

# The effect of two types of exercise training (continuous and intermittent) and atorvastatin on the expression of VEGF and MMP2 genes in aortic tissue of diabetic rats

Maryam Mousapour<sup>1</sup>, Parvin Farzanegi<sup>1\*</sup>, Hajar Abbaszadeh<sup>1</sup>, Farzane Farokhi<sup>2</sup>

1. Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran
2. Department of Biological Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Sari Branch, Sari, Iran

\* Corresponding author e-mail: [parvin.farzanegi@gmail.com](mailto:parvin.farzanegi@gmail.com)

## Abstract

**Background and Objective:** It has been shown that about 80% of deaths in diabetic patients are caused by cardiovascular disorders, which is called diabetic heart disease. The purpose of this research was to investigate the effect of two types of exercise (continuous and periodic) and the drug atorvastatin on the expression of VEGF and MMP2 genes in the aorta tissue of diabetic rats.

**Materials and Methods:** In this study, 40 male rats, which were randomly divided into 8 groups: 1) control, 2) diabetic, 3) diabetic+continuous, 4) diabetic+intermittent, 5) atorvastatin, 6) continuous + atorvastatin, 7) intermittent + atorvastatin and 8) saline. Rats performed two types of continuous and periodic training 5 days a week for 8 weeks. Atorvastatin was injected intraperitoneally at a daily dose of 20 mg per kilogram of body weight. To determine the significance of the difference between groups, one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used.

**Results:** MMP2 levels in the diabetes group significantly increased at the significance level of 0.05 compared to the control group and in the supplement, intermittent, intermittent-supplement and continuous-supplement groups significantly decreased compared to the diabetes group. The levels of VEGF in the diabetes group increased significantly compared to the control and the intermittent-supplement group significantly decreased compared to the diabetes group.

**Conclusion:** There is a possibility that intermittent exercise in combination with atorvastatin can have a protective effect on the aorta through the reduction of VEGF and MMP2 genes in the aortic tissue and the improvement of angiogenesis that was impaired due to the induction of diabetes.

**Keywords:** Continuous and intermittent exercises, Atorvastatin, Angiogenesis, VEGF, MMP2

**Received:** Sep 06, 2023

**Revised:** Dec 10, 2023

**Accepted:** Dec 20, 2023

**How to cite this article:** Mousapour M, Farzanegi P, Abbaszadeh H, Farokhi F. The effect of two types of exercise training (continuous and intermittent) and atorvastatin on the expression of VEGF and MMP2 genes in aortic tissue of diabetic rats. *Daneshvar Medicine* 2024; 31(6): 1-13. doi: 10.22070/DANESHMED.2024.18171.1393

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and build up the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.



# اثر دو نوع تمرین (تداومی و تناوبی) و داروی آترواستاتین بر بیان ژن‌های VEGF و MMP2 بافت آئورت موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی مدل دیابتی

مریم موسی پور<sup>۱</sup>، پروین فرزانی<sup>۱\*</sup>، هاجر عباس زاده<sup>۱</sup>، فرزانه فرخی<sup>۲</sup>

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران
۲. گروه علوم و فناوری های زیستی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

Email: parvin.farzanegi@gmail.com

\*نویسنده مسئول: پروین فرزانی

## چکیده

**مقدمه و هدف:** نشان داده شده است که حدود ۸۰ درصد مرگ و میر در بیماران دیابتی ناشی از اختلالات قلبی عروقی است که به آن بیماری قلبی دیابتی گفته می‌شود، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر دو نوع تمرین (تداومی و تناوبی) و داروی آترواستاتین بر بیان ژن‌های VEGF و MMP2 بافت آئورت موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی مدل دیابتی بود.

**مواد و روش‌ها:** ۴۰ سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی نر، که در ۸ گروه به صورت تصادفی تقسیم‌بندی شدند: شامل (۱) کنترل، (۲) دیابتی، (۳) دیابتی + تداومی، (۴) دیابتی + تناوبی، (۵) آترواستاتین، (۶) تداومی + آترواستاتین، (۷) تناوبی + آترواستاتین و (۸) سالین. موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی دو نوع تمرین تداومی و تناوبی را ۵ روز در هفته و به مدت ۸ هفته اجرا کردند. آترواستاتین به صورت روزانه با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی به آنان تزریق شد. به منظور تعیین معنادار بودن تفاوت بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

**نتایج:** سطوح MMP2 گروه دیابت در سطح معناداری ۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار، و گروه‌های مکمل، تناوبی، تناوبی-مکمل و تداومی-مکمل نسبت به گروه دیابت کاهش معناداری یافت. سطوح VEGF گروه دیابت نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار و گروه تناوبی-مکمل نسبت به گروه دیابت کاهش معنادار یافت.

**نتیجه‌گیری:** این احتمال وجود دارد که تمرین تناوبی در ترکیب با آترواستاتین بتواند از طریق کاهش ژن‌های VEGF و MMP2 بافت آئورت و بهبود آنژیوژنز که در اثر القای دیابت مختل شده بود، دارای اثر حفاظتی بر آئورت باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تمرینات تداومی و تناوبی، آترواستاتین، آنژیوژنز، VEGF و MMP2

وصول مقاله: ۱۴۰۲/۰۶/۱۵

اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۰۹/۱۹

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۹

## مقدمه

در طول رگ‌زایی دارد (۷). نشان داده شده است که MMPها، به‌ویژه MMP-2 با تنظیم رفتارها یا عملکردهای سلول‌های عروقی و بنیادی/پیش‌ساز به فرایند رگ‌زایی کمک می‌کنند (۸، ۹). MMPها همچنین بر فاکتورهای رشد مانند VEGF و تبدیل فاکتور رشد بتا ( $TGF-\beta$ ) که یک عامل پیش رگ‌زایی است، تأثیر می‌گذارند. VEGF القاکننده قوی شناخته شده رگ‌زایی است. MMP-2 با برش پروتئولیتیک VEGF را آزاد می‌کند و آن را در دسترس گیرنده‌هایش (VEGFR) قرار می‌دهد و رگ‌زایی را ارتقا می‌دهد (۱۰).

