

اثرات تمرین ورزشی روی بیان ژن عامل رشد اندوتلیال عروقی و اندوستاتین در بافت قلبی رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۲

سعید اسمعیلی^۱، واژگن میناسیان^۲، هادی کرمی^۳، محمد بیات^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اختلال آنژیوژنز و تشکیل عروق جانبی، یکی از عوارض عمده‌ی دیابت نوع ۲، هنگام ایسکمی در عضلات اسکلتی و قلبی است. هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، بررسی تغییرات در بیان ژن عامل رشد اندوتلیال عروقی و اندوستاتین در بافت قلبی رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۲، به دنبال تمرینات تداومی و تناوبی شدید بود.

روش‌ها: در این مطالعه، ۴۸ سر رت نژاد Wistar به طور تصادفی در ۴ گروه مساوی، شاهد سالم، شاهد مبتلا به دیابت و گروه‌های مبتلا به دیابت با تمرین تداومی و تناوبی شدید، تقسیم شدند. القای دیابت نوع ۲، از طریق تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین صورت گرفت و تمرینات ۵ جلسه در هفته، به مدت ۸ هفته انجام شد. بررسی سطوح بیان عامل رشد اندوتلیال عروقی و اندوستاتین از طریق آزمایش Reverse transcription-Quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار بیان عامل رشد اندوتلیال عروقی و اندوستاتین در گروه شاهد مبتلا به دیابت نسبت به گروه شاهد سالم بود. در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به دیابت، گروه تمرین تداومی و تناوبی شدید در بیان عامل رشد اندوتلیال عروقی و گروه تمرین تداومی در بیان اندوستاتین افزایش معنی‌داری نشان دادند.

نتیجه‌گیری: هر دو روش تمرینی در افزایش بیان عامل رشد اندوتلیال عروقی و اندوستاتین پس از القای دیابت نوع ۲ مؤثر بودند. از آن جایی که افزایش در نسبت عامل رشد اندوتلیال عروقی به اندوستاتین مشاهده گردید، احتمال می‌رود افزایش در فعالیت پروآنژیوژنیک در بافت قلب نیز رخ داده باشد، اما تمرین تناوبی شدید در افزایش بیان عامل رشد اندوتلیال عروقی مؤثرتر بود.

واژگان کلیدی: دیابت نوع ۲، عامل رشد اندوتلیال عروقی، اندوستاتین، تمرین تناوبی شدید

ارجاع: اسمعیلی سعید، میناسیان واژگن، کرمی هادی، بیات محمد. اثرات تمرین ورزشی روی بیان ژن عامل رشد اندوتلیال عروقی و اندوستاتین در

بافت قلبی رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۲. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۹۱): ۹۱۶-۹۰۹

شکل‌گیری عروق جانبی کرونر، بروز ایسکمی، انفارکتوس میوکارد، بیماری عروق محیطی، سکته و کاردیومیوپاتی دیابتی محسوب می‌شوند (۱).

یکی از عوامل کلیدی مؤثر در تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال VEGF است که موجب تشکیل عروق جدید می‌شود (۲). در تمرینات ورزشی، بیان VEGF از طریق محرک‌های مختلفی نظیر نیتریک اکساید و Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)، تحریک و موجب توسعه‌ی شبکه‌ی عروقی عضله‌ی قلب می‌شود.

مقدمه

هم‌ایستایی بین مولکول‌های آنتی‌آنژیوژنیک با منشأ داخلی و پروآنژیوژنیک موجب حفظ تعادل آنژیوژنیک می‌شود، در حالی که در ناراحتی‌هایی نظیر دیابت، این تعادل آنژیوژنیک با کاهش بیان عامل رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor) یا VEGF و افزایش عوامل آنژیوستاتیک (از جمله اندوستاتین)، به نفع فنوتیپ آنتی‌آنژیوژن تغییر می‌یابد. آنژیوژنز ناقص و اختلال در عملکرد اندوتلیال در دیابت نوع ۲، از عوامل خطرزای مهم در عدم

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه پزشکی مولکولی و بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۴- استادیار، گروه آناتومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

