

# دانشور

## پزشکی

## تأثیر تمرین هوازی بر بیان پروتئین های -Spred Raf1 و VEGF بافت قلب در موش های صحرائی

نویسندگان: سجاد محمدیاری<sup>۱</sup>، سیروس چوبینه<sup>۱\*</sup>، رحمان سوری<sup>۱</sup>، عباسعلی گایینی<sup>۱</sup>، حمداله هادی<sup>۲</sup>

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. گروه تربیت بدنی دانشگاه علوم انتظامی امین

E-mail: choobineh@ut.ac.ir

\* نویسنده مسئول: سیروس چوبینه

### چکیده

مقدمه و هدف: دیابت یکی از بیماری های متابولیکی است که با دیسفانکشن و آسیب عروقی همراه است. تمرینات ورزشی در بیماران دیابتی باعث بهبود رگ زایی می شود که به روند درمان این بیماران کمک می کند. هدف پژوهش حاضر، بررسی تمرین هوازی بر بیان پروتئین -1 Spred، Raf1 و VEGF بافت قلبی موش های صحرائی دیابتی بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه، ۵۰ موش صحرائی به صورت رندمازیم به چهار گروه دو گروه تمرین هوازی دیابتی و سالم (به مدت ۸ هفته و ۶ جلسه در هفته) و دو گروه کنترل دیابتی و سالم تقسیم شدند. ۴۸ ساعت پس از اتمام دوره تمرینی عضله قلبی آن ها تحت شرایط استریل جدا شد. بیان پروتئین -1 Spred و Raf-1 با روش الایزا سنجیده شد. برای تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون تحلیل واریانس یک سویه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی داری  $p < 0.05$  و نرم افزار Spss نسخه ۱۶ استفاده شد.

نتایج: نتایج مطالعه نشان داد دیابت موجب کاهش معنی دار میزان بیان پروتئین VEGF ( $p < 0.05$ ) و Raf-1 ( $p < 0.05$ ) و افزایش معنی دار پروتئین -1 Spred ( $p < 0.05$ ) می شود. همچنین، نشان داده شد هشت هفته تمرین هوازی باعث افزایش معنی دار بیان پروتئین VEGF ( $p < 0.05$ ) و Raf-1 ( $p < 0.05$ ) و کاهش معنی دار پروتئین -1 Spred ( $p < 0.05$ ) می شود.

نتیجه گیری: تمرین هوازی توانست سبب افزایش بیان پروتئین VEGF و Raf1 و کاهش -1 Spred در سلول های قلبی شده و به این ترتیب اثرات دیابت بر بیان این پروتئین ها در قلب را بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: تمرین هوازی، عامل رشدی اندوتلیال عروق، دیابت، -1 spred، Raf1

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست و پنجم-شماره ۱۳۳  
اسفند ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۹  
آخرین اصلاح ها: ۱۳۹۶/۱۱/۲۴  
پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۳۰

## مقدمه

می‌دهد. باوجوداین، مطالعات خیلی اندکی تأثیر تمرین هوازی بر مسیر Spred1 در آنژیوژنز را بررسی کرده‌اند. ناتان<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۱۳)، نقش تمرین هوازی شنا بر بیان mir126 را بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند، تمرین هوازی بیان mir126 را افزایش می‌دهد که از راه تنظیم مستقیم مسیر VEGF و تنظیم غیرمستقیم Spred1/Raf1/MAPK آنژیوژنز قلبی را پیش برده است (۱۲). تیاگو<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که miRNAs از راه کاهش فیروز قلبی بر اثر افزایش mir29 و مهار کلاژن و افزایش آنژیوژنز بر اثر mir126 توسط مهار تنظیم‌کننده‌های منفی مسیر VEGF به تمرین ورزشی هوازی پاسخ می‌دهند (۱۳) به نظر می‌رسد بیان mir126 در افراد دیابتی کاهش می‌یابد و فعالیت ورزشی می‌تواند از راه افزایش mir126 و درگیری مسیر Spred-1/Raf1/MAPK/VEGF، به بهبود عملکرد عروقی در قلب بیماران دیابتی کمک کند. باوجوداین، مطالعه‌ای آثار هم‌زمان تمرین ورزشی و دیابت را بر مسیر Spred1/Raf1/MAPK/VEGF در بافت قلبی بررسی نکرده است. بنابراین، هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی بر VEGF، Spred-1، Raf-1 در بافت قلبی موش‌های صحرایی سالم و دیابتی بود.

## مواد و روش‌ها

روش پژوهش حاضر از نوع پژوهش‌های بنیادی-توسعه‌ای است که به صورت تجربی با طرح پس‌آزمون با گروه کنترل انجام شد. مطالعه حاضر در سال ۱۳۹۵ در محل آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد. شمای کلی طرح پژوهش در جدول ۱ گزارش شده است.

