مجله دیابت و متابولیسم ایران. مرداد- شهریور ۱۳۹۵؛ دوره ۱۵ (شماره ۶) ۳۵۰-۳۳۹

مقاله پژوهشی

تاثیر هشت هفته تمرین هوازی بر بیان ژن mir-126 و تراکم مویرگی بافت قلبی در رت‌های نر دیابتی

میرحجت موسوی نژاد[۱]، حسن متین همایی[۱*]، محمد علی آذربایجانی[۱]، مقصود پیری[۱]

چکیده

مقدمه: تمرین‌های ورزشی به‌عنوان جزء سودمند برنامه‌ی درمانی مبتلایان به دیابت معرفی شده است. فرآیند آنژیوژنز در افراد دیابتی، می‌تواند با فعالیت‌های ورزشی تحت تأثیر قرار بگیرد. هدف ما در این پژوهش، تعیین تأثیر تمرین هوازی بر بیان mir-126 و تراکم مویرگی بافت قلبی در رت‌های نر دیابتی بود.

روش‌ها: تعداد ۲۰ سر رت نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۰/۸۵± ۱۹۱/۹ گرم، تصادفی به دو گروه کنترل دیابتی (n=۱۰)، و تمرینی دیابتی (n=۱۰) تقسیم و گروه‌ها براساس وزن همسان‌سازی شدند. دیابت از طریق ترکیب مصرف غذای پُرچرب و تزریق استرپتوزوتوسین ایجاد شد. برنامه‌ی تمرینی شامل ۸ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط بر روی نوارگردان بود. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، و پس از ناشتایی شبانه نمونه‌گیری بافت قلبی به‌عمل آمد. بیان ژن mir-126 با استفاده از روش Real Time PCR انجام شد. جهت اندازه‌گیری دانسیته مویرگی عضله‌ی قلبی از روش ایمونوهیستوشیمی (فعالیت آلکالین فسفاتاز) استفاده شد. برای مقایسه‌ی اختلاف میانگین‌ها از آزمون تی مستقل استفاده گردید و سطح معنی داری آزمون ها P < ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج آزمون تی مستقل نشان داد، اجرای ۸ هفته تمرین هوازی موجب افزایش معنی‌دار بیان mir-126 (P= ۰/۰۰۱) و تراکم مویرگی (P= ۰/۰۱۸) بافت قلبی در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر که نشان دهنده‌ی توسعه‌ی آنژیوژنز توسط تمرین هوازی در شرایط دیابتی می‌باشد، می‌توان بیان کرد تمرین هوازی به‌عنوان یک درمان غیردارویی برای بهبود خون رسانی قلب می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: تمرین هوازی، تراکم مویرگی، mir-126، دیابت نوع دو

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

***نشانی:** تهران، میدان صنعت، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، تلفن: ۰۹۱۴۹۶۴۲۱۳۲، نشانی پست الکترونیک: mhmousavi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۱۲ **تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۵/۰۶/۱۷** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۶/۲۸**

مقدمه

شیوع گسترده‌ی بیماری دیابت در سال‌های اخیر، این بیماری را به یک نگرانی عمده‌ی بهداشت عمومی تبدیل کرده است [۱]. در دهه‌های گذشته تعداد افرادی که از دیابت رنج می‌برند افزایش یافته است. براساس گزارش فدراسیون بین‌المللی دیابت، تا سال ۲۰۱۱ حدود ۳۶۵ میلیون نفر به این بیماری مبتلا بودند که انتظار می‌رود این رقم تا سال ۲۰۳۰ به ۵۵۲ میلیون نفر افزایش یابد [۲]. مطالعات نشان می‌دهند که بیماری دیابت، فقط اختلال متابولیسم قند خون را ایجاد نمی‌کند، بلکه عوارض مزمنی را در ساختار و عملکرد عروق خونی در بافت‌های مختلف بدن به همراه دارد که این عوارض را می‌توان به دو دسته میکرووواسکولار (شامل رتینوپاتی، نوروپاتی و نفروپاتی) و ماکرووواسکولار (شامل بیماری عروق محیطی و بیماری قلبی–عروقی) تقسیم بندی کرد [۳]. به‌طور کلی، دیابت از نقطه نظر عروقی و آنژیوژنز، بیماری متناقضی می‌باشد، زیرا از یک طرف باعث افزایش آنژیوژنز در اندام‌هایی مانند کلیه و چشم می‌شود و از طرف دیگر، موجب مهار آنژیوژنز در قلب و عروق محیطی می‌شود. لذا اصطلاح پارادوکس آنژیوژنز در دیابت اشاره به حضور هم‌زمان شرایط پرو و آنتی آنژیوژنیک به‌صورت توأم در این بیماری دارد [۴]. شواهد روزافزونی وجود دارد که نشان می‌دهد، دیابت باعث کاهش آنژیوژنز، کاهش قطر مویرگ‌ها، کاهش نسبت مویرگ‌ها به فیبرها و تشکیل عروق جانبی قلب در انسان و مدل‌های حیوانی می‌گردد [۵، ۶]. Abaci و همکاران با مطالعه‌ای که بر روی ۴۱۰ فرد مبتلا به بیماری عروق کرونر انجام دادند (۲۰۵ فرد دیابتی و ۲۰۵ فرد غیردیابتی) مشاهده کردند، بیماران دیابتی میزان عروق جانبی کرونر کمتری دارند [۷]. مطالعات Werner و همکاران نیز از این یافته که رشد و توسعه‌ی عروق جانبی کرونر در بیماران دیابتی کاهش می‌یابد، حمایت کردند [۸]. به‌علاوه، نشان داده شده است دیابت باعث کاهش قطر مویرگ‌ها، کاهش نسبت مویرگ‌ها به فیبرها، کاهش ظرفیت انتشار مویرگ‌ها و هم‌چنین اختلال در تنظیم همودینامیک عروق عضلات می‌شود [۹]. دیابت بر روی عوامل پروآنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک نیز اثر می‌گذارد و این اثر باعث تغییر موازنه‌ی بین عوامل تحریک کننده و مهار کننده‌ی آنژیوژنز شده و در نتیجه با تغییر آنژیوژنز، بیماری‌های قلبی– عروقی افزایش می‌یابد [۱۰، ۱۱]. در مقابل، مطالعات نشان می‌دهد تمرین ورزشی، عملکرد اندوتلیال را بهبود بخشیده و کاهش دانسیته عروق ریز (میکرووواسکولار) را خنثی می‌کند [۱۲]. در مجموع افزایش رشد مویرگی بر اثر تمرینات ورزشی در افراد دیابتی و سالم گزارش شده است، اما اثر این عمل آنگونه که در افراد سالم اتفاق می‌افتد معنی‌دار نیست [۱۳، ۱۴].