القای دیابت، تا پایان مطالعه هیچ مداخله‌ای انجام نشد، اما برای گروه‌های مبتلا به دیابت همراه با تمرین ورزشی، مداخلات تمرینی روی دستگاه نوارگردان ۵ کاناله‌ی مخصوص جواندگان مطابق با جدول ۱ به مدت ۸ هفته و ۵ روز در هفته اجرا شد. شیوه‌نامه‌ی تمرینی شامل سه مرحله‌ی آشنایی، افزایش بار کاری (هفته‌ی ۴-۱) و تثبیت بار کاری (هفته‌ی ۸-۴) بود (جدول ۱). در ابتدا و انتهای هر جلسه‌ی تمرینی، ۵ دقیقه برای گرم و سرد کردن با سرعت ۱۶ متر در دقیقه در نظر گرفته شد. شدت تمرینات تداومی و تناوبی شدید به ترتیب ۸۰ و ۹۵-۱۰۰ درصد VO_2max و استراحت فعال بین دوره‌های تمرینی در گروه تناوبی شدید ۶۰ ثانیه با سرعت ۱۶ متر در دقیقه طرح‌ریزی شده بود (۸).

اندازه‌گیری وزن و سطح گلوکز خون حیوانات: اندازه‌گیری وزن و سطح گلوکز خون حیوانات از ابتدای مطالعه هر هفته انجام و ثبت شد. اندازه‌گیری قند خون از طریق نمونه‌گیری از انتهای دم رت‌های بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی در هر مرتبه، توسط گلوکومتر (Beurer model GL42, Germany) انجام شد.

نمونه‌برداری: ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه‌ی تمرینی (پس از ۱۴ ساعت ناشتایی)، رت‌ها از طریق تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین هیدروکلراید (۷۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. پس از ایجاد شکاف در قسمت جلوی سینه، بافت قلب به سرعت جدا و پس از پاک‌سازی از بافت چربی و همبند، در نیتروژن مایع منجمد و تحت شرایط ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه نگهداری شد.

استخراج RNA messenger (mRNA) و سنتز complementary DNA (cDNA): برای استخراج mRNA، ۵۰ میلی‌گرم از بافت قلب با اضافه کردن ۱ میلی‌مول معرف RNX Plus (سینازن، ایران) هموزن گردید. سپس، مراحل مختلف طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA تا مرحله‌ی نهایی استخراج، انجام شد. خلوص کل RNA استخراج شده به شیوه‌ی اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد و نسبت جذبی ۲۸۰-۲۶۰ نانومتر برای تمامی نمونه‌ها بین ۱/۸-۲ بود. در مرحله‌ی بعد، ۵ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از شیوه‌نامه‌ی کیت First standard cDNA synthesis (Takara, Japan) و با استفاده از پرایمرهای Oligo-dT به cDNA تبدیل گردید.

سنجش بیان VEGF و اندوستاتین به روش RT-qPCR: آزمایش RT-qPCR توسط دستگاه Light cycler 96 (Roche) و با استفاده از رنگ SYBR Green I (یکتا تجهیز، ایران) و پرایمرهای طراحی شده توسط نرم‌افزار Primer3 به شرح زیر انجام شد:

بهبود آنژیوژنز قلبی، از مکانیسم‌های سودمند احتمالی تمرینات ورزشی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ مطرح و در نظر گرفته شده است (۳).

اندوستاتین، با اختلال در سیگنالینگ VEGF و جلوگیری از فسفریلاسیون تیروزین کیناز، آنژیوژنز را مهار می‌کند و تعادل آنژیوژنز را به ویژه در تومورها به نفع فنوتیپ آنتی‌آنژیوژنز تغییر می‌دهد (۴). البته، امروزه کارکردهای نوینی از اندوستاتین به جز فعالیت آنتی‌آنژیوژنز آن، از جمله تحریک تکثیر و مهاجرت ناشی از زخم در فیبروبلاست‌های قلب در فرایند بهبود زخم پس از انفارکتوس میوکارد نیز نشان داده شده است (۵).

شواهد متعددی از اثربخشی تمرینات ورزشی در روند کنترل و درمان بیماری‌های مختلف نظیر دیابت نوع ۲ حمایت می‌کنند (۶)، اما ساز و کارهای دقیق اثربخشی فعالیت‌های ورزشی مختلف بر روی آنژیوژنز بافت قلبی در شرایط طبیعی و پاتولوژیک، به طور کامل شناخته نشده است (۳). بنابراین، هدف کلی مطالعه‌ی حاضر، بررسی تغییرات بیان ژن VEGF و اندوستاتین در بافت قلبی رت‌های دیابت نوع ۲، به دنبال تمرینات ورزشی استقامتی تداومی و تناوبی شدید بود.