تعداد ۵۰ موش صحرایی نژاد ویستار در سن ۴ هفتگی با میانگین وزنی  $9 \pm 11/9$  گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه و در شرایط دمایی  $26^{\circ}\text{C}$  -  $20^{\circ}\text{C}$ ، رطوبت

شیوع گسترده بیماری دیابت در سال‌های اخیر، این بیماری را به نگرانی عمده بهداشت عمومی تبدیل کرده است (۱). بر اساس گزارش انجمن بین‌المللی دیابت، تا سال ۲۰۱۱ تقریباً ۳۶۵ میلیون نفر به دیابت مبتلا بودند و انتظار می‌رود تا سال ۲۰۳۰ به ۵۵۲ میلیون نفر افزایش یابد (۲). دیابت بیماری متابولیکی است که نه تنها اختلال متابولیسم گلوکز را در برمی‌گیرد، بلکه عوارض عروقی مزمن میکرووواسکولارو ماکرو و اسکولار را نیز در برمی‌گیرد (۳). به علاوه، دیابت با ناهنجاری‌های آنژیوژنی نیز همراه است، به گونه‌ای که علت بسیاری از تظاهرات بالینی در افراد دیابتی مانند نقص در ترمیم زخم، افزایش خطر رد پیوند، ناهنجاری‌های جنینی در مادران دیابتی، تشکیل ناقص عروق جانبی کروتر و ... با اختلال در آنژیوژنز ارتباط دارند (۴، ۵). باوجوداین، دیابت از نقطه‌نظر عروقی و آنژیوژنز بیماری متناقضی است، زیرا از یک‌طرف باعث افزایش آنژیوژنز در اندام‌هایی مانند کلیه و چشم می‌شود و از طرف دیگر موجب مهار آنژیوژنز در قلب و عروق محیطی می‌شود (۶). دیابت آنژیوژنز و تشکیل عروق جانبی در قلب انسان و مدل‌های حیوانی را کاهش می‌دهد (۷) و باعث کاهش پرفیوژن و خون‌رسانی به میوکارد و افزایش مرگ‌ومیر می‌شود (۸). مطالعات نشان داده‌اند، بیماران دیابتی در مقایسه با بیماران غیر دیابتی میزان عروق جانبی کروتر کمتری دارند (۹، ۱۰). به علاوه، نشان داده‌اند، قطر مویرگی، نسبت مویرگی به تارهای عضلانی، ظرفیت انتشار مویرگی در دیابت کاهش می‌یابد و تنظیم همودینامیک عروقی عضلات مختل می‌شود (۱۱). باوجوداین، سازوکارهای مولکولی درگیر در این پدیده به طور دقیق شناخته نشده‌اند. یکی از این سازوکارها مسیر Sprouty-related protein 1 (Spred-1) است که سرکوب‌کننده درون‌سلولی مسیر Ras/MAPK است. به علاوه، نشان داده شده است که تمرین ورزشی آنژیوژنز در افراد سالم و بیماران دیابتی را افزایش

<sup>۱</sup>. Natan  
<sup>۲</sup>. Tiago

وزنی  $10/85 \pm 191/9$  گرم بر اساس وزن به طور تصادفی به چهار گروه کنترل سالم ( $n=10$ )، تمرینی سالم ( $n=15$ )، کنترل دیابتی ( $n=10$ ) و تمرینی دیابتی ( $n=15$ ) همسان‌سازی و گروه‌بندی شدند. خلاصه شمای کلی طرح پژوهش در جدول ۱ گزارش شده است.

۵۰ درصد و کم سروصدا و چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته به صورت انفرادی در هر قفس نگهداری شدند. وزن بدن روزانه ثبت و موش‌های صحرایی با غذای مخصوص موش صحرایی و آب تغذیه شدند. بعد از گذشت دو هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن مطلوب) موش‌های صحرایی با میانگین

جدول ۱. شمای کلی طرح پژوهش

شرح و استخراچ بافت	اعمال پروتکل تمرینی	آشناسازی	انجام تست تایید دیابت	تزریق STZ	مصرف غذای پرچرب	نگهداری و رسیدن به وزن مطلوب	مراحل
۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی	۸ هفته	۵ روز	۴۸ ساعت بعد از تزریق STZ		۲ هفته	۲ هفته	مدت
*	-	-	-	-	-	*	کنترل سالم
*	*	*	-	-	-	*	تمرین سالم
*	-	-	*	*	*	*	کنترل دیابتی
*	*	*	*	*	*	*	تمرین دیابتی

## نحوه ایجاد دیابت نوع ۲

دیابت در این پژوهش از طریق ترکیب مصرف غذای پرچرب و تزریق استرپتوزوتوسین ایجاد شد (۱۴). غذای مورد استفاده شامل ۵۸ درصد چربی، ۲۵ درصد پروتئین و ۱۷ درصد کربوهیدرات بود. موش‌های صحرایی گروه دیابتی به مدت دو هفته تحت مصرف غذای پرچرب قرار گرفتند، درحالی‌که گروه‌های سالم غذای طبیعی مصرف می‌کردند. بعد از آن، تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان ۳۵ میلی‌گرم/کیلوگرم حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد بعد از ۶ ساعت ناشتایی در دو گروه دیابتی انجام گرفت (۱۵). ۴۸ ساعت بعد از تزریق دارو، نمونه خونی از چشم حیوان جمع‌آوری و جداسازی سرم انجام و غلظت گلوکز با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون سنجیده شد. غلظت گلوکز بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم/دیسی‌لیتر به عنوان ابتلا به دیابت تعریف شد [۱۴] و موش‌های صحرایی واجد شرایط (۱۲ موش صحرایی از گروه کنترل دیابتی و ۱۳ موش صحرایی از

گروه تمرین دیابتی) وارد پژوهش شدند.

