JAMS

Journal of Arak University of Medical Sciences
2019; 21(7)

Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

The Effect of Endurance Training on Angiostatin and Enos Gene Expression of Cardiac Tissue in Type 2 Diabetic Male Wistar Rats

Ali Asghar Ghorbanalipour[1], Pezhman Motamedi[2*], Hamid Rajabi[2], Hadi Karami[3]

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Science, International Campus of Kharazmi University, Karaj, Iran.

2. Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Kharazmi University, Karaj, Iran.

3. Department of Molecular Medicine and Biotechnology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: *23 April 2018*

Accepted: *25 July 2018*

Published online: *04 February 2019*

Keywords

Angiostatin

Endurance training

eNOS

**** Corresponding Author:***

Pezhman Motamedi; P.O. Box 1544733111, Physical Education and Sport Science Faculty, Kharazmi University, Shahid Keshvari Sport Complex, Mirdamad Blvd, Tehran, Iran.

Fax: *+98 86 3422 4029*

Email: *pezhman.motamedi@khu.ac.ir*

ABSTRACT

Background and Aim: The eNOS gene that is responsible for the production of nitric oxide and angiostatin is an inhibitor of angiogenesis. The aim of present study was to investigate the effect of endurance training on angiostatin and eNOS gene expression of cardiac tissue in type 2 diabetic male wistar rats.

Materials and Methods: In an experimental study, 36 male wistar rats were randomly divided into three groups, Diabetic Endurance Training (DET, n=12), Diabetic Control (DC, n=12) and Healthy Control (HC, n=12). Type 2 diabetes was induced by intraperitoneal injection of STZ. The endurance training included 10 weeks, 5 sessions per week running at speed of 27 m/min for 15 minutes in 1st week and reached to 27 m/min for 60 min/day in 9th weeks. The animals were sacrificed 24 h after last training session and the samples were taken from cardiac tissue. The gene expression of angiostatin and eNOS were examined by Real-Time PCR. The one-way ANOVA was used to analysis the data. The significant level was set at $p<0.05$.

Ethical Considerations: This study was approved in Research Ethics Committee of Arak university of medical sciences with the code IR.ARAKMU.REC.1394.329.

Findings: The gene expression of angiostatin and eNOS of DC group showed significant increase compared to HC group ($p=0.000$). The endurance training induced significant decrease in the gene expression of angiostatin and eNOS compared to DC group ($p=0.000$).

Conclusion: It appears that gene expression of angiostatin and eNOS of diabetic cardiac tissue are affected by positive effect of endurance training.

© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Use your device to scan and read this article online:

Ghorbanalipour AA., Motamedi P., Rajabi H., et al. The Effect of Endurance Training on Angiostatin and Enos Gene Expression of Cardiac Tissue in Type 2 Diabetic Male Wistar Rats. J Arak Uni Med Sci. 2019; 21(7): 112-122.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و یک، شماره هفت، بهمن و اسفند ۱۳۹۷

journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

مقاله پژوهشی

اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن آنژیوستاتین و eNOS در بافت قلب موش‌های صحرایی نر ویستار دیابتی نوع ۲

علی اصغر قربانعلی پور[۱]، پژمان معتمدی[۲*]، حمید رجبی[۲]، هادی کرمی[۳]

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، پردیس بین الملل دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران.

۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران.

۳. گروه پزشکی مولکولی و بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۰۳

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۰۳

تاریخ انتشار: ۹۷/۱۱/۱۵

واژگان کلیدی

آنژیوستاتین

تمرین استقامتی

eNOS

*نویسنده مسئول:

پژمان معتمدی

آدرس پستی: ایران، تهران، بلوار میرداماد، مجموعه ورزشی شهید کشوری، دانشکده تربیت بدنی دانشگاه خوارزمی، کد پستی: ۱۵۴۴۷۳۳۱۱۱.

نمابر: +98 86 3422 4029

E-mail: pezhman.motamedi@khu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: ژن eNOS مسئول تولید نیتریک اکساید و آنژیوستاتین، مهارکننده آنژیوژنز می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن آنژیوستاتین و eNOS در بافت قلب رت‌های نر ویستار دیابتی نوع دوم بود.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه تجربی، ۳۶ سر رت نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به سه گروه دیابتی با تمرین استقامتی (DET ،n =۱۲)، گروه کنترل دیابتی (DC ،n =۱۲) و گروه کنترل سالم (HC ،n =۱۲) تقسیم شدند. القای دیابت نوع ۲ از طریق تزریق درون صفاقی STZ صورت گرفت. پروتکل تمرین شامل ۱۰ هفته تمرین استقامتی، ۵ جلسه در هفته به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۲۷ متر در دقیقه در هفته اول بود که به‌تدریج به مدت ۶۰ دقیقه با سرعت ۲۷ متر در دقیقه در هفته نهم رسید. حیوانات ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین قربانی شدند و نمونه‌ها از بافت قلب گرفته شد. بیان ژن‌های آنژیوستاتین و eNOS با روش Real-Time PCR بررسی شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از تحلیل واریانس یک طرفه استفاده گردید. سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد IR.ARAKMU.REC. ۱۳۹۴. ۳۲۹ به تصویب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک رسیده است.