روش‌ها

آزمودنی‌ها: این پژوهش به روش تجربی آزمایشگاهی بود و بر روی ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar با سن ۸-۶ هفته و میانگین وزن 25 ± 25 گرم، در آزمایشگاه استاندارد جواندگان (چرخه‌ی ۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی، رطوبت ۵۵ درصد و درجه‌ی حرارت 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد با دسترسی آزادانه به آب و غذا) و با رعایت اصول اخلاقی منطبق با منشور حقوق حیوانات؛ مصوب کمیته‌ی اخلاق دانشگاه اصفهان (IR.U.I.REC.1396.13)، انجام گردید. گروه‌بندی حیوانات مورد مطالعه: تمامی رت‌ها پس از یک هفته آشنایی با شرایط زندگی در حیوان‌خانه و نحوه‌ی دوییدن روی نوار گردان، به روش تصادفی به ۴ گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند. گروه‌های تحقیق حاضر شامل گروه شاهد سالم، گروه شاهد مبتلا به دیابت، گروه مبتلا به دیابت با تمرین تداومی و گروه مبتلا به دیابت با تمرین تناوبی شدید بودند.

القای دیابت نوع ۲: برای القای دیابت نوع ۲ بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی از استرپتوزوتوسین (Sigma, USA) به صورت تزریق درون صفاقی استفاده شد. ۷۲ ساعت پس از تزریق برای اطمینان از ابتلا به دیابت، رت‌هایی که میزان قند خون آن‌ها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر بود، به عنوان مبتلا به دیابت در نظر گرفته شدند (۷).

شیوه‌نامه‌ی تمرینی: برای گروه شاهد سالم تا پایان مطالعه، هیچ گونه مداخله‌ای اجرا نگردید. در گروه شاهد مبتلا به دیابت نیز پس از

جدول ۱. شیوه‌نامه‌های تمرین استقامتی تداومی و تناوبی شدید روی نوار گردان

مدت (ثانیه)	تمرین تناوبی شدید		تمرین استقامتی تداومی		جلسات تمرین	هفته‌های تمرین
	شدت (متر در دقیقه)	تعداد تکرار	مدت (دقیقه)	شدت (متر در دقیقه)		
۶۰۰	۱۰	۱	۱۰	۱۰	۵ جلسه	مرحله‌ی آشنایی
۱۸۰	۴۰	۲	۲۰	۲۷	۱	هفته‌ی اول
۳۰	۵۴	۳	۲۲	۲۷	۲	
۱۸۰	۴۰	۲	۲۴	۲۷	۳	
۳۰	۵۴	۵	۲۶	۲۷	۴	
۱۸۰	۴۰	۲	۲۸	۲۷	۵	
۳۰	۵۴	۷	۳۰	۲۷	۶	هفته‌ی دوم
۱۸۰	۴۰	۳	۳۲	۲۷	۷	
۳۰	۵۴	۹	۳۴	۲۷	۸	
۱۸۰	۴۰	۳	۳۶	۲۷	۹	
۳۰	۵۴	۱۱	۳۸	۲۷	۱۰	
۱۸۰	۴۰	۳	۴۰	۲۷	۱۱	هفته‌ی سوم
۳۰	۵۴	۱۳	۴۲	۲۷	۱۲	
۱۸۰	۴۰	۴	۴۴	۲۷	۱۳	
۳۰	۵۴	۱۵	۴۶	۲۷	۱۴	
۱۸۰	۴۰	۴	۴۸	۲۷	۱۵	
۳۰	۵۴	۱۷	۵۰	۲۷	۱۶	هفته‌ی چهارم
۱۸۰	۴۰	۱۵	۵۲	۲۷	۱۷	
۳۰	۵۴	۱۹	۵۴	۲۷	۱۸	
۱۸۰	۴۰	۵	۵۶	۲۷	۱۹	
۳۰	۵۴	۲۰	۵۸	۲۷	۲۰	
۱۸۰	۴۰	۶	۶۰	۲۷	۲۰-۴۰	هفته‌ی ۵-۸
۳۰	۵۴	۲۰	۶۰	۲۷	یک در میان	