مطالعات نشان می‌دهد که تغییرات در microRNA های‌گردش خون با بیماری‌های قلبی–عروقی از قبیل انفارکتوس میوکارد، بیماری شریان کرونری و ایست قلبی، همچنین بیماری‌های خود ایمنی همراه بوده است [۱۵]. microRNA ها، RNA های کوچک کد گذاری نشده درون‌زاد با تعداد نوکلئوتید ۲۱–۲۵ هستند که بیان ژنی را از طریق سرکوب مرحله‌ی پس از رونویسی تنظیم می‌کنند [۱۶]. microRNA ها، از طریق بازدارندگی ترجمه یا کاهش mRNA در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی از قبیل تمایز سلولی، تکثیر و رشد، آپوپتوز، آنژیوژنز، التهاب، سیگنالینگ ردوکس و دیگر اعمال اندوتلیالی نقش دارند [۱۷]. تاکنون بیش از ۱۰۰۰ microRNA در ژنوم انسان شناسایی شده است که نقش اساسی در تنظیم عملکرد عضله‌ی قلبی و اسکلتی دارند [۱۸]. mir126 یکی ازmicroRNA های ویژه است که به‌عنوان آنژیومیر[1] معروف است و تنها در سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود. mir126 مهم‌ترین و بهترین نقش را در کنترل آنژیوژنز و یکپارچگی عروقی بازی می‌کند [۱۹، ۲۰]. mir126 به‌صورت مستقیم دو تنظیم کننده‌ی منفی مسیر VEGF را سرکوب می‌کند. این دو مسیر عبارتند از: Sprouty-related protein 1 (Spred-1) که یک سرکوب کننده‌ی درون سلولی مسیر Ras/MAPK می‌باشد و زیر واحد تنظیمی ۲ فسفو اینوزیتول تری کیناز[2] (PIK3R2) که

[1]Angiomir
[2]Phosphoinositol-3 kinase regulatory subunit 2

به‌صورت منفی فعالیت مسیر PIK3/Akt/eNOS را تنظیم می‌کند. مطالعه‌ی Da silva و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد، تمرین هوازی شنا باعث افزایش بیان mir126 می‌شود و این امر می‌تواند با آنژیوژنز قلبی ناشی از فعالیت ورزشی بوسیله‌ی تنظیم مستقیم مسیر VEGF و تنظیم غیرمستقیم اهداف آن مانند MAPK, PI3K/Akt/eNOS ارتباط داشته باشد [۱۹]. در خصوص تأثیر بیماری دیابت بر میزان بیان mir126، گزارش تحقیقی Yang Liu و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد، mir126 سرمی در بیماران دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم پایین‌تر است [۱۶]. با وجود این، بررسی پژوهش‌های انجام شده، نشان می‌دهد که هیچ مطالعه‌ای آثار هم‌زمان تمرین ورزشی و دیابت را بر mir126 و مسیرهای سیگنالینگ آن در آنژیوژنز قلبی بررسی نکرده است. بنابراین، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر تمرین استقامتی بر میزان بیان mir126 و دانسیته‌ی مویرگی بافت قلبی در رت‌های نر دیابتی انجام شد.

روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی- آزمایشگاهی می‌باشد که به‌صورت تجربی با طرح پس آزمون با گروه کنترل انجام شد. شمای کلی طرح پژوهش در جدول ۱ گزارش شده است. تعداد ۲۰ سر رت نژاد ویستار در سن ۴ هفتگی با میانگین وزنی ۱۱/۹± ۹۸/۵ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه و در شرایط دمایی C °۲۲-۲۰، رطوبت ۵۰ درصد، کم سر و صدا و چرخه‌ی روشنایی – تاریکی ۱۲ساعته به‌صورت انفرادی در هر قفس نگه داری شدند. وزن بدن روزانه ثبت و رت‌ها با غذای مخصوص رت و آب تغذیه شدند. بعد از گذشت دو هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن مطلوب) رت‌ها با میانگین وزنی ۱۰/۸۵± ۱۹۱/۹گرم تصادفی به دو گروه کنترل دیابتی (n=۱۰)، و تمرینی دیابتی (n=۱۰) تقسیم و گروه‌ها براساس وزن همسان‌سازی شدند. در نهایت، در تجزیه و تحلیل داده‌ها، برای سنجش بیان ژن و دانسیته‌ی مویرگی از گروه کنترل دیابتی ۸ سر و تمرینی دیابتی ۸ سر استفاده شد. دیابت در این پژوهش از طریق ترکیب مصرف غذای پُرچرب و تزریق استرپتوزوتوسین ایجاد شد [۲۱]. غذای مورد استفاده شامل ۵۸ درصد چربی، ۲۵ درصد پروتئین و ۱۷ درصد کربوهیدرات بود. این ترکیب غذایی به‌وسیله محقق به‌صورت دست ساز تهیه گردید [۷]. رت‌ها به‌مدت دو هفته تحت مصرف غذای پُرچرب قرار گرفتند. بعد از آن تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان mg/Kg ۳۵ حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد بعد از ۶ ساعت ناشتایی در دو گروه دیابتی انجام گرفت [۲۲]. ۴۸ ساعت بعد از تزریق دارو، نمونه‌ی خونی از چشم حیوان جمع‌آوری و جداسازی سرم انجام و غلظت گلوکز با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. غلظت گلوکز بالاتر از mg/dl ۳۰۰ به‌عنوان دیابت تعریف [۲۱] و رت‌های واجد شرایط وارد پژوهش شدند.

پروتکل تمرینی

تمرین هوازی به‌مدت ۸ هفته و ۶ جلسه در هفته بر روی نوار گردان انجام شد [۲۳، ۲۴] که خلاصه‌ی آن در جدول ۲ گزارش شده است. قابل ذکر است که پروتکل تمرینی، قبل از شروع مطالعه با انجام Pilot study بر روی ۴ رت مورد تایید قرار گرفت. این حیوانات پس از ۵ جلسه فعالیت (۵ الی ۱۰ دقیقه با شیب صفر و سرعت ۱۰ متر بر دقیقه) با نحوه‌ی فعالیت روی دستگاه نوار گردان ویژه جوندگان آشنا شدند.

