پژوهش‌نامهٔ فیزیولوژی ورزشی کاربردی **مقاله پژوهشی**

سال هفدهم/ شماره سی و سوم/بهار و تابستان ۱۴۰۰

دریافت: ۹۹/۸/۲۷ پذیرش: ۹۹/۱۱/۹ ص ص: ۸۷-۷۳

بررسی اثر تمرین هوازی بر بیان ژن شاخص رشد اندوتلیال عروق-B (VEGF-B) و وضعیت آنتی اکسیدانی تام (TAS) بافت قلب در موش‌های صحرایی دیابتی

حجت اله شهاوند[۱]، صدیقه حسین پور دلاور[۲]، ناصر بهپور[۳]، حسن صفی خانی[۴]، معصومه عزیزی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: دیابت با هایپرگلایسمی و افزایش استرس اکسیداتیو باعث اختلالات قلبی و عروقی شده، بدین ترتیب سبب بروز بیماری‌های شریان کرونری یا پرفشارخونی سیستمیک می‌شود. از این رو هدف از مطالعه اخیر بررسی اثر تمرین هوازی بر بیان ژن شاخص رشد اندوتلیال عروق-B (VEGF-B) و وضعیت آنتی اکسیدانی تام (TAS) بافت قلب در موش‌های صحرایی نر دیابتی بود. **مواد و روشها:** پژوهش حاضر از نوع تجربی است و در آن ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ به ۳ گروه ۱۰ تایی شامل گروه دیابت تمرین، دیابت کنترل و سالم کنترل تقسیم شدند. موش‌های گروه‌های دیابتی از طریق تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین (mg/kg ۴۵) دیابتی شدند. برنامه تمرینی ورزشی شامل ۶ هفته تمرین روی نوارگردان بود. ۲۴ پس از ساعت از آخرین جلسه تمرین برای بررسی اثر تمرین، نمونه‌های بافت قلب به منظور اندازه گیری بیان ژن شاخص رشد اندوتلیال عروق-B و TAS استخراج گردید. برای مقایسه بین گروهی و اختلاف معنادار بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی LSD با سطح آماری (P<۰/۰۵) استفاده گردید. **یافته‌ها:** یافته‌ها نشان داد که پس از یک دوره تمرین استقامتی میزان بیان ژن VEGF-B و TAS در گروه دیابت تمرین نسبت به دیابت کنترل افزایش معنادار داشته است (P=۰/۰۰۱)، اما میزان بیان ژن VEGF-B و TAS بین دو گروه دیابت تمرین و سالم کنترل به ترتیب عدم تفاوت معنادار (P=۰/۳۶۴) و تفاوت معناداری (P=۰/۰۳۳) مشاهده شد. **نتیجه گیری:** به نظر می‌رسد تمرین استقامتی می‌تواند اثر مثبت بر میزان بیان ژن VEGF-B و سطح TAS بافت قلب موش‌های دیابتی داشته باشد و می-تواند باعث بهبود قلب دیابتی شود.

واژه‌های کلیدی: تمرین هوازی، VEGF-B، TAS، قلب، دیابت

۱ دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزش، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

۲ استادیار، گروه فیزیولوژی ورزش، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران. نویسنده مسئول: delavar2009@yahoo.com

۳ دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۴ استادیار، گروه حرکات اصلاحی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

۵ استادیار، گروه فیزیولوژی ورزش، واحد آبادان، دانشگاه آزاد اسلامی، آبادان، ایران

مقدمه

دیابت ملیتوس شایع‌ترین مشکل متابولیکی می‌باشد و یکی از شاخص‌های خطرزا برای توسعه مشکلات نارسایی قلبی به‌شمار می‌رود. با این حال هنوز سازوکار دقیق چگونگی تأثیر این بیماری بر قلب مشخص نشده است (۱). یکی از مشخصه‌های دیابت اختلال در عملکرد آندوتلیال از طریق افزایش چربی، انسولین و استرس اکسیداتیو است (۲). به همین دلیل گفته می‌شود که بیماری‌های قلبی عروقی در بیماران دیابتی شایع‌تر است (۳). در بیماری دیابت رگ‌زایی در قلب کاهش می‌یابد و بر عکس در اندام‌هایی مثل چشم و کلیه افزایش می‌یابد (۴). از جمله شاخص‌های مهمی که در آنژیوژنز نقش اساسی دارد عامل رشد آندوتلیال عروقی-B (Vascular endothelial growth factor-B: VEGF-B) می‌باشد که تولید و فعالیت آن در بیماری دیابت کاهش می‌یابد (۵). این شاخص رشد به عنوان تنظیم کننده مهم آنژیوژنز؛ تمایز، تکثیر و مهاجرت سلول اندوتلیال را میانجی‌گری می‌کند، درحالی‌که مانع مرگ سلولی شده و با افزایش تولید نیتریک اکسید (NO) و نفوذپذیری عروقی همراه است (۶،۷). کاهش و مهار عوامل مرتبط با آنژیوژنز در بیماری دیابت باعث کاهش پرفیوژن و خون رسانی به میوکارد و افزایش مرگ و میر می‌گردد (۵). از طرف دیگر اگرچه عوامل متعددی در پیشرفت بیماری دیابت دخیل هستند، اما امروزه نقش استرس اکسیداتیو و رادیکال های آزاد در پاتوژنز این ضایعات مورد توجه قرارگرفته است (۸). در شرایط طبیعی بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرآیندها موجب استرس اکسیداتیو شده که اگر این استرس شدید یا طولانی باشد، رادیکال‌های آزاد در واکنش با قسمت‌های مختلف سلولی و پروتئین ها، پراکسیداسیون لیپید و DNA باعث آسیب به سلول و حتی مرگ می‌شود (۹). در سیستم‌های بیولوژیک هوازی به‌منظور مقابله با رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن، مکانیسم‌های دفاع آنتی اکسیدانی طراحی شده است تا اثرات زیانبار این عوامل مهاجم را خنثی نموده، یا به حداقل برساند (۱۰). هر یک از ترکیبات آنتی اکسیدانی نقش منحصر به فردی دارند که عمل یکدیگر را کامل می‌کنند و برآیند آنها تحت عنوان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام بدن تلقی می‌گردد (۱۱).