یافته‌ها: بیان ژن آنژیوستاتین و eNOS در گروه DC در مقایسه با گروه HC افزایش معنی‌داری را نشان داد (p=۰/۰۰۰). تمرین استقامتی موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن آنژیوستاتین و eNOS در مقایسه با گروه DC شد (p=۰/۰۰۰).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد بیان ژن آنژیوستاتین و eNOS بافت قلب دیابتی تحت تاثیر مثبت تمرین استقامتی قرار می‌گیرد.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

۱. مقدمه

دیابت نوع ۲، یک نوع بیماری مزمن است و به عنوان دلیل اصلی مرگ در بسیاری از بیماری‌ها مانند رتینوپاتی، نفروپاتی و نوروپاتی و هم‌چنین بیماری‌های قلبی و عروقی مثل سکته، کرونر قلبی و بیماری عروق محیطی شناخته شده است. دیابت نوع ۲ مقاوم به انسولین و هایپر انسولینمیا می‌باشد (۱). آنژیوژنز شامل رشد عروق خونی جدید است و توسط تکثیرزایی سلول‌های اندوتلیال آغاز شده و به داخل بافت احاطه‌شده نفوذ می‌کند و به سختی توسط فاکتورهای رشدی و مهارکننده‌ها تنظیم می‌شود (۲). در شرایط عادی، آنژیوژنز در نسبت معینی رخ می‌دهد، با وجود این می‌تواند در وضعیت‌های پاتولوژیکی معینی افزایش یا کاهش یابد. آنژیوژنز پاسخ سازگارانه‌ای است که در وضعیت‌های هایپوکسی و ایسکمی به عنوان مکانیسم جبرانی رخ می‌دهد و توسط فاکتورهای مختلفی مانند تمرین و نیتریک اکساید (NO) تعدیل می‌شود (۳). راه‌اندازهای مهم روشن کننده ی آن به عنوان فاکتورهای رشدی تحریک کننده ی آنژیوژنز شناخته شده‌اند و مهم‌ترین آن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) است (۴). راه اندازهای مهم خاموش آن به عنوان مهارکننده‌های آنژیوژنز شناخته شده‌اند و مهم‌ترین آن‌ها، آنژیوستاتین، اینترفرون‌ها و TGF-β هستند (۴). آنژیوستاتین یک بخش پروتئولیتیکی از پلاسمینوژن می‌باشد و به عنوان یک فاکتور آنتی آنژیوژنیک قوی، رشد و انتشار عروق خونی جدید را محدود می‌کند (۵). بدن سالم و طبیعی، تعادل تنظیم‌کننده‌های آنژیوژنز را حفظ می‌نماید (۴). فرآیند آنژیوژنز در قلب بیماران دیابتی کاهش می‌یابد (۶). آنژیوستاتین به عنوان یک مهارکننده‌ی قوی رگ زایی جدید و سرکوب کننده‌ی رشد و متاستاز تومور شناخته شده است و به‌طور خاصی تکثیرزایی را مهار می‌کند و موجب آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال عروقی می‌گردد (۵). اکثر مرگ‌های رخ داده در بیماران دیابتی به دلیل اختلالات عروقی می‌باشد. غلظت زیاد گلوکز مرتبط با اختلال اندوتلیالی است. مکانیسم‌های این اختلال اندوتلیالی می‌تواند شامل کاهش فعالیت و یا افزایش غیرطبیعی بیان نیتریک اکساید سنتتاز اندوتلیالی (eNOS)، افزایش تخریب NO ثانویه یا افزایش تولید سوپر اکسید باشد (۶). اختلال در تولید NO، پاسخ آنژیوژنزی را کاهش می‌دهد. eNOS، ایزوفرم مهم تنظیم عمل عروق است (۷) و در سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های اندوکاردیال، میوسیت‌های بطنی و سلول‌های میوکاردی دیگر بیان می‌شود. eNOS، نقش تولید NO برای پیام دهی سلولی و عملکردهای مختلف مانند آنژیوژنز در بیماران و افراد سالم را دارد. فعالیت eNOS و تولید NO می‌تواند توسط چندین محرک مانند استرس برشی، استیل کولین، برادی کینین، هیستامین و استروئیدال β۱۷ در هر دو روش وابسته به کلسیم و یا مستقل از کلسیم، آغاز و یا افزایش یابد (۸). در مطالعه‌ای گزارش کرده‌اند که قرارگیری سلول در معرض گلوکز زیاد مانند بیماری دیابت، موجب تولید ROS (گونه‌های اکسیژن فعال) می‌شود (۶). تعدادی از مطالعات بیان کرده‌اند که کاهش در دسترس‌پذیری زیستی NO مرتبط با هایپرگلیسمیا و دیابت می‌باشد که ناشی از رهایی نرمال NO یا اختلال در فعالیت NOS است که به نقص در سیگنالینگ AKT/eNOS در اختلال عروقی در دیابت نوع ۲ نسبت داده‌اند. مطالعات نشان داده که فسفوریلاسیون AKT/eNOS در آئورت بیماران دیابتی نوع دوم کاهش یافته است (۶). فعال‌شدن مسیر PI3K-AKT (Phosphatidylinositol 3-kinase) و eNOS مشتق گرفته از NO منجر به بهبود عملکرد اندوتلیالی و نجات سلول‌های مختل شده‌ی میوکاردی می‌شود (۹). در تضاد با نتایج مطالعاتی که سطوح بالای گلوکز و هایپرگلیسمیا را دلیل کاهش eNOS در دیابت نوع ۲ بیان کرده‌اند (۱۰)، نتایج دیگر، افزایش eNOS ناشی از دیابت نوع ۲ را نشان داده‌اند (۱۱) که مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات نشان داده‌اند تمرین ورزشی به‌خصوص تمرین استقامتی با تغییر در نیازهای سوخت و ساز عضلات قلبی و اسکلتی در عضلات اسکلتی و قلبی (۱۲)، باعث کاهش مقاومت به انسولین و افزایش حساسیت انسولینی بیماران دیابتی در هر دو مدل انسانی و حیوانی شده (۱۳) و از این طریق می‌تواند به عنوان محرکی بر فرآیند آنژیوژنز، رشد مویرگی، تعداد میتوکندری و ظرفیت اکسایشی به شمار رود (۱۲). تمرین ورزشی باعث بهبود عملکرد

