

مقایسه‌ی اثر هشت هفته تمرین تداومی متوسط و تناوبی شدید بر آنژیوژنز قلب موش های نر دیابتی نژاد ویستار

فرشته شهیدی^۱، فرامرز یزدانی^{۱*}، عباسعلی گائینی^۲، پوران کریمی^۳

چکیده

مقدمه: کاردیومیوپاتی دیابتی اولین عامل مرگ و میر بیماران دیابتی است و آنژیوژنز مهم‌ترین سازوکار احیاء جریان خون قلب در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک است. هدف از مطالعه‌ی حاضر، مقایسه تأثیر هشت هفته تمرین تداومی متوسط و تناوبی شدید بر آنژیوژنز قلب موش‌های نر دیابتی نژاد ویستار است.

روش‌ها: تعداد ۳۲ سر رت نژاد ویستار به صورت تصادفی در ۴ گروه سالم بدون تمرین، دیابتی بدون تمرین، دیابتی + تمرین تداومی متوسط و دیابتی + تمرین تناوبی شدید قرار گرفتند. دو نوع تمرین از نظر کالری مصرفی یکسان سازی شد و شدت تمرین براساس حداکثر اکسیژن مصرفی و ۵ روز در هفته تعیین گردید. عوامل پروآنژیوژنیک ($VEGF$, MMP_2 , $TGF\beta_1$) و آنتی آنژیوژنیک ($TIMP_2$) از بافت بطن چپ قلب رت بعد از ۸ ساعت از آخرین جلسه تمرینی برداشت شد. برای ارزیابی میزان سنتز پروتئین‌های درگیر در مسیر آنژیوژنیک از روش وسترن بلات استفاده شد. داده‌ها با روش آماری تحلیل واریانس یکراهه با اندازه‌گیری‌های مکرر اندازه‌گیری شد ($P < 0/05$).

یافته‌ها: نتایج نشان داد که سطح عوامل پروآنژیوژنیک $VEGF$, MMP_2 , $TGF\beta_1$ به طور معنی‌داری افزایش داشت ولی عامل آنتی آنژیوژنیک $TIMP_2$ کاهش یافت ($P < 0/05$). علاوه بر آن سطح حداکثر اکسیژن مصرفی در هر دو گروه تمرینی تداومی و تناوبی افزایش معنی‌داری نشان داد ($P = 0/000$).

نتیجه‌گیری: تمرین تداومی متوسط و تناوبی شدید سبب افزایش فاکتورهای آنژیوژنیک و کاهش عامل آنتی آنژیوژنیک در بافت قلب رت‌های نژاد ویستار دیابتی می‌شود که راهکاری مناسبی برای کاهش میزان مرگ و میر ناشی از قلب دیابتی است.

واژگان کلیدی: آنژیوژنز، دیابت، عضله‌ی قلب، تمرین تداومی متوسط، تمرین تناوبی شدید

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- گروه پزشکی، دانشکده‌ی علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

***نشانی:** تهران، لویزان، بزرگراه شعبانلو، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی، تلفن:

۰۹۱۴۹۹۹۹۰۵۹، نمایر ۰۰۴۱۳۶۵۶۴۵۶۲، پست الکترونیک: Yaziferi@gmail.com

مقدمه

دیابت نوع دو یک اختلال متابولیکی است که به دلیل قند خون بالا در اثر ترشح ناکافی انسولین و مقاومت به انسولین به وجود می‌آید. عامل اصلی شیوع دیابت نوع دوم، مقاومت به انسولین است که سبب کاهش پاسخ بافت‌های محیطی به عملکرد انسولین می‌شود [۱]. دیابت از عوامل خطر شناخته شده بیماری‌های قلبی عروقی است که می‌تواند موجب مرگ زودرس یا ناتوانی گردد، عوارض عروقی دیابت می‌تواند به صورت میکرو و ماکروواسکولر باشد. که منجر به ایجاد بیماری‌های عروقی (میکروآنژیوپاتی دیابتی^۱) در عروق مرکزی و محیطی در اندام‌های حیاتی مانند قلب می‌شود و باعث از بین رفتن جریان خون خواهد شد [۲]. آنژیوزنز^۲ به معنی شکل‌گیری مویرگ جدید از مویرگ‌های قبلی است که برای احیاء جریان خون بافت حیاتی است، آنژیوزنز فرایند پیچیده‌ای است که مستلزم فراهم شدن فاکتورهای پروآنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک مختلف است و تعادل بین این عوامل زمینه را به سوی رگ‌زایی یا مهار رگ‌زایی پیش می‌برد [۳]. دیابت از نظر آنژیوزنری بیماری متناقضی است یعنی از یک طرف سبب آنژیوزنز پاتولوژیک در کلیه و چشم (نفروپاتی، رتینوپاتی) شده، از طرفی، سبب مهار رگ‌زایی در عروق کرونر می‌شود [۴]. در فرآیند آنژیوزنز فاکتورهای آنژیوژنیک پس از اتصال به گیرنده‌هایشان که روی سلول‌های اندوتلیال قرار دارد موجب فعال شدن این سلول‌ها می‌شوند با شروع فعالیت سلول‌های اندوتلیال، انواع خاصی از متالوپروتئینازها از سلول‌های فوق ترشح می‌شوند و غشای پایه را در منطقه‌ی مذکور تجزیه می‌کنند. بعد از هضم غشای پایه، سلول‌های اندوتلیال اقدام به مهاجرت و تکثیر می‌نماید [۵]. خانواده‌ی ماتریکس متالوپروتئینازها^۳ آنزیم‌های دارای فعالیت پروتئولیتیکی هستند که اتصالات خارج سلولی و بافت پایه‌ی نگه دارنده سلول‌ها را هضم می‌کنند. از این رو این آنزیم‌ها می‌توانند بر عملکرد سلول‌های اندوتلیال در مراحل مختلف آنژیوزنز و تسریع این مراحل تأثیرگذار باشند [۶]. عوامل آنژیوژنیک عمده‌ای شناسایی شده‌اند که از میان آنها عامل رشد اندوتلیال عروقی