تمرینات منظم بدنی توانایی سیستم‌های ضد اکسایشی بدن را افزایش داده و بدن را در مقابل خاصیت تخریب‌کنندگی فشار اکسایشی که در اثر ورزش افزایش می‌یابد، محافظت می‌کند. این تغییرات به‌طور آهسته و به مرور زمان و به‌صورت موازی با دیگر سازگاری‌های ورزش رخ می‌دهد (۱۲). در اثر فعالیت هوازی حجم قلب و خون افزایش می‌یابد و تراکم مویرگی، تعداد و تراکم میتوکندری و تعداد آنزیم‌های اکسایشی زیاد می‌گردد (۱۳). این عوامل سبب بهینه شدن مصرف اکسیژن می‌شود؛ فرد کمتر دچار محدودیت اکسیژن شده و یک فعالیت مشخص را با مصرف اکسیژن کمتری انجام می‌دهد. درواقع تمرینات منظم باعث ایجاد نوعی سازگاری در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی و ترمیم می‌شوند که این امر موجب افزایش مقاومت نسبت به انسولین و استرس اکسایشی می‌شود (۱۴). تمرین ورزشی به‌خصوص نوع استقامتی می‌تواند باعث تغییر در فرآیند آنژیوژنز و وضعیت انتی‌اکسیدانی گردد (۱۵). اجرای تمرین ورزشی به تغییر در نیروهای همودینامیکی، فشار برشی، کشش و فشار بر دیواره‌های عروق منجر می‌شود که در نهایت تغییر در مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیال را به همراه دارد (۱۶).

با این حال اگرچه فعالیت‌های ورزشی توانایی تنظیم سطوح سرمی فاکتورهای مرتبط با آنژیوژنز را دارند تا بدین شکل از ایجاد شرایط پاتولوژیکی مانند ضخیم‌شدن و سفتی دیواره‌ی سرخ‌رگ و آرتریت جلوگیری کنند، اما هنوز سازوکار مولکولی شروع فرایند توسعه‌ی شبکه‌ی مویرگی در پاسخ به تمرینات ورزشی به‌خوبی شناخته نشده است. از طرفی تأثیر ورزش بر VEGF-B نتایج متناقضی دارد و روشن شدن فرایند تنظیمی به وسیله VEGF-B و شناسایی سازو کارهای جدید که به وسیله تمرین ورزشی تحت تاثیر قرار می گیرد استراتژی بسیار مهمی است، ازسوی دیگر سازوکارهای اثربخشی تمرین استقامتی بر آنژیوژنز قلبی در شرایط پاتولوژیک به خوبی مشخص نشده است. از این رو هدف از مطالعه اخیر بررسی اثر تمرین هوازی بر بیان ژن VEGF-B و میزان TAS بافت قلب در موش‌های صحرایی دیابتی بود.

روش پژوهش

تحقیق حاضر با کد کمیته اخلاق پژوهش بر حیوانات به شماره IR.KUMS.REC.1399.126 از نوع تجربی با طرح پس آزمون به همراه گروه کنترل است. برای این منظور ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (Wistar) به عنوان نمونه تحقیق در نظر گرفته شدند. کلیه موش‌ها در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای ۳±۲۲ درجه سانتی گراد، چرخه روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری گردیدند و دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش داشتند. حیوانات به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاه و نوارگردان مخصوص جوندگان آشنا شدند و ۵ روز در هفته به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوار گردان در طول مرحله آشنا سازی، به منظور آشنا شدن با شرایط آزمایشگاه، راه رفتند.

گروه بندی و برنامه تمرینی

سی سر موش صحرایی به روش تصادفی به ۳ گروه مساوی ۱۰ تایی تقسیم شدند: ۱)گروه دیابت تمرین :(DT) این گروه شامل۱۰ سر موش صحرایی بود که از طریق تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین :Streptozotocin) (STZدیابتی شدند و ۶ هفته فعالیت ورزشی روی نوارگردان داشتند ۲) گروه دیابت کنترل :(DC) این گروه شامل ۱۰ سر موش صحرایی بود که از طریق تزریق درون صفاقی STZ دیابتی شده و در هیچ‌گونه برنامه تمرینی شرکت داده نشدند، ۳) گروه سالم کنترل :(HC) این گروه شامل ۱۰ موش صحرایی بود که درگیر هیچ فعالیتی نبودند. لازم به ذکر است تنها گروه DT قبل از شروع برنامه تمرینی در برنامه آموزش و آشنایی با نوار گردان شرکت داشتند.

القای دیابت در موش توسط استرپتوزوتوسین (STZ)

القای دیابت پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، در ۲۰ سر از موش‌های صحرایی با یکبار تزریق درون صفاقی ۴۵ mg/kg محلولSTZ Sigma, St. Louis MO, USA، تهیه شده در بافر سیترات تازه ۰/۵ مولار با pH=۴,۵ صورت پذیرفت. به موش‌های صحرایی غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانست روی ورید دم موش های صحرایی، یک قطره خون روی نوار گلوکومتر قرار داده شد و قند خون با استفاده از دستگاه گلوکومتری تندازه گیری شد. موش‌های صحرایی که قند خون آنها بالاتر از ۲۴۰ mg/dl بود، به عنوان موش های صحرایی دیابتی در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفتند. دیابتی شدن همه‌ی آنها تایید گردید.