برنامه‌های ورزشی مختلفی برای بهبود عوارض قلبی عروقی در بیماران دیابتی و نقش برجسته آن در بهبود عوارض ناشی از میکروآنژیوپاتی در مقایسه با مداخلات غیرورزشی (هورمون، درمان‌های مکمل، روش‌های دارویی و غیره) در این بیماران اثبات شده پیشنهاد شده است (۲). ورزش می‌تواند با تحریک بیان MiR-126 و VEGF، روند رگ‌زایی قلبی را در جمعیت دیابتی به‌طور چشمگیری تسریع و افزایش دهد. در حمایت از این نظریه کاربردی، افزایش چشمگیر در تعداد و تراکم مویرگ‌های میوکارد موش صحرایی با استفاده از یک برنامه شنای ویژه موش صحرایی متشکل از ۵ روز در هفته به دلیل تغییرات در دو مسیر سیگنالینگ شامل VEGF/Raf-1/ERK و VEGF/P13K/AKT بود (۱۱). ورزش همچنین می‌تواند پروتئین‌های SPRED1 و PIK3R2 را با تنظیم بیش از حد بیان MiR-126 مسدود کند (۱۱). بنابراین می‌توان گفت که ورزش ساختاریافته و هدفمند می‌تواند یک داروی کم‌عارضه ارزشمند باشد که به‌طور چشمگیری باعث تنظیم بیش از حد رگ‌زایی، تسریع و بهبود جریان خون کرونر و در نهایت بهبود عملکرد بیماران DHD می‌شود. (۲). اثر برجسته تمرین تناوبی بر توسعه ظرفیت هوازی و عملکرد قلبی عروقی در افراد سالم و بیماران قلبی عروقی در مقایسه با تمرینات تداومی ثابت شده است (۱۲). سبزواری راد و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای روی موش‌های صحرایی دیابتی ثابت کردند که یک دوره (۶ هفته) تمرینات تناوبی با شدت بالا منجر به افزایش قابل توجه بیان miR-126 ژن قلبی و افزایش غلظت سرمی

دیابت ملیتوس به یک بیماری متابولیک مزمن شایع در سراسر جهان تبدیل شده است. بر اساس داده‌های انجمن بین‌المللی دیابت<sup>۱</sup> (IDF)، ۵۳۷ میلیون بزرگسال بین ۲۰ تا ۷۹ سال (۱۰،۵ درصد) در سال ۲۰۲۱ به دیابت مبتلا بودند و انتظار می‌رود این تعداد تا سال ۲۰۳۰ به ۶۴۳ میلیون (۱۱،۳ درصد) و ۷۸۳ میلیون (۱۲،۲ درصد) تا سال ۲۰۴۵ افزایش یابد (۱). نشان داده شده است که حدود ۸۰ درصد مرگ و میر در بیماران دیابتی ناشی از اختلالات قلبی عروقی است که به آن بیماری قلبی دیابتی<sup>۲</sup> یا DHD گفته می‌شود که مهم‌ترین آنها اختلال عملکرد و آسیب عروقی و در نتیجه توقف رگ‌زایی عروق کرونر است. علی‌رغم پیشرفت‌های زیادی که در زمینه تحقیقات پزشکی و سابقه بالینی طولانی مدت دیابت شیرین انجام شده است، خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی مرتبط با دیابت کاهش نیافته است (۲).

بنابراین شناخت اصلاح‌کننده‌های این بیماری نه تنها منجر به مداخلات درمانی جدید و مؤثر می‌شود، بلکه جدیدترین روش‌های تشخیص زودهنگام بیماری قبل از وقوع را نیز به همراه دارد (۳). DHD نوعی بیماری قلبی است که در جمعیت دیابتی نوع ۱ و ۲ رخ می‌دهد و با تغییرات ساختاری در قلب و عروق خونی، مولکولی و عملکردی رخ می‌دهد و شامل بیماری عروق کرونر قلب (CHD) یا بیماری عروق کرونر (CAD)، کاردیومیوپاتی (CAN) یا کاردیومیوپاتی دیابتی (DCM) و نارسایی قلبی (HF) است (۴). دیابت از منظر عروقی و رگ‌زایی پارادوکس این بیماری است که به دلیل افزایش آنژیوژنز در بافت‌هایی مانند کلیه و چشم و از سوی دیگر منجر به کاهش رگ‌زایی در بافت قلب و عروق می‌شود (۵). کاهش بروز آنژیوژنز با ناهنجاری‌های جنینی در مادران دیابتی، افزایش خطر رد پیوند، کاهش تشکیل عروق جانبی و بهبود زخم در بیماران دیابتی همراه است (۶).

فرایند رگ‌زایی به تخریب ECM برای تهاجم بافت اطراف و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال نیاز دارد. MMPها و VEGF تأثیر مهمی بر تخریب ECM و عملکردهای اضافی

<sup>1</sup> International Diabetes Federation

<sup>2</sup> Diabetic Heart Disease

واحد ساری انتخاب و وارد پژوهش شدند. سپس آنها در ۸ گروه به صورت تصادفی تقسیم‌بندی شدند که شامل (۱) کنترل سالم، (۲) کنترل دیابتی، (۳) دیابتی + تداومی، (۴) دیابتی + تناوبی، (۵) دیابتی + آترواستاتین، (۶) دیابتی + تداومی + آترواستاتین، (۷) دیابتی + تناوبی + آترواستاتین و (۸) سالمین بود. این مطالعه توسط کمیته اخلاق کار با حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تأیید شد.

### محیط پژوهش و تغذیه آزمودنی‌ها:

پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه در قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات، دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت  $5 \pm$  ۵۵ درصد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ با تهویه مناسب قرار گرفتند. آزمودنی‌ها دارای چیره غذایی پرچرب به روش Zou و همکاران داشتند که امولسیون هر روز صبح به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به ازای هر کیلو گرم وزن بدن به صورت گاواژ دریافت کرد. در تمام مراحل پژوهش، آب مورد نیاز حیوان به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در دسترس آنها بود.

### نحوه دیابتی کردن رت‌ها:

پس از گروه‌بندی موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی برای دیابتی کردن آنها از داروی استرپتوزوتوسین (STZ) با دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد که به صورت درون صفاقی به آنها تزریق شد و برای اطمینان از دیابتی بودن موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی از گوشه چشم نمونه‌های خونی تهیه شد و میزان گلوکز سنجش، که بالاتر از ۱۲۶ میلی‌گرم بر دسی لیتر در نظر گرفته شد.

### پروتکل تمرین ورزشی:

قبل از شروع پروتکل اصلی، برای آشنایی از فعالیت، موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی به مدت یک هفته با تواتر پنج جلسه و به مدت پنج دقیقه با سرعت ۸ تا ۱۰ متر بر دقیقه با شیب صفر از تردمیل استفاده شد. برنامه تمرینی شامل دو پروتکل تمرین تداومی و تناوبی بود. برنامه تمرین تداومی هفته اول با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه برای مدت‌زمان پنج دقیقه شروع به دویدن روی تردمیل کرد. سپس هر هفته با افزایش سرعت ۲ تا ۲ متر بر دقیقه به

پروتئین‌های VEGF و Raf-1 شد. و کاهش غلظت سرمی Spred-1 و همچنین مکانیسم‌های رگ‌زایی ایجاد شده توسط تمرین تناوبی شدید و آبشار سیگنالینگ (-miR) 126/Spred-1/Raf-1/VEGF ثابت کرده است که تمرین تناوبی با شدت بالا یک عامل درمانی بالقوه و ارزان در درمان عوارض بیماری قلبی دیابتی و تقویت فرایند رگ‌زایی است (۱۳).