به عنوان قوی‌ترین میتوزن مخصوص سلول‌های اندوتلیال شناخته شده است. عامل رشد اندوتلیال عروقی یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های اختصاصی رگ‌زایی است [۷]. پروتئین VEGF سبب گشاد شدن رگ‌ها، ممانعت از انباشت پلاکت‌ها و لکوسیت‌ها در دیواره‌ی اندوتلیالی می‌شود. VEGF تکثیر و تمایز سلول‌های اندوتلیال را تحریک می‌کند، نفوذپذیری عروقی را افزایش می‌دهد، از آپوپتوز^۵ (مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلول) سلول‌های اندوتلیال جلوگیری کرده و اتساع رگ‌های خونی را تنظیم می‌کند [۸]. عامل رشد اندوتلیال عروقی، عمل زیستی خود را از طریق میان‌کنش با گیرنده‌های تیروزین‌کینازی موجود در غشای پلاسمایی سلول، در روی سلول‌های هدف به انجام می‌رساند. این گیرنده‌ها پس از اتصال به لیگاند مخصوص خود، به صورت دایمر درآمده و اتوفسفریله می‌شوند که در نهایت این وضعیت خود منجر به ایجاد وقایع آبخاری درون سلولی می‌شود [۹]. فعالیت فیزیولوژیکی همچون تمرینات ورزشی با شدت مناسب می‌تواند موجب تحریک آنژیوزنز برای از بین بردن ضایعات متابولیکی ناشی از بیماری‌ها به منظور حفظ وضعیت پایدار سلولی شود و باعث افزایش چگالی مویرگی در عضله‌ی اسکلتی و عضله‌ی قلبی شود [۵]. فعالیت‌های ورزشی توانایی تنظیم عوامل آنژیوژنیک را دارند تا بدین ترتیب از به وجود آمدن شرایط پاتولوژیکی مانند آترواسکلروز جلوگیری کنند، اما هنوز سازوکار مولکولی شروع فرآیند توسعه‌ی شبکه‌ی مویرگی در پاسخ به تمرینات ورزشی به خوبی شناخته نشده است [۱۰]. Valeska و همکاران (۲۰۱۸) گزارش نمودند که ۸ هفته مداخله‌ی تمرین دوچرخه‌سواری با دو شدت متوسط و تناوبی باعث افزایش عوامل آنژیوژنیک در مقایسه با حالت استراحتی می‌گردد. چنین به نظر می‌رسد که تمرینات HIIT^۶ (تمرینات تناوبی شدید) در راستای بهبود و تعدیل جریان خون کرونر بسیار مؤثرتر از تمرینات MICT^۷ (تمرینات مداوم با شدت متوسط) در مدل‌های دیابتی باشد [۱۱]. لذا، تحقیق پیش‌رو با توجه به وجود یافته‌های متناقض [۷] در ارتباط با تأثیر دیابت بر شاخص‌های آنژیوژنیک و همچنین وجود مطالعات

⁴ Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF

⁵ Apoptosis

⁶ High Intensity Interval Training

⁷ Moderate Intensity Continuous Training

¹ Diabetic microangiopathy

² Angiogenesis

³ Matrix Metalloproteinase; MMP

اندک در ارتباط با آثار آن با هدف مقایسه‌ی اثر هشت هفته تمرین تناوبی متوسط و تناوبی شدید بر آنژیوژنز قلب موش های نر دیابتی نژاد ویستار انجام شد.

روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع مطالعات تجربی در قالب یک طرح پس‌آزمون با گروه کنترل بوده که با استفاده از چهار گروه ۸ سری از موش‌ها براساس مقررات نحوه‌ی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. برای این منظور، تعداد ۳۲ سر موش‌های صحرایی نر سفید نژاد ویستار به روش در دسترس از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با سن حدود ۳ ماه و در محدوده‌ی وزنی 180 ± 20 گرم تهیه و در آزمایشگاه حیوانی دانشگاه علوم پزشکی تبریز نگهداری شد. به‌منظور ایجاد حالت سازش با محیط، جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیایی، شرایط تمامی مداخلات پس از گذشت دست کم دو هفته استقرار حیوانات و آغاز چرخه‌ی شبانه (ساعت ۱۹:۰۰) در آزمایشگاه حیوانات انجام گردید. به‌طوری‌که آزمودنی‌ها در محیط آزمایشگاهی ویژه‌ی حیوانات به‌صورت ۳ تا ۴ عدد موش در هر قفس از جنس پلی‌کربنات شفاف با قابلیت اتوکلاو قرار داده شدند. در طی این دوره، تمامی حیوانات به‌صورت آزادانه به آب و غذای استاندارد حیوانی (پلت تهیه شده از شرکت خوراک‌سازان اصفهان) به‌مدت دو ماه و دو هفته دسترسی داشتند که این میزان غذای مصرفی به‌صورت دقیق اندازه‌گیری و ثبت گردید. سپس نمونه‌ها (به غیر از گروه‌های کنترل سالم بدون تمرین و دیابتی بدون تمرین) به‌مدت ۷ روز تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. طی دوره‌ی آشنایی، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۵-۱۰ متر در دقیقه و مدت تمرین نیز ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، آزمودنی‌ها پس از مطابقت وزنی به‌طور تصادفی ساده در یکی از ۴ گروه ۸ سری قرار گرفتند. به‌علاوه، در این تحقیق از آن دسته موش‌های صحرایی استفاده گردید که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری، میزان گلوکز سرم آنها بالاتر یا مساوی ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود. فرآیند کلی کار در کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تبریز به تصویب رسید.

درضمن، کلیه‌ی مراحل تیمار موش‌های صحرایی و آزمایش‌های تجربی نیز در محل آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام گردید.