پروتکل تمرین استقامتی

تمرین استقامتی روی نوارگردان با شدت متوسط در تحقیق حاضر انجام گردید. به‌طوری که گروه تمرین استقامتی در معرض تمرین نوار گردان برای ۵ جلسه در هفته و به مدت ۶ هفته تمرین قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین نوار گردان به تدریج افزایش یافت درحالی‌که شیب صفر درنظر گرفته شد. روند افزایش سرعت و مدت پژوهش بدین شرح بود: بدین ترتیب که از ۱۰ متر در دقیقه با برای ۱۰ دقیقه در هفته اول، ۱۰ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته دوم، ۱۵ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم، به ۱۸–۱۷ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت. جهت رسیدن به سازگاری‌های بدست‌آمده در حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه‌داشته شدند. اندازه‌گیری سطوح گلوکز قبل از شروع انجام پروتکل، در طول دوره‌ی تمرینی و پس از اتمام آن از انتها دم هر یک از حیوانات پس از ۱۲ ساعت ناشتا توسط گلوکومتر گرفته شد

بافت برداری

با گذشت ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی توسط تزریق درون صفاقی ترکیبی از ۷۵mg/kg کتامین و۵ mg/kg-1 زایلازین بیهوش شدند. در پژوهش حاضر ۳ موش دیابتی تلف گردیدند. تحت شرایط استریل بافت قلب جدا شد و تا قبل از انجام بررسی‌های آزمایشگاهی در دمای منفی۷۰ نگهداری شدند. برای سنجش TAS جهت یکنواخت سازی، پس از جدا کردن بافت قلب و برش قسمتی از آن، بخش مد نظر را در بافر لیز کننده به نسبت ۱۰ به ۱ قرار داده و با استفاده از هموژناز شیشه‌ای با ۱۰ ضربه بر روی یخ هموژنیز شده. برای اندازه گیری میزان غلظت آن از کیت تجاری TAS شرکت Rel Assay Diagnostic با استفاده از روش رنگ سنجی و فتومتریک انجام گردید. استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری TRIZOL و مطابق با روش ارائه شده توسط شرکت انجام شد. به‌منظور حذف DNA، تمام نمونه‌های RNA به‌مدت ۱ ساعت با آنزیم Dnaseو مطابق روش ارائه شده توسط شرکت تیمار شدند. غلظت و میزان خلوص نمونه‌های RNA پس از قرائت جذب آنها در طول موج ۲۶۰ nm و نیز محاسبه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ با استفاده از اسپکتروفوتومتر بیوفتومتر (اپندورف، آلمان) تعیین گردید. نمونه‌هایی که نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ آنها بیش از ۱/۸ بود. جهت سنتز cDNAمورد استفاده قرار گرفتند. سنتز cDNA با استفاده از کیت تجاری AmpliSence صورت پذیرفت. پرایمرهای تصادفی هگزامر در واکنش‌هایی با حجم ۲۰ µL مطابق دستورالعمل شرکت انجام شد. به منظور تأیید بیان ژن‌های مورد نظر، ابتدا واکنش روی بافت‌های مورد نظر انجام گردید و در صورت تأیید بیان ژن‌های مورد نظر به منظور بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها از آزمون PCR در زمان حقیقی استفاده گردید. برای طراحی پروب و پرایمر از نرم افزار Beacon designer TM7/01 استفاده شد. واکنش‌های PCR با استفاده از آنزیم Taq polymeraseدر واکنش‌هایی با حجم ۲۵ µL انجام شد. نمونه cDNA بافت قلب به عنوان کنترل مثبت و یک نمونه واکنش فاقد cDNA به‌عنوان کنترل منفی در هر واکنش PCR در نظر گرفته شد. به‌منظور مشاهده محصول PCR از ژل آگاروز دو درصد تهیه شده در محلول بافر TAE استفاده شد. برای ارزیابی تغییرات در بیان ژن‌ها روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و دستگاه Mini Option Tm محصول شرکت بیوراد و کیت تجاری qPCR Probe Master Bioneer استفاده شد. مقادیر مقایسه‌ای بیان ژن‌های مورد نظر در مقایسه با بیان GAPDH در هر بافت توسط نرم افزار ژن ارزیابی و بر اساس رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ گزارش گردید.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

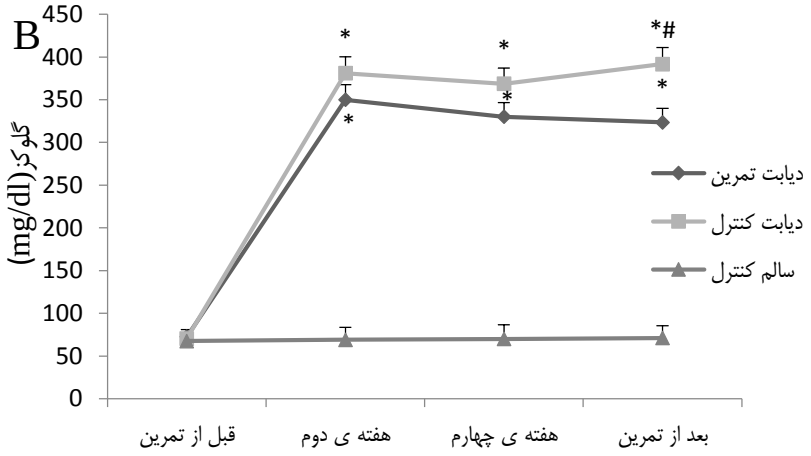
ژن‌ها	رفت	برگشت	اندازه bp
GAPDH	AGTTCAACGGCACAGTCAAG	TACTCAGCACCAGCATCACC	119
VEGF-B	ACCTCTGAGCATGGAACTCA	CATGAGGATCTGCATTCGGAC	149

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه وتحلیل داده‌ها از آزمون شاپیروویلک برای طبیعی بودن توزیع داده‌ها استفاده شد و پس از بدست آمدن تجانس میانگین واریانس‌ها از تحلیل واریانس اندازه گیری مکرر برای بررسی نتایج قندخون و از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه با سطح معناداری (P<۰/۰۵) و آزمون تعقیبی LSD استفاده گردید.

یافته‌ها

در شروع برنامه تمرینی سطح گلوکز خون به صورت معناداری پس از القای دیابت توسط استرپتوزوتوسین در موش‌های گروه‌های دیابتی افزایش یافت و پس از ۶ هفته تمرین استقامتی در مقایسه با گروه‌های سالم همچنان از اختلاف معناداری برخوردار بود (P<۰/۰۵) و این افزایش گلوکز در طول دوره‌ی تمرینی نیز ادامه داشت، اما باید بیان نمود که در پایان برنامه تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت کنترل به صورت معناداری پایین‌تر بود (شکل ۱).

