

# تأثیر ۴ هفته تمرین هوازی بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آنژیوژنز در بافت قلب رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو

فریبا بختیاری<sup>۱</sup>، حسن متین همایی<sup>۱\*</sup>، فرشاد غزالیان<sup>۲</sup>

گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۰۴/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۶

## چکیده

زمینه و هدف: دیابت نوع دو اثرات اکسیداتیوی و ضد آنژیوژنزی را از طریق مسیرهای مختلف در بافت قلب اعمال می‌کند. هدف از پژوهش حاضر، تعیین و بررسی اثر ۴ هفته تمرین هوازی بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آنژیوژنز در بافت قلب رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو بود.

روش بررسی: در یک مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار وارد مطالعه شدند و به طور تصادفی به سه گروه مساوی: دیابتی با تمرین هوازی، گروه کنترل دیابتی و گروه کنترل سالم تقسیم شدند. القاء دیابت نوع دوم از طریق تزریق درون صفاقی STZ صورت گرفت. پروتکل تمرین هوازی فزآینده شامل ۴ هفته، ۵ جلسه در هفته دویدن بر روی تردمیل با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه بود. سطوح ROS و NO به ترتیب توسط اسپکتروفلوریمتر و رنگ سنجی اندازه گیری شدند. بیان ژن‌های HIF-1 $\alpha$  و VEGF توسط Real time & PCR بررسی شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و تعقیبی بونفرونی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که دیابت نوع دو موجب افزایش معنی‌دار سطوح ROS ( $p < 0.05$ ) و کاهش معنی‌دار سطوح NO ( $p < 0.05$ ) و بیان ژن‌های HIF-1 $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) و VEGF ( $p < 0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل سالم شده است. تمرین هوازی باعث کاهش معنی‌دار سطوح ROS ( $p < 0.05$ ) و افزایش معنی‌دار سطوح NO ( $p < 0.05$ ) و افزایش بیان ژن‌های HIF-1 $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) و VEGF ( $p < 0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل دیابت شده است. هم چنین، تمرین هوازی باعث کاهش معنی‌دار گلوکز ( $p < 0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل دیابت شد.

نتیجه‌گیری: دیابت نوع دو باعث افزایش استرس اکسیداتیو در بافت قلب می‌شود و فرآیند آنژیوژنز در قلب دیابتی را مختل می‌کند. به نظر می‌رسد تمرین هوازی با کاهش ROS، دارای اثر مثبت بر فرآیند آنژیوژنز می‌باشد و می‌تواند باعث بهبود قلب دیابتی شود.

واژه‌های کلیدی: فشار اکسیداتیو، رگ‌زایی، تمرین هوازی

\* نویسنده مسئول: حسن متین همایی، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، گروه فیزیولوژی ورزشی

Email: hasanmatinhomae@yahoo.com

## مقدمه

ROS می‌شود. در بیماری دیابت نوع دو، به دلیل افزایش گلوکز، تولید ROS عروق به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۱۰)، از این رو باید تحت تأثیر مداخله‌ای قرار بگیرد که از افزایش طبیعی آن جلوگیری نماید و یا مقدار آن را کاهش دهد.

NO، مولکول سیگنالینگ کلیدی تولید شده به وسیله سلول‌های اندوتلیال عروق می‌باشد که نقش حیاتی در حفظ تون عروقی و فرآیندهای فیزیولوژیکی دیگر سلول بازی می‌کند. افزایش تولید سوپراکسید آنیون (O<sub>2</sub>)<sup>(۵)</sup> می‌تواند به کاهش در دسترس‌پذیری NO از طریق واکنش با رادیکال‌ها منجر شود که بسیار سریع‌تر از واکنش O<sub>2</sub> با سوپراکسید دیسموتاز است (۶). این پدیده، تنظیم گشادشدگی اندوتلیالی را تغییر می‌دهد. پژوهش‌های زیادی بیان کرده‌اند که کاهش فعالیت زیستی NO مرتبط با هایپرگلیسمیا می‌باشد (۱۱). HIF-1 $\alpha$ ، فاکتور رونویسی مهمی است که سازگاری سلول‌ها به فشار اکسیژن کم را میانجی می‌نماید و به وسیله هایپوکسی و هایپرگلیسمیا که اصلی‌ترین مشکلات دیابت هستند، تنظیم می‌شود (۱۲)، با این که پژوهش‌ها نشان داده‌اند که هایپرگلیسمیا و گلوکز زیاد موجب اختلال در مسیر تولید HIF-1 $\alpha$  می‌شوند، اما هنوز مکانیسم مولکولی آن به طور کامل مشخص نشده است (۱۲). در طی آنژیوژنز، فعال شدن HIF-1 $\alpha$ ، آغاز کننده ی بیان