جدول ۱- شمای کلی طرح پژوهش

مراحل	نگه داری و رسیدن به وزن مطلوب	مصرف غذای پُرچرب	تزریق STZ	انجام تست تأیید دیابت	آشناسازی	اعمال پروتکل تمرینی	تشریح و استخراج بافت
مدت	۲ هفته	۲ هفته		۴۸ ساعت بعد از تزریق STZ	۵ روز	۸ هفته	۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه‌ی تمرینی
کنترل دیابتی	*	*	*	*	–	–	*
تمرین دیابتی	*	*	*	*	*	*	*

جدول ۲- پروتکل تمرین هوازی با شدت متوسط بر روی نوار گردان

		سرعت (متر بر دقیقه)	شیب (درصد)	مدت تمرین (دقیقه)
هفته اول	روز اول	۱۰	۱۰	۱۰
	روز دوم	۱۱	۱۰	۱۵
	روز سوم	۱۲	۱۰	۲۰
	روز چهارم	۱۳	۱۰	۲۵
	روز پنجم	۱۴	۱۰	۳۰
	روز ششم	۱۵	۱۰	۳۵
هفته دوم	روز اول	۱۶	۱۰	۴۰
	روز دوم	۱۷	۱۰	۴۰
	روز سوم	۱۸	۱۰	۴۵
	روز چهارم	۱۹	۱۰	۵۰
	روز پنجم	۲۰	۱۰	۵۵
	روز ششم	۲۱	۱۰	۶۰
هفته سوم		۲۲	۱۰	۶۰
هفته چهارم		۲۳	۱۰	۶۰
هفته پنجم		۲۴	۱۰	۶۰
هفته ششم		۲۵	۱۰	۶۰
هفته هفتم		۲۶	۱۰	۶۰
هفته هشتم		۲۶	۱۰	۶۰

سنجش متغیرهای پژوهش

پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه‌ی تمرین، و پس از ناشتایی شبانه نمونه‌گیری انجام شد. رت‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلوزین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند. سپس قفسه‌ی سینه‌ی حیوان شکافته شد و برای اطمینان از کمترین آزار حیوان، خون مستقیم از قلب حیوان گرفته شد. عضله‌ی قلبی آن‌ها تحت شرایط استریل جدا شد. بافت مورد نظر بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد. بیان ژن mir126 قلبی به روش و مراحل زیر مورد بررسی قرار گرفت:

۱ میلی‌لیتر از بافر ترایزول اینویتروژن به بافت‌ها زده و پیپتاژ شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط زده شد و چند بار

به‌شدت تکان داده و به‌مدت ۱۵-۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. مخلوط حاصل در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد (در میکروسانتریفیوژ یخچال‌دار) با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ترکیب به‌صورت overnight در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد. در روز بعد محلول فوق به‌مدت ۴۰ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد (در میکروسانتریفیوژ یخچال‌دار) با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله‌ی آخر، رسوب در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر و به همراه پیپتاژ آهسته به‌طور کامل حل گردید و RNA در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. پس از ساخته شدن RNA برای اطمینان از کافی بودن غلظت RNA در تهیه cDNA، OD آن توسط دستگاه فتومتر وارسی شد. برای خواندن غلظت نمونه RNA به نسبت یک به ۵۰ با آب رقیق شد (۲ لاندا RNA و ۹۸ لاندار آب مقطر) و سپس کووت داخل فتومتر قرار داده شد و غلظت RNA (ng/µl) و OD آن خوانده شد که هر دو در محدوده‌ی یاد شده قرار داشتند (غلظت = ۲۱۶۰ ng/µl و OD=۱/۷۴). برای هر نمونه RNA یک reaction انجام گرفت. محصول ایجاد شده را بدون ورتکس کردن و به آرامی مخلوط کرده و سپس با برنامه زیر در دستگاه ترموسایکلر انکوبه شد:

- پنج دقیقه در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد
- ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد
- ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (مرحله‌ی ساخت cDNA به‌وسیله آنزیم RT)
- پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (جهت غیرفعال کردن آنزیم RT)

پس از اتمام مراحل ترموسایکلر ۲۸۰ میکرولیتر آب تزریقی به هر reaction اضافه شد و برای استفاده در QPCR در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

برای هر نمونه cDNA، یک reaction انجام گرفت. حجم نهایی هر میکروتیوب به ۲۵ µl رسید و نمونه‌ها برای نداشتن حباب در داخل خود بررسی شدند و درب میکروتیوب‌ها به‌خوبی بسته شد. نمونه‌ها به آرامی و بدون ورتکس مخلوط و در دستگاه Real Time PCR (Corbett) با برنامه‌ی زیر PCR شد:

۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (واسرشته شدن اولیه)

۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (واسرشته شدن)

۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (اتصال پرایمرها)

۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (گسترش)

واکنش از مرحله‌ی دوم به بعد، برای ۴۰ سیکل تکرار شد.

برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن مورد نظر از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ (۲ به توان منفی ΔΔct) استفاده شد.

جهت اندازه‌گیری دانسیته مویرگی عضله‌ی قلبی از روش ایمونوهیستوشیمی (فعالیت آلکالین فسفاتاز) استفاده شد. برای این منظور، لام‌ها پس از شارژ کردن در محلول پلی الیزین (Poly-E-lysin) به‌مدت سه دقیقه شست و شو و به‌طور کامل در آب مقطر حرکت داده شد. پس از بیرون آوردن و خارج شدن آب از لام‌های داخل رک، به‌مدت ۷۲ ساعت زمان نیاز است تا لام‌ها خشک شود. پس از خارج شدن لام‌ها در جعبه چیده و در این زمان لام‌ها شارژ شده می‌باشد.

عضله‌ی منجمد را که کمی از حالت انجماد در آمده بر روی قالب با چسب مخصوص چسبانده و در دستگاه فروزن سکشن با دمای منفی ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده و برش داده می‌شود. پس از آن نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در محلول متانول ثابت و بعد از آن به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول بافر سالین شست و شو داده شد. در مرحله‌ی بعد پس از خشک کردن اطراف نمونه‌ها به‌ترتیب ۵ دقیقه در آب اکسیژنه و آب مقطر قرار گرفت. ماده‌ی سوپر بلاک نیز به‌مدت ۵ دقیقه روی آن ریخته و آنتی بادی NCL-31 اضافه شد. همچنین محلول آلکالن فسفاتاز را نیز به‌مدت ۲ ساعت روی لام اضافه کرده و پس از آن به‌مدت ۵ دقیقه در محلول PBS شست و شو و به‌مدت ۲ ساعت در محلول پست پرایمری (محلولی که بعد از اولین آنتی ژن و آنتی بادی اضافه می‌شود) با حرکت دورانی به شیکر قرار گرفت. مجدداً محلول به‌مدت ۱۰ دقیقه با PBS (فسفات بافر سالین) شست و شو داده شد. در مرحله‌ی بعد محلول پلیمر ثانوی نیز به‌مدت ۲ ساعت روی