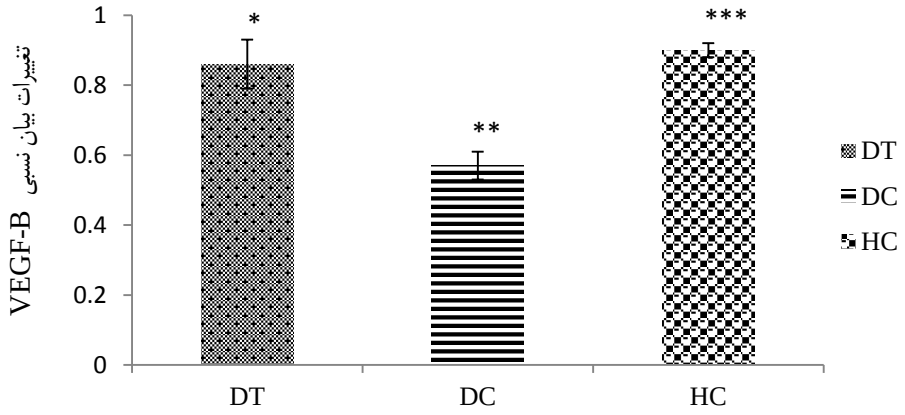


شکل ۱: سطح سرمی گلوکز ناشتا (Mean ± SD) در موش های صحرایی گروه های مختلف.

*تفاوت معنادار بین گروه دیابت تمرین و دیابت کنترل با سالم کنترل و # تفاوت معنادار گروه دیابت تمرین و دیابت کنترل (P<۰/۰۵) براساس آزمون آماری تحلیل واریانس با اندازه‌گیری های مکرر

نتایج تجزیه و تحلیل بافت قلب

نتایج آزمون تعقیبی LSD نشان داد که پس از ۶ هفته تمرین استقامتی میزان بیان ژن VEGF-B در گروه تمرین دیابت نسبت به دیابت کنترل تفاوت معناداری (P=۰/۰۰۱) و میزان آن درگروه تمرین دیابت بیشتر بوده است. در گروه دیابت کنترل نسبت به گروه سالم کنترل تفاوت معناداری داشته است (P=۰/۰۰۱). لازم به ذکر است که بین دو گروه دیابت تمرین و کنترل سالم نیز تفاوت معناداری مشاهده نشد (P=۰/۳۶۴). میزان TAS در گروه دیابت تمرین تفاوت معناداری نسبت به گروه کنترل دیابت مشاهده گردید (P=۰/۰۰۱) و میزان آن در در گروه دیابت تمرین بیشتر بوده است. همچنین نتایج نشان داد که میزان TAS در دو گروه دیابت تمرین و دیابت کنترل نسبت به گروه کنترل سالم به ترتیب با سطح معناداری (P=۰/۰۰۱) و (P=۰/۰۳۳) کاهش معناداری را داشتند. در دوگروه دیابت تمرین و دیابت کنترل نیز اختلاف معناداری مشاهده شد (P=۰/۰۰۱).

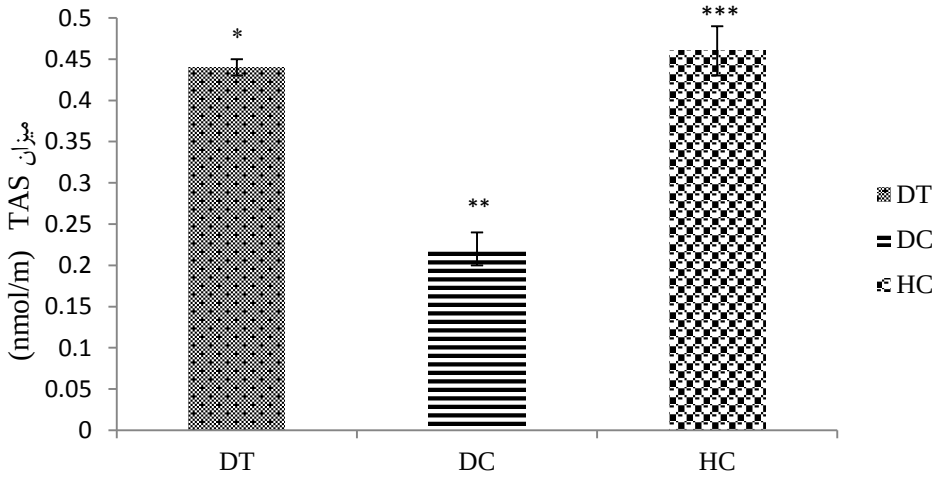


شکل ۲: بیان ژن VEGF-B بر اساس (Mean±SD) بافت قلب پس از شش هفته تمرین استقامتی بر اساس آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه در موش‌های گروه‌های مختلف. علائم اختصاری: DT: دیابت تمرین، DC:دیابت کنترل و HC: سالم کنترل. *اختلاف معنادار گروه DT و DC, **اختلاف معنادار گروه DT و HC,***اختلاف معنادار گروه HC و DC.

بحث و بررسی

فعالیت‌های ورزشی را می‌توان به‌عنوان یک شاخص محافظتی برای قلب بیماران دیابتی در نظر گرفت. تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند که هنگام فعالیت ورزشی، تغییرات ساختاری در بافت قلب دیده می‌شود (۱۸،۱۷). مطالعات نشان داده‌اند که احتمال دارد دیابت بر شاخص‌های پروآنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک اثرگذار باشد؛ به طوری که موجب تغییر تعادل بین عوامل تحریک کننده و مهار کننده آنژیوژنز شده و در نهایت، موجب افزایش بیماری های قلبی- عروقی شود (۱۹). در مطالعه حاضر به بررسی اثر ۶ هفته تمرین استقامتی بر میزان بیان ژن