عدم اجرای فعالیت بدنی و بی‌حرکی مرتبط با چاقی، بیماری‌های قلبی-عروقی و متابولیکی مانند دیابت نوع دو می‌باشد (۱، ۲). طبق پژوهش‌های پیشین، دیابت نوع دو با هایپرگلیسمیا و تغییرات در گونه‌های واکنش اکسیژن (ROS)<sup>(۱)</sup>، فاکتورهای آنژیوژنزی و سایتوکاین‌ها همراه است. اختلال در متابولیسم گلوکز و التهاب مزمن در قلب، به بیماری‌هایی مانند کاردیومیوپاتی منجر می‌شود که نتیجه شایع اختلال متابولیکی کنترل نشده است (۳). دیابت نوع دو از نظر رگ‌زایی یک بیماری متناقض است، زیرا از یک سو در ارگان‌هایی مانند چشم و کلیه موجب افزایش آنژیوژنز و از سوی دیگر در بافت‌هایی مانند قلب و عضلات باعث کاهش و یا مهار آنژیوژنز می‌گردد (۴). آنژیوژنز رشد مویرگ‌های جدید از مویرگ‌های قبلی از طریق جوانه زدن می‌باشد (۵). ROS، نیتریک اکساید (NO)<sup>(۲)</sup> (۶)، فاکتور القا کننده ی هایپوکسی ۱ آلفا (HIF-1 $\alpha$ )<sup>(۳)</sup> و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)<sup>(۴)</sup> در فرآیند آنژیوژنز شرکت دارند (۷)، بین آنها ارتباط وجود دارد و تولید و فعالیت آنها در دیابت نوع دو متغیر می‌باشد.

ROSها مولکول‌های شیمیایی بسیار فعالی هستند که حاوی اکسیژن با الکترون‌های جفت نشده در آخرین لایه خود هستند (۸). ROS نقش کلیدی در فرآیندهای تغییر شکل عروق و آنژیوژنز از طریق دخالت در تکثیر، مهاجرت و مرگ آنها بازی می‌کند (۹). اختلال در سلول‌های اندوتلیالی عروق موجب تولید

- 1-Reactive Oxygen Species (ROS)
- 2-Nitric Oxide
- 3-Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$
- 4-Vascular Endothelial Growth Factor
- 5-Superoxide Anion

VEGF می‌باشد (۱۴). VEGF، میتوژن اصلی درگیر در فرآیند آنژیوژنز می‌باشد، از سلول‌های اندوتلیال ترشح می‌شود، باعث بقاء، تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و در نهایت شکل‌گیری عروق خونی جدید می‌شود (۱۵). طبق گزارشی در دیابت نوع دو، مسیر سیگنالینگ HIF-1 $\alpha$  آسیب می‌بیند (۱۲) و در نتیجه بیان و فعالیت VEGF نیز در بطن‌های بیماران دیابتی کاهش یافته و تنظیم پایینی می‌شود (۱۶).

تمرین هوازی منظم یک روش غیر دارویی مؤثر در جهت کنترل دیابت نوع دو می‌باشد. اجرای فعالیت بدنی منظم خطر بیماری شریان کرونری را کاهش می‌دهد و پیشرفت اختلال اندوتلیال را آهسته می‌کند و منجر به بهبود جریان خون و پرفیوژن قلب می‌شود (۱۷). تمرین ورزشی در بهبود کنترل گلوکز، لیپیدهای پلاسما و حساسیت انسولینی بیماران دیابتی نقش دارد (۱۸، ۱۹). در مدل‌های دیابتی شده با STZ، اختلال بیان شاخص VEGF در عضله اسکلتی با اجرای تمرین ورزشی بهبود را نشان داده است (۲۰، ۲۱). تمرین ورزشی به تغییرات مختلفی در عملکرد عروق مانند کاهش ضربان قلب، کاهش فشار خون، افزایش حداکثر اکسیژن مصرفی قلب و گشادشدگی عروق وابسته به اندوتلیوم منجر می‌شود (۲۲، ۲۳). پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که تمرین هوازی بر عملکرد عروقی رت‌های دیابتی نوع دو نیز مؤثر می‌باشد (۲۴). بشیری و همکاران به بررسی اثر ۸ هفته تمرین استقامتی بر آنژیوژنز عضلانی و سطح سرمی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی

در رت‌های صحرایی دیابتی پرداختند. نتایج نشان داد که دیابت موجب کاهش معنی‌دار تراکم مویرگی عضله قلبی و مقدار سرمی VEGF شد. همچنین تمرین استقامتی به مدت ۸ هفته موجب افزایش معنی‌دار تراکم مویرگی عضله قلبی و مقدار سرمی VEGF شد (۲۵).

تحریک آنژیوژنز و کاهش گلوکز نشان دهنده سازگاری مهم تمرین ورزشی در بهبود جریان خون و توسعه تحویل انسولین برای حذف گلوکز می‌باشد. با وجود افزایش اطلاعات به دست آمده از اثرات مخرب دیابت نوع دو بر آنژیوژنز، ساز و کار مولکولی مربوط به اثر تمرین هوازی بر مسیر آنژیوژنز در بافت قلب به طور دقیق شناخته نشده است و پژوهش‌های محدودی به بررسی تأثیر تمرین هوازی بر متغیرهای مسیر سیگنالینگ آنژیوژنز در بافت قلب دیابتی پرداخته‌اند. به همین دلیل و با توجه به تأثیر تمرین ورزشی در بهبود هایپرگلیسمیا و نقش هایپرگلیسمیا در آنژیوژنز، در این مطالعه هدف از این پژوهش تعیین و تأثیر ۴ هفته تمرین هوازی بر سطوح ROS و NO و بیان ژن‌های HIF-1 $\alpha$  و VEGF بافت قلب رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو بود.

### روش بررسی

در یک مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار بالغ با میانگین وزن ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم و سن ۶ هفته از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. همه رت‌ها در دمای ۲۱±۲

دقیقه و به مدت ۶۰ دقیقه دویند (۲۸). مراحل مختلف تمرین، بر اساس رعایت مسائل اخلاقی رفتار با حیوانات تأیید کمیته اخلاق دانشگاه رازی با کد ۲۴-۲۰۹۶۷-۳۹ انجام شد.