برای تحلیل داده‌ها و انجام محاسبات آمار توصیفی، میانگین و انحراف استاندارد و آمار استنباطی One-way ANOVA و همچنین، آزمون فرضیه‌های تحقیق و ترسیم شکل‌ها، از نرم‌افزار Prism (Graphpad Prism) نسخه‌ی ۵ استفاده شد. سپس، برای تعیین تفاوت‌های معنی‌دار بین گروه‌ها، آزمون تعقیبی Tukey در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ به کار گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، کاهش معنی‌داری در وزن گروه تمرین تداومی ($P < 0.01$) و تناوبی شدید ($P < 0.05$) پس از مداخلات ورزشی در مقایسه با گروه شاهد سالم بود. سطوح قند خون نیز در تمام گروه‌ها پس از القای دیابت و همچنین، پس از مداخلات ورزشی نسبت به گروه شاهد سالم افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.01$). در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به دیابت در پس‌آزمون، گروه‌های تمرینی کاهش معنی‌داری در سطح گلوکز خون نشان دادند ($P < 0.01$).

VEGF, Forward: TGTGAGCCTTGTTTCAGAGCG,
Reverse: GACGGTGACGATGGTGGTGT

Endostatin, Forward: GATTTGGCATGAGGGGAATG,
Reverse: AAGAAAGTCAAACGGAAACTGC

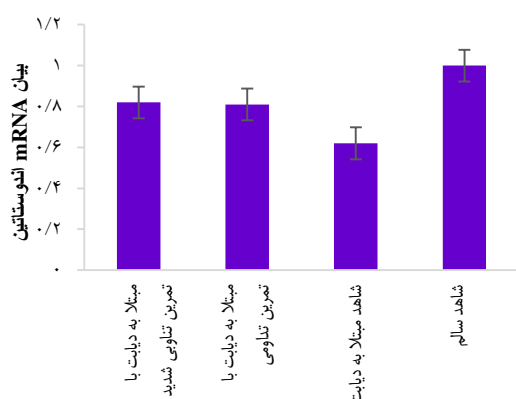
Beta-actine, Forward: CGTTGACATCCGTAAGACCTC
Reverse: TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT

شرایط Polymerase chain reaction (PCR) شامل فعال‌سازی اولیه‌ی آنزیم پلیمرز در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه و طول‌سازی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه انجام شد. سطح بیان نسبی mRNA اندوستاتین و VEGF در بافت قلب گروه‌های مورد مطالعه با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه و توسط ژن بتا‌کتین طبیعی‌سازی شد و در نهایت، مقادیر مربوط نسبت به گروه‌های دیگر مقایسه گردید.

جدول ۲. تغییرات سطوح قند خون ناشتا و وزن بدن در گروه‌های مختلف (میانگین \pm انحراف معیار)

گروه‌ها	وزن بدن (گرم)		قند خون (میلی گرم/دسی لیتر)	
	پیش آزمون	پس آزمون	پیش آزمون	پس آزمون
شاهد سالم	۲۴۱/۹ \pm ۲۱/۰	۲۷۹/۴ \pm ۳۸/۰	۹۰/۰ \pm ۱۶/۰	۷۳/۰ \pm ۸/۵
شاهد مبتلا به دیابت	۲۲۳/۶ \pm ۳۶/۰	۲۵۰/۶ \pm ۴۸/۰	۳۰۱/۰ \pm ۲۱/۰	۳۲۵/۰ \pm ۳۲/۵
مبتلا به دیابت با تمرین تداومی	۲۲۴/۳ \pm ۲۰/۰	۲۲۷/۴ \pm ۳۸/۰	۳۲۶/۰ \pm ۲۸/۰	۱۳۸/۰ \pm ۲۳/۰
مبتلا به دیابت با تمرین تناوبی شدید	۲۲۸/۲ \pm ۱۸/۰	۲۳۵/۶ \pm ۴۰/۰	۳۱۵/۰ \pm ۲۶/۰	۱۱۲/۰ \pm ۲۴/۰

* و # نشانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0/050$) به ترتیب نسبت به گروه‌های شاهد سالم و شاهد مبتلا به دیابت
 & نشانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0/050$) در مقایسه‌ی گروه‌های تمرینی با یکدیگر



شکل ۲. تغییرات بیان messenger RNA اندوستاتین

(mRNA اندوستاتین)

* و # نشانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0/050$) به ترتیب نسبت به گروه‌های شاهد سالم و شاهد مبتلا به دیابت
 & نشانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0/050$) در مقایسه‌ی گروه‌های تمرینی با یکدیگر