از طرفی، استاتین‌ها، به‌عنوان مثال، داروهایی که معمولاً در عمل بالینی با فعالیت کاهش‌دهنده چربی به‌خوبی تخمین زده شده، استفاده می‌شوند، اثرات پلیوتروپیک متعددی دارند که وابسته به چربی نیستند (۱۴). بیشتر این فعالیت‌ها به‌ویژه برای بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ مفید است (۱۵). نشان داده شده است که استاتین‌ها رگ‌زایی را تحریک می‌کنند، به‌عنوان یک رویکرد بالقوه در درمان بیماری عروق کرونر در نظر گرفته می‌شوند (۱۶). در مقابل، در مطالعه دیگری دیده شده است که آترواستاتین پاسخ رگ‌زایی میوکارد به ایسکمی مزمن را مختل می‌کند (۱۷)، یا حتی رگ‌زایی را قطع می‌کند (۱۸). علاوه‌براین، پیشنهاد شده، که استاتین‌ها بسته به دوزهای تجویز شده ممکن است بر روند رگ‌زایی دوفازی تأثیر بگذارند (۱۹). بااین‌حال مکانیسم‌های اساسی که فعالیت ورزشی و داروی آترواستاتین آنژیوژنز را در رت‌های دیابتی بهبود می‌بخشد کاملاً مشخص نیست. لذا این پژوهش به بررسی دو نوع تمرین (تداومی و تناوبی) و داروی آترواستاتین بر بیان ژن VEGF و MMP2 بافت آئورت رت‌های مدل دیابتی پرداخته است.

### مواد و روش‌ها

نمونه‌های پژوهش حاضر را موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی تشکیل دادند. با توجه به اینکه آزمودنی‌ها در آزمایشگاه به لحاظ بسیاری از متغیرها تحت کنترل بودند، از این رو پژوهش حاضر از نوع تجربی است.

### جامعه و نمونه آماری:

در این مطالعه تجربی تعداد ۴۰ سر موش سفید بزرگ آزمایشگاهی نر با سن حدود ۶ تا ۸ هفته در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی

شش ست ۲/۵ دقیقه‌ای بود که بین هر ست مدت‌زمان چهار دقیقه استراحت در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است تمرین تناوبی برای مدت ۵ جلسه در هفته انجام شد (جدول ۲). همچنین موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی گروه کنترل بدون هیچ‌گونه تمرینی هشت هفته را پشت سر گذاشتند.

مدت ۱ تا ۲ دقیقه بر زمان دویدن افزوده شد. به طوری که در هفته چهارم سرعت به ۲۰ متر بر دقیقه و زمان دویدن به ۱۳ تا ۱۴ دقیقه رسید و در هفته هشتم سرعت دویدن به ۲۸ تا ۲۹ متر بر دقیقه و مدت‌زمان ۲۱ تا ۲۲ دقیقه رسید. تعداد جلسات تمرین تداومی پنج مرتبه در هر هفته انجام شد (جدول ۱). از سویی دیگر برنامه تمرین تناوبی شامل

جدول ۱. پروتکل تمرین تداومی

مدت	سرعت	هفته
۵-۷	۱۴-۱۶	۱-۲
۱۲-۱۰	۲۱-۱۹	۳-۴
۱۷-۱۵	۲۵-۲۳	۵-۶
۲۲-۲۱	۲۸-۲۹	۷-۸

جدول ۲. پروتکل تمرین تناوبی

مدت	سرعت	هفته
۶ ست ۵/۲ دقیقه‌ای	۱۴-۱۶	۱-۲
*	۱۹-۲۱	۳-۴
*	۲۵-۲۴	۵-۶
*	۲۹-۲۸	۷-۸

و خشک شدند. سپس به آن آب استریل (۱/۵ میکرولیتر بر میلی‌گرم بافت) اضافه شد. برای سنج کمی RNA استخراج شده از دستگاه بایوفتومر با طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده شد. میانگین OD خوانده شده ۱/۷۷ بود که نشانگر کارایی مناسب RNA استخراج شده است. استخراج cDNA برای هر نمونه سه مرحله ساخت cDNA انجام گرفت. بدین ترتیب که در ابتدا ۸ میکروگرم از RNA استخراج شده را با ۰/۸ میکرولیتر از آنزیم Dnase I و ۲ میکرولیتر از بافر x10 آن و آب DEPC خورده مخلوط کرده و حجم نمونه به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. محصول ایجاد شده را بدون ورتکس کردن و به آرامی مخلوط کرده و سپس با برنامه‌ریز در دستگاه ترموسایکر انکوبه شد: ۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد. پس از اتمام مراحل ترموسایکلر ۲۸۰ میکرولیتر آب تزریقی اضافه شد و برای استفاده در QPCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد

### نحوه مصرف آترواستاتین:

آترواستاتین در گروه‌های دارو و دارو+تمرین، به صورت روزانه با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی به آنان تزریق شد (۲۰).

### نحوه جداسازی نمونه‌های بافتی:

پس از اتمام دوره تمرینی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی با ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین و زایلازین موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی بی‌هوش شدند و نمونه‌گیری بافتی انجام شد. بدین ترتیب بافت آئورت آنها جدا و در محیط ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به آزمایشگاه برای اندازه‌گیری بیان ژن VEGF و MMP2 ارسال شد. بافت با استفاده از یک میلی‌مول محلول تریزول لیز و با دستگاه همگن‌کننده بافت، هموژن شد. در مرحله بعد، جداسازی از فاز آبی به کمک ۰/۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم صورت گرفت. RNA استخراج شده با یک میلی‌لیتر اتانول سرد ۷۰ درصد شستشو

## نتایج

نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه حاکی از وجود تفاوت معنادار بیان ژن MMP2 در بین گروه‌های مختلف پژوهش است ( $P=0/0001$ ) (جدول ۱). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که گروه‌های دیابت و شم نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری در بیان ژن MMP2 داشتند ( $P<0/0001$ ). در مقابل، گروه‌های تناوبی ( $P=0/044$ )، تداومی ( $P<0/0001$ )، تناوبی-مکمل ( $P<0/0001$ ) و تداومی-مکمل ( $P<0/0001$ ) نسبت به گروه دیابت کاهش معناداری یافتند. همچنین، گروه‌های تناوبی ( $P=0/048$ )، تداومی ( $P<0/0001$ )، تناوبی-مکمل ( $P<0/0001$ ) و تداومی-مکمل ( $P<0/0001$ ) نسبت به گروه شم کاهش معناداری یافتند. گروه‌های تداومی ( $P=0/010$ )، تناوبی-مکمل ( $P=0/0001$ ) و تداومی-مکمل ( $P=0/001$ ) نسبت به گروه مکمل کاهش معناداری نشان دادند (نمودار ۱).

نتایج مربوط به بیان ژن VEGF نیز تفاوت معناداری بین گروه‌های مختلف پژوهش نشان داد ( $P=0/001$ ) (جدول ۱). بیان ژن VEGF گروه‌های دیابت ( $P=0/009$ ) و شم ( $P=0/004$ ) نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشتند. در مقابل، بیان ژن VEGF گروه تناوبی-مکمل نسبت به گروه دیابت ( $P=0/011$ ) و شم ( $P=0/005$ ) کاهش معناداری را نشان داد. گروه تداومی-مکمل نیز نسبت به گروه دیابت ( $P=0/016$ ) و شم ( $P=0/008$ ) کاهش معناداری را نشان داد (نمودار ۲).