روش القاء دیابت

پس از دو هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، برای القای دیابت نوع دو، طبق روش گروه مطالعاتی Srinivasan و همکاران (۲۰۰۵)، دو هفته مصرف غذای پُرچرب (۵۸٪ چربی، ۲۵٪ پروتئین و ۱۷٪ کربوهیدرات) که توسط محققان و با همکاری شرکت خوراک‌سازان اصفهان تهیه شد و سپس تزریق درون صفاقی^۱ سم استرپتوزتوسین^۲ (شرکت سیگما آلدریچ^۳، آمریکا) در یک دوز ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار (PH=۴/۵) بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی به‌صورت تک وهله‌ای اعمال گردید [۱۲]. برای گروه کنترل سالم (بدون تمرین) نیز همان مقدار سرم فیزیولوژیک (سالین)^۴ برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان و استرس ناشی از تزریق با گروه‌های تمرینی تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از روش دیابتی کردن، میزان گلوکز نمونه خونی از ورید دمی حیوان جمع‌آوری و با استفاده از روش آنزیمی گلوکز اُکسیداز بررسی و غلظت گلوکز ≥ 250 میلی‌گرم در دسی‌لیتر به‌عنوان موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو (در این نوع دیابت بدن آزمودنی به میزان کافی انسولین تولید می‌کند ولی کاهش در پاسخ بافت‌های محیطی به انسولین مشاهده می‌شود) وارد تحقیق شدند. به‌منظور کنترل وزن، موش‌های صحرایی در ابتدا و انتهای تحقیق توسط ترازوی دیجیتال با دقت (۰/۰۰۲) اندازه‌گیری شد. روش تمرینی دو گروه تمرینی تحقیق حاضر برگرفته از مطالعه‌ی Kailu و همکاران (۲۰۱۵) بود که در آن کالری تمرینی در هر دو نوع تمرین یکسان بود، آزمودنی‌ها برای ۵ روز در هفته (شنبه، یکشنبه، سه‌شنبه، چهارشنبه و پنج‌شنبه) برای مدت ۸ هفته در یک برنامه‌ی تمرین تناوبی شدید و تناوبی متوسط را اجرا کردند [۱۳] و شروع فعالیت حیوانات در محدوده‌ی ساعت ۱۰-۱۳ بر روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت تکنوازا بود. قبل از

1. Intraperitoneal Injection

2. Streptozotocin

3. Sigma-Aldrich

4. Saline

گروه کنترل سالم که در هیچ‌گونه برنامه‌ی فعالیتی شرکت نمی‌کرد، برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با سایر گروه‌های تمرینی، ۵ روز در هفته به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوارگردان بی‌حرکت قرار داده شد. درضمن، به‌منظور تحریک موش‌ها برای دویدن از محرک الکتریکی با ولتاژ کم تعبیه شده در قسمت عقبی نوارگردان، استفاده شد که برای ادامه مناسب بود.

اجرای پروتکل، آزمون رسیدن به واماندگی برای محاسبه‌ی بیشینه سرعت موش‌ها انجام گرفت [۱۵]. به‌طوری‌که، سرعت دویدن با ۱۰ متر بر دقیقه شروع و در هر دو دقیقه یکبار، سرعتی معادل با سه متر بر دقیقه به آن تا زمان رسیدن به حالت واماندگی افزوده شد. زمان رسیدن به خستگی نیز با عدم توانایی موش‌ها در دویدن روی نوارگردان باوجود ایجاد شوک الکتریکی مشخص شد. روش تمرین HIIT (جدول ۱) و تمرین تناوبی متوسط (جدول ۲) بیان شده است. همچنین،

جدول ۱- زمان‌بندی تمرینات تناوبی شدید موش‌ها

هفته	تکرارهای دویدن ۲ دقیقه‌ای	سرعت دویدن (m.min)	شیب نوارگردان (%)	زمان اولیه غیرفعال (m.min)	سرعت برگشت به حالت
اول	۶	max speed ۹۰-۸۵٪	۰	۳۰	۱
دوم	۷	max speed ۹۰-۸۵٪	۰	۳۲	۱
سوم	۸	max speed ۹۰-۸۵٪	۰	۳۵	۱
چهارم	۹	max speed ۹۰-۸۵٪	۰	۳۷	۱
پنجم	۱۰	max speed ۹۰-۸۵٪	۰	۴۰	۱
ششم	۱۱	max speed ۹۰-۸۵٪	۰	۴۲	۱
هفتم	۱۲	max speed ۹۰-۸۵٪	۰	۴۵	۱
هشتم	۱۳	max speed ۹۰-۸۵٪	۰	۵۰	۱

جدول ۲- زمان‌بندی تمرینات تناوبی متوسط موش‌ها

هفته	مدت تمرین (دقیقه)	سرعت دویدن (m.min)	شیب نوارگردان (%)	سرعت برگشت به حالت اولیه غیرفعال (m.min)
اول	۱۰	max speed ۵۵-۵۰٪	۰	۵
دوم	۱۵	max speed ۵۵-۵۰٪	۰	۵
سوم	۲۲	max speed ۵۵-۵۰٪	۰	۵
چهارم	۳۰	max speed ۵۵-۵۰٪	۰	۵
پنجم	۳۶	max speed ۵۵-۵۰٪	۰	۵
ششم	۴۲	max speed ۵۵-۵۰٪	۰	۵
هفتم	۴۸	max speed ۵۵-۵۰٪	۰	۵
هشتم	۵۰	max speed ۵۵-۵۰٪	۰	۵

بدون درد توسط محقق بیهوش و جراحی شدند. سپس بخشی از بافت قسمت آپکس بطن چپ آزمودنی‌ها با دقت برداشته شده و پس از شستشو با سرم نرمال سالین در نیتروژن مایع

تمامی موش‌های صحرایی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرینی و پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، با تزریق داخل صفاقی کتامین (۹۰ mg.kg⁻¹) و زایلازین (۱۰ mg.kg⁻¹) به روش

سانتیمتر برداشته و پس از شماره‌گذاری به روی لام منتقل شدند. به دنبال آن مقاطع مربوط به هر نمونه با رنگ آمیزی‌های اختصاصی ماسون تریکروم آبی پرئودتیک اسید شیف رنگ آمیزی شدند [۱۴]. توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف بررسی گردید. پس از تأیید توزیع طبیعی داده‌ها و باتوجه به هدف تحقیق، نخست پیش فرض تحقیق مبنی بر تفاوت معنی‌دار گروه‌های تجربی با گروه کنترل با استفاده از آزمون تی وابسته زوجی بررسی و سپس اثرات جداگانه و هم‌زمان متغیرهای مستقل تمرین روی متغیرهای وابسته در قالب یک طرح آماری تحلیل واریانس یکراهه با اندازه‌گیری‌های مکرر انجام شد و برای مقایسه‌ی تفاوت بین گروهی از آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید. تمامی عملیات آماری در سطح معنی‌داری برابر و کمتر از ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS22 تحت ویندوز انجام شد. نمودارها و جداول نیز با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردیدند.

یافته‌ها

مقادیر پیش‌آزمون و پس‌آزمون وزن موش‌های صحرائی و همچنین شاخص‌های آنژیوژنیک گروه‌های چهارگانه تحقیق در شکل‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. نتایج آزمون کلموگروف-اسمیرنوف^۸ نشان داد توزیع عامل رشد اندوتلیال عروق، ماتریکس متالوپروتئیناز^۲، عامل تبدیل رشد بتا و مهارکننده‌ی متالوپروتئیناز^۲ در گروه‌های تحقیق طبیعی بود. وزن موش‌های صحرائی گروه تمرین تداومی و تناوبی در پس‌آزمون به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل سالم و دیابتی کاهش یافت (جدول ۳).

