Journal of Sport and Exercise Physiology
Spring 2022/Vol.15/No.1/11-20

The effect of eight weeks of endurance training along with cinnamon extract consumption on expression of angiogenic markers in endothelial dysfunction of the coronary arteries in streptozotocin-diabetic male rats

Amir Houshang Monzemi [1], Zaher Etemad [*1], Afshin Nazari [2], Mohsen Mohammadi [2]

1 Department of Physical Education, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

2 Razi Herbal Medicines Research Center, Department of Pharmaceutical Biotechnology Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

Original Article

Abstract

Purpose: Angiogenesis refers to the formation of new blood vessels from existing vessels, which is an important event in various physiological processes. In this study, the role of exercise along with the consumption of cinnamon bark extract on the expression of important genes in angiogenesis in diabetic male rats was examined.

Methods: In this study, 24 diabetic male rats (50 mg/kg streptozotocin (STZ)) with 180-220-gram weight and 8-10 weeks old, were randomly divided into four groups, consisting of 1- Control diabetic (CD), 2-Diabetic+cinnamon (D+CZ), 3- Diabetic+exercise (D+E), 4- Diabetic+cinnamon+exercise (D+CZ+E). To investigate the effect of diabetes induction on research variables, six rats were in the healthy control group. Then groups three and four trained for eight weeks, five sessions per week and each session for 10-30 minutes at a speed of 10-18 meters per minute and Groups two and five received 200 mg / kg of cinnamon extract daily by gavage. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test in SPSS software version 22 software were used to analyze the data ($P \geq 0.05$).

Results: endothelin-1 ($P \geq 0.05$) and eNOS ($P \geq 0.05$) gene expression in the diabetic control group were significantly higher than the healthy control group. eNOS and VEGF levels in the exercise group, cinnamon consumption group and endurance training group + cinnamon were not significantly different from the diabetic control group ($P \leq 0.05$). But endothelin-1 levels in the endurance training + cinnamon group were higher than the diabetic control group ($P \geq 0.05$).

Conclusion: Endurance training and cinnamon bark extract with the present study method amount do not have a significant effect on some angiogenesis markers in the heart tissue of diabetic rats, although due to limited information on the mechanism of the effect of streptozotocin on angiogenesis in Cardiac tissue further studies are needed in this area.

Keywords: Diabetes, Endurance Exercise and Cinnamon Extract Edn1, eNOS, VEGF End1.

How to cite this article Monzemi A, Etemad Z, Nazari A, Mohammadi M. The effect of eight weeks of endurance training with cinnamon extract on the expression of angiogenic markersin endothelial dysfunction of the coronary arteries in streptozotocin-diabetic male rats. Journal of Sport and Exercise Physiology 2022;15(1):11-20

*Corresponding Author; E-mail: zetemad2002@yahoo.com
DOI: 10.52547/joeppa.15.1.11

Received: 14/06/2020 Revised:11/10/2020 Accepted: 13/10/2020

نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی
بهار ۱۴۰۱/ دوره ۱۵/ شماره ۱/ صفحه‌های ۱۱-۲۰

اثر هشت هفته تمرین استقامتی توأم با مصرف عصارۀ چوب دارچین بر بیان نشانگران آنژیوژنیک در بافت قلب موش‌های صحرایی نر دیابتی‌شده با استروپتوزتوسین

امیرهوشنگ منظمی[۱]، ظاهر اعتماد[۴*]، افشین نظری[۲]، محسن محمدی[۲]

۱ گروه تربیت بدنی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

۲ مرکز پژوهش‌های داروهای گیاهی رازی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

مقاله پژوهشی

چکیده

هدف: فرایند رگ‌زایی به تشکیل عروق خونی جدید از عروق موجود اطلاق می‌شود که رویدادی مهم در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی است. در این تحقیق نقش تمرین استقامتی توأم با مصرف عصارۀ چوب دارچین روی بیان برخی نشانگرهای رگ‌زایی در موش‌های صحرایی نر دیابتی‌شده با استروپتوزتوسین (STZ) بررسی شد.

روش‌ها: در این تحقیق تجربی ۲۴ سر موش صحرایی نر دیابتی‌شده با STZ ۵۰mg /kg با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم و محدودۀ سنی ۸ تا ۱۰ هفته، به‌صورت تصادفی به چهار گروه ۱. کنترل دیابتی، ۲. دیابتی+مصرف دارچین، ۳. دیابتی+تمرین استقامتی و ۴. دیابتی+مصرف دارچین+تمرین استقامتی تقسیم شدند. به‌منظور بررسی اثر القای دیابت بر متغیرهای پژوهش شش سر موش صحرایی در گروه کنترل سالم قرار گرفتند. در ادامه گروه‌های ۳ و ۴ به مدت هشت هفته، پنج جلسه در هفته و هر جلسه ۱۰-۳۰ دقیقه، با سرعت ۱۰-۱۸ متر بر دقیقه به تمرین استقامتی پرداختند و گروه‌های ۲ و ۵ روزانه ۲۰۰ mg /kg عصارۀ دارچین را به‌صورت گاواژ دریافت کردند. به‌منظور تجزیه‌وتحلیل یافته‌های پژوهش از آزمون تحلیل واریانس یکراهه همراه با آزمون تعقیبی توکی در نرم‌افزار SPSS نسخۀ ۲۲ استفاده شد (P≤۰/۰۵).