عروق و نیز عملکرد قلبی در بیماران دیابتی نیز می‌شود. از آن‌جایی که قلب دیابتی، VEGF و گیرنده‌های VEGF کمی را بیان می‌کند و القای هایپوگلیسمیا تولید مهارکننده‌های آنژیوژنز مانند آنژیوستاتین را افزایش می‌دهد، تمرین استقامتی نیز می‌تواند آنژیوژنز را توسط کاهش سطوح آنژیوستاتین و اندوستاتین پلاسما بهبود بخشد (۱۴). اثر مزمن تمرین استقامتی تمایل به القای آنژیوژنز و تغییر در حساسیت عروقی دارد. سلول‌های اندوتلیال هدف مهمی برای این سازگاری نسبت به تمرین استقامتی هستند. افزایش تولید NO به عنوان سازگاری اولیه در پاسخ به تمرین، سریعاً بعد از یک هفته تمرین در سلول‌های اندوتلیال مشاهده شده است. مطالعات نشان داده‌اند تمرین سبب افزایش پروتئین eNOS نیز می‌شود (۱۵) و تنظیم بالای بیان eNOS ارتباط نزدیکی با تغییرات شدت تمرین، به‌خصوص استرس برشی در داخل عروق دارد. افزایش ضربان قلب و برون ده قلبی و استرس برشی ناشی از تمرین به افزایش بیان eNOS منجر می‌شود (۱۲) با توجه به نتایج بعضی از مطالعات درباره اثر افزایشی دیابت نوع ۲ و تمرین به تنهایی بر بیان ژن eNOS و اثر تحریکی و مهاری دیابت نوع ۲ و تمرین بر بیان ژن آنژیوستاتین، این سوال پیش می‌آید که آیا تمرین استقامتی می‌تواند باعث بهبود عملکرد قلب دیابتی شود یا خیر. بنابراین با توجه به تاثیر مختلف دیابت بر فرآیند آنژیوژنز و بیان ژن eNOS ، ساز و کار نامشخص تاثیر تمرین استقامتی بر بیان ژن آنژیوستاتین و eNOS بافت قلبی در بیماری دیابت نوع ۲ و یافتن روش درمانی موثر و کم هزینه برای درمان دیابت نوع ۲، مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن آنژیوستاتین و eNOS در رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ پرداخته است.

۲. مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی-آزمایشگاهی بود. ۳۶ سر رت نر نژاد ویستار بالغ با میانگین وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم و سن ۸ هفته با همکاری دانشگاه بقیه الله و دانشگاه علوم پزشکی اراک تهیه شدند. همه‌ی رت‌ها در دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و تحت چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های پلی کربنات (۵ موش در هر قفس) بدون محدودیت در آب و غذا نگه‌داری شدند. در مراحل مختلف تمرین، مسائل اخلاقی رفتار با حیوانات جهت جلوگیری از آزار و اذیت آن‌ها رعایت شد. پس از دو هفته آشنایی با محیط، جهت القای دیابت نوع ۲ در رت‌ها، بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی، محلول نیکوتین آمید (ساخت شرکت سیگما، آمریکا) محلول شده در نرمال سالین با دوز ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و بعد از ۱۵ دقیقه از محلول استرپتوزوتوسین (STZ) (ساخت شرکت سیگما، آمریکا) محلول در بافر سیترات ۰/۱ مولار با دوز ۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی تزریق شد (۱۶). یک هفته پس از تزریق جهت اطمینان از دیابتی بودن، رت‌هایی که میزان قند خون آن‌ها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی لیتر بود به عنوان رت‌های دیابتی در نظر گرفته شدند (۱۷). سپس رت‌های دیابتی شده به طور تصادفی به دو گروه دیابتی + تمرین استقامتی (n =۱۲) و گروه کنترل دیابتی (n =۱۲) تقسیم شدند و یک گروه دیگر از رت‌ها که قند خون طبیعی داشتند به عنوان گروه کنترل سالم (n =۱۲) در نظر گرفته شدند. هم‌چنین گروه کنترل سالم نیز برای این‌که شرایط یکسانی با گروه‌های دیابتی داشته باشد به مقدار ۱ سی سی نرمال سالین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت نمود. برنامه تمرین استقامتی بر روی تردمیل ۵ کاناله (ساخت ایران) به دلیل کنترل آسان‌تر سرعت و مدت زمان دویدن اجرا شد. رت‌ها در گروه تمرین به مدت ۱۰هفته و هر هفته ۵ جلسه تمرین کردند. کل دوره تمرین به سه مرحله آشنایی، اضافه بار، حفظ و تثبیت شدت کار تقسیم شد. در مرحله آشنایی، رت‌ها هر روز به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند. در مرحله اضافه بار (هفته دوم تا چهارم)، رت‌ها ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۲۷ متر بر دقیقه روی نوارگردان دویدند و به تدریج در طول مدت ۳ هفته، مدت فعالیت افزایش یافت (۲ دقیقه افزایش در هر جلسه) تا به میزان نهایی ۶۰ دقیقه رسید و در نهایت در مرحله حفظ و تثبیت شدت کار به مدت ۳ هفته تمرین استقامتی (۶۰ دقیقه و با سرعت ۲۷ متر بر دقیقه) اجرا

شد (جدول ۱). در ضمن در هر جلسه تمرینی رت‌ها به اجرای ۵ دقیقـه گـرم کردن (با شدت ۱۶ متر در دقیقه) و ۵ دقیقـه سرد کردن (شدت ۱۶ متر در دقیقه و با کاهش تدریجی شدت به کمترین مقدار) پرداختند (۱۸).