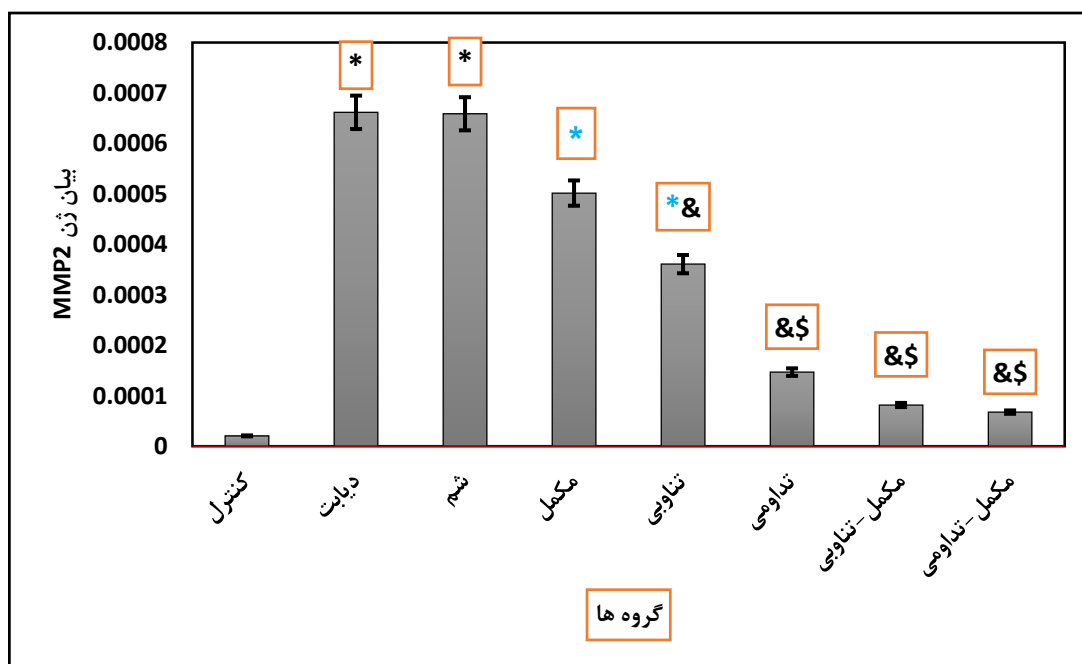
نگهداری شدند. برای هر نمونه cDNA نیز، یک نمونه کنترل مثبت با پرایمر b2m به‌عنوان کنترل داخلی، برای آزمون حضور cDNA تهیه شد. نمونه‌ها به آرامی و بدون ورتکس مخلوط شده و در دستگاه RT-PCR با برنامه‌ریز PCR قرار گرفتند. ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، واکنش از مرحله دوم به بعد، برای ۴۰ سیکل تکرار شد. Cts مربوط به واکنش‌ها توسط نرم‌افزار دستگاه RT-PCR استخراج و در نهایت CT Mean سه مرتبه ثبت شد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول آورده شده است. کمی‌سازی مقادیر بیان ژن هدف مورد نظر از فرمول ۲ به توان منفی  $\Delta\Delta CT$  استفاده شد.

## روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:

به‌منظور، طبقه‌بندی داده‌های حاصل از این پژوهش، از آمار توصیفی استفاده شد؛ برای تعیین نرمال‌بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلیک استفاده شد؛ و تعیین معناداربودن تفاوت بین متغیرها و تعامل بین آنها از تحلیل واریانس یک‌طرفه و با معنادارشدن یافته‌ها برای تعیین محل تفاوت از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. یافته‌ها در سطح معناداری  $P\geq 0/05$  بررسی شدند و برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نیز از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۰ استفاده شد. تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند.

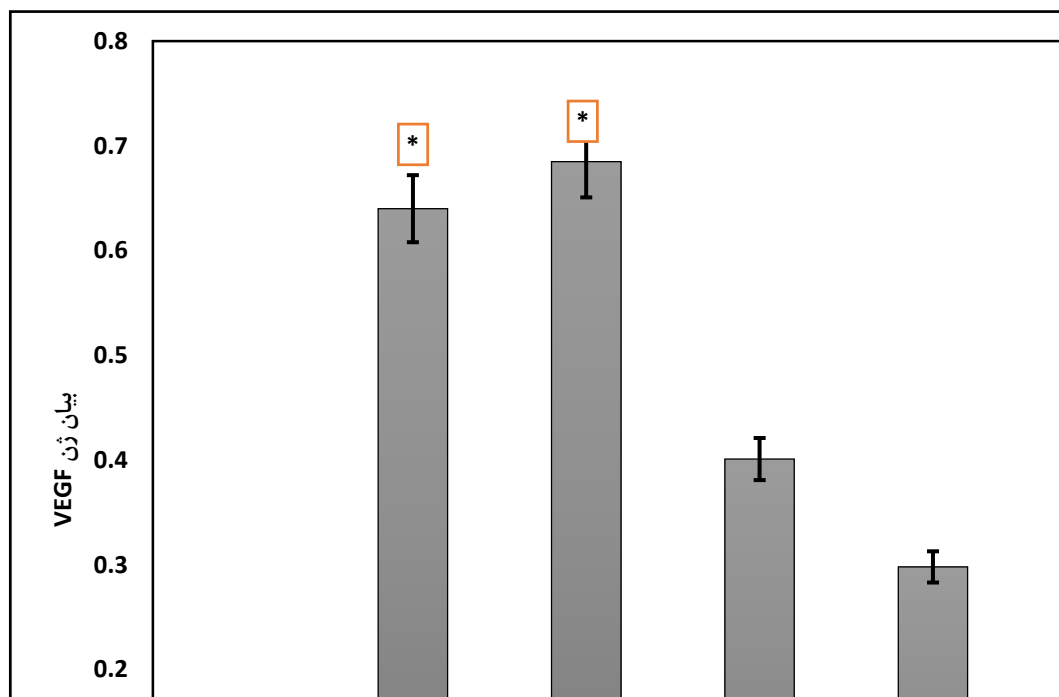
جدول ۱. میانگین و انحراف استاندارد متغیرهای پژوهش