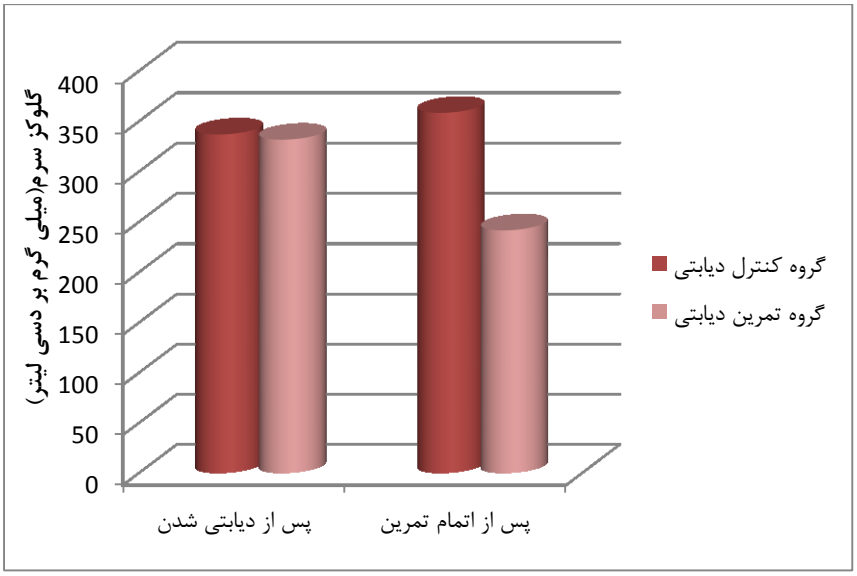
نمونه انکوبه شد. از دی‌ای بی کرموزن یک قطره به ۱۹ قطره از سوبسترا اضافه شد. پس از آن ۵ قطره محلول از ۲۰ قطره فوق را روی لام اضافه کرده به‌مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر شست و شو داده می‌شود. در مراحل آخر نمونه‌ها را به‌مدت ۳۰ ثانیه با رنگ زمینه‌ای هماتوکسیلین رنگ کرده و لام‌ها خشک و در هوای آزاد با چسب اینتلان مانت شد. در این مرحله لام‌ها جهت شمارش و بررسی آماده بود. تراکم مویرگی (Capillary density) به‌صورت تعداد در فیلد میکروسکوپی گزارش شد.

روش‌های آماری

با توجه به اهدف و فرضیه‌های پژوهش، ابتدا آمار توصیفی برای توصیف، طبقه‌بندی و تنظیم داده‌های خام متغیرهای پژوهش از طریق میانگین، انحراف استاندارد، رسم جداول و نمودارها استفاده شده است. در بخش تجزیه و تحلیل استنباطی، برای بررسی توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون کولموگروف- اسمیرنف، استفاده شد. سپس برای مقایسه‌ی اختلاف میانگین‌ها از آزمون تی مستقل استفاده گردید. تمامی عملیات آماری آزمون بر حسب اهداف ویژه‌ی پژوهش، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-23 انجام گردید و سطح معنی‌داری آزمون‌ها $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

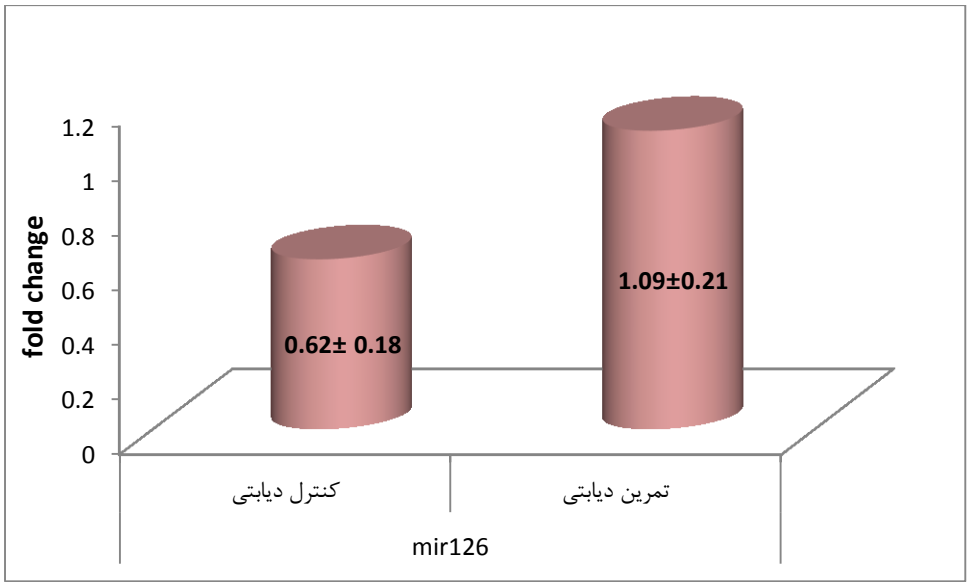
یافته‌ها

مقادیر گلوکز سرمی رت‌ها پس از القای دیابت و پس از ۸ هفته تمرین هوازی در شکل ۱ ارائه شده است. القای دیابت موجب افزایش معنی‌دار گلوکز سرمی در گروه‌های کنترل دیابتی و تمرین دیابتی گردید. هم‌چنین ۸ هفته تمرین هوازی موجب کاهش معنی‌دار گلوکز سرمی در گروه تمرین دیابتی شد ($P= ۰/۰۰۰۵$).



شکل ۱- تغییرات گلوکز سرمی (میلی‌گرم بر دسی لیتر) در گروه‌های مورد مطالعه پس از دیابتی شدن و پس از اتمام ۸ هفته تمرین هوازی

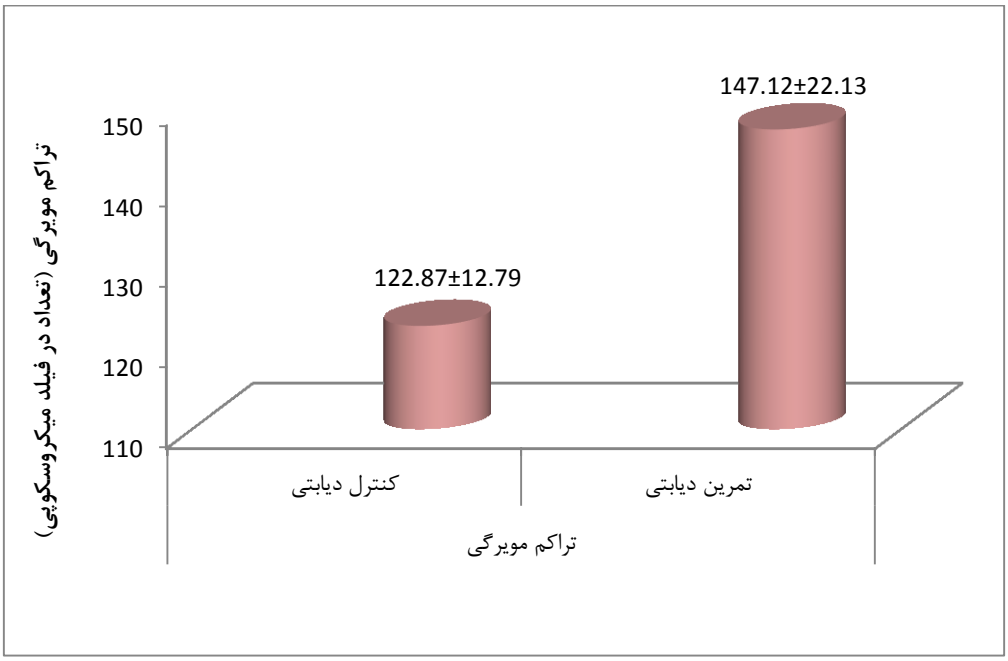
شکل ۲، میانگین مقادیر mir126 بافت قلبی در دو گروه کنترل دیابتی و تمرین دیابتی را نشان می‌دهد. تمرین هوازی باعث افزایش معنی‌دار بیان ژنی mir126 گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی شد. نتایج آزمون تی مستقل نشان داد، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مورد مطالعه وجود دارد ($t_{۱۴}= -۴/۶۷$، $P= ۰/۰۰$).