VEGF-Bو TAS بافت قلب موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت تجربی پرداخته شد. تمرینات بدنی منظم و مستمر، می‌تواند موجب ایجاد سازوکارهای مفیدی در عملکرد قلب شود و در آماده‌سازی سلول‌ها برای مقابله با سطوح بالاتر استرس اکسیداتیو و بیماری‌های مرتبط با این ارگان، نقش داشته باشد که از جمله این تمرینات، تمرین استقامتی است (۲۰). بنابر نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر ۶ هفته تمرین استقامتی موجب کاهش معنادار غلظت گلوکز خون در گروه تمرین دیابتی شده است. نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهند که ورزش می‌تواند جهت کاهش سطح گلوکز پلاسما در طول ورزش و پس از آن مفید واقع شود. همچنین نشان داده شده ورزش می‌تواند حساسیت انسولینی را نیز افزایش دهد (۲۱). در برخی مطالعات بیان شده است که کاهش گلوکز خون پس از فعالیت ورزشی ریشه در بهتر شدن عملکرد انسولینی و بهبود پاسخ سلول‌ها به انسولین دارد. بنابراین افزایش برداشت گلوکز ناشی از فعالیت ورزشی می‌تواند ریشه در افزایش بیان GLU4-4 وIRS-1 در فعالیت ورزشی داشته باشد (۲۲).



شکل ۳: وضعیت TAS براساس (Mean±SD) بافت قلب پس از شش هفته تمرین استقامتی بر اساس آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه در موش‌های گروه‌های مختلف. علائم اختصاری: DT: دیابت تمرین، DC: دیابت کنترل و HC: سالم کنترل. *اختلاف معنادار گروه DT و DC, **اختلاف معنادار گروه DT و HC, ***اختلاف معنادار گروه HC و DC.

یکی از شاخص‌های اندازه گیری در تحقیق حاضر میزان بیان ژن VEGF-B در بافت قلب موش‌های دیابتی بود که مشاهده گردید تمرین ورزشی بر میزان بیان آن تاثیر داشته است و باعث افزایش بیان آن در گروه دیابت تمرین در مقایسه با دیابت کنترل شده است که این بیان از طریق محرک‌های مختلفی نظیر نیتریک اکساید، GIF-1 تحریک و موجب توسعه‌ی شبکه عروقی قلب می‌گردد. نشان داده است که در قلب طبیعی و سالم پروتئین VEGF-B بیان می‌شود و آنژیوژنز را در هر دو شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی میانجی می‌نماید

(۲۳). فقدان VEGF-B و ایزوفرم‌های قلب دیابتی منجر به اختلال آنژیوژنز، کاهش پرفیوژن میوکارد و ایسکمی می‌شود (۲۴). می‌توان اینگونه بیان نمود که دیابت با افزایش فشار اکسیداتیو باعث اختلال فرآیند آنژیوژنز می‌شود (۲۵). مطالعه‌ی حاضر نشان داد که القای دیابت در قلب سطوح بیان ژن VEGF-B را کاهش می‌دهد که همراستا با نتایج بسیاری از مطالعات است (۲۶–۲۸). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که انسولین می‌تواند از طریق فعال کردن مسیر PI3 kinase/Akt بیان این پروتئین را تنظیم نماید (۲۹). در گروه دیابتی شده با STZ مشاهده گردید که دیابت باعث کاهش بیان ژن VEGF-B گردیده است که مطابق با نتایج گزارش‌های قبلی بود که تنظیم پایینی این پروتئین در قلب دیابتی و وضعیت مقاوم به انسولین نشان داده بودند و کاهش انسولین را به عنوان دلیل کاهش بیان کرده بودند (۳۰). از طرف دیگر، نشان داده است که بیان ژن و پروتئین VEGF-B نیز بعد از تمرین استقامتی افزایش می‌یابد. احتمالا کاهش مقاومت به انسولین، افزایش حساسیت انسولینی و انقباض‌های عضلانی ناشی از تمرین استقامتی سبب بهبود و افزایش معنادار بیان ژن این پروتئین بافت قلب شده باشند (۳۱). بنابراین یکی از عواملی که منجر به آزاد شدن سطوح VEGF-B در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل گردیده است بالاتر بودن جریان خون عضله در رت‌های تمرین کرده است که به موجب آن فشار برشی بیشتری به جدار عروق وارد گردد (۳۲). فشار برشی به‌طور عمده سبب آرتریوژنز و آنژیوژنز می‌گردد. این‌گونه به نظر می‌رسد که افزایش فشار برشی از طریق فعال‌سازی کانال‌های یونی به‌ویژه کانال‌های پتاسیمی بیشتر موجب ترشح اتساع کننده‌های عروقی به‌ویژه NO در نتیجه فعال‌سازی گیرنده‌های تیروزین کینازی فاکتورهای رشد به‌ویژه VEGF می‌گردد (۳۳). یک فرضیه دیگر که برای افزایش این پروتئین می‌توان در نظر گرفت این است که فعالیت‌های بدنی موجب افزایش شاخص‌های رشدی می‌گردند و این شاخص‌ها موجب فعال سازی GH-IGF1 و بدین ترتیب موجب افزایش رگزایی می‌گردند. از سوی دیگر هورمون رشد عاملی برای فعال سازی نیتریک اکساید می‌باشد که از طریق رگ گشایی می‌تواند عاملی برای رگزایی باشد. رادریگیجز و همکاران (۳۴) و ارکات و همکاران (۳۵) همراستا با مطالعه‌ی حاضر نشان دادند که تمرینات استقامتی میزان بیان VEGF-B را افزایش می‌دهد که این افزایش از طریق افزایش متابولیسم عضله‌ی قلبی و ایجاد شرایط کمبود اکسیژن موجب تحریک HIF-1 و بهبود آنژیوژنز قلبی از طریق افزایش VEGF-B می‌گردد. در بیشتر پژوهش‌های انجام شده افزایش سطوح این پروتئین دیده می‌شود اما در پاره‌ای از پژوهش‌ها هم کاهش آن دیده می‌گردد (۳۶،۳۷) که این به معنای عدم تاثیر فعالیت ورزشی نیست بلکه این کاهش موقتی می‌تواند ناشی از اتصال VEFG-B به گیرنده‌های موجود در سلول‌های آندوتلیال باشد که این اتصال خود محرکی برای فرایند آنژیوژنز در عضله‌ی قلبی باشد (۳۸). عوامل دیگری نیز علل ناهمسویی تغییرات VEFG-B در تحقیق حاضر درمقایسه با نتیجه تحقیقات ناهمسو می‌باشد که ازجمله‌ی آنها می‌توان به نوع آزمودنی‌ها باشد چنانچه در پژوهش حاضر از رت‌ها به عنوان آزمودنی استفاده گردید اما در پژوهش‌های ذکر شده آزمودنی‌ها انسان بودند. سایر عوامل موثر دیگر در اثرگذاری بر این فاکتور پروتکل تحقیق، مدت و شدت تمرین می‌باشد (۳۹).