(-196°C) منجمد^۱ و در دمای (-80°C) نگه‌داری شد. در ادامه نیز برای ارزیابی میزان سنتز پروتئین درگیر در مسیر آنژیوژن یعنی VEGF, MMP2, TGF β 1, TIMP2 از روش وسترن بلات استفاده شد. ابتدا، برای تهیه‌ی هموزنه ۱۰٪ وزنی حجم بافت قلب از بافر رپا (شرکت سیگما) حاوی مهارکننده‌ی پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده شد. غلظت تام پروتئین با روش برآدفورد^۲ (سیگما) اندازه‌گیری شد. سپس پروتئین مورد نظر در ژل ۱۰ درصد دناتوره کننده‌ی پلی‌آکریل‌آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS)^۳ با دستگاه الکتروفورز (شرکت Bio Rad، آمریکا) تفکیک گردید. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی غشاء پلی وینیلیدین دی فلوراید (PVDF)^۴ سیگما منتقل شد. بعد از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشاء از آنتی بادی اولیه خرگوشی ضد پروتئین‌های مورد نظر ساخت شرکت سانتاکروز^۵ آمریکا با گُد sc-398822 به نسبت ۱ به ۵۰۰ (در طول شب) استفاده گردید. غشاها پس از چهار بار شستشو هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰، در معرض آنتی بادی ثانویه کونژوگه با Hrp β ۶ به مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد با روش قبلی این بار به صورت سه تکرار از کیت (BioRad) که برای آشکارسازی مجموعه‌های ایمنی تشکیل شده استفاده گردید. غشاها در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفته و دانسیته‌ی باندها توسط نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری و دانسیته‌ی باندهای پروتئین هدف در مقابل لودینگ کنترل بتا اکتین نرمالیزه شدند. در انتها نیز نتایج به صورت دانسیته‌ی نسبی (نسبت به گروه کنترل) ارائه گردیدند [۶]. روش رنگ آمیزی به این صورت بود که عملیات آماده‌سازی بافت توسط دستگاه (هیستوتکنیکون) انجام شد. قطعات مورد نظر به صورت افقی و از طرف راست (سطح محدب) قالب‌گیری شد. برش نمونه‌ها توسط میکروتوم دوار انجام گرفت. از تمام قالب‌ها برش‌هایی به ضخامت ۶ میکرومتر به صورت برش‌های پی در پی^۷ تهیه شد و مقاطع مربوط به هر نمونه با فاصله ۳

¹ Liquid nitrogen; LN2

² Bradford

³ Sodium dodecyl sulfate

⁴ Polyvinylidene fluoride

⁵ Santa Cruz Biotechnology

⁶ Horseradish peroxidase

⁷ Serial Sections

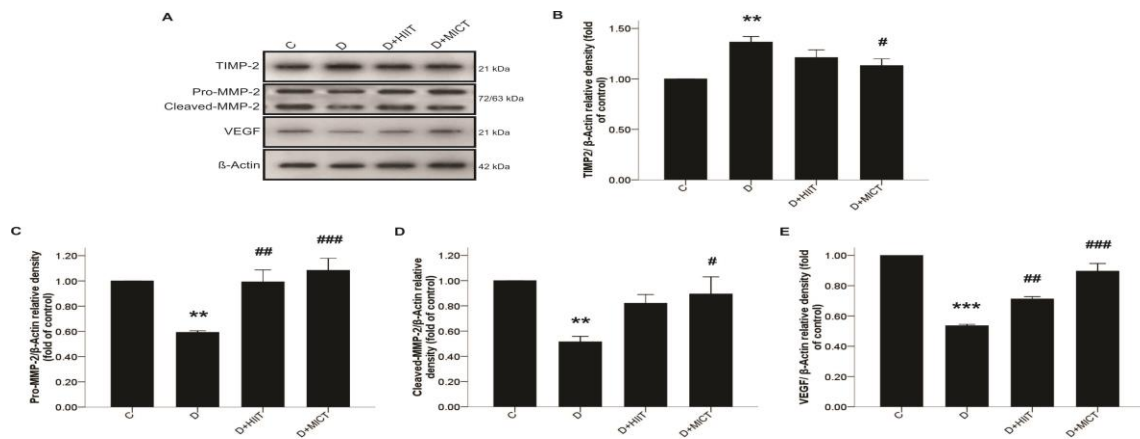
⁸ Kolmogrov- Smirnov; K-S

جدول ۳- وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های تحقیق (M±SD) هرگروه (n=8)

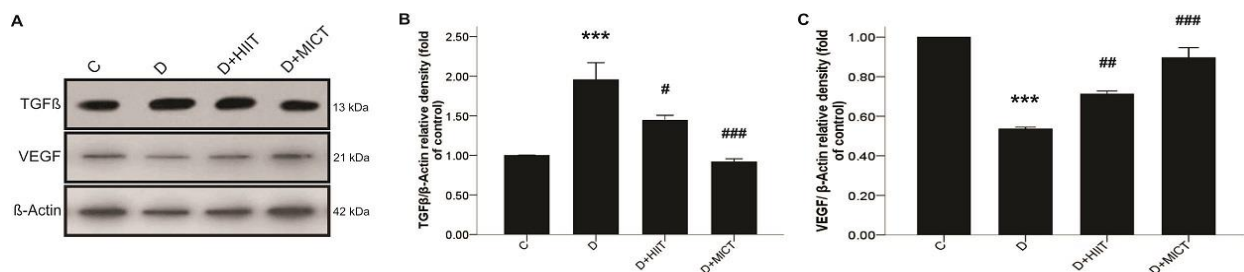
معنی داری	پس آزمون	پیش آزمون	گروه
P=۰/۲۴	۲۱۴±۱۸/۹۰	۱۸۱±۱۳/۱۹	کنترل سالم بدون تمرین (گرم)
P=۰/۰۰۴	۲۳۰±۱۶/۲۶	۱۸۶±۱۵/۰۲	شم (کنترل دیابتی بدون تمرین) (گرم)
P=۰/۰۰۲	۲۱۷±۱۹/۸۶	۱۸۹±۱۶/۳۳	تمرین تناوبی متوسط دیابتی (گرم)
P=۰/۰۰۳	۲۱۹±۱۶/۳۱	۱۸۴±۱۲/۸۴	تمرین تناوبی شدید دیابتی (گرم)

گروه تمرین تناوبی شدید تفاوت مشاهده شد ولی معنی‌دار نبود. اما تفاوت بین گروه کنترل دیابتی و تمرین تناوبی معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۳). بین گروه سالم بدون تمرین و هم دیابتی بدون تمرین با گروه تمرین تناوبی متوسط تفاوت معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۰). همچنین تفاوت بین مقادیر MMP2، TGFβ1، TIMP2 در گروه‌های چهارگانه تحقیق معنی‌دار بود یعنی تمرین و دیابت مقادیر عوامل پروانژیوتیک و آنتی‌انژیوتیک را تغییر داده‌است (P≥۰/۰۵).