نمونه‌گیری خونی به وسیله سرنگ آغشته به هیپارین به طور مستقیم از قلب گرفته شد و برای استخراج پلاسما به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سطوح پلاسمایی NO با تبدیل NO به متابولیت‌های پایدار آن (احیاء یون‌های نیترات به نیتريت از طریق نیترات ردوکتاز) و اندازه‌گیری غلظت نیترات با استفاده از روش رنگسنجی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری سطح فعالیت ROS بافت قلب با استفاده از DCF-DA که یک روش عمومی برای اندازه‌گیری ROS در انواع مختلفی از سلول‌ها است، با استفاده از تکنیک اسپکتروفلوریمتری انجام شد. به این ترتیب، ۵۰ میلی‌گرم از بافت بطن چپ قلب با ۱۰۰ میکرولیتر از DCF-DA به آرامی ترکیب شد. سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. بعد از سپری شدن مدت انکوباسیون بافت با دستگاه سونیکتور، خرد شده و به قطعات ریز تبدیل شد. سپس با دور ۱۵۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه و با زمان ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی با دستگاه اسپکتروفلوریمتر با طول موج ۴۸۸ نانومتر بررسی گردید. برای آنالیز داده‌ها با غلظت‌های لگاریتمی پنج، غلظت محاسبه و نمودار استاندارد رسم

درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و تحت چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های پلی کربنات (۵ موش در هر قفس با اندازه ۴۲×۳۰×۱۶ سانتی‌متر مربع) نگهداری شدند. 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 (۲۶). یک هفته پس از تزریق جهت اطمینان از دیابتی بودن، رت‌هایی که میزان قند خون آنها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود به عنوان رت‌های دیابتی در نظر گرفته شدند (۲۷). رت‌های دیابتی شده به طور تصادفی به ۲ گروه کنترل دیابتی (n=۱۰) و گروه دیابتی + تمرین هوازی (n=۱۰) تقسیم شدند و یک گروه از رت‌ها نیز که قندخون طبیعی داشتند به عنوان گروه کنترل سالم (n=۱۰) در نظر گرفته شدند. برنامه تمرین هوازی شامل دوییدن بر روی تردمیل به مدت ۴ هفته و ۵ جلسه در هر هفته بود. رت‌ها در گروه تمرین هوازی ابتدا با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه با شیب ۱۵ درصد به مدت ۵ دقیقه تمرین خود را شروع کردند و سپس مدت و سرعت به تدریج ۲-۳ دقیقه در هر جلسه و ۱-۲ متر بر دقیقه در هر هفته افزایش یافت، به صورتی که در هفته چهارم رت‌ها با سرعت ۲۰ متر بر

شد. سایر نمونه‌ها با استفاده از نمودار استاندارد ارزیابی شدند.

برای استخراج RNA، ۵۰ میلی‌گرم از بافت قلب با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر معرف YtzoI (شرکت یکتا تجهیز آزما) هموژن گردید. سپس مراحل مختلف طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA تا مرحله نهایی استخراج و تهیه RNA خالص انجام شد. محلول RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI از هر گونه آلودگی به DNA و آنزیم‌های تخریب‌کننده RNA پاک‌سازی شد. نسبت جذبی ۲۸۰-۲۶۰ نانومتر به شیوه اسپکترومتری برای تمامی نمونه‌های استخراج شده بین ۱/۸-۲ بود. سپس برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده 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 استخراج شده نهایی و پرایمرهای Oligo-dT (آنزیم نسخه برداری معکوس) مطابق جدول کیت سنتز cDNA شرکت پارس توس استفاده شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری کلموگروف

اسمیرنوف، آنالیز تحلیل واریانس یکطرفه تجزیه و تحلیل شدند.

### یافته‌ها

داده‌های آزمون گلوکز ناشتایی و وزن رت‌ها قبل و بعد از پایان تمرین هوازی در جدول ۲ به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد آورده شده است. مقایسه‌های داده‌های قبل و بعد نشان داد که وزن رت‌های سه گروه در قبل و بعد از تمرین هوازی تفاوت معنی‌داری نداشته‌اند ( $p > 0.05$ )، اما گلوکز ناشتایی آنها در قبل و بعد از تمرین در گروه تمرین هوازی نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌دار و قابل توجهی داشته است ( $p < 0.05$ ).

نتایج آماری در مورد سطوح غلظتی ROS در رت‌ها نشان داد سه گروه (نمودار ۱) با هم اختلاف معنی‌داری دارند ( $F_{2,27} = 5.19/5$ ،  $p < 0.001$ ). با مراجعه به آزمون تعقیبی بنفرونی مشخص شد که داده‌های گروه کنترل سالم و دیابتی با هم اختلاف معنی‌داری دارند ( $p < 0.001$ ) و داده‌های گروه کنترل دیابتی و گروه تمرین هوازی هم اختلاف معنی‌داری نشان دادند ( $p < 0.001$ ).