جدول ۱. طرح پروتکل تمرین استقامتی طی ۱۰ هفته روی تریدمیل

هفته‌های تمرین	آشنایی	هفته۱	هفته۲	هفته۳	هفته۴	هفته ۹-۵
مدت تمرین (دقیقه)	۱۰-۱۵	۲۰-۳۰	۳۰-۴۰	۴۰-۵۰	۵۰-۶۰	۶۰
سرعت (متر بر دقیقه)	۱۰	۲۷	۲۷	۲۷	۲۷	۲۷
معادل شدت (Vo2max) ٪	۴۰	۷۵	۷۵	۷۵	۷۵	۷۵

برای استخراج RNA، ۵۰ میلی‌گرم از بافت قلب با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر معرف Ytzol (شرکت یکتا تجهیز آزما) هموژن گردید. سپس مراحل مختلف طبق دستور العمل کیت استخراج RNA تا مرحله‌ی نهایی استخراج و تهیه RNA خالص انجام شد. محلول RNA استخراج شده با آنزیم DNasI از هر گونه آلودگی به DNA و آنزیم‌های تخریب‌کننده RNA پاکسازی شد. نسبت جذبی ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر به شیوه اسپکترومتری برای تمامی نمونه‌های استخراج شده بین ۱/۸ تا ۲ بود. سپس برای بررسی کیفیت RNA استخراج‌شده از روش الکتروفورز و ژل آگاروز ۱ درصد استفاده گردید. از هر کدام از نمونه‌ها ۲۰ میکروگرم mRNA برای سنتز اولین رشته cDNA از نمونه‌های RNA استخراج‌شده نهایی و پرایمرهای Oligo-dT (آنزیم نسخه برداری معکوس) مطابق جدول کیت سنتز cDNA شرکت پارس توس استفاده شد. RT-Qpcr با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده توسط نرم‌افزار Primer 3 انجام گردید. مشخصات پرایمرها در جدول ۲ آمده است. با استفاده از نتایج Real-Time PCR، سطح بیان نسبی ژن آنژیوستاتین و eNOS در بافت قلب گروه‌های مورد مطالعه با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

جدول ۲. مشخصات پرایمرها

ژن	F. primer	R. Primer
بتا اکتین	5'CGTTGACATCCGTAAAGACCTC3'	5'TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT3'
آنژیوستاتین	5'-ACCTGCTAGACCACCTGGAG-3'	5'-CCTTGGCTGTTATCTTCGGTACCGG-3' '
eNOS	5′-GTGACCCTCACCGATACAACATAC-3'	5′-5'GATGAGGTTGTCCGGGTGTCT-3′

تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار Graph Pad Prism صورت گرفت و جهت بررسی میزان تفاوت بین میانگین گروه‌ها از آزمون پارامتریک تحلیل واریانس یک طرفه و از آزمون تعقیبی توکی جهت یافتن محل اختلاف استفاده شد. سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

۳. ملاحظات اخلاقی

در مراحل مختلف تمرین، مسائل اخلاقی رفتار با حیوانات جهت جلوگیری از آزار و اذیت آن‌ها رعایت شد. این مطالعه با کد ۳۲۹ IR.ARAKMU.REC. ۱۳۹۴. به تصویب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک رسیده است.

۴.یافته‌ها

داده‌های آزمون گلوکز ناشتایی و وزن رت‌ها قبل و بعد از پایان تمرین استقامتی در جدول ۳ به‌صورت میانگین±انحراف معیار آورده شده است. مقایسه‌های داده‌های قبل و بعد نشان داد که وزن رت‌های سه گروه در قبل و بعد از تمرینات تفاوت معنی‌داری نداشته‌اند ($p > ۰/۰۵$)، اما گلوکز ناشتایی آن‌ها در

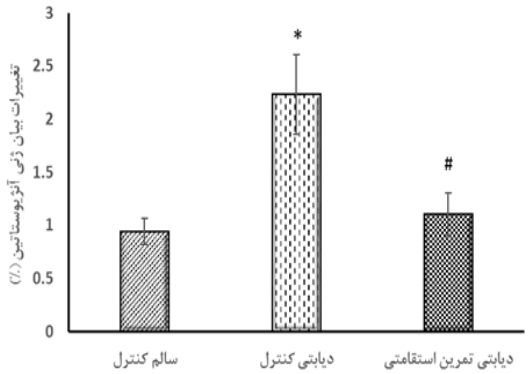
قبل و بعد از تمرینات در گروه تمرین استقامتی نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌دار داشته است (p < ۰/۰۵).