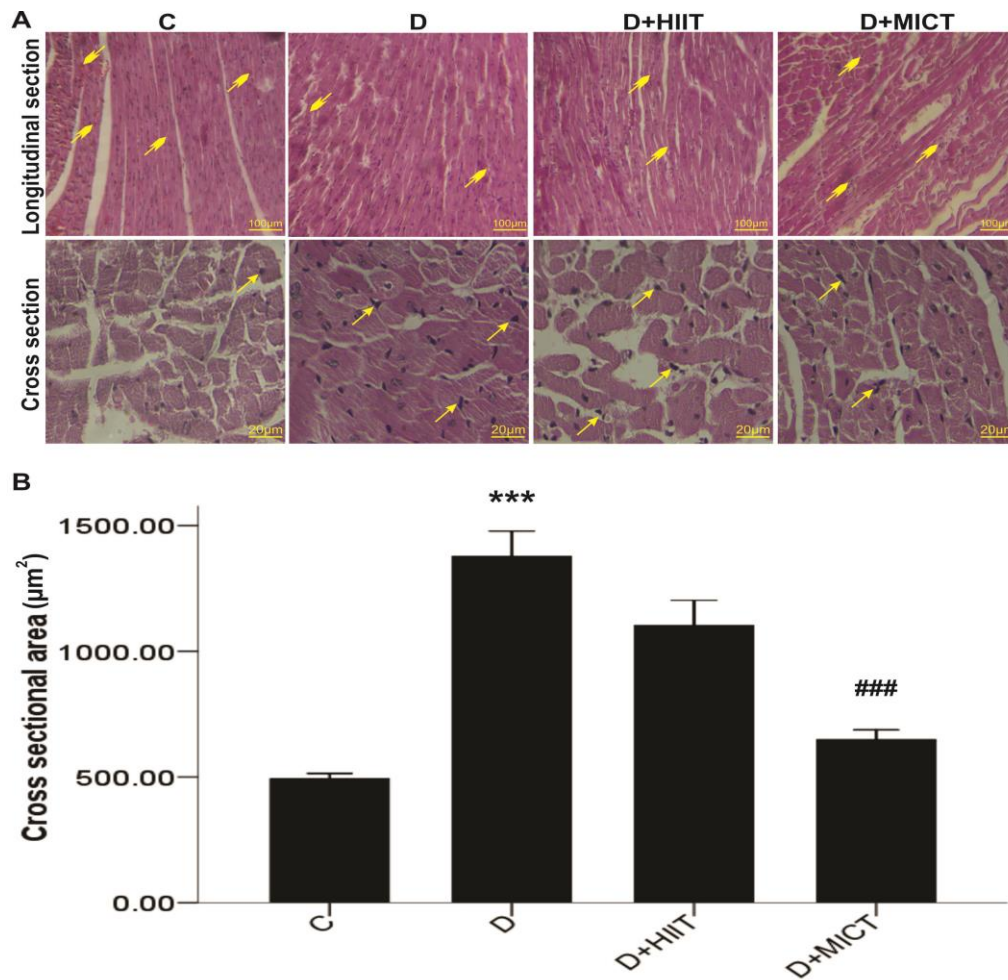
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی نشان داد که تفاوت آماری معنی‌داری از نظر میزان تظاهر عوامل آنژیوتیک ناحیه‌ی بطن چپ قلب رت‌ها در گروه‌های مختلف تحقیق وجود دارد (P=۰/۰۰۱) (شکل ۳). علاوه بر این تفاوت معنی‌داری در وزن آزمودنی‌ها در گروه سه گانه دیابتی مشاهده شد که در گروه‌های تمرینی معنی‌دار بود (جدول ۳). همچنین نتایج مربوط به مقایسه‌ی جفتی گروه‌ها که با استفاده از آزمون تعقیبی توکی انجام شده است به شرح ذیل است. بین گروه کنترل سالم و گروه دیابتی بدون تمرین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بین گروه کنترل سالم و



شکل ۱- VEGF: فاکتور رشد اندوتلیال عروق و TIMP2: فاکتور مهارکننده در بافت بطن چپ قلب موش‌های نر نژاد ویستار با روش وسترن بلات. C: گروه کنترل سالم بدون تمرین، D: گروه دیابتی بدون تمرین، D+HIIT: گروه دیابتی + تمرین تناوبی شدید D+MICT: گروه دیابتی + تمرین تناوبی متوسط، **، ***، #### سطح معنی‌داری



شکل ۲- TGFβ: فاکتور رشد تبدیل بتا و VEGF: فاکتور رشد اندوتلیال عروق در بافت بطن چپ قلب موش‌های نر نژاد ویستار با روش وسترن بلات. C: گروه کنترل سالم بدون تمرین، D: گروه دیابتی بدون تمرین، D+HIIT: گروه دیابتی + تمرین تناوبی شدید D+MICT: گروه دیابتی + تمرین تناوبی متوسط، **، ***، #### سطح معنی‌داری



شکل ۳- فتومیکروگراف‌های رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی در بطن چپ قلب رت‌ها در گروه‌های مختلف تحقیق

(C) کنترل بدون تمرین، (D) دیابتی بدون تمرین، (D+HIIT) دیابتی+تمرین تناوبی شدید، (D+MICT) دیابتی+ تمرین تداومی متوسط، (فلش‌ها تظاهر عوامل آنژیوژنیک را نشان می‌دهند، بزرگ نمایی $\times 20$ Bar:100µm)