گروه	متغیر	VEGF	MMP2
کنترل		۰,۰۲۳۴±۰,۰۰۲۷	۰,۰۰۰۰۲۰۴±۰,۰۰۰۰۰۹۲۵
دیابت		۰,۰۶۴±۰,۰۲۶	۰,۰۰۰۰۶۶±۰,۰۰۰۰۱۳۷
شم		۰,۰۶۸۵±۰,۰۲۲۳	۰,۰۰۰۰۶۵۹±۰,۰۰۰۰۰۸۹۲
مکمل		۰,۰۴۰۱±۰,۰۱۲	۰,۰۰۰۰۵۰۲±۰,۰۰۰۰۲۹۱
تناوبی		۰,۰۲۹۸±۰,۰۰۷۱	۰,۰۰۰۰۳۶۱±۰,۰۰۰۰۱۸۳
تداومی		۰,۰۳۲۰۴±۰,۰۱۳۶۵	۰,۰۰۰۰۱۴۷±۰,۰۰۰۰۰۴۰۵
مکمل-تناوبی		۰,۰۴۰۸±۰,۰۰۱۵	۰,۰۰۰۰۰۸۲±۰,۰۰۰۰۰۱۳۴
مکمل-تداومی		۰,۰۶۲۳±۰,۰۰۲۹۷	۰,۰۰۰۰۰۶۸±۰,۰۰۰۰۰۴۸
تفاوت بین گروه‌ها		$P=0,001$	$P=0,0001$
(نتایج تحلیل واریانس یک‌راهه)		$F=0,007$	$F=17,251$



نمودار ۱. مقایسه میانگین سطوح MMP2 در گروه‌های مختلف پژوهش

\*: نشانه معناداری نسبت به گروه کنترل. &: نشانه معناداری نسبت به گروه دیابت و شم. &\$: نشانه معناداری نسبت به گروه مکمل.



نمودار ۲. مقایسه میانگین سطوح VEGF در گروه‌های مختلف پژوهش

\*: نشانه معناداری نسبت به گروه کنترل. &: نشانه معناداری نسبت به گروه دیابت و شم.

## بحث

هدف از اجرای پژوهش حاضر بررسی اثر دو نوع تمرین (تداومی و تناوبی) و داروی آترواستاتین بر بیان ژن‌های VEGF و MMP2 بافت آئورت موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی مدل دیابتی بود. یکی از یافته‌های اصلی پژوهش حاضر این بود که القای دیابت در موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی منجر به افزایش معنادار در بیان ژن‌های MMP2 و VEGF شد. دیابت بر عوامل پیش‌رگ‌زایی و ضد رگ‌زایی تأثیر می‌گذارد که تعادل بین محرک‌های رگ‌زایی و مهارکننده‌های رگ‌زایی را تغییر می‌دهند و بنابراین با تغییر رگ‌زایی، بیماری‌های قلبی عروقی افزایش می‌یابد. از طرفی رگ‌زایی پاتولوژیک و افزایش آن با رتینوپاتی دیابتی و خونریزی در پلاک‌های آترواسکلروتیک و بی‌ثباتی آنها مرتبط است. علی‌رغم افزایش آگاهی از اثرات ضد دیابتی رگ‌زایی، مکانیسم‌های مولکولی مؤثر درگیر در پدیده رگ‌زایی دقیقاً شناخته نشده است (۲). مهار رگ‌زایی در دیابت احتمالاً به دلیل تجزیه ضعیف غشای پایه، تغییر در تعادل فاکتورهای رشد، سیتوکین‌های تثبیت عروقی یا مشکلات انتقال سیگنال در مسیر است. از سوی دیگر، رگ‌زایی در دیابت با افزایش سطح VEGF، FGF، تنظیم افزایشی اینتگرین (که مسئول مهاجرت است و فاکتورهای رشد ضروری در فرایند رگ‌زایی را تحریک می‌کند)، اختلالات حرکتی و غیرآزیمی همراه است (۲۱). در مطالعهٔ لین<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۱۹) موش‌های DFU<sup>۲</sup> تحت درمان با مهارکننده‌های miR-217 بیان بالایی از  $HIF-1\alpha$  و VEGF، کاهش بیان عوامل التهابی ( $IL-1\beta$ ،  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$ ) و همچنین افزایش معنادار eNOS، MMP-2 و MMP-9 را نشان دادند (۲۲). انواع فاکتورهای التهابی، مانند  $IL-1\beta$ ،  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$  ترشح شده توسط مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها، در روند بهبود زخم در بیماران مبتلا به زخم پای دیابتی نقش دارند (۲۳، ۲۴). علاوه بر این،  $IL-1\beta$  همچنین می‌تواند بیان

MMPS را القا کند (۲۵)، و بیان غیرطبیعی MMPS در فرایند بهبود زخم می‌تواند باعث هیدرولیز گسترده ماتریکس شود؛ بنابراین مانع از بهبود زخم‌ها می‌شود (۲۶). علاوه بر این، افزایش VEGF و کاهش سطوح  $IL-1\beta$ ،  $TNF-\alpha$  و همچنین کاهش بیان پروتئین eNOS، MMP2 و MMP9، باعث بهبود زخم موش‌های DFU، بهبود رگ‌زایی و مهار التهاب در مطالعه دیگری شد (۲۷)، که نشان داد مهارکننده‌های miR-217 می‌توانند التهاب را سرکوب کرده و بیان غیرطبیعی MMP2 را برای التیام زخم بهبود بخشند. در عین حال،  $HIF-1\alpha$  شناسایی شده است که می‌تواند به زیر واحد  $HIF-1\beta$  در سلول‌های اندوتلیال متصل شود تا رونویسی و اتصال به آغازگر VEGF را افزایش دهد و سطح بیان VEGF که یک فاکتور رگ‌زایی است، افزایش دهد (۲۸)، عاملی که ارتباط نزدیکی با نئوواسکولاریزاسیون (NV) دارد (۲۹)، و می‌تواند به‌طور مؤثری تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال را با سطح بالا نیتریک اکسید سنتاز (eNOS) ترویج کند (۳۰)، و باعث ایجاد یک سری واکنش‌ها برای القای رگ‌زایی و افزایش خون‌رسانی به ناحیه زخم موضعی و ترویج بهبود زخم در بیماران DFU شود (۳۱). علاوه بر این ژانگ<sup>۳</sup> و همکاران نشان دادند، با تنظیم مثبت بیان VEGF با واسطه  $HIF-1\alpha$  برای تسریع بهبود زخم رت‌های دیابتی، می‌تواند رگ‌زایی را تحریک کنند (۳۲). سونکاری<sup>۴</sup> و همکاران همچنین نشان دادند که بیان بیش از حد  $HIF-1\alpha$  می‌تواند تکثیر سلول‌های اندوتلیال را افزایش داده و باعث بهبود زخم موش‌های DFU شود (۳۳). از یافته‌های مهم دیگر در پژوهش حاضر، کاهش تنظیمی به سمت مقادیر نرمال گروه کنترل در بیان ژن‌های MMP2 و VEGF گروه‌های تناوبی، تداومی، تناوبی-مکمل و تداومی-مکمل نسبت به گروه‌های دیابت بود، که این تغییرات در برخی موارد به‌ویژه در گروه‌های تناوبی-مکمل و تداومی-مکمل

<sup>3</sup> Zhang EY

<sup>4</sup> Sunkari

<sup>1</sup> Lin CJ

<sup>2</sup> Diabetic foot ulcer



شد. همچنین، سطح بیان mRNA آنژیواستاتین در هیپوکامپ موش‌های تزریق‌شده با  $A\beta$  بالا بود و تمرین ورزشی بیان آن را لغو کرد (۳۴).