جدول ۱: مشخصات پرایمرها

Gene	F. primer	R. Primer
HIF-1 $\alpha$	5'CCAGTCGCAGACGTAG3'	5'TGTGCTGTTGTATCGG3'
VEGF	5'TGTAGCACCCACGACAGAGCG3'	5'GACTTCACATGAACGCTTGT3'
Beta actin	5'TGTTGACATCCGTAAGAAGGC3'	5'GAGGAGCCAGGGCAGTATGA3'

گروه‌های مورد مطالعه برای بیان ژن VEGF دو به دو با هم اختلاف معنی‌داری دارند ( $p < 0.001$ ). در رابطه با HIF-1 $\alpha$  ( $F_{2,27} = 69/1, p = 0.002$ ) نیز مشابه VEGF در سه گروه اختلاف معنی‌داری نشان داد (نمودار ۴). با مراجعه به آزمون تعقیبی بنفرونی مشخص شد که داده‌های گروه کنترل سالم و دیابتی با هم اختلاف معنی‌داری دارند ( $p < 0.001$ ) و داده‌های گروه کنترل دیابتی و گروه تمرین هوازی هم اختلاف معنی‌داری نشان دادند ( $p < 0.001$ ).

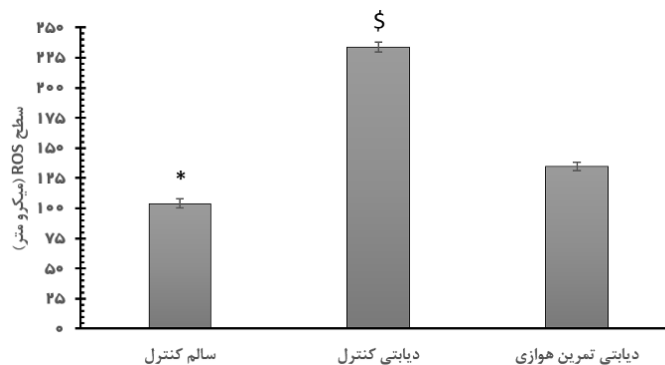
بررسی سطوح نیتریک اکساید نیز نشان داد سه گروه (نمودار ۲) با هم اختلاف معنی‌داری دارند ( $F_{2,27} = 215/4, p < 0.001$ ). با مراجعه به آزمون تعقیبی بنفرونی مشخص شد که داده‌های گروه کنترل سالم و دیابتی با هم اختلاف معنی‌داری دارند ( $p < 0.001$ ) و داده‌های گروه کنترل دیابتی و گروه تمرین هوازی هم اختلاف معنی‌داری نشان دادند ( $p < 0.001$ ).

نتایج تحلیل واریانس یکطرفه برای بیان ژن VEGF ( $F_{2,27} = 47/1, p = 0.008$ ) نشان داد که تغییرات سه گروه تحقیق اختلاف معنی‌داری دارند (نمودار ۳). با مراجعه به آزمون بنفرونی مشخص شد که تمامی

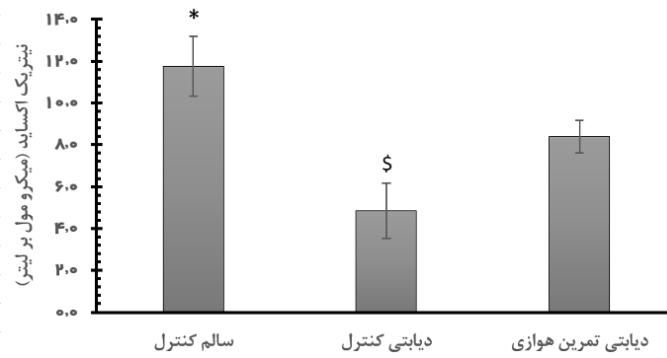
جدول ۱: داده‌های گلوکز ناشتا و وزن رت‌ها در قبل و بعد از تمرین‌های هوازی در گروه‌های کنترل سالم، کنترل دیابتی و دیابتی با تمرین هوازی

گروه	متغیر		وزن بدن (گرم)		گلوکز ناشتا (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	
	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد
کنترل سالم	۲۳۲/۲۲±۷	۲۶۴/۳۷±۱	۹۰/۱۶±۴	۹۳/۸±۴		
کنترل دیابتی	۲۲۳/۳۶±۶	۲۵۰/۴۸±۶	*۲۹۹/۸۵±۳	*۳۷۸/۱۰۵±۳		
دیابتی + تمرین هوازی	۲۲۴/۳۰±۳	۲۲۷/۳۸±۴	*۳۵۴/۱۰۶±۲	§۱۵۰/۱۱۶±۷		

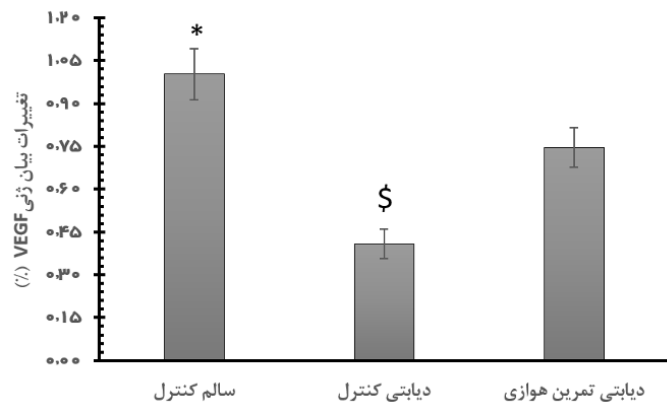
نشانگر تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم ( $p < 0.05$ ) و § نشانگر تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل دیابتی ( $p < 0.05$ ) می‌باشد.



