. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal

oxygen consumption. Journal of Strength and Conditioning Research. 2007;21(3):751.
21. Verboven M, Cuypers A, Deluyker D, Lambrichts I, Eijnde BO, Hansen D, et al. High intensity training improves cardiac function in healthy rats. Scientific Reports. 2019;9(1):5612.
22. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology. 2002;3(7): 1.
23. Smits K, Goossens K, Van Soom A, Govaere J, Hoogewijs M, Vanhaesebrouck E, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in equine in vivo and fresh and frozen-thawed in vitro blastocysts. BMC Research Notes. 2009;2(1):246.
24. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-λs mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. Nature Immunology. 2003;4(1):69-77.
25. Posa A, Szabo R, Kupai K, Barath Z, Szalai Z, Csonka A, et al. Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2015.
26. Kaur J, Bachhawat AK. A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. Analytical Biochemistry. 2009;384(2):348-9.
27. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. International Journal of Molecular Sciences. 2014;15(4):6184-223.
28. Borghouts L, Keizer H. Exercise and insulin sensitivity: a review. International Journal of Sports Medicine. 2000;21(01):1-12.
29. Henriksson J. Influence of exercise on insulin sensitivity. European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. 1995;2(4):303-9.
30. Kolluru GK, Sinha S, Majumder S, Muley A, Siamwala JH, Gupta R, et al. Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis. Nitric Oxide. 2010;22(4):304-15.
31. Vettor R, Valerio A, Ragni M, Trevellin E, Granzotto M, Olivieri M, et al. Exercise training boosts eNOS-dependent mitochondrial biogenesis in mouse heart: role in adaptation of glucose metabolism. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism. 2014;306(5):E519-28.
32. Zhao CX, Xu X, Cui Y, Wang P, Wei X, Yang S, et al. Increased endothelial nitric-oxide synthase expression reduces hypertension and hyperinsulinemia in fructose-treated rats. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2009;328(2):610-20.
33. Jesmin S, Zaedi S, Maeda S, Yamaguchi I, Goto K, Miyauchi T. Effects of a selective endothelin a receptor antagonist on the expressions of iNOS and eNOS in the heart of early streptozotocin-induced diabetic rats. Experimental Biology and Medicine. 2006;231(6):925-31.
34. Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology. 2005;289(5):H2144-52.
35. Joffe II, Travers KE, Perreault Micale CL, Hampton T, Katz SE, Morgan JP, et al. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced, non-insulin dependent diabetic rat: Noninvasive assessment with Doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. Journal of the American College of Cardiology. 1999;34(7):2111-9.
36. Wagner H, Fischer H, Degerblad M, Alvarsson M, Gustafsson T. Improvement of insulin sensitivity in response to exercise training in type 2 diabetes mellitus is associated with vascular endothelial growth factor A expression. Diabetes and Vascular Disease Research. 2016;13(5):361-6.
37. Kivela R, Silvennoinen M, Lehti M, Jalava S, Vihko V, Kainulainen H. Exercise induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle and in capillaries of healthy and diabetic mice. Cardiovascular Diabetology. 2008;7(1):1-10
.

The effect of eight weeks of continuous aerobic exercise training on VEGFA protein expression and eNOS and VEGFR1/2 Receptors gene expression in the cardiocytes of rats with type 2 diabetes

Received: 16 Apr 2021 Accepted: 16 May 2021

Fatemeh Noraie[1], Maghsoud Peeri[* 2], Mohammad Ali Azarbayjani[2], Maryam Delfan[3]

1. Ph.D of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran 2. Professor, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran 3. Department of Exercise Physiology, Alzahra University Sport Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Type 2 diabetes is considered as a risk factor for heart disease and has a major contribution to death and mortality due to cardiovascular disease. The aim of this study was to evaluate the effect of a continuous aerobic training period on the expression of VEGFA protein and expression of eNOS gene and VEGFR1 / 2 receptors in cardiocytes of type 2 diabetic rats.

Materials and Methods: 18 rats were randomly divided into 3 groups of 6 including healthy control, diabetic control, and continuous aerobic exercise. After an 8-week training period, the expression of eNOS VEGFR1 and VEGFR2 genes and VEGFA protein in left ventricular cardiomyocytes of rats was evaluated by RealTime-PCR and Western Blot techniques, respectively. Insulin level, glucose level and insulin resistance index were measured. To determine the significance of the differences between the research groups, one-way ANOVA statistical test was used at the significance level of p= 0.05.

Results: The results showed that there was a significant difference ($p<0.05$) between the VEGFA protein expression and the continuous aerobic exercise control group. There was a significant difference in the expression of eNOS gene between the two groups of continuous training with diabetic control ($p<0.05$), the values of changes in VEGFR1 gene expression were positively and incrementally adjusted compared to the diabetic training group. There was also a significant difference between insulin, glucose and insulin resistance levels in the training group compared to the control group ($p<0.05$).

Conclusion: It seems that the 8 weeks of continuous aerobic exercise training on the expression of VEGFA protein and expression of eNOS gene and tyrosine kinase receptor genes in the cardiocytes of diabetic rats is effective and can probably be considered as an effective intervention method.

Keywords: Continuous Exercise, VEGFA, eNOS, Cardiocyte, VEGFR1 / 2 receptors, Type 2 diabetes

***Corresponding Author:** Professor, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: m.peeri@iauctb.ac.ir **Tel:** +98 9121124434 **Fax:** +98 2122481622