چندین بررسی بالینی گزارش دادند که تمرین ورزشی از طریق کاهش تجمع  $A\beta$ ، که با افزایش mRNA سطوح HIF-1، VEGF و VEGFR2 در بدن همراه بود، از پیشرفت بیماری‌زایی AD و اختلال شناختی هیپوکامپ موش‌های دیابتی و همچنین بیماران مبتلا به AD جلوگیری می‌کند (۳۶-۳۴).

وزلوسکا<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که آترواستاتین در دوزهای پایین دارای فعالیت ضد رگ‌زایی است، ترشح فاکتورهای پیش‌رگ‌زایی قوی مانند VEGF و MCP-1 را کاهش می‌دهد و همچنین تحت شرایط هیپرگلیسمی مشخص برای دیابت نوع ۲، فاکتور ضد رگ‌زایی IL-10 را در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی<sup>۳</sup> (PBMCs) افزایش می‌دهد (۱۹).

هر دو فعالیت پیش‌رگ‌زایی و ضد رگ‌زایی استاتین‌ها مشاهده شده است (۱۹). پیشنهاد شد که اثر مخالف استاتین‌ها در روند رگ‌زایی ممکن است وابسته به دوز باشد. مشخص شد که دوزهای پایین استاتین‌ها اثرات پیش‌رگ‌زایی را نشان می‌دهند، درحالی‌که استفاده از دوزهای بالا با فعالیت ضد رگ‌زایی همراه بود (۳۷). علاوه بر این، به نظر می‌رسد که تأثیر استاتین‌ها بر پیشرفت رگ‌زایی در بیماران دیابتی که معمولاً با این داروها درمان می‌شوند، مهم باشد. نشان داده شد که رگ‌زایی توسط مکانیسم‌های مرتبط با دیابت اصلاح می‌شود و پیشرفت رگ‌زایی در بیماران دیابتی در مقایسه با بیماران بدون اختلالات متابولیک کمی متفاوت است (۳۸).

خاتری<sup>۴</sup> و همکاران (۳۹) نشان داد که ROS (گونه‌های اکسیژن فعال) بیان VEGF را در سلول‌های عضله صاف (SMCs) ترویج می‌کند. اگرچه این مطالعه به PBMCها

معنادار بود. ورزش می‌تواند با تحریک بیان پروتئین‌های MiR-126 و VEGF، روند رگ‌زایی قلبی را در جمعیت دیابتی به‌طور چشمگیری تسریع و افزایش دهد. در حمایت از این نظریه کاربردی، افزایش چشمگیر در تعداد و تراکم مویرگ‌های میوکارد موش صحرایی با استفاده از یک برنامه شنای ویژه موش صحرایی متشکل از ۵ روز در هفته به دلیل تغییرات در دو مسیر سیگنالینگ شامل VEGF/Raf-1/ERK و VEGF/P13K/AKT بود (۲).

ورزش همچنین می‌تواند پروتئین‌های SPRED1 و PIK3R2 را با تنظیم بیش از حد بیان MiR-126 مسدود کند. بنابراین می‌توان گفت که ورزش ساختاریافته و هدفمند می‌تواند یک داروی کم‌عارضه ارزشمند باشد که به‌طور چشمگیری باعث تنظیم بیش از حد رگ‌زایی، تسریع و بهبود جریان خون کرونر و در نهایت بهبود عملکرد بیماران قلبی دیابتی<sup>۱</sup> DHD می‌شود. (۱۱). اثر برجسته تمرین تناوبی با شدت بالا بر توسعه ظرفیت هوازی و عملکرد قلبی عروقی در افراد سالم و بیماران قلبی عروقی در مقایسه با تمرینات مداوم با شدت متوسط (MICT)، ثابت شده است (۱۲). سبزواری راد و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای روی موش‌های صحرایی دیابتی ثابت کردند که یک دوره (۶ هفته) HIIT منجر به افزایش قابل توجه بیان miR-126 ژن قلبی و افزایش غلظت سرمی پروتئین‌های VEGF و Raf-1 شد. و کاهش غلظت سرمی Spred-1 و همچنین مکانیسم‌های رگ‌زایی ایجادشده توسط HIIT و آبخار سیگنالینگ (miR-) (126/Spred-1/Raf-1/VEGF) ثابت کرده است که تمرین تناوبی با شدت بالا یک عامل درمانی بالقوه و ارزان در درمان عوارض بیماری قلبی دیابتی و تقویت فرایند رگ‌زایی است (۱۳).

تمرین ورزشی باعث افزایش سطح بیان mRNA کاهش سیگنالینگ VEGF، از جمله  $HIF1\alpha$ ، VEGF، و VEGFR2 در هیپوکامپ موش‌های تزریق‌شده با  $A\beta$

<sup>2</sup> Wesolowska

<sup>3</sup> Peripheral Blood Mononuclear Cell Secretion

<sup>4</sup> Khatri

<sup>1</sup> Diabetic Heart Disease

می‌دهد. VEGF، Ang-2 و MMP9 باعث افزایش نفوذپذیری عروق، کاهش بلوغ و تثبیت عروق و تحریک التهاب می‌شود. بنابراین، افزایش بیان VEGF، Ang-2 و MMP9 ناشی از دوز بالای آترواستاتین ممکن است میزان جذب هماتوم را کاهش دهد. همچنین، آترواستاتین در دوزهای بالا ممکن است خطر خونریزی داخل مغزی را افزایش دهد یا خطر آن را تسریع کند (۴۳). مطالعات مختلف با استفاده از مداخلات ورزشی و غیرورزشی (دارویی) توانسته‌اند با تأثیر بر رگ‌زایی قلب، روند بهبود بیماران دیابتی را تسریع بخشند. وجه مشترک همه این مطالعات (چه بر اساس ورزش، دارو، و روش‌های دیگر) این است که آنژیوژنز قلبی را از طریق آبخارهای مختلف سیگنالینگ تقویت و افزایش می‌دهند و در نهایت دیابت را بهبود می‌بخشند. البته یادآوری این نکته حائز اهمیت است که HIIT در مقایسه با (MICT) تأثیر بارزتری بر رگ‌زایی قلب دارد (Rad RS, 2022). مکانیسم‌های متعددی برای افزایش رگ‌زایی قلب با تمرین HIIT در مقایسه با MICT وجود دارد؛ HIIT منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی و بار انرژی از طریق کالمودولین و کلسینورین می‌شود که با افزایش PGC-1a منجر به افزایش رگ‌زایی قلب می‌شود، HIIT همچنین HIF-1a را افزایش داده و متعاقباً پس از این تمرینات و افزایش رگ‌زایی با افزایش جریان خون کرونر، NO تولید می‌کند (۴۴). HIIT با افزایش GH، IGF-I (PI3K/AKT/mTOR)، آدنوزین، تخریب pcr را کاهش داده و گلیکوژنز عضلانی را افزایش می‌دهد، که تولید NO و در نهایت بیان VEGF و رگ‌زایی را افزایش می‌دهد (۴۵). از طرفی، HIIT منجر به بهبود پروفایل گلوکز و مهار عوامل ضد رگ‌زایی و افزایش تنظیم VEGF، VEGF-R2 می‌شود که در نهایت منجر به افزایش رگ‌زایی می‌شود (۴۶). همچنین HIIT منجر به دفسفوریلاسیون AMP از طریق آنزیم اکتو ۵ نوکلئوتیداز و افزایش سطح آدنوزین می‌شود که با افزایش تولید NO و بیان VEGF در نهایت پدیده رگ‌زایی را افزایش می‌دهد (۴۷). HIIT

اشاره نکرد، اما به‌وضوح نشان داد که تولید VEGF به‌شدت با رادیکال‌های آزاد مرتبط است، بدون شک با وجود هیپرگلیسمی مرتبط است. در واقع، این مفهوم می‌تواند تا حدودی مکانیسمی را نیز توضیح دهد که استاتین‌ها، به‌عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی، ترشح VEGF وابسته به گلوکز را کاهش می‌دهند (۱۹).