شکل۲- میانگین مقادیر بیان mir126 بافت قلبی گروه‌های مورد مطالعه پس از دوره تمرینی

تغییرات به‌صورت چند برابری (fold change) نسبت به گروه کنترل می‌باشد و واحد خاصی ندارد.

شکل ۳، میانگین مقادیر تراکم مویرگی عضله قلبی در دو گروه کنترل دیابتی و تمرین دیابتی را نشان می‌دهد. تمرین هوازی باعث افزایش معنی‌دار تراکم مویرگی عضله‌ی قلبی گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی شد. نتایج آزمون تی مستقل نشان داد، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مورد مطالعه وجود دارد ($t_{۱۴}$= -۲/۶۸، p= ۰/۰۱۸).



شکل۳- میانگین مقادیر تراکم مویرگی (بافت قلبی) گروه‌های مورد مطالعه پس از دوره تمرینی.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد، میزان بیان mir126 بافت قلبی در گروه تمرین دیابتی پس از ۸ هفته تمرین هوازی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. هر چند تا به حال، پژوهشی درباره تأثیر هم‌زمان دیابت و تمرین ورزشی بر میزان بیان mir126 گزارش نشده است، اما مطالعاتی چند، به‌طور مستقل اثرات تمرین ورزشی و دیابت را بر بیان mir126 مورد بررسی قرار داده‌اند. Ye و همکاران (۲۰۱۴)، در مطالعه‌ی خود نشان دادند که mir126 در سلول‌های تحت شرایط هایپوکسی در مقایسه با شرایط نورموکسی، کاهش معنی‌داری می‌یابد. هم‌چنین، بیان mir126 در بافت رتینای موش‌های دیابتی کاهش یافته بود. بیان پروتئین‌های VEGF و MMP-9 نیز در سلول‌های RF/6A تحت شرایط هایپوکسی افزایش یافته بود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد mir126 تحت شرایط هایپوکسی در هر دو وضعیت آزمایشگاهی و طبیعی، تنظیم منفی می‌شود و ممکن است رگ‌زایی ناشی از هایپوکسی را از راه به تعویق انداختن پیشرفت چرخه‌ی سلولی و مهار بیان VEGF و MMP-9 متوقف سازد [۲۵].

Zampetaki و همکاران (۲۰۱۰) نیز کاهش بیان mir126 پلاسمایی را در بیمارانی با دیابت نوع دو گزارش کردند. این محققان بیان کردند، mir126 به‌عنوان یک پیش‌بین دیابت ملیتوس عمل می‌کند [۲۶].

Yang و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه‌ی خود که از ۱۸۲ آزمودنی با اختلال تحمل گلوکز (IGT)، ۷۵ آزمودنی با اختلال در گلوگز ناشتایی (IFG)، ۱۶۰ بیمار با دیابت نوع دوم تازه تشخیص داده شده و ۱۳۸ فرد سالم استفاده کردند، به این نتیجه رسیدند mir126 سرمی در آزمودنی‌های IGT/IFG و بیماران دارای دیابت نوع دوم نسبت به آزمودنی‌های سالم به‌طور معنی‌داری کم‌تر بود. پس از ۶ ماه درمان (کنترل رژیم غذایی و فعالیت ورزشی در آزمودنی‌های IGT/IFG ، کنترل انسولین و رژیم غذایی و فعالیت ورزشی در بیماران دیابت نوع دوم)، mir126 سرمی به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. این نتایج، استفاده از mir126 سرمی را به‌عنوان یک شاخص برای شناسایی زود هنگام بیماران دیابتی و هم‌چنین تشخیص پاسخ‌های درمانی توصیه می‌کند [۲۷].

Yang liu و همکاران (۲۰۱۴) نیز در مطالعه‌ی خود به این نتیجه رسیدند که mir126 ادراری، در بیماران مبتلا به دیابت نوع دوم همراه با نفروپاتی دیابتی در حد معنی‌داری زیادتر بود. هم‌چنین، این محققان بیان کردند درمان دارویی و ورزش، mir126 ادراری را در بیماران دیابت نوع دوم همراه با نفروپاتی دیابتی کاهش داد. بنابراین، در کل این محققان بیان کردند mir126 در ادرار پایدار است و می‌تواند به‌عنوان یک شاخص نفروپاتی دیابتی و هم‌چنین نشانگر پاسخ درمانی مورد استفاده قرار گیرد [۲۸]. یکی از دلایل احتمالی این تناقض، می‌تواند وجود نفروپاتی دیابتی علاوه بر دیابت نوع دوم در آزمودنی‌های Yang و همکاران باشد. در حالی که در مطالعه پیش رو، وجود نفروپاتی دیابتی ثابت نشده است. دومین دلیل تناقض یافته‌های Yang و همکاران با مطالعه‌ی حاضر را می‌توان با نوع نمونه‌گیری مرتبط دانست. در مطالعه‌ی Yang، mir126 ادراری مورد بررسی قرار گرفته است، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر، mir126 در بافت قلبی بررسی شده است. با توجه به نتایج مطالعه‌ی Yang و همکاران، این احتمال وجود دارد که mir126 ادراری از سلول‌ها منشا می‌گیرد (به‌وسیله اگزوزوم‌ها ترشح می‌شود). هنگام ترک سلول‌ها، miRNA ها با مولکول‌های دیگر ارتباط پیدا کرده و بنابراین از تخریب آن‌ها جلوگیری می‌شود. احتمالاً، miRNA ها از سلول‌های آسیب دیده اپی تلیال کلیه یا سلول‌های آسیب دیده‌اندوتلیال عروق گلومرولی به داخل ادرار، نشت پیدا کند. بنابراین این موضوع می‌تواند میزان mir126 ادراری کم‌تر پس از درمان مؤثر را در مطالعه‌ی Yang و همکاران توصیف کند.