MMP2 است. به نظر می‌رسد پروتکل‌های ورزشی شدید و متوسط در شرایط پاتولوژیک دیابت تأثیر زیادی بر آنژیوژنز بافت قلبی داشته است و منجر به سازگاری حاصل از متغیرهای فوق در بافت قلب رت‌های دیابتی شود که دلیل احتمالی آن غالب بودن عوامل پروآنژیوژنیک بر عوامل آنتی آنژیوژنیک و فیبروز حاصل از دیابت در قلب رت‌های دیابتی باشد. در مطالعات دیگر کاهش $TGF\beta 1$ [۱۵] و MMP2 و VEGF [۱۶] و افزایش رگ‌زایی بعد از میوپاتی و آنژیوپاتی دیابتی اتفاق افتاده است [۱۷]. MMP2 به‌عنوان یک ژلاتیناز شکافنده کلاژن غیر فیبریلی (کلاژن ۴) نقش مهمی در تغییر پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی در کاردیومیوپاتی دیابتی دارد [۱۸]. افزایش سطوح گلوکز می‌تواند با افزایش سنتز

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بعد از هشت هفته تمرین تناوبی شدید و تداومی متوسط عوامل پروآنژیوژنیک افزایش و عامل آنتی آنژیوژنیک و فیبروز در بطن چپ قلب رت‌های دیابتی کاهش داشت که به وقوع رگ‌زایی در بافت قلب آزمودنی‌ها اشاره دارد. هشت هفته تمرین منجر به کاهش معنی‌دار $TGF\beta 1$ و TIMP2 بافت قلب رت‌های دیابتی شد که بیانگر تأثیر محافظتی تمرینات ورزشی (تداومی متوسط و تناوبی شدید) در کاهش شاخص فیبروز شدن قلبی و همچنین، سرکوب و پیش‌گیری عوارض احتمالی میکروواسکولار و ماکروواسکولار ناشی از آن، از طریق افزایش فعالیت VEGF و

عوامل آنتی‌آنژیوژنیک مانند ترومبواسپوندين-۱، فعال سازی TGFβ1 را تسهیل می‌کند. فاکتور پروفیبروتیک TGFβ1 نیز به واسطه میانجی‌گری در پاسخ‌های التهابی، می‌تواند تجمع ماتریکس خارج سلولی را شتاب بخشد [۱۹]. بنابراین افزایش فعالیت MMP2، کاهش مقادیر TGFβ1 در بافت قلبی و کاهش سطوح گلوکز خون رت‌های تمرین کرده در تحقیق حاضر، می‌تواند تأییدی بر نقش حمایتی قلبی فعالیت‌های ورزشی در شرایط دیابت باشد. غلظت VEGF بعد از هشت هفته تمرین تداومی متوسط و تناوبی شدید در قلب رت‌های دیابتی مطالعه‌ی حاضر افزایش داشت البته مقدار آن در گروه دیابتی نیز افزایش داشت [۲۰]. عوامل مختلفی در افزایش و کاهش مقادیر سرمی و بافتی VEGF دخیل هستند، مجموعه‌ای از عوامل مکانیکی، متابولیکی، هورمونی، میزان و شدت فعالیت بدنی از عوامل مهمی هستند که بر میزان VEGF تأثیر می‌گذارد [۲۱]. پس، اینکه رگ‌زایی در گروه‌هایی تمرینی بیشتر از گروه کنترل سالم و دیابتی بود، احتمالاً نتیجه‌ی سازوکارهای استرس برشی یعنی فشاری که جریان خون به دیوار رگ‌ها وارد می‌کند [۲۲]، تجمع متابولیت‌ها و کشش عضلانی (کششی که بر اثر انقباض عضلانی به ساختارهای سلولی می‌آید) یا اثر متقابل این عوامل بر یکدیگر است که موجب افزایش سنتز VEGF و رشد مویرگ‌های جدید در بافت‌های گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل شده است [۲۳]. نیروهای مکانیکی ناشی از فعالیت ورزشی در تحریک ترشح VEGF و تغییر شکل شبکه عروق نقش دارند، چنانچه اگر در عروق جریان خون کم شود سلول‌های اندوتلیال به دلیل آپوپتوز و کلاپس از بین می‌روند [۱۸]. سلول‌های اندوتلیال پیوسته در معرض فشار مکانیکی ناشی از انقباض عضلانی حین فعالیت ورزشی هستند و تنش وارده بر اندوتلیال یکی از عوامل آزاد سازی VEGF است [۲۴]. تحقیقات نشان داده است VEGF بافت‌های عضلانی و قلبی اگر در معرض اضافه بار، انقباض و هایپریمیا باشند، افزایش می‌یابد [۲۵]. از آنجا که در زمان فعالیت ورزشی تداومی و تناوبی سلول‌های اندوتلیال تحت کشش قرار می‌گیرند سرعت رهاسازی VEGF افزایش خواهد یافت. همچنین در زمان فعالیت ورزشی جریان خون عضلات فعال حدود ۱۰ تا ۲۰ برابر افزایش می‌یابد که این افزایش باعث ایجاد تنش برشی در عروق می‌شود که سبب ایجاد فشارهای مکانیکی و

همودینامیکی لازم از عضلات شده و منتهی به تحریک آزادسازی NO و افزایش eNOS^۱ می‌شود [۲۶]. تحقیقات متعددی نشان داده است که NO در فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ VEGF نقش کلیدی دارد و علاوه بر این کشش سلول‌های اندوتلیال باعث تجزیه‌ی غشای پایه و ماتریکس برون سلولی شده و شرایط لازم را برای رگ‌زایی و ایجاد عروق جدید تسهیل و مهیا می‌کند [۲۷]. پس تمرینات ورزشی تداومی و تناوبی با بهبود نیم‌رخ گلوکزی و مقابله با افزایش عوامل مهار کننده رگ‌زایی که سبب کاهش میتوزن قوی VEGF است (ناشی از دیابت) باعث بهبود شرایط رگ‌زایی و رخ داد آنژیوژنز می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد هشت هفته فعالیت ورزشی تداومی و تناوبی باعث افزایش معنادار مسیر سیگنالینگ رگ‌زایی با VEGF می‌شود که با مطالعه‌ی Mousavi و همکاران [۹] Nabipour و همکاران [۱۴] Jun-K و همکاران [۲۰] ShuaiFei و همکاران [۸] همسو است. بعضی از تحقیقات نیز عدم تغییر یا عدم افزایش در عوامل آنژیوژنیک به‌ویژه VEGF را گزارش کرده‌اند که با مطالعه‌ی حاضر همسو نیست [۲۸، ۱۶]. دلیل احتمالی این مغایرت در تحقیق اعظمیان و همکاران مدت و شدت تمرین و همچنین نوع آزمودنی‌ها است که به مدت ۴ هفته و با ایجاد انفارکتوس تجربی در قلب موش‌ها (تحقیق حاضر دیابت) انجام شده بود که تظاهر VEGF در گروه ترکیبی (تمرین+آتورواستاتین^۲) و تمرین استقامتی در مقایسه با گروه کنترل معنادار نبود [۲۹]. از آنجا که هیپرلیپیدمی و هیپرگلاسمی از ویژگی‌های بارز دیابت نوع دو است، به‌نظر می‌رسد که التهاب ایجاد شده در اثر انباشت بیش از حد گلوکز در بافت‌ها و سلول‌های اندوتلیال بدن و ایجاد لخته‌های خون و ترومبوز در رگ‌ها از میزان گردش خون بکاهد و عوامل آنژیوژنیک فرصت و شرایط بروز و ظهور نیابند و مانع از رگ‌زایی و ایجاد عروق جدید شوند. یکی از علل احتمالی آن را می‌توان کاهش کشش دیواره‌ی اندوتلیال و تنظیم مسیرهای افزایشی VEGF ناشی از تنش برشی دانست [۳۰]