وانگ<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند استاتین‌ها در کاهش لیپیدهای پلاسما، سرکوب التهاب و ترویج رگ‌زایی فعال هستند. از آنجایی که رگ‌زایی برای جذب هماتوم سابدورال<sup>۲</sup> (SDH) حیاتی است، آترواستاتین رگ‌زایی را برای افزایش جذب هماتوم ترویج می‌کند (۴۰). حجم SDH به‌طور قابل توجهی کاهش یافت و نقایص عصبی در موش‌هایی که دوز پایین آترواستاتین دریافت کردند در مقایسه با موش‌هایی که دوز بالای آترواستاتین یا سالین دریافت کردند، بهبود یافت. مطابق با این معیارهای نتیجه، آترواستاتین با دوز پایین بیان آنژیوپوئنت-۱ و VEGF را افزایش داد و بیان MMP2 را در بافت همبند دیواره SDH کاهش داد، که منجر به افزایش تراکم عروقی و افزایش بلوغ عروقی شد (۴۰).

بیان MMP2 در نئومیران موش‌هایی که آترواستاتین با دوز پایین دریافت می‌کردند در مقایسه با موش‌هایی که آترواستاتین با دوز بالا یا سالین دریافت می‌کردند کمتر بود (۴۰). این متالوپروتئاز، کلاژن نوع IV را که یکی از اجزای اصلی غشای پایه است تجزیه می‌کند (۴۱). بنابراین، MMP2 بیشتر می‌تواند عروق را با افزایش تخریب غشای پایه بی‌ثبات کند (۴۲)؛ و کاهش بیان MMP2 ناشی از ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم آترواستاتین ممکن است برای بالغ‌شدن عروق تازه تشکیل‌شده ضروری باشد (۴۰).

تحقیقات نشان داد که دوز بالای آترواستاتین به‌طور قابل توجهی بیان VEGF، Ang-2 و همچنین بیان فاکتور التهابی MMP9 را در بافت مغز آسیب‌دیده افزایش

<sup>1</sup> Wang<sup>2</sup> Subdural hematoma

MMP بافت آئورت موش‌های سفید بزرگ آزمایشگاهی دیابتی هستند، که در اثر القای دیابت افزایش یافتند.

### ملاحظات اخلاقی

این تحقیق در قالب رساله دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری با کد اخلاق NO.19.33.2018 انجام شد.

### تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

باعث افزایش جریان خون عضلانی (۱۰-۲۰ برابر) و در نتیجه افزایش استرس از طریق فعال‌سازی PI3K/AKT/eNOS می‌شود که منجر به افزایش تولید NO می‌شود و با افزایش بیان VEGF باعث افزایش روند رگ‌زایی می‌شود (۴۸). نهایتاً، HIIT طول عضله را نسبت به استراحت افزایش می‌دهد و در نتیجه MMPها را در ECS افزایش می‌دهد که در نهایت با افزایش تجزیه غشای پایه از طریق Ca منجر به رگ‌زایی می‌شود (۴۹). پیام مقاله: همان‌گونه که از نتایج پیداست بهترین نتیجه در گروه‌های ترکیبی تمرین تناوبی و تداومی به همراه داروی آترواستاتین به دست آمد، که نشان از اثر هم‌افزایی تمرین ورزشی و داروی آترواستاتین در کاهش سطوح VEGF و

### منابع

1. Wang Y, Zhu J, Chen J, Xu R, Groth T, Wan H, et al. The signaling pathways induced by exosomes in promoting diabetic wound healing: a mini-review. *Current Issues in Molecular Biology* 2022; (44)10:4960-4976.
2. Ghaffari R, Salimi Rad M. Effect of exercise and non-exercise interventions on cardiac angiogenesis in diabetes mellitus patients: a review. *International Journal of Diabetes and Endocrinology* 2022;7(1).
3. Rawal Sh, Ram TP, Coffey S, Williams M J A, Saxena P, Bunton RW, et al. Differential expression pattern of cardiovascular microRNAs in the human type-2 diabetic heart with normal ejection fraction. *International Journal of Cardiology* 2016; 202:40-43.
4. Asmal AC, Leary WP, Thandroyen F. Diabetic heart disease. *South African Medical Journal* 1980; 57(19):788-790.
5. Rask-Madsen Ch, King G L. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metabolism* 2013; 17(1):20-33.
6. Robert D G, Tepper O M, Pelo C R, Bhatt K A, 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): 1935-1947.
7. Asgari R, Vaisi-Raygani A, Aleagha MS, Mohammadi P, Bakhtiari M, Arghiani N. CD147 and MMPs as key factors in physiological and pathological processes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2023;157: 113983.
8. Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators of Inflammation* 2013;928315. doi: 10.1155/2013/928315.
9. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2005;9(2):267-85.
10. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS Journal* 2011;278(1):16-27.
11. Silva Jr ND DA, Fernandes T, Soci UPR, Monteiro AW, Phillips MI, Edilamar Menezes DE Oliveira E M DE. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2012;44(8):1453-62.
12. Gibala M J, McGee S L. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain?. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 2008; 36(2):58-63.
13. Sabzevari Rad R, Shirvani H, Mahmoodzadeh Hosseini H, Shamsoddini A, Samadi M. Micro RNA-126 promoting angiogenesis in diabetic heart by VEGF/Spred-1/Raf-1 pathway: effects of high-intensity interval training. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 2020; 19(2): 1089-1096.
14. Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: Molecular mechanisms and clinical results. *Trends in Molecular Medicine* 2008; 14:37-44.
15. Colhoun H M, Betteridge D J, Durrington, P N, Hitman G A, Neil H A, Livingstone S J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): Multicentre randomised placebo-