از دیگر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در پژوهش حاضر بررسی تغییرات TAS پس از یک دوره تمرین استقامتی در موش‌های دیابتی بود که نتایج نشان‌دهنده‌ی تاثیر مثبت فعالیت استقامتی بر سطح آن در بافت قلب حیوانات دیابتی بوده است که همراستا با سایر پژوهش‌هایی است که تاثیر مثبت فعالیت ورزشی را بر TAS بیان

نموده اند (۴۰-۴۲). این درحالی است که در گروه دیابت کنترل کاهش سطوح آن دیده شده است. از جمله دلایل ایجاد استرس اکسیداتیو در گروه رت‌های دیابتی می‌توان به فعال‌سازی مسیر پینه آل، افزایش نسبت NAD/NADH+ درون سلولی، خوداکسایشی گلوکز و همچنین اختلال در متابولیسم نیتریک اکساید اشاره کرد (۴۳). این‌گونه به‌نظر می‌رسد که بر اثر بیماری دیابت اکسیدان‌های ناشی از بافت قلب افزایش یافته است و سیستم آنتی‌اکسیدانی تضعیف می‌گردد. مکانیسم‌های متعددی برای توجیه پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به فعالیت ورزشی ارائه شده است. متعاقب تمرینات ورزشی تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد. در نتیجه به دنبال آن مالون دی آلدئید (MDA) که به عنوان یکی ازشاخص‌های پراکسیداسیون لیپیدی غشاء گلبول-های قرمز خون شناخته شده است، افزایش می‌یابد. افزایش استرس اکسیداتیوها در بدن، سیستم دفاعی سلول همانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی جهت مقابله با استرس اکسیداتیو تولید شده تحریک و فعال می‌شوند (۴۴). فعالیت ورزشی منظم قادر است از استرس اکسیداتیو با کاهش پراکسیداسیون لیپید و همچنین افزایش TAS و فعالیت سوپراکسیدیسموتاز جلوگیری کند (۴۵). می‌توان به این نکته نیز اشاره کرد که قرار گیری مداوم در موقعیت‌های تسهیل کننده تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر باعث ایجاد سازگاری‌هایی می‌شود که دفاع سلولی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را بهبود بخشیده و در نتیجه، فعالیت رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهد (۴۶). کاهش وضعیت اکسیدانی بر اثر تمرینات ورزشی منظم چندین هفته‌ای را می‌توان به بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی درونزاد و یا بهبود عملکرد دستگاه انتقال الکترون (جلوگیری از نشت الکترون) نسبت داد (۴۷). همچنین، تولید مکرر رادیکال‌های آزاد ناشی از ایسکمی و انتشار مجدد خون در سطح عضلانی که در اثر فعالیت‌های ورزشی روی می‌دهد می‌تواند در بهبود نیم رخ آنتی‌اکسیدانی نقش داشته باشد (۴۶،۴۸). این نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر دلالت بر نقش تمرینات با شدت متوسط بر کنترل شاخص های استرس اکسایشی و پیشگیری از پراکسیداسیون لیپید و آسیب پذیری غشاء دارد. شدت و مدت فعالیت بدنی متغیرهای مهمی هستند که می‌توانند در نوع فعالیت بدنی و بر اثرگذاری روی شاخص‌های استرس اکسایشی و وضعیت آنتی اکسیدانی بدن دخالت نماید (۴۹). با این وجود در برخی از پژوهش‌ها میزان TAS پس از فعالیت ورزشی تغییر معناداری نکرده و یا حتی کاهش یافته است که به دلایل بسیاری بستگی دارد. با توجه به اینکه اکسیژن رسانی زیاد بافتی یکی از مهمترین دلایل افزایش عوامل استرس اکسیداتیو می‌باشد و پاسخ استرس اکسیداتیو به فعالیت ورزشی تحت تأثیر عواملی از قبیل وضعیت سلامتی فرد، سن، جنس، نژاد، ژنتیک، میزان آمادگی جسمانی، تفاوت‌های فردی، پاسخ‌های متفاوت بافتی، تارهای عضلانی و انواع آن، شدت و مدت و نوع تمرین ورزش انجام شده و کاهش دریافت مواد غذائی ضد استرس اکسیداتیو در تغذیه روزانه افراد قرار می‌گیرد. دلایل ذکر شده در بالا می‌تواند علت عدم تغییر معنادار یا کاهش TAS پس از فعالیت ورزشی باشد (۵۰،۵۱). این پژوهش نیز همانند بسیاری از پژوهش‌ها دارای محدودیت‌هایی بوده است که ازجمله آن عدم بررسی سایر عوامل مرتبط در روند آنژیوژنز بوده است و پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آینده سایر عوامل درگیر در این روند نیز تحت بررسی قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که دیابت باعث کاهش بیان ژن VEFG-B در بافت قلب دیابتی گردیده است و تمرین استقامتی باشدت متوسط اثر مثبتی بر بیان ژن آنزیم VEGF-B داشته است که نشان-

دهنده‌ی اثر مثبت فعالیت بدنی در مقابل بی‌تحرکی در بیماری دیابت و آسیب های قلبی ناشی از دیابت در نتیجه افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش همزمان وضعیت آنتی اکسیدانی است. بنابراین شاید بتوان نتیجه گرفت که تمرین استقامتی باشدت متوسط از طریق بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام به عنوان عامل قدرتمند در جهت محافظت از بافت قلب در مقابل استرس اکسیداتیو می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه دوره دکترای تخصصی دانشگاه آزاد واحد کرمانشاه می‌باشد. بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از دوستان عزیزی که در دانشگاه آزاد کرمانشاه ما را یاری رساندند، اعلام می نماییم.