Chengli du و همکاران (۲۰۱۴)، مطالعه‌ای را با عنوان "mir126-3p متاستاز تومور و آنژیوژنز سرطان سلول کبدی را با هدف قرار دادن LRP6 و PI3KR2 مهار می‌کند" انجام دادند. در این مطالعه، محققان برای نخستین بار، تنظیم منفی بیان mir126-3p در سرطان سلول کبد نشان دادند و ارزیابی‌های عملکردی آن‌ها نشان داد mir126-3p نقش

حیاتی در فرایند آنتی متاستاز و آنتی آنژیوژنز در شرایط آزمایشگاهی بازی می‌کند. این محققان در نتایج خود عنوان کردند mir126-3p، متاستاز و آنژیوژنز را به‌ترتیب با هدف قرار دادن LRP6 و PI3KR2 مهار می‌کند. آن‌ها نشان دادند مقدار mir126-3p همبستگی معکوسی با LRP6و PI3KR2 در بافت‌های سرطانی سلول کبدی دارد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان بیان کرد مسیر mir126-PI3KR2-Akt می‌تواند به‌عنوان یک هدف درمانی محتمل، حداقل با توجه به آنژیوژنز عمل کند. Mir126 دو تنظیم کننده منفی مسیرVEGF را مستقیم سرکوب می‌کند. این دو مسیر عبارتند از: Sprouty-related protein 1 (Spred-1) که یک سرکوب کننده درون سلولی مسیر Ras/MAPK می‌باشد و زیر واحد تنظیمی ۲ فسفو اینوزیتول تری کیناز[1] (PIK3R2) که به‌صورت منفی فعالیت مسیر PIK3/Akt/eNOS را تنظیم می‌کند [۲۹]. فیش و همکاران (۲۰۰۸) نیز در مطالعه‌ی خود دریافتند فسفوریلاسیون ERK1/2 و AKT ناشی از VEGF در سلول‌هایی که mir126 در آن‌ها ناک اوت شده است، تضعیف می‌شود [۳۰].

در تناقض با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر Karolina و همکاران (۲۰۱۱) افزایش mir144, 192 و 29a را در خون تام بیماران دیابتی گزارش کردند، در حالی که هیچ تغییری در مقدار mir126 یافت نشد [۳۱]. دلیل تناقض یافته‌های این مطالعه با یافته‌های حاضر، ممکن است با نمونه‌های متفاوت اندازه‌گیری (خون در برابر بافت قلبی) و هم‌چنین نحوه‌ی دیابتی کردن آزمودنی‌ها (تزریق STZ به تنهایی در برابر مصرف غذای پُرچرب به همراه تزریق STZ در مطالعه‌ی حاضر) توجیه شود. اگرچه معلوم شده است تمرین ورزشی آنژیوژنز را از راه سازوکارهای گوناگونی افزایش می‌دهد، با وجود این، تنها یک مطالعه آثار تمرین هوازی را بر miRNA درگیر در آنژیوژنز (mir126) بررسی کرده است. در این راستا، Natan و همکاران (۲۰۱۲)، نقش تمرین هوازی شنا را بر بیان mir126 که با آنژیوژنز ارتباط دارد، مطالعه کرده‌اند. در این مطالعه موش‌های ماده‌ی ویستار در سه گروه دسته‌بندی شدند: بی‌تحرک (s)، تمرین ۱(t1 تمرین با حجم متوسط) و تمرین ۲(t2 تمرین با حجم بالا). T1 شامل تمرین شنا به‌مدت ۶۰ دقیقه در روز، ۵ جلسه در هفته به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۵٪ اضافه بار بدن بود. T2 دارای پروتکل مشابه با T1 تا هفته هشتم بود ولی در هفته نهم، دو جلسه در روز و در هفته دهم ۳ جلسه در روز تمرین انجام شد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد نسبت مویرگ تار قلبی در T1 (۵۸٪) و T2 (۱۰۱٪) نسبت به گروه بی‌تحرک افزایش یافت. بیان پروتئین VEGF ۴۲٪ در گروه T1 و ۱۰۸٪ در گروه T2 افزایش یافت. بیان mir126 قلبی، ۲۶٪ در گروه T1 و ۴۲٪ در گروه T2 در مقایسه با گروه بی‌تحرک افزایش نشان داد. مقدار پروتئین SPRED-1 که یکی از اهداف mir126 می‌باشد، ۴۱٪ در گروه T1 و ۳۹٪ در گروه T2 کاهش یافت. از سوی دیگر، بیان ژن PI3KR2، هدف دیگر mir126، ۳۹٪ در گروه T1 و ۷۸٪ در گروه T2 کاهش یافته بود و هم‌چنین افزایش در بیان پروتئین مؤلفه‌های مسیر پیام‌رسان PI3K/Akt/eNOS در گروه‌های تمرینی مشاهده شد. این مطالعه نشان داد، تمرین هوازی باعث افزایش بیان mir126 می‌شود و این امر می‌تواند با آنژیوژنز قلبی ناشی از فعالیت ورزشی از راه تنظیم غیرمستقیم مسیر VEGF و تنظیم مستقیم اهداف آن که با افزایش در مسیرهای آنژیوژنز مانند MAPK, PI3K/Akt/eNOS هم‌گرا می‌شود، مرتبط باشد [۱۹].

یافته‌ی دیگر مطالعه‌ی حاضر نشان داد، میزان تراکم مویرگی بافت قلبی در گروه تمرین دیابتی پس از ۸ هفته تمرین هوازی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. دیابت یکی از مهم‌ترین عوامل خطر قلبی–عروقی بوده که منجر به اختلال عملکرد اندوتلیوم، توسعه‌ی بیماری‌های عروقی و در نهایت افزایش مرگ و میر ناشی از این بیماری‌ها می‌شود [۴]. Abaci برای نخستین بار اعلام نمود که دیابت ملیتوس باعث کاهش معنی‌داری در رشد و توسعه‌ی عروق جانبی کرونر می‌شود [۷]. نتیجه‌ی کار پژوهشی Chou و همکاران (۲۰۰۲) که بر روی رت‌های مبتلا به دیابت انجام شده بود، نیز نشان داد که بیان عامل رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF) که یک شاخص کلیدی در فرآیند آنژیوژنز است در عضله‌ی میوکارد این حیوانات در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری داشت [۳۲]. اثر تمرینات استقامتی بر تراکم مویرگی در مطالعات بسیاری بررسی شده که تغییرات آن در حیوانات و افراد

[1]Phosphoinositol-3 kinase regulatory subunit 2

دیابتی با نتایج متفاوت (کاهش یا افزایش میزان تراکم مویرگی) گزارش شده است [۳۳]. موافق با نتایج پژوهش حاضر، آدلوفسون در مطالعه‌ای بر نقش تمرین هوازی در افزایش تراکم مویرگی اشاره کرده است [۳۴].