جدول ۳. داده‌های گلوکز ناشتا و وزن رت ها در قبل و بعد از تمرینات هوازی در گروه‌های کنترل سالم، کنترل دیابتی و دیابتی با تمرین استقامتی

متغیر / گروه	وزن بدن (گرم)		گلوکز ناشتا (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	
	قبل	بعد	قبل	بعد
کنترل سالم (HC)	۲۴۱/۹±۲۱	۲۷۹/۴±۳۸	۹۰/۴±۱۶	۷۳/۴±۸
کنترل دیابتی (DC)	۲۲۳/۶±۳۶	۲۵۰/۶±۴۸	*۲۹۹/۳±۸۵	*۳۷۸/۳±۱۰۵
دیابتی با تمرین استقامتی (DET)	۲۲۴/۳±۳۰	۲۲۷/۴±۳۸	*۳۵۴/۲±۱۰۶	$۱۵۰/۷±۱۱۶

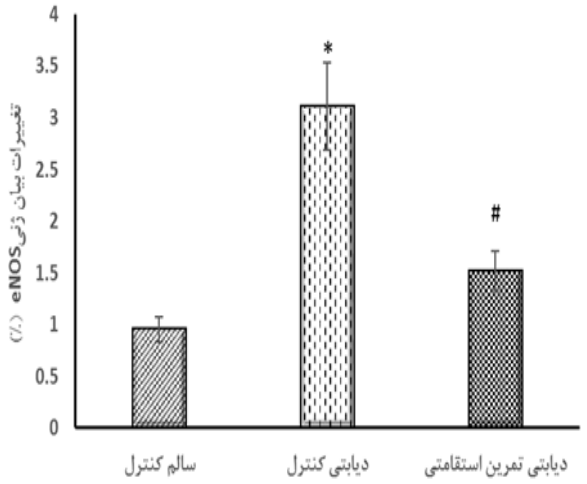
*نشانگر تفاوت معنی‌دار (p <۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل سالم و $ نشانگر تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل دیابتی می‌باشد.

هم‌چنین میانگین±انحراف معیار تغییرات داده‌های بیان ژن آنژیوستاتین در گروه‌های کنترل سالم (HC)، کنترل دیابت (DC) و دیابت تمرین استقامتی (DET) در نمودار ۱ نشان داده شده است. نتایج آزمون آنوای یک طرفه نشان داد که تغییرات سه گروه اختلاف معنی‌داری دارند (F =۵۸/۱ ،p =۰/۰۰۴). با مراجعه به آزمون توکی مشخص شد که تغییرات داده‌های گروه HC با DC (p=۰/۰۰۰) و DC با DET (p=۰/۰۰۰) اختلاف معنی‌داری دارند. اما تغییرات بیان ژن داده‌های HC و DET اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (p > ۰/۴۰۳).



نمودار ۱. تغییرات بیان ژن آنژیوستاتین در گروه‌های مختلف. * نشانگر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل سالم (p<۰/۰۵) و # نشانگر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل دیابتی (p<۰/۰۵) می‌باشد.

علاوه بر آن میانگین±انحراف معیار تغییرات داده‌های بیان ژن eNOS در گروه‌های مختلف در نمودار ۲ نشان داده شده است. نتایج آزمون آنوای یک طرفه نشان داد که تغییرات سه گروه اختلاف معنی‌داری دارند (F=۹۱/۹ ،p=۰/۰۰۲). با مراجعه به آزمون توکی مشخص شد که تغییرات داده‌های گروه HC با DC (p=۰/۰۰۰) و DC با DET (p=۰/۰۰۰) اختلاف معنی‌داری دارند. اما تغییرات بیان ژن داده‌های HC و DET اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (p =۰/۰۵۱).



نمودار ۲. تغییرات بیان ژن گیرنده eNOS در گروه‌های مختلف. * نشانگر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل سالم (p<۰/۰۵) و # نشانگر تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل دیابتی (p<۰/۰۵) می‌باشد.

۵. بحث

در این مطالعه به بررسی اثر تمرین استقامتی بر بیان آنژیوستاتین و eNOS در بافت قلب رت‌های نر ویستار دیابتی نوع ۲ پرداختیم. نتایج Real-Time PCR نشان داد که بیان هر دو ژن آنژیوستاتین و eNOS در گروه DC در مقایسه با گروه HC افزایش معنی‌داری را نشان دادند. تمرین استقامتی نیز موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن آنژیوستاتین و eNOS در