## پروتکل تمرینی

تمرین هوازی به مدت ۸ هفته ۶ جلسه در هفته روی نوارگردان موتوردار انجام شد. (۱۶، ۱۷) خلاصه پروتکل تمرینی در جدول ۲ گزارش شده است. قابل ذکر است که پروتکل تمرینی قبل از شروع مطالعه با انجام مطالعه مقدماتی<sup>۱</sup> روی ۴ موش صحرایی مورد تایید قرار گرفت.

<sup>۱</sup>. Pilot study

جدول ۲. پروتکل تمرین هوازی با شدت متوسط روی نوار گردان

مدت تمرین	شیب	سرعت	
۱۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۱۰ (m/min)	روز اول
۱۵ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۱۱ (m/min)	روز دوم
۲۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۱۲ (m/min)	روز سوم
۲۵ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۱۳ (m/min)	روز چهارم
۳۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۱۴ (m/min)	روز پنجم
۳۵ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۱۵ (m/min)	روز ششم
۴۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۱۶ (m/min)	روز اول
۴۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۱۷ (m/min)	روز دوم
۴۵ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۱۸ (m/min)	روز سوم
۵۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۱۹ (m/min)	روز چهارم
۵۵ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۲۰ (m/min)	روز پنجم
۶۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۲۱ (m/min)	روز ششم
۶۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۲۲ (m/min)	هفته سوم
۶۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۲۳ (m/min)	هفته چهارم
۶۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۲۴ (m/min)	هفته پنجم
۶۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۲۵ (m/min)	هفته ششم
۶۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۲۶ (m/min)	هفته هفتم
۶۰ (min)	۱۰٪ (۶ درجه)	۲۶ (m/min)	هفته هشتم

## سنجش متغیرهای وابسته

پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرین و پس از ناشتایی شبانه نمونه‌گیری انجام شد. موش‌های صحرایی با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس قفسه سینه حیوان شکافته شد و عضله قلبی موش‌های صحرایی تحت شرایط استریل جدا شد. بطن چپ قلب بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد. ابتدا نمونه‌ها از حالت فیریز خارج شدند و مدتی در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها وزن شده و مقدار ۵۰-۱۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه در میکروتیوب ۱/۵ کدگذاری شده قرار داده شدند. نمونه‌ها روی یخ گذاشته شدند تا دیگر مراحل کار انجام گیرد.

## روش تجزیه و تحلیل آماری

تست الایزا برای سنجش میزان پروتئین‌های VEGF و Spred-1, Raf1 با استفاده از کیت تجاری اختصاصی اندازه‌گیری (SPRED1 ELISA Kit, Catalog no: ABIN1232768, antibodies شرکت Raf1 ELISA Kit, antibodies شرکت Catalog no: ABIN1125759, antibodies شرکت Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ELISA Kit, Catalog no.: ABIN772617, antibodies شرکت انجام شد. لازم به ذکر است تمامی کیت‌های مورد استفاده مربوط به موش‌های صحرایی بودند.

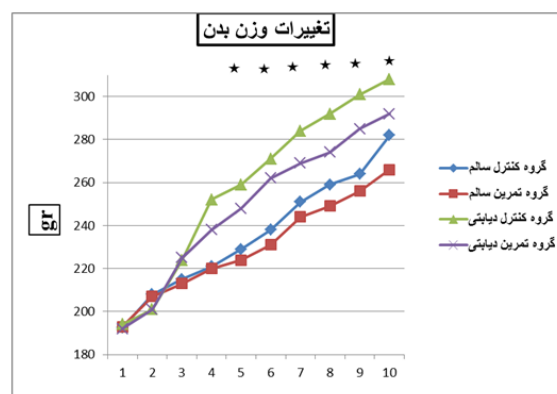
برای تعیین توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف، آنالیز داده‌های بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌سویه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS.19 در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

دوماهانه علمی - پژوهشی دانشور پزشکی / دانشگاه شاهد / اسفند ۱۳۹۶ / سال بیست و پنجم / شماره ۱۳۳

## یافته‌ها

## تغییرات وزن موش‌های صحرایی

همان‌گونه که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، کاهش اندک در وزن بدن در هفته بعد از القای دیابت در گروه‌های دیابتی مشاهده و پس از آن روند افزایش وزن در تمامی گروه‌ها به صورت طبیعی ادامه یافت. بعد از گذشت چهار هفته از زمان شروع مصرف غذای پرچرب توسط گروه‌های دیابتی، اختلاف وزن بین گروه کنترل دیابتی و تمرین دیابتی با سایر گروه‌ها معنی‌دار شد و این اختلاف تا پایان تحقیق برای گروه کنترل و دو هفته قبل از اتمام تمرین برای گروه تمرین دیابتی ادامه داشت.