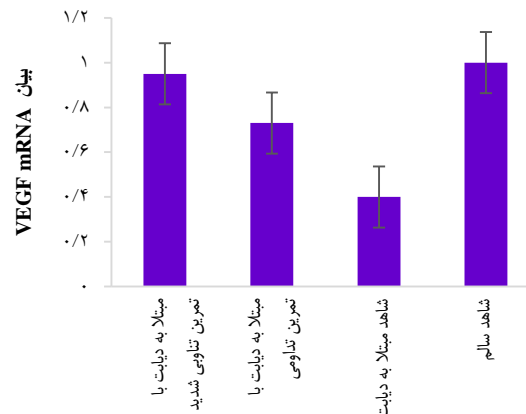
بحث

در این مطالعه، تأثیر دو شیوه‌ی تمرین ورزشی روی بیان ژن عامل رشد اندوتلیال عروقی و اندوستاتین در قلب رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق، حاکی از کاهش بیان VEGF و اندوستاتین در بافت قلب رت‌ها پس از القای دیابت نوع ۲ بود که حاکی از وجود رابطه‌ی معکوس بیان VEGF و اندوستاتین با افزایش سطح گلوکز خون در نتیجه‌ی دیابت نوع ۲ است. این نتایج، اگر چه کاهش بیان اندوستاتین را نشان داد، اما کاهش بیان VEGF بسیار شدیدتر بود. به گونه‌ای که نسبت VEGF به اندوستاتین پس از القای دیابت کاهش یافته بود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که فرایند رگ‌زایی در بافت قلب، تحت تأثیر دیابت دچار اختلال می‌گردد.

نتایج این تحقیق، کاهش بیان VEGF پس از القای دیابت نوع ۲ را نشان داد که با یافته‌های مطالعات Smith و همکاران (۶)، Hazarika و همکاران (۹)، و Gao و Yu (۱۰) و خزاعی و همکاران (۱۱) همسو است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که انسولین می‌تواند

همچنین، گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه تمرین تداومی کاهش معنی‌داری در سطح گلوکز خون نشان داد ($P < 0/050$) (جدول ۲).

در بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه، نتایج کاهش معنی‌داری در بیان VEGF در گروه شاهد مبتلا به دیابت و تمرین تداومی نسبت به گروه شاهد سالم نشان داد ($P < 0/001$). در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به دیابت، گروه تمرین تداومی و تناوبی شدید افزایش معنی‌داری در بیان VEGF نشان دادند ($P < 0/001$). همچنین، افزایش معنی‌داری در بیان VEGF گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه تمرین تداومی ($P < 0/001$) مشاهده گردید (شکل ۱).



شکل ۱. تغییرات بیان VEGF mRNA

* و # نشانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0/050$) به ترتیب نسبت به گروه‌های شاهد سالم و شاهد مبتلا به دیابت
 & نشانگر تفاوت معنی‌دار ($P < 0/050$) در مقایسه‌ی گروه‌های تمرینی با یکدیگر

از سوی دیگر، همان گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، کاهش معنی‌داری در بیان اندوستاتین در تمام گروه‌ها نسبت به گروه شاهد سالم مشاهده شد ($P < 0/001$). در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به دیابت نیز گروه تمرینی افزایش معنی‌داری در بیان اندوستاتین نشان داد ($P < 0/050$).

سطوح اندوستاتین سرمی مردان و زنان مبتلا به دیابت را به میزان ۱۵/۰۵-۱۰/۵۹ درصد افزایش می‌دهد (۲۱) و این نتایج در یافته‌های مطالعه‌ی Suhr و همکاران نیز مورد تأیید قرار گرفته است (۲۲) و با نتایج مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. در حال حاضر، پیشینه‌ی تحقیقاتی که به طور مستقیم اثر تمرینات تناوبی شدید روی بیان ژن VEGF و اندوستاتین در بافت قلبی در شرایط دیابت نوع ۲ را بررسی کرده باشند، بسیار محدود می‌باشند، اما مطالعات انجام شده در مورد جوانان سالم نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی هوازی تداومی و تناوبی، اثرات افزایشی مشابهی در تراکم مویرگی قلب دارند (۲۳).