مطالعه‌ی Lemitsu و همکاران نیز نشان داد که تمرین هوازی شنا به‌مدت ۸ هفته، باعث افزایش دانسیته‌ی مویرگی عضله‌ی قلبی در رت‌های مسن می‌شود. همچنین اثرات یک برنامه‌ی تمرینی استقامتی بر تراکم مویرگی بررسی شده که نتایج آن نشان داد، تراکم مویرگی به‌طور معنی‌داری افزایش داشته است [۳۵] که نتایج به‌دست آمده، همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر است. همسویی نتایج مطالعات مذکور با مطالعه‌ی حاضر، احتمالاً ناشی از کافی بودن شدت و مدت تمرین بوده که برنامه‌ی تمرینی استفاده شده توانسته است، کشش مورد نیاز و استرس فرسایشی[1] را برای تولید رگ ایجاد کند که احتمالاً می‌تواند در افزایش تعداد سلول‌های اندوتلیال نیز مؤثر واقع شده باشد. مطالعات انجام گرفته بر روی انسان نیز حاکی از آن است که تمرین مقاومتی (سه بار در هفته؛ سه ست با ۱۰ تکرار بیشینه) توانسته است، باعث ایجاد رگ‌زایی شود.

در مقابل، نتایج مطالعات Lloyd (۲۰۰۱) و Shekarchizadeh و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که یک جلسه تمرین یک ساعته بر روی نوارگردان با سرعت ۱۸ متر بر دقیقه و شیب ۱۰ درصد، نتوانست میزان آنژیوژنز را افزایش دهد. آن‌ها پیشنهاد کردند که تکرار دوره‌ای تمرین در طی هفته‌های بیشتر، می‌تواند تراکم مویرگی را در عضله‌ی اسکلتی بالا ببرد. این محققین عدم تغییر در تراکم مویرگی و نسبت آن به فیبر را کافی نبودن مدت زمان و شدت تمرین پیش‌بینی کردند [۳۶، ۱۳]، که این نتایج با یافته‌های پژوهش ما در تضاد است. برنامه‌ی تمرینی استفاده شده در مطالعه‌ی حاضر (با شدت بالا) توانسته است، بافت عضله‌ی قلبی موش‌های دیابتی را تحت تأثیر قرار داده و تراکم مویرگی را افزایش دهد که دلیل این تغییرات می‌تواند ناشی از عدم تعادل بین تحریک کننده‌ها و بازدارنده‌های آنژیوژنز (تنظیم مثبت عوامل آنژیوژنیک) در اثر تمرین باشد. در مطالعه‌ی Jensen و همکاران (۲۰۰۴)، نتایج نشانگر این بود که تمرین استقامتی تراکم مویرگی را در طول چهار هفته افزایش می‌دهد در حالی که هیچ افزایشی پس از هفت هفته تمرین مشاهده نشد [۳۷]. این نتایج نیز با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر متناقض است. به‌نظر می‌رسد شدت بالاتر تمرین در مطالعه‌ی حاضر، دلیل احتمالی تفاوت با مطالعه‌ی Jensen و همکاران باشد. از علل احتمالی مطرح شده در توجیه افزایش تراکم مویرگی در اثر تمرین استقامتی در حیوانات دیابتی، می‌توان به افزایش بیان عوامل آنژیوژنیک از قبیل VEGF و تغییرات در تعادل عوامل رشد (افزایش نسبت عوامل پروآنژیوژنیک به آنتی آنژیوژنیک) اشاره کرد [۳۸].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر، به‌نظر می‌رسد تمرین هوازی می‌تواند از طریق مسیر VEGF/ mir126/PI3KR2 باعث بهبود بیماران دیابتی گردد. یافته‌های مطالعه‌ی حاضر که نشان دهنده‌ی توسعه‌ی آنژیوژنز توسط تمرین هوازی در شرایط دیابتی می‌باشد، می‌توان بیان کرد تمرین هوازی به‌عنوان یک درمان غیردارویی برای بهبود خون‌رسانی قلب می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. یافته‌های به‌دست آمده، دانش ما را در مورد سازوکارهای آنژیوژنز در دیابت و تمرین هوازی افزایش داده و نشان می‌دهد mir126 و مسیر مرتبط با آن (PI3K/Akt/eNOS) یک هدف درمانی احتمالی برای شرایط پاتولوژیکی درگیر در آنژیوزنز می‌باشد. برای نتیجه‌گیری بهتر در خصوص نقش تمرین هوازی بر بیان ژن mir126 و تأثیر آن بر توسعه‌ی آنژیوژنز قلبی در شرایط دیابتی، توصیه می‌شود عوامل پایین دستی مرتبط با mir126 در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرند.

**پژوهش حاضر، مستخرج از رساله دکتری به کد شناسایی ۱۰۲۱۴۰۴۹۴۱۰۱۶ مصوب گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی می‌باشد.