¹ Endothelial Nitric-Oxide Synthase; eNOS

² Atorvastatine

نتیجه گیری

دیابتی دارد، به یقین انجام پژوهش‌های آتی برای روشن شدن برخی ابهامات در این زمینه جهت یافت پاسخ مناسب پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

این تحقیق مستخرج از رساله‌ی دکتری دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی تهران است، با تشکر از مساعدت‌های دانشگاه و دانشکده‌ی تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، همچنین از تمامی افراد مرکز پژوهشی و تحقیقاتی دانشکده‌ی علوم پزشکی تبریز که ما را در این پژوهش یاری کردند، سپاسگزاریم.

به‌طورکلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد هشت هفته فعالیت ورزشی تداومی متوسط و تناوبی شدید موجب افزایش عوامل آنژیوژنیک و کاهش فاکتورهای آنتی‌آنژیوژنیک می‌شود. از آنجا که تمرینات ورزشی یکی از راهکارهای اساسی برای کاهش و تعدیل عوارض بیماری دیابت است و با توجه به اینکه فعالیت ورزشی تداومی و تناوبی سبب افزایش نیروهای همودینامیکی، متابولیت‌ها، کشش مکانیکی و تنش برشی شده، سبب بهبود نیمرخ لیپیدی و گلوکوزی مبتلا به دیابت خواهد شد با احتیاط می‌توان گفت این نوع از تمرینات تأثیر زیادی بر افزایش رگ‌زایی در بیماران دیابتی مبتلا به کاردیومیوپاتی

مآخذ

1. Laura BM, Nathalia AL, Mara RM, Clever GC, Lidiane BS, Tabata CT, et al. Evaluation of Collagen Fibers, MMP2, MMP9, 8-OHdG and Apoptosis in the Aorta of Ovariectomized LDL Knockout Mice Submitted to Aerobic Exercise. *Sociedade de Brazilia de Cardiologia* 2019; 112(2):180-188
2. Krzysztof C L, Ewa B, Małgorzata B, Andrzej L. Matrix metalloproteinases in type 2 diabetes and non-diabetic controls: effects of short-term and chronic hyperglycaemia. *Clinical Research* 2011; 2: 295-303.
3. Celena SB, Andreas B, Peter S, Klaus Q, Satu OK, Flemming D. Exercise-induced regulation of matrix metalloproteinases in the skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes & Vascular Disease Research* 2014; 11(5): 324-334
4. Anderson RO, Flavio SS, Raul HB, Da Emanuele SM, Gracielle VR, Rita CM, et al. Effect of photobiomodulation and exercise on early remodeling of the Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLOS ONE* 2019; 14(2): 1-16
5. Ke L, Wei A. Investigation of expression and effects of TGF- β 1 and MMP-9 in lens epithelial cells of diabetic cataract rats. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2019; 2: 1-5
6. Ali A Gh, Pezhman M, Hamid R, Hadi K. The Effect of Endurance Trainin on Angiostatin and Enos Gene Expression of Cardiac Tissue in Type 2 Diabetic Male Wistar Rats. *Journal of Arak University of Medical Sciences* 2019; 21(7): 112-122
7. Roy Z, Ambra P. Angiogenesis in Diabetic Nephropathy. *Nephrology* 2007; 27(2): 161-171
8. ShuaiFei J, Jie Z, XiuDe F, XiQiang W, Xiao NN, BaBo Z, et al. The relationship between mean platelet volume and diabetic retinopathy: a systematic review and meta- analysis. *Diabetology Metabolic Syndrome* 2019; 11(25): 1-8.
9. Mousavi F, Jahed Seyed A, Rajab A, Nikuo Sokhantabar AK, Kash Giti, Tabatabaee R. Survey of Air Pollution Effect on Variation of Glycosylated Hemoglobin A1C (HbA1C) level in Diabetic Patients in Tehran, Iran. *J. Health & Environ* 2013; 6(1); 1-10
10. Alexander K, Eilon R, Shany L, Enrique ZF, Alexander T, et al. Impact of type 2 diabetes mellitus on short- and long- term mortality after coronary artery bypass surgery. *Cardiovascular Diabetology* 2018; 17:151-159
11. Valeska O, Soumyalekshmi N, Omar E, Claudio A, Carlos S, Felipe AZ. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology* 2018; 17: 122-135
12. K Srinivasan, B Viswanad, Lydia Asrat CL, Kaul PR. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research* 2005; 52: 313-320
13. Kailu, Li Wang, Changying W, Yuan Y, Dayi H, Rongjing D. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Molecular Medicine Reports* 2015; 12: 2374-2382
14. Nabipour A, Moussavinik SA. Histological Study of the Atrioventricular Node and the Atrioventricular Bundle in the Heart of Rat (*Rattus norvegicus*). *Iranian Veterinary Journal* 2006; 12: 71-80
15. John PK, Ohjessica S, Ohstephan N. The essential role of exercise in the management of type 2