به طور کلی، در مقایسه‌ی شیوه‌های تمرینی مورد استفاده، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تمرینات هوازی تناوبی شدید نسبت به تمرینات هوازی تداومی، در افزایش بیان VEGF و نسبت VEGF به اندوستاتین برتری دارند و هم‌راستا با یافته‌های مطالعات Weston و همکاران (۲۴) و Ross و همکاران (۲۵) می‌باشد. ساز و کار تمرینات تناوبی شدید برای بهبود کنترل گلوکز، ممکن است مربوط به قابلیت این شیوه‌ی تمرینی برای آماده‌سازی بیشتر تارهای عضلانی و تخلیه‌ی سریع‌تر سطوح گلیکوژن عضلات باشد و به این ترتیب، در حساسیت انسولینی عضلات ۴۸-۲۴ ساعت پس از ورزش افزایش بیشتری ایجاد نماید و در نتیجه، احتمال می‌رود این تمرینات بتوانند اثرات پروآنژیوژنیک بهتری در شرایط بیماری دیابت نوع ۲ داشته باشند (۲۶).

از سوی دیگر، برخی شواهد حاکی از این است که افراد با سطوح بالاتر اندوستاتین در مقابل بیماری‌های قلبی و پلاک‌های آترواسکلروز به شکل موثرتری محافظت می‌شوند، اما سطوح بالای اندوستاتین به علت ایجاد اختلال در رگ‌زایی جانبی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، می‌تواند زیان‌بار نیز باشد. بنابراین، اگر چه نتایج چالش برانگیز است، اما با توجه به یافته‌های مطالعات پیش‌گفته و مطالعه‌ی حاضر که بیانگر افزایش کلی نسبت VEGF به اندوستاتین ناشی از تمرینات استقامتی هوازی تداومی و تناوبی شدید است، در حال حاضر می‌توان بیان نمود که تمرینات هوازی تداومی و تناوبی شدید برای افراد سالم و بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ به احتمال زیاد بی‌خطر است و فواید پروآنژیوژنیک آن در پیش‌گیری و کنترل بیماری‌های قلبی - عروقی قابل توجه می‌باشد.

با توجه به اثربخشی بیشتر تمرینات تناوبی شدید در افزایش بیان VEGF و همچنین، سودمندی و سازگاری‌های بیشتر آن در مقایسه با تمرینات هوازی تداومی طولانی مدت، این روش تمرینی چنانچه در نمونه‌های انسانی نیز به کار گرفته شود، شاید بتواند به عنوان یک راهبرد مناسب برای اعمال فشار تمرینی مناسب برای افراد مبتلا به بیماری‌های مختلف، توسعه‌ی سریع‌تر آمادگی قلبی - تنفسی، کاهش هایپرگلیسمی و افزایش آنژیوژنز در بیماران دیابت نوع ۲ مطرح شود.

از طریق فعال کردن مسیر PI3 Kinase/Akt، بیان VEGF را افزایش دهد (۱۲). بنابراین، تغییرات در سطوح انسولین می‌تواند یک مکانیسم بالقوه برای کاهش بیان VEGF میوکارد در شرایط دیابت نوع ۲، نقص در بیان VEGF در نتیجه‌ی مقاومت انسولینی باشد.

نتایج این تحقیق، همچنین کاهش بیان اندوستاتین پس از القای دیابت نوع ۲ را نشان داد. هم‌راستا با این نتایج، مطالعه‌ی Sponder و همکاران (۱۳)، نشان داد که هر دوی زنان و مردان مبتلا به دیابت، سطح اندوستاتین پایین‌تری نسبت به گروه شاهد دارند (۱۳). از سوی دیگر، Sodha و همکاران، گزارش کرد که بیان اندوستاتین در بیماران مبتلا به دیابت همراه با بیماری عروق کرونر، ۲/۰۲ برابر بیماران غیر مبتلا به دیابت است (۱۴)، که با نتایج تحقیق حاضر همسو نیست و احتمال می‌رود به دلیل ابتلای هم‌زمان آزمودنی‌ها به بیماری عروق کرونر و دیابت در مطالعه‌ی وی و همچنین تفاوت در نمونه‌های انسانی باشد. اوکادا، برای اولین بار نشان داد که اگر چه میزان بیان اندوستاتین در برخی بیماری‌های قلبی افزایش می‌یابد، اما اندوستاتین می‌تواند موجب تحریک تکثیر و مهاجرت ناشی از زخم در فیبروبلاست‌های قلب موش‌های صحرائی گردد. یافته‌های مطالعه‌ی وی، عملکرد نوینی از اندوستاتین به جز فعالیت آنتی‌آنژیوژن آن در فرایند بهبود زخم پس از انفارکتوس میوکارد را نشان می‌دهد.