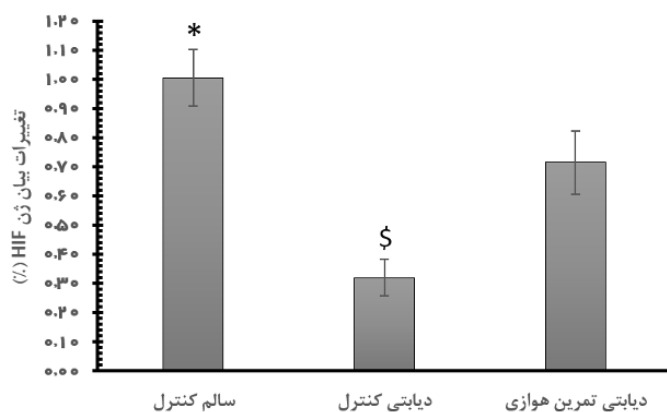
نمودار ۱: میانگین و انحراف استاندارد تغییرات سطوح ROS در سه گروه. \* نشانگر تفاوت معنی‌دار گروه سالم کنترل با دیابتی کنترل و دیابتی تمرین هوازی می‌باشد. § نشان دهنده تفاوت معنی‌دار گروه دیابتی کنترل و دیابتی تمرین هوازی می‌باشد ( $p < 0.05$ ).



شکل ۲: میانگین و انحراف استاندارد تغییرات سطوح نیتریک اکساید در سه گروه \* نشانگر تفاوت معنی دار گروه سالم کنترل با دیابتی کنترل و دیابتی تمرین هوازی می باشد. \$ نشان دهنده تفاوت معنی دار گروه دیابتی کنترل و دیابتی تمرین هوازی می باشد ( $P < 0.05$ ).



نمودار ۳: میانگین و انحراف استاندارد تغییرات بیان ژن VEGF در سه گروه \* نشانگر تفاوت معنی دار گروه سالم کنترل با دیابتی کنترل و دیابتی تمرین هوازی می باشد. \$ نشان دهنده تفاوت معنی دار گروه دیابتی کنترل و دیابتی تمرین هوازی می باشد ( $P < 0.05$ ).



نمودار ۴: میانگین و انحراف استاندارد تغییرات بیان ژن HIF-1α در سه گروه \* نشانگر تفاوت معنی دار گروه سالم کنترل با دیابتی کنترل و دیابتی تمرین هوازی می باشد. \$ نشان دهنده تفاوت معنی دار گروه دیابتی کنترل و دیابتی تمرین استقامتی می باشد ( $P < 0.05$ ).





## بحث

تمرین هوازی منظم یک رویکرد سالم و مؤثر غیر دارویی در جهت مدیریت دیابت نوع دو می‌باشد و کمک به کنترل بهتر گلوکز، کاهش وزن بدن و بهبود سلامتی قلب و عروق می‌نماید (۱۷)، لذا هدف از مطالعه حاضر تعیین و بررسی اثر ۴ هفته تمرین هوازی بر سطوح ROS و NO و بیان ژن‌های HIF-1 $\alpha$  و VEGF بافت قلب رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو بود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دیابت نوع دو موجب افزایش معنی‌دار غلظت ROS و گلوکز، کاهش معنی‌دار غلظت NO، بیان ژن‌های HIF-1 $\alpha$  و VEGF در مقایسه با گروه سالم می‌شود. تمرین هوازی نیز موجب کاهش معنی‌دار غلظت ROS و گلوکز، افزایش معنی‌دار غلظت NO، بیان ژن‌های HIF-1 $\alpha$  و VEGF در مقایسه با گروه کنترل دیابتی شد. این نتایج بیان‌کننده حفاظت قلب از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و هایپرگلیسمیا و بهبود بیان ژنی مارکرهای مرتبط با آنژیوژنز بافت قلب دیابتی نوع دو است. در رابطه با علت نتایج به دست آمده از اثر دیابت نوع دو بر متغیرهای مورد نظر در مطالعه حاضر، هایپرگلیسمیا موجب استرس اکسیداتیو و تولید زیاد ROS (افزایش واکنش بین سوپراکسید و NO) می‌شود، که خود موجب کاهش غلظت NO و بنابراین کاهش تجمع و بیان ژن HIF-1 $\alpha$  القا شده به وسیله NO می‌شود و متعاقب آن کاهش بیان ژن VEGF را سبب می‌شود (۲۹). همچنین TNF- $\alpha$  و آنژیوتنسین II ناشی از دیابت نوع دو نیز در مهار

تولید HIF-1 $\alpha$  نقش دارند (۱۲). در حالی که افزایش فعالیت و تجمع NO موجب افزایش بیان HIF-1 $\alpha$  می‌شود (۱۲)، کاهش NO باعث مهار و سرکوب بیان HIF-1 $\alpha$  می‌شود و متعاقب آن کاهش بیان VEGF رخ می‌دهد (۲۹). نتایج مطالعه حاضر هم راستا با گزارش‌های پیشین است که تنظیم منفی VEGF در قلب دیابتی و وضعیت مقاومت انسولینی را در پاسخ به تمرین نشان داده‌اند (۳۰، ۳۱). از این رو، مطالعه حاضر گزارش‌های پیشین در ارتباط با تغییر معنی‌دار بیان ژن VEGF در قلب دیابتی نسبت به قلب سالم را تأیید می‌کند (۳۲).