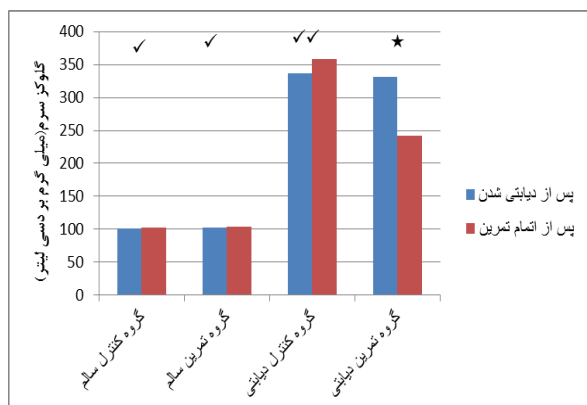


شکل ۱. تغییرات وزن بدن در گروه‌های مختلف پژوهش

★ تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل دیابتی با گروه‌های سالم  
✓ تفاوت معنی‌دار بین گروه دیابتی تمرین با گروه‌های سالم

## تغییرات گلوکز سرمی موش‌های صحرایی

مقادیر گلوکز سرمی موش‌های صحرایی پس از القای دیابت و پس از ۸ هفته تمرین استقامتی در شکل ۲ ارائه شده است. القای دیابت موجب افزایش معنی‌دار گلوکز سرمی در گروه‌های دیابتی و تمرین دیابتی گردید. هم‌چنین ۸ هفته تمرین استقامتی موجب کاهش معنی‌دار گلوکز سرمی در گروه تمرین دیابتی گردید.

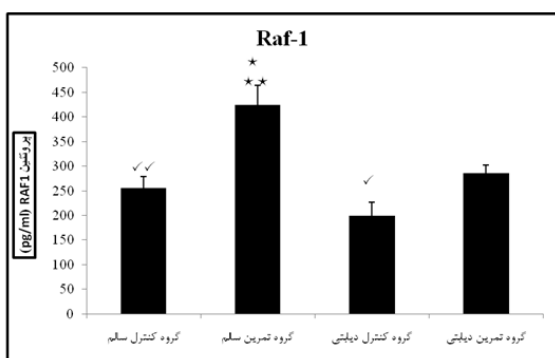


شکل ۲. تغییرات گلوکز سرمی در چهار گروه مورد مطالعه پس از دیابتی شدن و پس از اتمام ۸ هفته تمرین استقامتی

★ تفاوت معنی‌دار پس از القای دیابت و پس از اتمام ۸ هفته تمرین استقامتی  
✓ تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های سالم و گروه‌های دیابتی قبل و پس از اتمام ۸ هفته تمرین استقامتی  
✓✓ تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل دیابتی و گروه تمرین دیابتی پس از ۸ هفته تمرین استقامتی

## تجزیه و تحلیل متغیرهای اصلی تحقیق

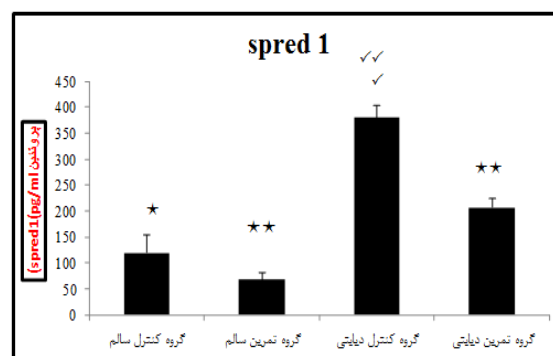
شکل ۳ میانگین مقادیر پروتئین SPRED1 بافت قلبی در چهار گروه کنترل، کنترل تمرین، دیابت و دیابت تمرین را نشان می‌دهد. نتایج مربوط به آزمون آنالیز واریانس یک‌سویه، برای مقادیر پروتئین SPRED1 بافت قلبی نشان داد تفاوت معنی‌داری بین چهار گروه مورد مطالعه وجود دارد ( $F=190.48$  و  $P<0.0005$ ). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد مقدار بیان این پروتئین در گروه کنترل به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل تمرین ( $P<0.0005$ ) و گروه دیابت ( $P<0.0005$ ) بود. هم‌چنین در گروه دیابت به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل تمرین ( $P<0.0005$ ) و دیابت تمرین ( $P<0.0005$ ) بود.



شکل ۲. میانگین مقادیر بیان پروتئین Raf-1 بافت قلبی گروه‌های مورد مطالعه پس از دوره تمرینی

★ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سالم و تمرین سالم  
 ★★ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه تمرین سالم و تمرین دیابتی  
 ✓ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل دیابتی و تمرین دیابتی  
 ✓✓ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی

شکل ۵ میانگین مقادیر پروتئین VEGF بافت قلبی در چهار گروه کنترل، کنترل تمرین، دیابت و دیابت تمرین را نشان می‌دهد. نتایج مربوط به آزمون آنالیز واریانس یک‌سویه ویژه مقادیر پروتئین VEGF بافت قلبی نشان داد تفاوت معنی‌داری بین چهار گروه مورد مطالعه وجود دارد ( $F=102.70$  و  $P<0.0005$ ). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد مقدار بیان این پروتئین در گروه کنترل تمرین، به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل ( $P<0.0005$ ) و گروه دیابت ( $P<0.0005$ ) بود. هم‌چنین در گروه کنترل به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه دیابت ( $P<0.0005$ ) و در گروه دیابت تمرین بیشتر از گروه دیابت ( $P<0.0005$ ) بود.