- controlled tri-al. *Lancet* 2004; 364: 685-696.
16. Zhou J, Cheng M, Liao YH, Hu Y, Wu M, Wang, Q, et al. Rosuvastatin enhances angiogenesis via eNOS-dependent mobilization of endothelial progenitor cells. *PLoS ONE* 2013; 8: e63126.
  17. Garjani A; Rezazadeh H; Andalib S; Ziaee M; Doustar Y; Soraya H; et al. Ambivalent effects of atorvastatin on angiogenesis, epidermal cell proliferation and tumorigenesis in animal models. *Iran. Biomedical Journal*. 2012; 16:59-67.
  18. Müick AO, Seeger H, Wallwiener D. Class-specific pro-apoptotic effect of statins on human vascular endothelial cells. *Z. Kardiol* 2004; 93: 398-402.
  19. Wesolowska A, Winiarska H, Owoc J, Borowska M, Domagała J, Mikołajczak PL, et al. Effects of Low-Dose Atorvastatin on the Peripheral Blood Mononuclear Cell Secretion of Angiogenic Factors in Type 2 Diabetes. *Biomolecules* 2021;11(12):1885.
  20. Zeng H, Liu Zh. Atorvastatin Induces Hepatotoxicity in Diabetic Rats via Oxidative Stress, Inflammation, and Anti-Apoptotic Pathway. *Medical Science Monitor* 2019; 25: 6165-6173.
  21. Liu B, Peng XC, Zheng XL, Wang J, Qin YW. MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung Cancer* 2009;66(2):169-75.
  22. Lin CJ, Lan YM, Ou MQ, Ji LQ, Lin SD. Expression of miR-217 and HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway in patients with diabetic foot ulcer and its effect on angiogenesis of diabetic foot ulcer rats. *Journal of endocrinological investigation*. 2019;42(11):1307-17.
  23. Ahmad J, Zubair M, Malik A, Siddiqui MA, Wangnoo SK. Cathepsin-D, adiponectin, TNF- $\alpha$ , IL-6 and hsCRP plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlation with clinical variables: a multicentric study. *The Foot* 2012;22(3):194-9.
  24. Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooei MK, Ghahary A. Critical role of transforming growth factor beta in different phases of wound healing. *Advances in Wound Care* 2013;2(5):215-24.
  25. Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Shiratsuchi H, Motohashi M, Matsumura H. The effect of IL-1 $\beta$  on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes. *Life Sciences*. 2005;77(25):3210-21.
  26. Rohani MG, Parks WC. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biology* 2015;44:113-21.
  27. Lv Y, Ge L, Zhao Y. Effect and mechanism of SHED on ulcer wound healing in Sprague-Dawley rat models with diabetic ulcer. *Lancet* 2004;364(9435):685-96.
  28. Jeon O, Song SJ, Bhang SH, Choi CY, Kim MJ, Kim BS. Additive effect of endothelial progenitor cell mobilization and bone marrow mononuclear cell transplantation on angiogenesis in mouse ischemic limbs. *Journal of Biomedical Science* 2007;14(3):323-30.
  29. Keating AM, Jacobs DS. Anti-VEGF treatment of corneal neovascularization. *The Ocular Surface* 2011;9(4):227-38.
  30. Kuhlencordt PJ, Rosel E, Gerszten RE, Morales-Ruiz M, Dombkowski D, Atkinson WJ, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2004;286(5):C1195-202.
  31. Losi P, Briganti E, Errico C, Lisella A, Sanguinetti E, Chiellini F, et al. Fibrin-based scaffold incorporating VEGF-and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice. *Acta Biomaterialia* 2013 ;9(8):7814-21.
  32. Zhang EY, Gao B, Shi HL, Huang LF, Yang L, Wu XJ, et al. 20 (S)-Protopanaxadiol enhances angiogenesis via HIF-1 $\alpha$ -mediated VEGF secretion by activating p70S6 kinase and benefits wound healing in genetically diabetic mice. *Experimental & Molecular Medicine* 2017;49(10):e387.
  33. Sunkari VG, Lind F, Botusan IR, Kashif A, Liu ZJ, Ylä-Herttuala S, et al. Hyperbaric oxygen therapy activates hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), which contributes to improved wound healing in diabetic mice. *Wound Repair and Regeneration* 2015;23(1):98-103.
  34. Zarezaadmehrzi A, Hong J, Lee J, Rajabi H, Gharakhanlu R, Naghdi N, et al. Exercise training ameliorates cognitive dysfunction in amyloid beta-injected rat model: possible mechanisms of Angiostatin/VEGF signaling. *Metabolic Brain Disease* 2021;36(8):2263-71.
  35. Pedrinolla A, Venturelli M, Fonte C, Tamburin S, Di Baldassarre A, Naro F, et al. Exercise training improves vascular function in patients with Alzheimer's disease. *European Journal of Applied Physiology* 2020;120(10):2233-45.
  36. Guo H, Xia D, Liao S, Niu B, Tang J, Hu H, et al. Vascular endothelial growth factor improves the cognitive decline of Alzheimer's disease via concurrently inducing the expression of ADAM10 and reducing the expression of  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1 in Tg2576 mice. *Neuroscience Research* 2019;142:49-57.
  37. Weis M, Heeschen C, Glassford A J, Cooke J P. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002; 105:739-745.
  38. Zimering M B, Anderson R J, Ge Ling, Moritz T E. Increased plasma basic fibroblast growth factor is associated with coronary heart disease in adult type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2011; 60:284-291.
  39. Khatri J J, Johnson C, Magid R, Lessner S M, Laude K M, Dikalov S I, Harrison D G; et al. Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. *Circulation* 2004; 109(4):520-525.
  40. Wang D, Li T, Wei H, Wang Y, Yang G, Tian

- Y, et al. Atorvastatin enhances angiogenesis to reduce subdural hematoma in a rat model. *Journal of the neurological sciences* 2016;362:91-9.
41. Naduk-Kik J, Hrabec E. [The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of diabetes mellitus and progression of diabetes retinopathy]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2008;62:442-50.
  42. Yan T, Chopp M, Ning R, Zacharek A, Roberts C, Chen J. Intracranial aneurysm formation in type-one diabetes rats. *PloS One* 2013;8:e67949.
  43. Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A, 3rd, Goldstein LB, Hennerici M, Rudolph AE, et al. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *The New England Journal of Medicine* 2006;355:549-59.
  44. Len K, Zuhl M. High intensity interval training vs. continuous cardio training: battle of the aerobic titans 2014.
  45. Hudlicka O, Brown MD. Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor. *Journal of Vascular Research* 2009;46(5):504-12.
  46. Ilkhanizadeh B, Shirpoor A, Khadem Ansari M H, Nemati S, Rasmi Y. Protective effects of ginger (*Zingiber officinale*) extract against diabetes-induced heart abnormality in rats. *Diabetes & Metabolism Journal* 2016;40(1):46-53.
  47. Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2012;1822(1):2-8.
  48. Kadoglou NP, Vrabas IS, Sailer N, Kapelouzou A, Fotiadis G, Noussios G, et al. Exercise ameliorates serum MMP-9 and TIMP-2 levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism* 2010;36(2):144-51.
  49. Nazari M, Kordi MR, Choobineh S. The Effect of High Intensity Interval Training (HIIT) on Gelatinase-A (MMP-2) Serum Levels and Muscle Damage Indices in Young Sedentary Girls. *Journal of Arak University of Medical Sciences* 2015;18(1):78-86.