در ارتباط با مداخلات ورزشی، نتایج این تحقیق نشان داد که ۸ هفته تمرینات هوازی تداومی و تناوبی شدید در گروه‌های مبتلا به دیابت در مقایسه با گروه شاهد مبتلا به دیابت، ضمن افزایش بیان اندوستاتین، از طریق افزایش نسبت VEGF به اندوستاتین، موجب بهبود آنژیوژنز در بافت قلب نیز می‌شود. Rodrigues و همکاران (۱۵) و Erekat و همکاران (۱۶) هم‌راستا با نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان دادند که تمرینات استقامتی بیان VEGF را افزایش می‌دهند و گزارش شده است که فعالیت‌های ورزشی با شدت متوسط تا زیاد، از طریق افزایش متابولیسم عضله‌ی قلبی و ایجاد شرایط کمبود اکسیژن بافتی، موجب تحریک HIF- α و بهبود آنژیوژنز قلبی از طریق افزایش بیان VEGF می‌شود.

Gao و همکاران (۱۷)، Brixius و همکاران (۱۸) و Sponder و همکاران (۱۹)، کاهش سطوح اندوستاتین به دنبال فعالیت‌های ورزشی را گزارش کردند، که با نتایج مطالعه‌ی حاضر همسو نمی‌باشد و احتمال می‌رود به دلیل شدت پایین‌تر تمرینات ورزشی، دامنه‌ی سنی بالا و بیماری عروق کرونر آزمودنی‌ها باشد. از سوی دیگر، نورشاهی و همکاران نشان داد که اگر چه تمرینات هوازی بیان اندوستاتین سرم رت‌های سالم را کاهش می‌دهد، اما همچنان نسبت VEGF به اندوستاتین در نتیجه‌ی سازگاری به دویدن روی تردمیل به طور معنی‌داری افزایش داشته است (۲۰). Sponder و همکاران در تحقیق خود گزارش نموده است که تمرین روی دوچرخه‌ی کارسنج،

در هر حال، انجام تحقیقات بیشتر، به ویژه بر روی نمونه‌های انسانی و اندازه‌گیری بیان پروتئین‌های درگیر در این فرایند با استفاده از روش‌های دقیق‌تر ضروری و پیشنهاد می‌گردد.

این مقاله، حاصل بخشی از پایان‌نامه‌ی دکتری به شماره‌ی تصویب

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل بخشی از پایان‌نامه‌ی دکتری به شماره‌ی تصویب

References

1. Bitar MS, Al-Mulla F. Upregulation of CREM/ICER suppresses wound endothelial CRE-HIF-1 α -VEGF-dependent signaling and impairs angiogenesis in type 2 diabetes. *Dis Model Mech* 2015; 8(1): 65-80.
2. Gao Y, Zhao Y, Pan J, Yang L, Huang T, Feng X, et al. Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways. *Brain Res* 2014; 1585: 83-90.
3. Higashi Y, Murohara T. *Therapeutic Angiogenesis*. 1st ed. New York, NY: Springer; 2017.
4. Walia A, Yang JF, Huang YH, Rosenblatt MI, Chang JH, Azar DT. Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850(12): 2422-38.
5. Okada M, Oba Y, Yamawaki H. Endostatin stimulates proliferation and migration of adult rat cardiac fibroblasts through PI3K/Akt pathway. *Eur J Pharmacol* 2015; 750: 20-6.
6. Smith GA, Fearnley GW, Harrison MA, Tomlinson DC, Wheatcroft SB, Ponnambalam S. Vascular endothelial growth factors: multitasking functionality in metabolism, health and disease. *J Inher Metab Dis* 2015; 38(4): 753-63.
7. Punitha IS, Rajendran K, Shirwaikar A, Shirwaikar A. Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; 2(3): 375-81.
8. Afzalpour ME, Chadorneshin HT, Foadoddini M, Eivari HA. Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. *Physiol Behav* 2015; 147: 78-83.
9. 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.
10. 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.
11. 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 (Sao Paulo)* 2011; 66(8): 1419-24.
12. 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.
13. Sponder M, Sepiol K, Lankisch S, Priglinger M, Kampf S, Litschauer B, et al. Endostatin and physical exercise in young female and male athletes and controls. *Int J Sports Med* 2014; 35(13): 1138-42.
14. Sodha NR, Clements RT, Boodhwani M, Xu SH, 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. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296(2): H428-H434.
15. 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.
16. 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.
17. Gu JW, Shparago M, Tan W, Bailey AP. Tissue endostatin correlates inversely with capillary network in rat heart and skeletal muscles. *Angiogenesis* 2006; 9(2): 93-9.
18. 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. *Br J Sports Med* 2008; 42(2): 126-9.
19. Sponder M, Fritzer-Szekeres M, Marculescu R, Litschauer B, Strametz-Juranek J. Physical inactivity increases endostatin and osteopontin in patients with coronary artery disease. *Heart Vessels* 2016; 31(10): 1603-8.
20. Nourshahi M, Hedayati M, Nemati J, Ranjbar K, Gholamali M. Effect of 8 weeks endurance training on serum vascular endothelial growth factor and endostatin in Wistar rats. *Koomesh* 2012; 13(4): 474-9. [In Persian].
21. Sponder M, Dangl D, Kampf S, Fritzer-Szekeres M,