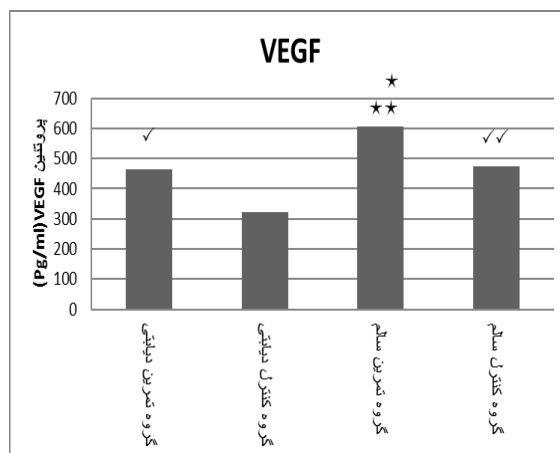
شکل ۳. میانگین مقادیر بیان پروتئین SPRED1 بافت قلبی گروه‌های مورد مطالعه پس از دوره تمرینی

★ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سالم و تمرین سالم  
 ★★ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه تمرین سالم و تمرین دیابتی  
 ✓ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل دیابتی و تمرین دیابتی  
 ✓✓ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی

شکل ۴ میانگین مقادیر پروتئین Raf-1 بافت قلبی در چهار گروه کنترل، کنترل تمرین، دیابت و دیابت تمرین را نشان می‌دهد. نتایج مربوط به آزمون آنالیز واریانس یک‌سویه، برای مقادیر پروتئین Raf-1 بافت قلبی نشان داد تفاوت معنی‌داری بین چهار گروه مورد مطالعه وجود دارد ( $F=104.94$  و  $P<0.0005$ ). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد مقدار بیان این پروتئین در گروه کنترل تمرین، به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل ( $P<0.0005$ ) و گروه دیابت ( $P<0.0005$ ) بود. هم‌چنین در گروه کنترل به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه دیابت ( $P=0.002$ ) و در گروه دیابت تمرین بیشتر از گروه دیابت ( $P<0.0005$ ) بود.

دیابت طبیعی است، اما فعال‌سازی Flk-1 طبیعی نیست (۲۰). بنابراین، احتمالاً Flk-1 گیرنده اصلی درگیر در انتقال سیگنال VEGF است و از راه فعال‌سازی Akt-1 و ERK1/2 عملکرد سلولی را تنظیم می‌کند. Akt-1 به نوبه خود باعث فعال‌سازی eNOS و تولید NO می‌شود که برای تکثیر سلول‌های اندوتلیال و مهار آپوپتوز لازم است (۲۱). مطالعه حاضر نشان داد میزان پروتئین SPRED1 بافت قلبی در موش‌های دیابتی افزایش و میزان پروتئین Raf-1 کاهش می‌یابد. چنگلی و همکاران (۲۰۱۴)، تنظیم منفی بیان mir126-3p در سرطان سلول کبد را 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 به ترتیب با هدف قرار دادن LRP6 و SPRED1 مهار می‌کند. آن‌ها نشان دادند مقدار mir126-3p همبستگی معکوسی با LRP6 و PI3KR2 در بافت‌های سرطانی سلول کبدی دارد (۲۲). در مطالعه‌ای نشان دادند که در موش‌های دیابتی، بیان پروتئین VEGF بافت قلبی کاهش و پروتئین SPRED1 و Raf-1 افزایش یافت (۱۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد، میزان بیان پروتئین VEGF و Raf-1 بافت قلبی در گروه تمرین دیابتی پس از ۸ هفته تمرین هوازی افزایش و بیان پروتئین Spred-1 کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. هرچند تا به حال، پژوهشی درباره تأثیر هم‌زمان دیابت و تمرین ورزشی بر میزان بیان پروتئین‌های Raf-1 و Spred-1 گزارش نشده است، اما مطالعاتی چند، به طور مستقل اثرات تمرین ورزشی و دیابت را بر بیان Raf-1 و Spred-1 مورد بررسی قرار داده‌اند. در دیابت سلول‌های اندوتلیال و منوسیت‌ها دو در فرایند آرتروژنز درگیرند که دچار نقص عملکردی می‌شوند (۲۵).

مشخص شده است که فسفوریلاسیون ERK1/2 و AKT ناشی از VEGF در سلول‌هایی که mir126 در آن‌ها ناک اوت شده است، تضعیف می‌شود (۲۳). در راستای نتایج پژوهش حاضر، مطالعه ایمیتسو و همکاران



شکل ۵. میانگین مقادیر بیان پروتئین VEGF بافت

#### قلبی گروه‌های مورد مطالعه پس از دوره تمرینی

★ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سالم و تمرین سالم  
 ★★ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه تمرین سالم و تمرین دیابتی  
 ✓ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل دیابتی و تمرین دیابتی  
 ✓✓ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی

#### بحث و نتیجه‌گیری

هدف مطالعه حاضر، بررسی تأثیر تمرین هوازی بر VEGF، Spred-1، Raf-1 در بافت قلبی موش‌های سالم و دیابتی بود.