[1] Shear stress

مآخذ

1. Raffort J, Hinault C, Dumortier O, Obberghen EV. Circulating microRNAs and diabetes: potential applications in medical practice. *Diabetologia* 2015; 58:1978–1992.
2. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diab Res Clin Prac* 2011; 94:311–321.
3. Kantharidis p, Bo Wang, Rosemarie M. Carew, Hui Yao Lan. Diabetes Complications: The MicroRNA Perspective. *Diabetes* 2011; 60: 1832-1837.
4. Salehi E, Khazaei M, Rashidi B, Haghjooye Javanmard Sh. Effect of Rosiglitazone on Coronary Angiogenesis in Diabetic and Control Rats. *Journal of Isfahan Medical School* 2011; 29:134.
5. Boodhwani M, Sodha NR, Mieno S, Xu SH, Feng J, Ramlawi B, et al. Functional, cellular, and molecular characterization of the angiogenic response to chronic myocardial ischemia in diabetes. *Circulation* 2007; 116(11 Suppl): I31-I37.
6. Kivela R, Silvennoinen M, Lehti M, Jalava S, Vihko V, Kainulainen H. Exercise-induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle and in capillaries of healthyand diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 2008; 7: 13.
7. Abac A, Oğuzhan A, Kahraman S, Eryol NK, Ünal Ş, Arınç H, et al. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation* 1999; 99(17): 2239-42.
8. 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.
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. Khazaei M, Fallahzadeh A, Sharifi M, Afsharmoghaddam N, HaghjooJavanmardSh, Salehi E. Effects of diabetes on myocardial capillary density and serum biomarkers of angiogenesis in male rats. *Clinics*. 2011; 66(8):1419-1424.
11. Kivela R, Silvennoinen M, Lehti M, Jalava S, Vihko V, Kainulainen H. Exercise-induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle and in capillaries of healthyand diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 2008; 7: 13.
12. Fernandes T, Fla´vio C, Magalha˜es, Fernanda R, Roque M. Ian Phillips, Edilamar M. Oliveira. Exercise Training Prevents the Microvascular Rarefaction in Hypertension Balancing Angiogenic and Apoptotic Factors Role of MicroRNAs-16, -21, and -126, *Hypertension* 2012; 59:513-520.
13. Shekarchizadeh P, Khazaei M, Gharakhanlou R, Karimian J, Safarzadeh AR. The effects of resistance training on plasma angiogenic factors in normal rats. *J Isfahan Med Sch* 2012; 30: 65-73. (Farsi).
14. Shafiee A, Kordi MR, Gaeini AA, Soleimani M, Nekouei A, Hadidi V.The effect of eight week of high intensity interval training on expression of mir-210 and ephrinA3 mrna in soleus muscle healthy male rats. *Arak Medical University Journal* (*AMUJ*) 2014; 17(84): 26-34.
15. Küçükali CI; Kürtüncü M; Coban A; Cebi M; Tüzün E. Epigenetics of multiple sclerosis: An updated review. *Neuromol Med* 2014.
16. Yang Liu, Guangqiang Gao, Chun Yang, Kun Zhou, Baozhong Shen, Hongyan Liang, and Xiaofeng Jiang. The Role of Circulating MicroRNA-126 miR-126): A Novel Biomarker for Screening Prediabetes and Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *In J Mol Sci* 2014; 15, 10567-10577.
17. Fanzhen Hong, Yuyang Li and Yongping Xu. Decreased placental miR-126 expression and vascular endothelial growth factor levels in patients with pre-eclampsia. *Journal of International Medical Research* 2014; 42(6) 1243–1251.
18. Winbanks CE, Ooi JY, Nguyen SS, McMullen JR, Bernardo BC. McMullenand Bianca C. Bernardo. MicroRNAs differentially regulated in cardiac and skeletal muscle in health and disease: Potential drug targets?. *Proceedings of the Australian Physiological Society* 2014; 45:1-13.
19. DA Silva Junior ND, Fernandes T, Soci UP, Monteiro AWA, Phillips MI, Oliveira EM. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Medicine and science in sports and exercise* 2012; 44(8):1453-1462.
20. Rawal S, Manning P and Katare R. Cardiovascular microRNAs: as modulators and diagnostic biomarkers of diabetic heart disease. *Cardiovascular Diabetology* 2014, 13:44.
21. Nikoii R, Rajabi H, Gharakhanlou R, Atabi F, Omidfar K. The effect of endurance training on mitochondrial and sarcollema lactat transporters in skeletal and cardiac muscles in

diabetic rats. *Iran J Diabetes Lipid Disord* 2012; 11: 223-236.
22. Thomas C, Perrey S, Lambert K, Hugon G, Mornet D, Mercier J. Monocarboxylate transporters, blood lactate removal after supramaximal exercise, and fatigue indexes in humans. *Journal of Applied Physiology* 2005; 98(3):804-9.
23. Osborn BA, Daar JT, Laddaga RA, Romano FD, Paulson DJ. Exercise training increases sarcolemmal GLUT-4 protein and mRNA content in diabetic heart. *Journal of Applied Physiology* 1997; 82:828-34.
24. leosco D, Rengo G, laccarino G. exercise promotes angiogenesis and improves b-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovascular Research* 2008; 78(2): 385-94.
25. Ye P, Liu J, He F, Xu W, Yao K. Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression. *International Journal of Medical Sciences* 2014; 11(1):17.
26. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010; 107:810-7.
27. Yang L, Guangqiang G, Chun Y, Kun Z, Baozhong S, Hongyan L, et al. The Role of Circulating MicroRNA-126 (miR-126): A Novel Biomarker for Screening Prediabetes and Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 2014; 15:10567-77.
28. Liu Y, Gao G, Yang C, Zhou K, Shen B, Liang H, et al. Stability of miR-126 in Urine and Its Potential as a Biomarker for Renal Endothelial Injury with Diabetic Nephropathy. *International journal of endocrinology* 2014; 393109, 6 pages.
29. Chengli D, Zhen L, Linping C, Chaofeng D, Owusu-ansah, Haiyang X, et al. MiR-126-3p suppresses tumor metastasis and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by targeting LRP6 and PIK3R2. *Journal of Translational Medicine* 2014; 12(259):258-99.
30. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh R-F, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Developmental cell* 2008; 15(2):272-84.
31. Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2011; 6(8):e22839.
32. 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.
33. Prior BM, Yang H, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl* Physiol 2004; 97: 1119-1128.
34. Adolfsson J, Ljungqvist A, Tornling G, Unge G. Capillary increase in the skeletal muscle of trained young and adult rats. *J Physiol* 1981; 310: 529-532.
35. Andersen P, Henriksson J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *J Physiol* 1977; 270: 677-690.
36. Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL. Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circu Physiol* 2001; 281: H2528-H2538.
37. Jensen L, Bangsbo J, Hellsten Y. Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. *J physiol* 2004; 557: 571-582.
38. Salehi E, Amjadi F, Khazaei M. Angiogenesis in health and disease: role of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Isfahan Med Sch* 2011; 29: 312-326.

THE EFFECT OF EIGHT WEEKS OF AEROBIC TRAINING ON THE EXPRESSION OF MIR-126 AND CAPILLARY DENSITY IN THE CARDIAC TISSUE OF DIABETIC MALE RATS

Mir hojat Mousavi nezhad[1], Hoseein Matin Homaee[1*], Mohammad ali Azarbaijani[1], Maqsood Piri[1]

1. *Department of Sport physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

ABSTRACT

Background: Exercise training is identified as a beneficial component of diabetes treatment plan. Angiogenesis process in diabetics can be affected by exercise activity. The purpose of this study is to determine the effect of aerobic exercise on the expression of mir-126 and capillary density in the cardiac tissue of diabetic rats.
Methods: Twenty diabetic male Wistar rats (mean weight, 191.9±10.85) were divided into two groups of control (n=10) and training (n=10) and the groups were matched based on weight. 48 hours after the last training session, cardiac tissue samples were taken after an overnight fast. Mir-126 expression was used through Real Time PCR. Also, immunohistochemistry (alkaline phosphatase activity) was used to measure the cardiac muscle capillary density.
Results: Independent t-test showed that the 8-week aerobic training significantly increased the expression of mir-126(p=0.001) and capillary density (p=0.018) of cardiac tissue in the exercise group compared to the control group.
Conclusion: The results of this study indicate that the development of angiogenesis by aerobic exercise in diabetic conditions; can be expressed as a non-drug treatments for aerobic exercise and can be used to improve heart perfusion.

Keywords: aerobic exercise, capillary density, mir-126, Type 2 diabetes.

[*] Tehran, Sanat Square, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Dept. of Sport physiology, Tel: 09149642132,Email: mhmousavi@yahoo.com