تغییرات گلوکز خون گروه دیابتی با تمرین هوازی در مطالعه حاضر، کاهش معنی‌دار در پایان پروتکل تمرینی را نشان داد. کاهش گلوکز خون موجب کاهش تولید ROS شده است و این کاهش احتمالاً یکی از دلایل افزایش سطح NO و فعال شدن مسیر HIF-1 $\alpha$  / VEGF و افزایش بیان ژن آنها در مطالعه حاضر باشد. از سویی دیگر شاید تمرین هوازی از طریق مکانیسم‌هایی مانند؛ هایپوکسی، استرس برشی در عروق (افزایش بیان منبسط‌کننده‌های عروقی به خصوص NO، پروستاگلین‌ها و پروستاگولیدها) و کشش و فشار دیواره اندوتلیال عروق، باعث افزایش رهایی NO شده‌اند. از آنجایی که ROS کاهش یافته است و NO کمتری با شاخص‌های ROS مانند؛ سوپراکسید ترکیب می‌شود، تجمع NO موجب افزایش بیان ژن HIF-1 $\alpha$  و متعاقب آن افزایش بیان ژن VEGF در بافت قلب شده است (۳۳). هم راستا

با نتایج مطالعه حاضر، افزایش معنی‌دار NO سرم در بر اثر ۸ هفته تمرین استقامتی مشاهده شد (۳۴). افزایش غلظت NO ناشی از تمرین هوازی را می‌توان به دلیل کاهش ROS دانست. همچنین HIF-1 خود می‌تواند بیان فاکتور القا کننده نیتریک اکساید سنتتاز (iNOS) را تحریک کند و متعاقب آن تولید NO در عروق افزایش یابد که در نهایت به افزایش آنژیوژنز منجر گردد (۳۵). در شرایط هایپوکسی و ایسکمی ناشی از فعالیت ورزشی، فاکتور القا کننده هایپوکسی افزایش می‌یابد (۳۶). این فاکتور با اثرگذاری روی ناحیه پیش برنده ژن VEGF باعث افزایش بیان آن می‌شود. همچنین، تمرین هوازی موجب افزایش بیان PGC-1 شده که خود می‌تواند به افزایش بیان ژن VEGF در بافت قلب منجر شود (۳۶). همچنین این احتمال وجود دارد که تمرین هوازی از طریق افزایش فاکتور رشد GH و فعال کردن مسیر PI3K/AKT/mTOR سبب افزایش NO و در نهایت افزایش بیان VEGF شده باشد. بعضی از پژوهش‌ها نیز هم راستا با نتایج مطالعه حاضر نبودند (۳۷).

هم راستا با نتایج پژوهش حاضر، پژوهش‌های پیشین بیان کرده‌اند، مقدار VEGF بعد از تمرین افزایش می‌یابد (۳۸، ۳۹)، در حالی که پژوهش‌های دیگر تغییری در مقدار VEGF پس از تمرین را مشاهده نکرده‌اند (۴۰، ۴۱). گو و همکاران، کاهش غلظت VEGF سرم را بعد از تمرین گزارش کرده‌اند (۴۲) که ناهم‌سو با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. وارنر و همکاران به بررسی اثر ۱۲ هفته

تمرین موازی (تمرین هوازی با مقاومتی، ۳ جلسه در هفته) بر بیان ژن VEGF در رت‌های دیابتی نوع دو پرداختند. نتایج نشان داد تمرین هوازی موجب افزایش بیان VEGF شده است و یکی از عوامل مؤثر بر این افزایش را بهبود حساسیت انسولینی بیان کرده بود (۴۳). بر طبق نتایج مطالعه بشیری و همکاران ۸ هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنی‌دار تراکم مویرگی عضله قلبی و مقدار سرمی VEGF رت‌های دیابتی شد (۲۵). مطالعه ارکات و همکاران نشان داد تمرین دویدن بر روی تردمیل به طور معنی‌داری بیان VEGF در بافت قلب را در مقایسه با گروه دیابتی بی تحرک افزایش داد. در نهایت نتایج گویای اثر تمرین هوازی بر بهبود تنظیم منفی ناشی از دیابت بود (۲۰).

اکف و همکاران به بررسی نقش آنژیوژنز به عنوان تنظیم کننده مشکلات قلبی و عروقی با تحریک به وسیله تمرین هوازی، NO و آنژیوستاتین در رت‌های دیابتی پرداختند. نتایج نشان داد گروه تمرین هوازی و گروه مکمل NO دارای افزایش معنی‌دار سطح VEGF خون و بیان ژن آن بودند و گروهی که آنژیوستاتین مصرف نموده بودند دارای کاهش معنی‌دار در VEGF بودند (۲۳). همچنین ممکن است، لاکتات و آدنوزین از طریق فعال سازی گیرنده A2، موجب افزایش غلظت cAMP و متعاقب آن افزایش سطوح بیان ژن VEGF شده باشد (۳۶، ۴۴).

محدودیت پژوهش حاضر، عدم کنترل غذای مصرفی رت‌ها بود که به صورت آزادانه در دسترس آنها قرار داشت.

پیشنهاد می‌شود با توجه به اثر دیابت نوع دو در ایجاد تغییرات ساختاری در قلب، در مطالعه‌ی آتی برای بررسی بهتر اثر تمرین هوازی، از تصویربرداری و اکوقلبی نیز استفاده گردد.

### نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد تمرین هوازی باعث کاهش غلظت ROS، افزایش غلظت NO و افزایش بیان ژن‌های HIF-1 $\alpha$  و VEGF در قلب دیابتی شد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، فعالیت بدنی متناسب با نوع بیماری می‌تواند باعث بهبود عملکرد اندوتلیال و در نتیجه کاهش مشکلات عروقی در شرایط دیابتی شود.

### تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر برگرفته از بخشی از رساله دکترای تخصصی فیزیولوژی ورزشی گرایش قلب و عروق و تنفس با کد اخلاق ۰۲۴-۲۰۳۹۶-۲ می‌باشد. بدین وسیله از زحمات اساتید بزرگوار و دوستان عزیز که در اجرای پژوهش همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## REFERENCES

1. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Comprehensive Physiology*. 2011;2(2):1143-211.
2. Booth FW, Roberts CK, Thyfault JP, Ruegsegger GN, Toedebusch RG. Role of inactivity in chronic diseases: evolutionary insight and pathophysiological mechanisms. *Physiological reviews*. 2017;97(4):1351-402.
3. de Laat MA, Gruntmeir KJ, Pollitt CC, McGowan CM, Sillence MN, Lacombe VA. Hyperinsulinemia down-regulates TLR4 expression in the mammalian heart. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:120.
4. Werner GS, Ferrari M, Betge S, Gastmann O, Richartz BM, Figulla HR. Collateral function in chronic total coronary occlusions is related to regional myocardial function and duration of occlusion. *Circulation*. 2001;104(23):2784-90.
5. Rullman E, Rundqvist H, Waegsaeter D, Fischer H, Eriksson P, Sundberg CJ, et al. A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle. *Journal of applied physiology*. 2007;102(6):2346-51.
6. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*. 2007;87(1):315-424.
7. García-Pastor C, Benito-Martínez S, Moreno-Manzano V, Fernández-Martínez AB, Lucio-Cazaña FJ. Mechanism and Consequences of The Impaired Hif-1 $\alpha$  Response to Hypoxia in Human Proximal Tubular HK-2 Cells Exposed to High Glucose. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-18.
8. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *International journal of vascular medicine*. 2012;4(2):220-35.
9. Staiculescu M, Foote C, Meininger G, Martinez-Lemus L. The role of reactive oxygen species in microvascular remodeling. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(12):23792-835.
10. Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka T-a. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*. 2010;1(2):22-33.
11. Rask-Madsen C, King GL. Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*. 2007;3(1):46.
12. Xiao H, Gu Z, Wang G, Zhao T. The possible mechanisms underlying the impairment of HIF-1 $\alpha$  pathway signaling in hyperglycemia and the beneficial effects of certain therapies. *International journal of medical sciences*. 2013;10(10):1412.
13. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its  $\alpha$  subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(50):32253-9.
14. Zhao D, Tu Y, Wan L, Bu L, Huang T, Sun X, et al. In vivo monitoring of angiogenesis inhibition via down-regulation of mir-21 in a VEGFR2-luc murine breast cancer model using bioluminescent imaging. *PloS one*. 2013;8(8):e71472.
15. Tang K, Xia FC, Wagner PD, Breen EC. Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2010;170(1):16-22.
16. 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.
17. Broderick TL, Sennott JM, Gutkowska J, Jankowski M. Anti-inflammatory and angiogenic effects of exercise training in cardiac muscle of diabetic mice. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*. 2019;12:565-573.
18. Boule N, Haddad E, Kenny G, Wells G, Sigal R. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2002;12(1):60-1.
19. Ghosh S, Khazaei M, Moien-Afshari F, Ang LS, Granville DJ, Verchere C, et al. Moderate exercise attenuates caspase-3 activity, oxidative stress, and inhibits progression of diabetic renal disease in db/db mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2009;296(4):F700-F8.

20. 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. *Cardiology research*. 2014;5(1):23.
21. Ghorbanzadeh V, Mohammadi M, Dariushnejad H, Chodari L, Mohaddes G. Effects of crocin and voluntary exercise, alone or combined, on heart VEGF-A and HOMA-IR of HFD/STZ induced type 2 diabetic rats. *Journal of endocrinological investigation*. 2016;39(10):1179-86.
22. Green DJ, Maiorana A, O'driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *The Journal of physiology*. 2004;561(1):1-25.
23. Kojda G, Hambrecht R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovascular research*. 2005;67(2):187-97.
24. Moien-Afshari F, Ghosh S, Khazaei M, Kieffer T, Brownsey R, Laher I. Exercise restores endothelial function independently of weight loss or hyperglycaemic status in db/db mice. *Diabetologia*. 2008;51(7):1327-1337.
25. Bashiri J, Gaeini A, Hadi H. Endurance training affects muscular angiogenesis and serum VEGF concentration in diabetic rats. *Koomesh*. 2015;17(1):123-32.
26. 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.
27. Shahabinejad M, Rahmany M. The Effect Of Licorice Root Extract On Blood Sugar Level In Streptozotocin Induced Diabetic In Rats. *Journal Of Diabetes*. 2007;6(4):237-244.
28. Linden MA, Fletcher JA, Morris EM, Meers GM, Kearney ML, Crissey JM, et al. Combining metformin and aerobic exercise training in the treatment of type 2 diabetes and NAFLD in OLETF rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013;306(3):E300-E10.
29. Thomas DD, Ridnour LA, Espey MG, Donzelli S, Ambs S, Hussain SP, et al. Superoxide fluxes limit nitric oxide-induced signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(36):25984-93.
30. 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. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009;297(2):H829-H35.
31. Miele C, Rochford JJ, Filippa N, Giorgetti-Peraldi S, Van Obberghen E. Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(28):21695-702.
32. Li S, Culver B, Ren J. Benefit and risk of exercise on myocardial function in diabetes. *Pharmacological research*. 2003;48(2):127-32.
33. Khoweiled A, El-Sebaee H, El- Attar S, Mansour M. Role of Angiogenesis as a Factor Modulating the Course of Cardiovascular Complications in Diabetic Rats. *The Medical Journal of Cairo University*. 2011;79(2).
34. Jalali Z, Dabidi RV. The effect of regular endurance exercises and galbanum supplement on vascular function during chronic hypertension in male wistar rats. *Journal of Sport Biosciences*. 2014;6(1):95-113.
35. Hendrickson MD, Poyton RO. Crosstalk between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways: an update. *Research and Reports in Biochemistry*. 2015;5:147.
36. Trenerry MK, Carey KA, Ward AC, Cameron-Smith D. STAT3 signaling is activated in human skeletal muscle following acute resistance exercise. *Journal of applied physiology*. 2007;102(4):1483-9.
37. Mehri Alvar Y, Sayevand Z, Erfani Adab. F ,Heydari Moghadam R, Samavat Sharif MA, Karami S The effects of five weeks' resistance training on some vascular growth factors in sedentary men *Sport Physiology*. 2016;8(29):15-30.
38. Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VF, et al. A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *Journal of applied physiology*. 2008;104(4):1006-13.
39. Czarkowska-Paczek B, Bartłomiejczyk I, Przybylski J. The serum levels of growth factors: PDGF, TGF-BETA. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006;57(2):189-97.