در مطالعه حاضر مشخص شد دیابت باعث کاهش معنی‌دار میزان پروتئین VEGF بافت قلبی می‌شود. دیابت، رگ‌زایی و تشکیل عروق جانبی در قلب و عضلات اسکلتی در انسان و مدل‌های حیوانی را کاهش می‌دهد (۱۸-۲۱). هایپرگلیسمی باعث نقص پیام‌رسانی در پایین‌دست VEGFR2 سلول‌های اندوتلیال می‌شود. فعال‌سازی VEGFR1 در مونسیت‌های افراد دیابتی طبیعی است (۱۹). VEGF در بیماران پس از عمل جراحی بای‌پس شریان کرونر افزایش می‌یابد. در حالی که میزان VEGFR1,2 در آن‌ها کاهش یافته است. میزان فسفوریلاسیون Flk-1 که نشان‌دهنده وضعیت فعال آن است، کاهش شدیدی را نشان داده است. این پدیده خود منجر به کاهش فعالیت eNOS و Akt (یک سرین ترنوپونین کیناز) می‌شود. عملکرد VEGFR1 در شرایط

به گروه بی‌تحرك 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 بی‌تحرك افزایش نشان داد. مقدار پروتئین SPRED-1 که یکی از اهداف mir126 است، 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 آنکه با افزایش در مسیرهای آنژیوژنز مانند MAPK, PI3K/Akt/eNOS هم‌گرا می‌شود، مرتبط باشد (۱۲). شکرچی زاده و همکاران (۱۳۹۱) در مطالعه‌ای نشان داده شد، میزان پلاسمایی NO، VEGF و VEGFR1 در گروه تمرین با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشته است. آن‌ها نشان دادند که تمرینات مقاومتی اثری بر مقدار پلاسمایی عوامل مؤثر بر آنژیوژنز در حیوانات سالم ندارد (۲۵). مهرو و همکاران نشان دادند، هشت هفته تمرین مقاومتی تغییر معنی‌داری در VEGF و NO سرم موش‌های صحرایی نر دیابتی به همراه نداشت، بلکه موجب کاهش معنی‌دار گلوکز خون گردیده است. اگرچه میزان انسولین خون بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت. به نظر می‌رسد تمرینات مقاومتی علیرغم بهتر شدن مقادیر گلوکز، تأثیر مثبتی بر عوامل تحریکی رگ‌زایی در موش‌های صحرایی دیابتی ندارد. دیابت باعث التهاب در بدن موش می‌شود و فعالیت ورزشی مقاومتی برای مقابله با این التهاب اثربخش بوده است، و از طرفی با توجه به اینکه دوره تمرین هشت هفته بوده است، به نظر می‌رسد شدت التهاب ایجاد شده در موش‌های صحرایی زیاد بوده و تمرین مقاومتی تنها توانسته با کاهش عوامل رگ‌زایی مقابله کند و افزایش

(۲۰۰۶)، نشان داد که VEGF فرایند آنژیوژنز را از طریق فعال‌سازی آبشار سیگنالینگ آنژیوژنیک و از طریق مسیر AKT و نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) انجام می‌دهد. نتایج نشان داد، دانسیته مویرگی در قلب موش‌های مسن بی‌تحرك در مقایسه با موش‌های جوان بی‌تحرك، به طور معنی‌داری پایین‌تر بود، در حالی که این نسبت در موش‌های مسن تمرین کرده در مقایسه با موش‌های مسن بی‌تحرك به طور معنی‌داری بالاتر بود. mRNA و بیان پروتئین VEGF، و گیرنده‌های اصلی آن (Flt-1 و Flk-1) در قلب موش‌های مسن تمرین کرده در مقایسه با موش‌های مسن بی‌تحرك به طور معنی‌داری بالاتر بود. میزان تغییرات در فسفوریلاسیون پروتئین AKT و eNOS مشابه با تغییرات VEGF بود. میزان تغییرات AKT در سه گروه معنی‌دار نبود اما نسبت AKT فسفریله به AKT هم‌چنین نسبت eNOS فسفریله به eNOS قلب در گروه تمرینی به طور معنی‌داری بیشتر بود. آن‌ها از نتایج این پژوهش نتیجه گرفتند که افزایش بیان عوامل آنژیوژنیک این مسیر سیگنالینگ در اثر تمرین ورزشی، باعث افزایش تراکم مویرگی قلب می‌شود که از این طریق فراهمی اکسیژن و مواد مغذی بافت قلبی بهبود می‌یابد و نهایتاً فیبروزی شدن و آپوپتوز سلولی به تأخیر می‌افتد. بنابراین فعالیت ورزشی در افراد مسن می‌تواند، عوامل خطر آفرین قلبی ناشی از افزایش سن را کاهش دهد. بر اساس گزارش این محققین، مهار بیان eNOS در شرایط زیستی در حیوانات باعث کاهش بیان VEGF و کاهش عروق زایی و دانسیته مویرگی در قلب می‌شود (۲۴). نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا با مطالعه ناتان و همکاران (۲۰۱۲)، نشان داد که تمرین هوازی باعث درگیری و تغییر معنی‌دار مسیر Spred-1/Raf1/VEGF می‌شود. در این مطالعه، موش‌های ماده و یستار در سه گروه دسته‌بندی شدند: بی‌تحرك (s)، تمرین ۱ (t1) تمرین با حجم متوسط و تمرین ۲ (t2) تمرین با حجم بالا). آن‌ها نشان دادند که نسبت مویرگ تار قلبی در T1 (۵۸٪) و T2 (۱۰۱٪) نسبت



## نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد ۸ هفته تمرین هوازی، می‌تواند موجب افزایش معنی‌دار میزان بیان پروتئین‌های Raf-1 و VEGF و کاهش معنی‌دار Spred-1 بافت قلبی موش‌های صحرایی دیابتی شود. یافته‌های به‌دست‌آمده، دانش ما را در مورد سازوکارهای آنژیوژنز در دیابت و تمرین هوازی افزایش داده و نشان می‌دهد VEGF و مسیر مرتبط با آن (mir126/Spred-1/Raf-1) یک هدف درمانی احتمالی برای شرایط پاتولوژیکی درگیر در آنژیوژنز است.

## منابع

- Raffort J, Hinault C, Dumortier O, Van Obberghen E. Circulating microRNAs and diabetes: potential applications in medical practice. *Diabetologia* 2015;58(9):1978-92.
- Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2011;94(3):311-21.
- Chen G, McAlister FA, Walker RL, Hemmelgarn BR, Campbell NR. Cardiovascular outcomes in Framingham participants with diabetes. *Hypertension* 2011;57(5):891-7.
- Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *The American Journal of Pathology* 2004;164(6):1935-47.
- Martin A, Komada MR, Sane DC. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal Research Reviews* 2003;23(2):117-45.
- Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metabolism* 2013;17(1):20-33.
- Waltenberger J. Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. *Cardiovascular Research* 2001;49(3):554-60.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* 2003;9(6):653.
- Abacı 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.
- 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.

معناداری در این مقادیر در گروه تمرین دیده نشد (۲۶). تأثیر فعالیت بدنی بر عامل رشد اندوتلیال عروق خون نیز نتایج متناقضی دارد. برخی مطالعات نشان دادند فعالیت تمرینی حاد میزان عامل رشد اندوتلیال عروق سرم را افزایش می‌دهد (۲۷) در حالی که برخی دیگر عدم تغییر این فاکتور و حتی کاهش غلظت آن را گزارش کردند (۲۸). کاهش VEGF سرم به دنبال فعالیت حاد به این معنی نیست که فعالیت تمرینی، میزان تولید VEGF را کاهش می‌دهد، اما امکان دارد کاهش موقتی این عامل در پاسخ به تمرین ناشی از اتصال VEGF به گیرنده‌های موجود روی سلول‌های اندوتلیال باشد که این اتصال محرکی برای فرآیند آنژیوژنز در عضله قلبی و اسکلتی باشد (۲۹). در پژوهشی دیگر نشان داده شده که افزایش میزان عامل رشد اندوتلیال عروق سرم دو ساعت بعد از فعالیت می‌تواند ناشی از انتقال VEGF عضله اسکلتی به داخل جریان خون باشد (۳۰) کراوس<sup>۱</sup> و همکاران نشان دادند که پس از ۲ و ۴ ساعت فعالیت استقامتی در افراد فعال و غیرفعال مقدار VEGF افزایش یافته است (۲۹). مطالعات قبلی بیان کردند تمرینات حاد می‌تواند موجب تنظیم عوامل آنژیوژنیک به خصوص عامل رشد اندوتلیال عروق در عضلات اسکلتی شده که افزایش در بیان و مقدار پروتئین عامل رشد اندوتلیال عروق باعث ایجاد تراکم مویرگی در مقدار عضلات اسکلتی می‌شود. در مطالعات دیگر با برنامه تمرینی متفاوت شامل یک جلسه تمرین مزمن و هم‌چنین تمرین استقامتی نیز نتایج حاکی از افزایش بیان عامل رشد اندوتلیال عروق و گیرنده‌های آن‌ها بود که میزان تراکم مویرگی نیز در آن‌ها بهبود یافته بود. این مطالعات هم سو با مطالعه حاضر بهبودی را در میزان این عامل گزارش کرده‌اند (۳۰، ۳۱، ۳۲). در مطالعه حاضر میزان پروتئین VEGF در اثر تمرین استقامتی تغییر معنی‌داری را نشان داد که احتمالاً وجود مسیرها و سازوکارهای دیگری مانند Hif-1 $\alpha$  و PGC-1 $\alpha$  نیز در این فرآیند دخیل می‌باشند (۳۳).