- Strametz-Juranek J. Exercise increases serum endostatin levels in female and male patients with diabetes and controls. *Cardiovasc Diabetol* 2014; 13: 6.
22. Suhr F, Rosenwick C, Vassiliadis A, Bloch W, Brixius K. Regulation of extracellular matrix compounds involved in angiogenic processes in short- and long-track elite runners. *Scand J Med Sci Sports* 2010; 20(3): 441-8.
23. Pereira F, de MR, Tibirica E, Nobrega AC. Interval and continuous exercise training produce similar increases in skeletal muscle and left ventricle microvascular density in rats. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 752817.
24. Weston KS, Wisloff U, Coombes JS. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 2014; 48(16): 1227-34.
25. Ross LM, Porter RR, Durstine JL. High-intensity interval training (HIIT) for patients with chronic diseases. *Journal of Sport and Health Science* 2016; 5(2): 139-44.
26. Francois ME, Little JP. Effectiveness and safety of high-intensity interval training in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Spectr* 2015; 28(1): 39-44.

The Effects of Exercise Training on Vascular Endothelial Growth Factor and Endostatin Gene Expression in Cardiac Tissue of Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

Saeed Esmaeili¹, Vazgen Minasian², Hadi Karami³, Mohamad Bayat⁴

Original Article

Abstract

Background: Impaired angiogenesis and formation of collateral vessels in skeletal and cardiac muscle, is a major complication of type 2 diabetes mellitus in ischemia. The aim of this study was to evaluate the changes in vascular endothelial growth factor (VEGF) and Endostatin gene expression in cardiac tissue of rats with type 2 diabetes mellitus following aerobic continuous and high-intensity interval exercise training.

Methods: In this study, 48 Wistar rats were randomly divided into 4 equal groups of healthy control, diabetic control, diabetic continuous, and high-intensity interval training. Type 2 diabetes mellitus was induced by intra-peritoneal injection of streptozotocin, and exercise performed 5 sessions per week for 8 weeks. The levels of VEGF and Endostatin gene expression were evaluated using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) method.

Findings: There was a significant reduction in the expression of VEGF and Endostatin in the diabetic control group compared to the healthy control group. Compared to the diabetic control group, diabetic continuous and high-intensity interval training groups showed a significant increase in expression of VEGF, but there was significant increase in Endostatin expression in diabetic continuous group.

Conclusion: The results of this study showed that both training methods were effective to increase the expression of VEGF and Endostatin levels after induction of type 2 diabetes mellitus. Since, there was increase in VEGF/Endostatin ratio, increase in pro-angiogenic activity in heart may be occurred, but the high-intensity interval exercise training was more effective to increase the expression of VEGF.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, Vascular endothelial growth factor, Endostatins, High-intensity interval training

Citation: Esmaeili S, Minasian V, Karami H, Bayat M. **The Effects of Exercise Training on Vascular Endothelial Growth Factor and Endostatin Gene Expression in Cardiac Tissue of Rats with Type 2 Diabetes Mellitus.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(491): 909-16.

1- PhD Candidate, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Molecular Medicine and Biotechnology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

4- Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Corresponding Author: Vazgen Minasian, Email: v.minasian@spr.ui.ac.ir