منابع

1. Yoon Y-s, Uchida S, Masuo O, Cejna M, Park J-S, Gwon H-c, et al. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. Circulation 2005; 111(16):2073-85.
2. Hamilton SJ, Watts GF. Endothelial dysfunction in diabetes: pathogenesis, significance, and treatment. Rev Diabet Stud 2013; 10(2-3): 133-56.
3. White A, McKay GA, Fisher M. Drugs for diabetes: part 9 prescribing for patients with cardiac disease. Br J Cardiol 2012; 19: 85-9.
4. Marfella R, Esposito K, Nappo F, Siniscalchi M, Sasso FC, Portoghese M, et al. Expression of angiogenic factors during acute coronary syndromes in human type 2 diabetes. Diabetes 2004; 53(9):2383-91.
5. Ghardashi Afousi AR, Gaeini A, Gholami Borujeni B. The effect of aerobic interval training on endothelial vasculature function in type 2 diabetes patient. IJRN 2016; 2(3): 27-39. (Persian)
6. Epstein SE, Kornowski R, Fuchs S, Dvorak HF. Angiogenesis therapy: Amidst the hype, the neglected potential for serious side effects. Circulation 2001 Jul 3;104(1):115-9. 7.
7. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. Fertil Steril 2000 Sep; 74(3):429-38.
8. Filaire E, Rouveix M, Massart A, Gladine C, Davicco MJ, Durand D. 2009. Lipid peroxidation and antioxidant status in rat: effect of food restriction and wheel running. Eur Journal Of Appl Physiol. 107(2): 243-50.
9. Radak Z, Chung H, Goto S. 2008. Systemic adaptation to oxidative challenging induced by regular exercise.Free Radic Biol Med. 44:153-59 .
10. Zatalia SR, Sanusi H. The role of antioxidants in the pathophysiology, complications, and management of diabetes mellitus. Acta Med Indones 2013; 45(2):141-7.
11. Afzalpour m, Gharakhanlou r, Gaeini a. Effects of moderate and vigorous aerobic training on enzyme activity arylesterase (ARE) and total anti-oxidation capacity (TAC) in healthy sedentary men. Res Exer Sci 2005;3:105-23.
12. Bolboli L, KHajehlandi M. A Comparison of the Effect of Endurance Training on the Activities of Glutathione Peroxidase and Superoxide Dismutase in the Cardiac Tissue of Healthy and Diabetic Rats. yafte 2020; 21 (4) :20-31
13. Nakhaee, H., Nazarali, P., Hanachi, P., & Hedayati, M. (2018). The effect of aerobic training and Cinnamon Zeylanicum intake on total antioxidant capacity in active women. The Horizon of Medical Sciences, 24(2), 88-95.
14. Hovanloo F, Hedayati M, Abraham M, Abid Nazari H. The effect of endurance training in different periods of time in the activities of antioxidant enzymes in rat liver. Medical Research. 2011; 35(1):19-14. [Persian]
15. Egginton S. Invited review: activity-induced angiogenesis. PFLUG ARCH EUR J PHY. 2009; 457(5):963.
16. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. J CELL MOL MED 2005; 9(2):267-85.

17. Mihl C, Dassen W, Kuipers H. Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. NETH HEART J 2008;16 (4):129-33. 9.
18. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. CLIN EXP PHARMACOL P 2007;34(4):255-62.
19. Al-Harris ES, Al-Janabi AA, Al-Toriahi KM, Yasseen AA. Over expression of vascular endothelial growth factor in correlation to Ki-67, grade, and stage of breast cancer. Saudi Med J 2008;29(8):109-4.
20. Mihl C, Dassen W, Kuipers H. Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. NETH HEART J 2008; 16(4):129-33.
21. Chen Z, He Y, Song C, Dong Z, Su Z, Xue J. Sericin can reduce hippocampal neuronal apoptosis by activating the Akt signal transduction pathway in a rat model of diabetes mellitus. Neural regeneration research 2012;7(3):197-201.
22. Hong-tao Y, Shu-gang L, Yong-cheng Z, editors. Exercise contribute to attenuation of inflammation and oxidative stress in adipose tissue of IR rats. Proceedings of the 4th International Convention on Rehabilitation Engineering & Assistive Technology; 2010: Singapore Therapeutic, Assistive & Rehabilitative Technologies (START) Centre.
23. Erekat NS, Al-Jarrah MD, Al Khatib AJ. Treadmill exercise training improves vascular endothelial growth Factor expression in the cardiac muscle of type I diabetic rats. Cardiovasc Res 2014; 5(1):23.
24. Yoon Y-s, Uchida S, Masuo O, Cejna M, Park J-S, Gwon H-c, et al. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. Circulation 2005;111(16):2073-85.
25. Marfella R, Esposito K, Nappo F, Siniscalchi M, Sasso FC, Portoghese M, et al. Expression of angiogenic factors during acute coronary syndromes in human type 2 diabetes. Diabetes 2004; 53(9):2383-91.
26. Hazarika S, Dokun AO, Li Y, Popel AS, Kontos CD, Annex BH. Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. Circ Res 2007; 101(9): 948-56.
27. Gao L, Yu DM. Molecular mechanism of limbs' postischemic revascularization improved by perindopril in diabetic rats. Chin Med J (Engl) 2008; 121(21): 2129-33.
28. Khazaei M, Fallahzadeh AR, Sharifi MR, Afsharmoghaddam N, Javanmard SH, Salehi E. Effects of diabetes on myocardial capillary density and serum angiogenesis biomarkers in male rats. Clinics 2011; 66(8):1419-24.
29. Han B, Baliga R, Huang H, Giannone PJ, Bauer JA. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and redox imbalance in murine diabetic cardiomyopathy. AM J PHYSIOL-HEART C 2009; 297(2):H829-H35.
30. Li S, Culver B, Ren J. Benefit and risk of exercise on myocardial function in diabetes. Pharmacological research 2003; 48(2):127-32.
31. Rodrigues B, Jorge L, Mostarda CT, Rosa KT, Medeiros A, Malfitano C, et al. Aerobic exercise training delays cardiac dysfunction and improves autonomic