مقایسه با گروه DC شد. آنژیوستاتین به عنوان عاملی ضد آنژیوژنیک در بیماران دیابتی نقش دارد (۱۹) و به‌واسطه‌ی قطع‌شدن پروتئولیتیکی پلاسمینوژن توسط MMP-2 (Matrix metalloproteinase-2)، ۷، ۹ و۱۲ تولید می‌شود. مکانیسم مولکولی که آنژیوستاتین اثرات آنتی آنژیوژنیکی‌اش را اعمال می‌کند، حول سلول‌های اندوتلیال می‌گردد. آنژیوستاتین نشان داده که باعث مرگ سلول‌های اندوتلیالی از طریق مسیرهای آپوپتوتیک می‌شود و تکثیرزایی، مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و تشکیل لوله را توسط متصل‌شدن به آنژیومتین مختل می‌نماید (۲۰). از نظر مکانیکی مشخص نیست که چگونه دیابت باعث افزایش در آنژیوستاتین می‌شود. شواهدی وجود دارد که پلاسمین ردوکتاز درگیر در فرآیند پلاسمین، فسفوگلیسرات کیناز (PGK) است که یک آنزیم گلیکولیتیکی می‌باشد. فعالیت آنزیم PGK در دیابت افزایش می‌یابد و همراه با آن آنژیوستاتین نیز افزایش می‌یابد. احتمالا ارتباط افزایش آنژیوستاتین با فعالیت آنزیم PGK به این دلیل باشد که احیای پلاسمین، اولین مرحله از شکل‌گیری آنژیوستاتین است. آنزیم PGK تسهیل‌کننده‌ی احیای پلاسمین می‌باشد. افزایش فعالیت PGK (Cyclic-GMP-dependent protein kinase) در بالای دست MMP (Matrix metalloproteinases) می‌تواند توجیهی برای چرایی افزایش در آنژیوستاتین علی‌رغم کاهش در MMP-2 و MMP-9 باشد (۱۹). بر طبق گزارش‌های پیشین، بیان ژن آنژیوستاتین با هایپرگلیسمیا و دیابت افزایش می‌یابد (۱۹). نتایج ما افزایش معنی‌داری در بیان ژن آنژیوستاتین در بافت قلبی گروه DC در مقایسه با گروه HC را نشان دادند. از این‌رو، مطالعه‌ی ما گزارش‌های پیشین در ارتباط با تغییر معنی‌دار بیان ژن آنژیوستاتین در قلب دیابتی نسبت به قلب سالم را تایید می‌کند. از طرف دیگر، بیان ژن آنژیوستاتین نیز نشان داده که بعد از تمرین استقامتی کاهش می‌یابد. مطالعه‌ی حاضر نشان داد که القای دیابت توسط STZ، بیان آنژیوستاتین در قلب را افزایش می‌دهد. نتایج ما مطابق با نتایج گزارش‌های قبلی بود که تنظیم بالایی آنژیوستاتین در دیابت و وضعیت مقاوم به انسولین را نشان داده بودند و هایپرگلیسمیا را به عنوان دلیل افزایش بیان آنژیوستاتین بیان کرده بودند (۱۹). علاوه بر این، کاهش سطح VEGF قلب و متعاقب آن عدم شکل‌گیری کافی عروق جانبی و افزایش همزمان آنژیوستاتین را می‌توان به عنوان یک توضیح مولکولی برای افزایش خطر مرگ‌ومیر مشکلات قلبی و عروقی در بیماران مبتلا به مقاومت انسولینی و دیابت دانست (۸). بعضی از مطالعات نیز کاهش فعالیت eNOS را بعد از هایپرگلیسمیا نشان داده‌اند (۲۱). شواهدی نیز وجود دارند که افزایش بیان ژن و بیان پروتئین eNOS بعد از قرارگیری در معرض گلوکز زیاد را نشان داده‌اند (۱۱). از یک سو مطالعات در رابطه با کاهش eNOS در دیابت بیان کرده‌اند که دیابت منجر به اختلال معنی‌دار در وازودیلیشن اندوتلیوم در پاسخ به استیل کولین یا افزایش در جریان خون می‌شود. این اختلال احتمالا ناشی از کاهش اثربخشی NO میانجی‌کننده عملکرد داخل عروق می‌باشد. هایپرگلیسمیا، تولید NO در سلول‌های عضله صاف اندوتلیالی و عروقی را با بلاک کردن eNOS مهار می‌کند و استرس اکسیداتیو و تولید ROS به‌خصوص آنیون سوپر اکسید را افزایش می‌دهد (۲۲). سطوح گلوکز بالا علاوه بر کاهش eNOS باعث بیان بیش از حد iNOS (Inducible nitric oxide synthase) می‌شود که هر دو می‌توانند فعالیت HIF-1α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) را مهار کنند (۲۲). از سویی دیگر، مطالعات افزایش eNOS در بیماری دیابت نوع ۲ را نشان داده‌اند. Ser1177، به عنوان مهم‌ترین بخش تنظیم‌کننده‌ی فسفوریلاسیون شناخته شده است (۲۳). در وضعیت پایه (بازال)، Ser1177 فسفریله نمی‌شود، اما با محرک‌های مختلفی مانند استرس برشی، انسولین، برادی کینین یا مهارکننده‌ی آنزیم هیدروکسی متیل‌گلوتاریل کوآنزیم آ ردوکتاز (HMG-Co ردوکتاز) فسفریله شده و فعالیت eNOS آغاز می‌شود و در آنژیوژنز نقش خود را ایفا می‌نماید (۲۳). یکی از مسیرهای درگیر در فسفوریلاسیون، eNOS Ser1177 است. مسیر فسفاتیدیل اینوزیتول -۳- کیناز / پروتئین کیناز B (PI3K/ AKT) می‌باشد. پیام‌دهی طبیعی انسولین به فعال شدن دو مسیر موازی PI3K/ AKT و کیناز