<sup>1</sup>. Krous

11. Hazarika S, Dokun AO, Li Y, Popel AS, Kontos CD, Annex BH. Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus. *Circulation Research* 2007;101(9):948-56.
12. Da Silva Jr ND, Fernandes T, Soci U, Monteiro A, Phillips MI, De Oliveira EM. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2012;44(8):1453-62.
13. Fernandes T, Baraúna VG, Negrão CE, Phillips MI, Oliveira EM. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2015;309(4):H543-H52.
14. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016;17(10):611-25.
15. 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.
16. Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, et al. Exercise promotes angiogenesis and improves  $\beta$ -adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovascular Research* 2007.
17. 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(3):828-34.
18. Kivelä 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 healthy and diabetic mice. *Cardiovascular Diabetology* 2008;7(1):13.
19. Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, et al. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Therapy* 2001;8(3):181.
20. Sasso FC, Torella D, Carbonara O, Ellison GM, Torella M, Scardone M, et al. Increased vascular endothelial growth factor expression but impaired vascular endothelial growth factor receptor signaling in the myocardium of type 2 diabetic patients with chronic coronary heart disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2005;46(5):827-34.
21. 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. *Circulation* 2002;105(3):373-9.
22. Du C, Lv Z, Cao L, Ding C, Owusu-ansah KG, Xie H, et al. MiR-126-3p suppresses tumor metastasis and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by targeting LRP6 and PIK3R2. *Journal of Translational Medicine* 2014;12(1):259.
23. Boodhwani M, Sodha NR, Mieno S, Xu S-H, 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):I-31-I-7.
24. Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Miyauchi T. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2006;291(3):H1290-H8.
25. Shekarchizadeh P, Khazaei M, Gharakhanlou R, Karimian J, Safarzadeh AR. The Effects of Resistance Training on Plasma Angiogenic Factors in Normal Rats. *Journal of Isfahan Medical School* 2012;30(176).
26. Mahrou M, Gaeini AA, Chobbinah S, Javidi M. Changes in stimulating factors of angiogenesis, induced by progressive resistance training in diabetic rats. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism* 2014;14(1):1-8.
27. 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.
28. Gu J-W, Gadonski G, Wang J, Makey I, Adair TH. Exercise increases endostatin in circulation of healthy volunteers. *BMC Physiology*. 2004;4(1):2.
29. Kraus RM, Stallings HW, Yeager RC, Gavin TP. Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men. *Journal of Applied Physiology* 2004;96(4):1445-50.
30. Höffner L, Nielsen JJ, Langberg H, Hellsten Y. Exercise but not prostanoids enhance levels of vascular endothelial growth factor and other proliferative agents in human skeletal muscle interstitium. *The Journal of Physiology* 2003;550(1):217-25.
31. Breen E, Johnson E, Wagner H, Tseng H, Sung L, Wagner P. Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *Journal of Applied Physiology* 1996;81(1):355-61.
32. Gavin T, Drew J, Kubik C, Pofahl W, Hickner R. Acute resistance exercise increases skeletal muscle angiogenic growth factor expression. *Acta Physiologica* 2007;191(2):139-46.
33. Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiological Reviews* 1992;72(2):369-417.

## The effect of aerobic exercise on protein expression of VEGF, Spred 1, and Raf1 in cardiac tissue of rats

Sajjad Mohammadyari<sup>1</sup>, Siroos Choobineh<sup>1\*</sup>, Rahman Soori<sup>1</sup>, Abbasali Gaeini<sup>1</sup>, Hamdolah Hadi<sup>2</sup>

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

\* Corresponding author e-mail: choobineh@ut.ac.ir

### Abstract

**Background and Objective:** Diabetes is a metabolic disorder that is associated with dysfunction and impairment of vascular system. Exercise training in diabetic patients improves angiogenesis, which helps treatment of diabetes. The purpose of this study was investigation of aerobic exercise effect on cardiac expression of the proteins Spred-1, Raf1, and VEGF in diabetic rats.

**Materials and Methods:** In this study, 50 rats were randomly divided into 4 groups of diabetic, intact aerobic exercise (8 weeks for 6 sessions per week), diabetic, and intact control. Cardiac muscle was removed and placed immediately in liquid nitrogen. Protein expression of VEGF, Raf-1 and Spred-1 was investigated by ELISA method. Data were analysed using SPSS (version 16.0) at a significance level of  $p < 0.05$ . One way ANOVA was used for data analysis with Tukey's test to find differences between groups.

**Result:** Results showed that diabetes leads to decreased cardiac expression of Raf-1 ( $p < 0.05$ ) and VEGF ( $p < 0.05$ ) proteins and increased cardiac expression of Spred-1 protein ( $p < 0.05$ ). As well, eight weeks of aerobic training led to increase of cardiac expression of Raf-1 ( $p < 0.05$ ) and VEGF ( $p < 0.05$ ) protein and decreased cardiac expression of Spred-1 ( $p < 0.05$ ) protein in diabetic rats.

**Conclusion:** Aerobic exercise training increases expression of VEGF and Raf1 protein and decreases expression of Spred-1 in cardiomyocytes, therefore, the effect of diabetes on these proteins in the presence of aerobic exercise is attenuated.

**Keywords:** Aerobic training, Vascular endothelial growth factor, Diabetes, Spred-1, Raf1