control of circulation in diabetic rats undergoing myocardial infarction. J Card Fail 2012; 18(9): 734-44.
32. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia- inducible factor. EMBO J. 2012; 31(11):2448-60.
33. Friedmann B, Frese F, Menold E, Bärtsch P. Effects of acute moderate hypoxia on anaerobic capacity in endurance-trained runners.Eur J Appl Physiol. 2007;101(1):67-73.
34. Erekat NS, Al-Jarrah MD, Al Khatib AJ. Treadmill Exercise Training Improves Vascular Endothelial Growth Factor Expression in the Cardiac Muscle of Type I Diabetic Rats. Cardiol Res 2014; 5(1): 23-9.
35. Kraus RM, Stallings III HW, Yeager RC, Gavin TP. Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance trained men. J Appl Physiol. 2004; 96: 1445-1450.
36. Fathollahi Shourabeh F, Tarverdizadeh B, Keihani M. The impact of eight weeks of resistance training on some angiogenesis indicators in women with breast cancer. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2017; 20(3): 9-17. [In Persian]
37. Schwinger R. Long-term endurance exercise decreases antiangiogenic endostatin signalling in overweight men aged 50-60 years: Commentary. British Journal of Sports Medicine 2008; 42(2):126-9.
38. Hoffner L, Nielsen JJ, Langberg H, Hellsten Y. Exercise but not prostanoids enhance levels of vascular endothelial growth factor and other proliferative agents in human skeletal muscle interstitium. J Physiol 2003; 550: 217-225.
39. Khajehlandi M, Bolboli L, Siahkuhian M, Rami M, Tabandeh M. Effect of moderate intensity exercise on HDAC4 and CaMKII genes expression in myocardium of male rats. Feyz 2020; 24 (4): 357-65.
40. Bogdanis GC, Stavrinou P, Fatouros IG, Philippou A, Chatzinikolaou A, Draganidis D, et al. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. Food Chem Toxicol 2013; 61:171-7.
41. Fatouros IG, Jamurtas AZ, Villiotou V, Pouliopoulou S, Fotinakis P, Taxildaris K, et al. Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. Med Sci Sports Exerc 2004; 36:2065-72.
42. Repka CP, Hayward R. Oxidative stress and fitness changes in cancer patients after exercise training. Med Sci Sports Exerc 2016; 48:607-14.
43. Gül M, Atalay M, Hänninen O. Endurance training and glutathione-dependent antioxidant defence mechanism in heart of the diabetic rats. J of Sports Science and Medicine 2003; 2(2): 52-61.
44. Robertson JD, Maughan RJ, Duthie GG, Morrice PC. Increased blood antioxidant system of runners in response to training load. Clin Sci 1991. 80: 611-18.
45. De lemos T, Oliveira J, Pascoa Pinheiro J, Reis F. Regular Physical Exercise as a Strategy to ImproveAntioxidant andAnti-Inflammatory Status: Benefitsin Type2 Diabetes Mellitus. OXID MED CELL LONGEV 2012; 5: 15.
46. Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. Free Radic Biol Med 2008; 44:153-9.
47. Park SY, Kwak YS. Impact of aerobic and anaerobic exercise training on oxidative stress and antioxidant defense in athletes. J Exerc Rehabil 2016; 12:113-7.
48. Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, Cestaro B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in

professional soccer players and sedentary controls. Eur J Clin Invest 2003; 33:924-30.

49. Afzalpour ME, Gharakhanlou R, Mohebi H, et al Theeffects of vigorous and moderate aerobic exercise on theserum arylesterase activity and total antioxidant capacityin non-active healthy men–Persian . Res Sport Journal Sciences 2005; 3(9): 105-123.
50. Chevion S, Moran D, Heled Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical Exercise. PNAS 2003; 100(9): 5119-23.
51. Dernbach AR, Sherman WM, simonesen JC, Flowers km, lamb DR. No evidence of oxidant stress during high intensity rowing training. J Appl Physiol 1993; 74: 2140-46.

Effect of aerobic exercise on vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B) gene expression and total tissue antioxidant status (TAS) in diabetic rats

Hojatolah Shahavand[1], Sedigheh Hosseinpour Delavar[1*], Naser behpur[2], Hasan Safikhani[3], Masumeh Azizi[4].

1 Department of Physical Education and Sport Science, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
2 Department of Exercise Physiology, Sport Science Faculty, Razi University, Kermanshah, Iran
3 Department of Corrective Exercise, Kermanshah branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
4 Department of Physical Education and Sport Science, Abadan Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

[*]**Corresponding author**: delavar2009@yahoo.com

Abstract

Background and Purpose: Diabetes causes cardiovascular disorders and coronary artery disease or systemic hypertension. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of aerobic exercise on vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B) gene expression and the amount of total antioxidant status (TAS) of cardiac tissue in diabetic male rats.

Methodology: This experimental study was performed on 30 adult male Wistar rats and divided into 3 groups of Diabetic training, Diabetic control and healthy control (n = 10). Diabetes was induced by a single dose of streptozotocin (45 mg/kg). The exercise program consisted of 6 weeks of treadmill training. 24 hours after of the last training session, cardiac tissue samples were extracted to measure VEGF-B gene expression and TAS. One-way ANOVA and LSD test with statistical level of ($P<0.05$) were used to compare between groups differences.

Results: Results showed that after one period of endurance training there was a significant increase in VEGF-B gene expression and TAS in the DT group compared to CD group ($P = 0.001$). There was no significant difference ($P = 0.364$) in VEGF-B gene expression, also a significant difference ($P = 0.033$) was in antioxidant status in DT and HC groups.

Conclusion: It seems that endurance training has a positive effect on VEGF-B and TAS of in the heart of diabetic rats.

Key words: Aerobic Exercise, VEGF-B, TAS, Heart, Diabetes