- diabetes. *Cleveland Clinical Journal Medicine* 2017; 84(7):15-21
16. Ruth S C, Wing-HT, Ivan C H, Macy CK, Liz SL, Mandy MS, et al. Randomized trial examining effectiveness of lifestyle intervention in reducing gestational diabetes in high risk Chinese pregnant women in Hong Kong. *Scientific Reports* 2018; 8: 1-11
 17. Francisco Westermeyer 1, JaimeA.Riquelme1, MarioPavez1, ValeriaGarrido 1, ArielDíaz 1, Hugo E.Verdejo 2, 3, PabloF.Castro, et al. NewMolecularInsightsofInsulininDiabeticCardiomyopathy. *Frontiers in Physiology* 2016; 7(125): 1-11
 18. Carlos GL, Ana E A, Mariana B ,Moreira GC, Vera MP,Martha OG. Effects of moderate intensity endurance training vs. high intensity interval training on weight gain, cardiorespiratory capacity, and metabolic profile in postnatal overfed rats. *Diabetology &Metabolic Syndrome* 2018; 10(70): 1-9
 19. Halgord AMF, Mohammad JHA, Belal AM, Ahmad E, Abdel HB. Comparative effects of vitamin D and vitamin C supplementations with and without endurance physical activity on metabolic syndrome patients: a randomized controlled trial. *Diabetology &Metabolic Syndrome* 2018; 10(80): 1-12
 20. Jun- K Y, Zae- YR, Jae- J H, Dong- Yep O, Myoung- Ok K, Sung- HK. Beneficial effects of 6- shogaol on hyperglycemia, islet morphology and apoptosis in some tissues of streptozotocin- induced diabetic mice. *Diabetology &Metabolic Syndrome* 2019; 11(15): 1-13
 21. Diego-Augusto SS, Mohsen N, Bruce BD, Maria IS, Maria-Fatima MS, Deborah CM. Physical inactivity as risk factor for mortality by diabetes mellitus in Brazil in 1990, 2006, and 2016. *Diabetology &Metabolic Syndrome* 2019; 11(23): 1-11
 22. Mohammad M, Ali AR, Vahid T, Mousa Kh. The Effect of a High Intensity Interval Exercise (HIIE) on Hypothalamic Nesfatin Gene Expression of Diabetical Male Rats. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism* 2018; 17(3): 1-9
 23. Mohammad RH, Ammar S, Shaghayegh HS, Farugh S, Mahmud S. Effect of Hydroalcoholic Extract of Berberis Vulgaris Root on Serum Levels of Glucose, Malondehyde and HbA1c in Diabetic Rats. *Journal of Neyshabur University of Medical Sciences* 2015; 3(3): 20-28
 24. Hosseini SA, Zar AS , Ghasemi A, Salehi O, Khoradmehr A, Farkhaie F. Hypoglycemic Interactional Effects of Coriandrum Sativum Extract and Endurance Training in Diabetic Rats. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 2018; 13(2): 20-30
 25. Doustar Y, Mohajeri D, Rezaei A, Hashemi M. The effect of endurance swimming exercise on the occurrence of apoptosis in experimental diabetic myopathic rats. *Vet Journal of Islamic Azad University Tabriz Branch* 2010; 3(4): 629-636
 26. Kadoglou NP, Vrabas IS, Sailer N, Kapelouzou A, Fotiadis G, Noussios G, Karayannacos PE, Angelopoulou N. Exercise ameliorates serum MMP-9 and TIMP-2 levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism* 2010; 36: 144–151
 27. Behrouz Il, Alireza Sh, Mohamad KA, Samira N, Yusef R. Protective Effects of Ginger (*Zingiber officinale*) Extract against Diabetes-Induced Heart Abnormality in Rats. *Diabetes Metabolic Journal* 2016;40:46-53
 28. Derosa G, D'Angelo A, Tinelli C, Devangelio E, Consoli A, Miccoli R, Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes Metabolism* 2007; 33: 129-134
 29. AzamianJazi A, Haffezi M, Opera H, Abdi H. The Effect of Endurance Exercise Training and Atorvastatin on VEGF in Rat Following Experiment Myocardial Infarction. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences* 2015; 22(4): 21-31
 30. Raziye S, Khadijeh I, Morteza T. The Effect of Spirulina Supplementation and Combined Aerobic-Strength Training on Serum Homocysteine of Sedentary Females. *Asian Journal Sports Medicine* 2018; 9(4): 1-5

COMPARISON OF THE EFFECT OF EIGHT WEEKS OF MODERATE CONTINUOUS AND SEVER INTERVAL TRAINING ON CARDIAC ANGIOGENESIS IN WISTAR MALE DIABETIC RATS

Fereshteh Shahidi¹, Faramarz Yazdani¹, AbbasAli Gaeini², Poran Karimi³

1. Department of Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Rajaei Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

2. Department of Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Science, University of Tehran, Tehran, Iran

3. Department of Medicine, Faculty of Neuroscience, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ABSTRACT

Background: Diabetic cardiomyopathy is the first cause of death in diabetic patients and angiogenesis is the most important mechanism for the recovery of heart blood flow in physiologic and pathologic conditions. The purpose of this study was to compare the effect of eight weeks of moderate continuous and severe interval training on heart angiogenesis in Wistar male diabetic rats.

Methods: 32 Wistar rats were randomly assigned into 4 groups: healthy non-exercised, diabetic no exercise, diabetic + moderate continuation and diabetic + severe interval exercises. Two types of exercises were calibrated and the exercise intensity was determined based on the maximum oxygen consumption and 5 days a week. The pro-angiogenic (VEGF, MMP₂, TGFβ₁) and anti-angiogenic (TIMP₂) agents of the left ventricle of the heart were taken from the rat after 48 hours of the last training session. Western blot method was used to evaluate the synthesis of proteins involved in angiogenic route. Data were measured by one-way variance analysis with repeated measurements (P =0/000).

Results: The results showed that the levels of proangiogenic VEGF, MMP₂, TGFβ₁ significantly increased, but the anti-angiogenic factor of TIMP₂ decreased (P <0.05). In addition, the maximum level of oxygen consumed in both continuous and periodic training groups showed a significant increase.

Conclusion: Moderate and continuous exercise increases angiogenic factors in the heart of diabetic Wistar rats, which is a good way to reduce the mortality rate of diabetes.

Keywords: Angiogenesis, Diabetes, Heart Muscle, Continuous Moderate Exercise, Interval Severe Exercises

*Shahid Rajaei Tarbiat Modarres University, Faculty of Physical Education and Science Sports, Department of Physiology, Sha'bnlou Highway, Lavizan, Tehran, Iran. Phone: +989149999059, fax +984136564562, Email: Yaziferi@gmail.com