(Renin-angiotensin system) Ras /Raf/ MAP منجر می‌شود (۲۴). مسیر PI3K/ AKT علاوه بر تحریک بیان پروتئین‌های انتقال دهنده‌ی GLUT4 در عضلات اسکلتی و بافت چربی گیرنده انسولین در آن می‌تواند فعالیت eNOS در سلول‌های اندوتلیال عضله‌ی قلبی را نیز تحت تاثیر قرار دهد (۲۵). هنگامی‌که مقاومت انسولینی رخ می‌دهد، حساسیت به انسولین در بافت‌های مختلف کاهش می‌یابد و تعادل بین دو مسیر پایین دستی بر هم می‌خورد. در سلول‌های اندوتلیال، فعالیت مسیر PI3K/ AKT کاهش می‌یابد و انسولین اعمال سلولی را از طریق مسیر کیناز Ras/Raf/ MAP واسطه می‌نماید. بنابراین شکل‌گیری NO کاهش یافته و وازودیلیشن کمتری به واسطه‌ی انسولین رخ می‌دهد (۲۶). در بیماری‌های قلبی eNOS بسیار مهم می‌باشد و انسولین نیز نقش محافظتی از قلب را از طریق مسیر PI3K/AKT دارد که واسطه‌کننده فسفوریلاسیون Ser1177 و افزایش تولید NO است (۲۷). در دیابت نوع ۲ مسیر فسفوریلاسیون Ser1177 تغییر می‌کند و به واسطه‌ی آنژیوتنسین II اتفاق می‌افتد. آنژیوتنسین II اعمالش را از طریق گیرنده‌های AT1 (Angiotensin II receptor type 1) و AT2 انجام می‌دهد و باعث فعال شدن eNOS می‌شود و مسیر PKB/ AKT (Protein kinase B) جایگزین مسیر قبلی می‌گردد و در نهایت eNOS در قلب دیابتی افزایش می‌یابد. مطالعات اخیر درباره اختلال ژن eNOS نشان داده‌اند که این نقص منجر به مقاومت انسولینی، فشار خون بالا و هایپر لیپیدمیا می‌گردد (۶). کنترل سطوح پروتئین eNOS، عمل پیچیده‌ای است که در سطوح مختلف رونویسی eNOS، تثبیت mRNA و تغییرات پس از ترجمه واقع شده است (۲۸). ما در این مطالعه افزایش بیان eNOS mRNA را در گروه کنترل دیابت و اثر کاهشی تمرین استقامتی در بیان eNOS mRNA را در مقایسه با گروه کنترل دیابت مشاهده کردیم. این داده‌ها برعکس مشاهدات دیگران بود که دریافتند در مقایسه با گروه کنترل، بیان eNOS mRNA در گروه دیابتی تمرین افزایش می‌یابد (۲۶). به‌طور مشابه، در سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده، افزایش گلوکز باعث افزایش بیان eNOS mRNA شده بود (۲۸). این تناقض می‌تواند به این دلیل باشد که دیابت باعث کاهش در عملکرد eNOS می‌شود تا بتواند مکانیسم‌های جبرانی را فعال کند. احتمالا، ابتدا به دلیل کاهش ROS ناشی از تمرین استقامتی، eNOS mRNA تولیدی ناشی از مسیر PKB/AKT نیز کاهش می‌یابد. دوم این‌که، هایپر گلیسمیا به عنوان نابودکننده NO عمل می‌کند و بهبود ناشی از تمرین استقامتی در کنترل گلیسمی باید در دسترس پذیری NO را بهبود بخشیده باشد (۲۹). سوم، افزایش NO دردسترس به عنوان مکانیسم بازخورد منفی جهت کاهش رونویسی eNOS از طریق مسیر cGMP (Cyclic guanosine monophosphate) عمل می‌کند. بنابراین کاهش eNOS mRNA می‌تواند به دلیل کاهش نیروهای محرک برای رونویسی eNOS باشد و در این‌جا به عنوان یک پاسخ مفید در بیماران دیابتی می‌باشد (۲۸). جریجالوا و همکاران به بررسی اثر ۹ هفته برنامه تمرینی دویدن بر روی تریدمیل پرداختند. تمرین باعث افزایش نسبت دایمر به مونومر در بطن چپ، افزایش تولید NO و کاهش eNOS وابسته به تولیدات سوپراکسید شد (۲۸) که هم‌راستا با نتایج مطالعه‌ی ما بود. به‌طورکلی، تمرین ورزشی عملکرد قلبی و عروقی را بهبود می‌بخشد، ظرفیت انتقال عروقی عضله‌ی اسکلتی را افزایش می‌دهد و انقباض‌های عضلانی تاثیراتی شبه انسولینی بر برداشت گلوکز در عضله اسکلتی را دارد (۴، ۱۳). در آزمودنی‌های انسانی، ۴ هفته تمرین ورزشی با محدودیت جریان خون به ساعد، سبب افزایش ظرفیت جریان خون شد (۴). اثر تمرین استقامتی مزمن، تمایل به القای آنژیوژنز و تغییر در حساسیت عروقی دارد که توسط نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز تایید شد. سلول‌های اندوتلیال، هدف مهمی برای سازگاری با تمرین ورزشی هستند. مطالعات نشان داده‌اند که تمرین سبب افزایش پروتئین eNOS و کاهش eNOS mRNA می‌شود (۱۵). در نهایت، آنژیوژنز با VEGF شروع می‌شود (۹، ۲۲، ۳۰) و با یک فاکتور قوی ضد آنژیوژنزی به نام آنژیوستاتین سرکوب می‌شود که دارای اثرات مهاری بر تکثیر سلول‌های اندوتلیال و مهار تکثیر سلول‌های صاف و مهاجرت در عروق می‌باشد (۵). به نظر

می‌رسد، افزایش بیان eNOS در دیابت بستگی به نوع سلول و نیز غلظت گلوکز و مدت قرارگیری در معرض گلوکز زیاد دارد (۲۳) و در مطالعه‌ی ما، احتمالا هایپرگلیسمیا نقش محرک در بیان ژن آنژیوستاتین و eNOS را داشته است. محدودیت پژوهش حاضر، دمای محیط محل اجرای تمرین حیوانات بود که حتی با سعی ما در ثابت نگه داشتن دما در ۲۲ درجه، اما دما در دامنه ی ۲±۲۲ نوسان داشت. در نهایت با توجه به نقش رژیم غذایی پرچرب در توسعه‌ی بیماری دیابت نوع ۲، اجرای تمرین استقامتی همراه با رژیم غذایی پرچرب و بررسی اثر آن بر بیان ژن و پروتئین آنژیوستاتین، eNOS، عوامل پایین‌دستی و بالادستی این متغیرها در بافت قلب دیابتی نوع ۲ پیشنهاد می‌گردد.