40. Jensen L, Pilegaard H, Neufer PD, Hellsten Y. Effect of acute exercise and exercise training on VEGF splice variants in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004;287(2): 397-402.
41. Suhr F, Brixius K, de Marées M, Boolck B, Kleinoöder H, Achtzehn S, et al. Effects of short-term vibration and hypoxia during high-intensity cycling exercise on circulating levels of angiogenic regulators in humans. *Journal of applied physiology*. 2007;103(2):474-83.
42. Gu JW, Gadonski G, Wang J, Makey I, Adair TH. Exercise increases endostatin in circulation of healthy volunteers. *BMC physiology*. 2004;4(1):2.
43. Wagner H, Fischer H, Degerblad M, Alvarsson M, Gustafsson T. Improvement of insulin sensitivity in response to exercise training in type 2 diabetes mellitus is associated with vascular endothelial growth factor A expression. *Diabetes and Vascular Disease Research*. 2016;13(5):361-6.
44. Taheri Chadorneshin H, Nourshahi M, Ranjbar K. The response of vascular endothelial growth factor to exhausted submaximal exercise and its relationship with VO<sub>2</sub>max. *Sport Biosciences*. 2011; 2(7): 59-75.

# The Effects of 4 Weeks Aerobic Training on Oxidative and Angiogenesis Markers of Cardiac Tissue in Type 2 Diabetic Male Wistar Rats

Bakhtiari F<sup>1</sup> Matin Homaei H<sup>1\*</sup>, Ghazalian F<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Sport Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, <sup>2</sup>Department of Sport Physiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 24 Jun 2019 Accepted: 207 Sep 2019

## Abstract

**Background & aim:** Type 2 diabetes exerts oxidative and anti-angiogenic effects through different pathways in the heart tissue. The aim of the present study was to determine and evaluate the effect of 4 weeks aerobic training on oxidative stress and angiogenesis in cardiac tissue of male rats with type 2 diabetes.

**Methods:** In the present experimental study, 30 male Wistar rats were randomly divided into three equal diabetic groups with aerobic training, diabetic control group and healthy control group. Induction of type 2 diabetes was induced by intraperitoneal injection of STZ. The incremental aerobic exercise protocol consisted of 4 weeks, 5 sessions per week of running on the treadmill at a speed of 20 m/min for 60 min. ROS and NO levels were measured by spectrophotometer and colorimetric respectively. Expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF genes were evaluated by Real time PCR. Data were analyzed using one-way ANOVA and Bonferroni post hoc tests.

**Results:** the results revealed that type 2 diabetes significantly increased ROS ( $p < 0.05$ ) and decreased NO ( $p < 0.05$ ), HIF-1 $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) and VEGF ( $p > 0.05$ ) compared with control group. Aerobic training significantly decreased ROS ( $p < 0.05$ ) and NO ( $p < 0.05$ ) and increased HIF-1 $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) and VEGF ( $p < 0.05$ ) genes respectively in comparison with the control group. Also, aerobic training significantly reduced glucose ( $p < 0.05$ ) compared to the control group.

**Conclusion:** Type 2 diabetes increased oxidative stress in heart tissue and disrupted the process of angiogenesis in diabetic heart. Aerobic exercise seemed to have a positive effect on the process of angiogenesis by decreasing ROS and can improve diabetic heart.

**Key words:** Oxidative Stress, Angiogenesis, Aerobic Training.

---

**Corresponding author:** Matin Homaei H, Department of Sport Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

**Email:** hasanmatinhomaei@yahoo.com

## Please cite this article as follows:

Bakhtiari F, Matin Homaei H, Ghazalian F. The Effects of 4 Weeks Aerobic Training on Oxidative and Angiogenesis Markers of Cardiac Tissue in Type 2 Diabetic Male Wistar Rats. *Armaghane-danesh* 2020; 24(5)(2): 892-905.