۶. نتیجه گیری

دیابت قلبی مرتبط با افزایش بیان عامل آنتی آنژیوژنزی قوی آنژیوستاتین می‌باشد. تمرین استقامتی باعث کاهش بیان ژن آنژیوستاتین و eNOS در قلب دیابتی شد که احتمالا نشان دهنده‌ی موثر بودن تمرین استقامتی در مقایسه با بی‌تحرکی بر بهبود آنژیوژنز قلب دیابتی نوع ۲ می‌باشد و تمرینات استقامتی منظم ممکن است به عنوان عامل غیردارویی باعث کاهش یا تأخیر در ایجاد اختلال در عملکرد اندوتلیال بافت قلب دیابتی نوع ۲ گردند.

۷. تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر برگرفته از بخشی از رساله دکتری با گرایش فیزیولوژی ورزشی می‌باشد و هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است. بدین وسیله از زحمات اساتید بزرگوار و دوستان عزیزی که در اجرای پژوهش همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Neil Thomas G, Q Jiang C, Taheri S, H Xiao Z, Tomlinson B, MY Cheung B, et al. A systematic review of lifestyle modification and glucose intolerance in the prevention of type 2 diabetes. Current diabetes reviews. 2010; 6(6):378-87.
2. Korivi M, Hou C-W, Chen C-Y, Lee J-P, Kesireddy SR, Kuo C-H. Angiogenesis: role of exercise training and aging. Adaptive Medicine. 2010; 2(1):29-41.
3. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. BioMed research international. 2015; 2015.
4. Khalifa MM. Role of angiogenesis as a factor modulating the course of cardiovascular complications in diabetic rats. 2011.
5. Sima J, Zhang SX, Shao C, Fant J, Ma J-x. The effect of angiostatin on vascular leakage and VEGF expression in rat retina. FEBS letters. 2004; 564(1-2):19-23.
6. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. International journal of vascular medicine. 2012; 2012.
7. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. Journal of pharmacological sciences. 2015; 129(2):83-94.
8. 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.
9. Wang Y, Wei X, Xiao X, Hui R, Card JW, Carey MA, et al. Arachidonic acid epoxygenase metabolites stimulate endothelial cell growth and angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2005; 314(2):522-32.
10. De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. Circulation research. 1998; 82(10):1094-101.
11. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Lüscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. Circulation. 1997; 96(1):25-8.
12. Ingjer F. Effects of endurance training on muscle fibre ATP-ase activity, capillary supply and mitochondrial content in man. The Journal of Physiology. 1979; 294(1):419-32.
13. Way KL, Hackett DA, Baker MK, Johnson NA. The effect of regular exercise on insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Diabetes & metabolism journal. 2016; 40(4):253-71.
14. Brixius K, Schoenberger S, Ladage D, Knigge H, Falkowski G, Hellmich M, et al. Long-term endurance exercise decreases antiangiogenic endostatin signalling in overweight men aged 50–60 years. British journal of sports medicine. 2008; 42(2):126-9.
15. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. The Journal of clinical investigation. 2000; 105(11):1631-9.
16. Sanchez OA, Snow LM, Lowe DA, Serfass RC, Thompson LV. Effects of endurance exercise-training on single-fiber contractile properties of insulin-treated streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Applied Physiology. 2005; 99(2):472-8.
17. Shahabinejad M, Rahmany M. The Effect Of Licorice Root Extract On Blood Sugar Level In Streptozotocin Induced Diabetic In Rats. Journal Of Diabetes. 2009; 1:A249-A50.
18. Afzalpour ME, Chadorneshin HT, Foadoddini M, Eivari HA. Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. Physiology & behavior. 2015; 147:78-83.
19. Sodha NR, Clements RT, Boodhwani M, Xu S-H, Laham RJ, Bianchi C, et al. Endostatin and angiostatin are increased in diabetic patients with coronary artery disease and associated with impaired coronary collateral formation. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2009; 296(2):H428-H34.
20. Chen Y-H, Wu H-L, Li C, Huang Y-H, Chiang C-W, Wu M-P, et al. Anti-angiogenesis mediated by angiostatin K1–3, K1–4 and K1–

4.5. Thrombosis and haemostasis. 2006; 95(04):668-77.
21. Kassab A, Piwowar A. Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. Biochimie. 2012; 94(9):1837-48.
22. Tahergorabi Z, Khazaei M. Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms. International journal of preventive medicine. 2012; 3(12):827.
23. Adela R, Nethi SK, Bagul PK, Barui AK, Mattapally S, Kuncha M, et al. Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from South Indian patients. PloS one. 2015; 10(4):e0125270.
24. Ishii N, Patel KP, Lane PH, Taylor T, Bian K, Murad F, et al. Nitric oxide synthesis and oxidative stress in the renal cortex of rats with diabetes mellitus. Journal of the American Society of Nephrology. 2001; 12(8):1630-9.
25. Di Pietro N, Di Tomo P, Di Silvestre S, Giardinelli A, Pipino C, Morabito C, et al. Increased iNOS activity in vascular smooth muscle cells from diabetic rats: potential role of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II delta 2 (CaMKIIδ2). Atherosclerosis. 2013; 226(1):88-94.
26. Cai S, Khoo J, Channon KM. Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells. Cardiovascular research. 2005; 65(4):823-31.
27. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. Diabetes research and clinical practice. 2014; 103(2):137-49.
28. Grijalva J, Hicks S, Zhao X, Medikayala S, Kaminski PM, Wolin MS, et al. Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. Cardiovascular diabetology. 2008; 7(1):34.
29. Brodsky SV, Yamamoto T, Tada T, Kim B, Chen J, Kajiya F, et al. Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 2002; 282(6):F1140-F9.
30. Streit U, Reuter H, Bloch W, Wahlers T, Schwinger RH, Brixius K. Phosphorylation of myocardial eNOS is altered in patients suffering from type 2 diabetes. Journal of Applied Physiology. 2012; 114(10):1366-74.