نتایج: سطوح بیان ژنی اندوتلین-۱ (p≤۰/۰۵) و eNOS (P≤۰/۰۵) و در گروه کنترل دیابتی به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل سالم بود. سطوح eNOS و VEGF در گروه تمرین، گروه مصرف دارچین و گروه تمرین استقامتی+ دارچین تفاوت معناداری با گروه کنترل دیابتی نداشت (P≥۰/۰۵). اما سطوح اندوتلین-۱ در گروه تمرین استقامتی+دارچین بالاتر از گروه کنترل دیابتی بود (P≤۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: بهنظر می‌رسد تمرین استقامتی با روش تحقیق حاضر و عصارۀ پوست دارچین با این مقدار اثر معناداری بر برخی نشانگرهای آنژیوژنز در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت ندارد، هرچند با توجه به محدودیت اطلاعات در خصوص سازوکار اثر استروپتوزتوسین بر آنژیوژنز در بافت قلب تحقیقات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: آنژیوژنز، تمرین استقامتی، دیابت، عصارۀ دارچین.

* نویسنده مسئول: رایانامه: zetemad2002@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۲

مقدمه

دیابت نوعی بیماری متابولیکی است که با سطح بالای قند خون و اختلالات انسولین مشخص می‌شود (۱). براساس نتایج تحقیقات تعداد این بیماران در جوامع بشری به‌شدت در حال افزایش است، به‌گونه‌ای که پیش‌بینی می‌شود طی بیست سال آینده تعداد افراد مبتلا به دیابت به ۶۴۲ میلیون افزایش یابد. بیماری دیابت در طولانی‌مدت، خطر ابتلا به اختلالات کلیوی، قلبی-عروقی و نقص عملکرد کبدی را افزایش می‌دهد (۱). پژوهشگران بر این باورند که بیماری دیابت موجب کاهش رشد و توسعهٔ عروق جانبی کرونر، کاهش قطر مویرگ‌ها، کاهش نسبت مویرگ‌ها به فیبرها، کاهش ظرفیت انتشار مویرگ‌ها و همچنین اختلال در تنظیم همودینامیک عروق عضلات می‌شود (۲). همچنین اختلال در تنظیم اتساع و انقباض عروقی و افزایش فعالیت‌های التهابی با هیپرگلیسمی و دیس لیپیدمی و التهاب ناشی از بیماری دیابت ارتباط مستقیم دارد، به‌گونه‌ای که اختلالات انسولینی از دو مسیر افزایش فشار اکسایشی، و افزایش عوامل التهابی با افزایش اندوتلین-۱ و کاهش نیتریک اکساید (NO) در ارتباط است (۳).کاهش فسفوریلاسیون در بستر گیرندهٔ انسولین-۱ (IR-1)، کاهش فسفاتیدیل اینوزیتول تری کیناز (PI3K) /پروتئین کیناز B (PKB/Akt) می‌شود و آنزیم نیتریک اکساید اندوتلیالی (eNOS) و عامل رشد عروق اندوتلیال (VEGF) را کاهش و سطوح اندوتلین-۱ را همراه با مقاومت به انسولین افزایش می‌دهد (۳). با توجه به نقش پیشبرد اختلالات اندوتلیالی در بیماری‌های قلبی- عروقی ناشی از دیابت، پژوهشگران انجام فعالیت‌های ورزشی به‌عنوان راهکاری غیرتهاجمی در بهبود شاخص‌های گلایسمیک و نیمرخ چربی را پیشنهاد داده‌اند (۴). به‌نظر می‌رسد فعالیت‌های ورزشی با بهبود پاسخ اتساع عروقی حاصل از جریان خون تغییرات متوالی در تنش برشی و افزایش آن به افزایش فعالیت زیستی NO و بهبود عملکرد اندوتلیال عروقی منجر می‌شود. علاوه‌بر این حین فعالیت ورزشی سلول‌های اندوتلیال تحت کشش قرار می‌گیرند و سرعت رهاسازی VEGF افزایش می‌یابد. این افزایش می‌تواند تأثیرات مفیدی بر بیان VEGF در شرایط پاتولوژیکی مانند دیابت اعمال داشته باشد (۳). VEGF میانجی اصلی رگ‌زایی در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی است و نقش مهمی در توسعهٔ شکل‌گیری عروق خونی و تنظیم آنژیوژنز در بافت دچار هایپوکسی دارد. فعالیت ورزشی از طریق افزایش حساسیت انسولینی بافت‌های محیطی سبب هیپوگلیسمی و کاهش عوارض دیابت می‌شود (۵). از طرفی شواهد حاکی از آن است که NO نیز ممکن است بیان ژن VEGF را تحریک کند (۵). سلول‌های اندوتلیال عروق از طریق تولید مواد فعال عروق مانند اندوتلین -۱ و NO نقش مهمی در تنظیم فعالیت عروق ایفا می‌کنند (۶). اندوتلین-۱ نوعی پپتید منقبض‌کنندهٔ عروق است که به‌وسیلهٔ سلول‌های اندوتلیال تولید می‌شود و تأثیر انقباضی قوی در سلول‌های اندولیال عروق انسان دارد و نقش مهمی در تکثیر سلول‌های عضلهٔ صاف عروق داشته و در بیماری‌های قلبی و اترواسکلروز و رگ زایی نقش دارد (۷). در این زمینه پژوهشگران نشان دادند شش هفته تمرین هوازی موجب افزایش NO و کاهش گلوکز و مقاومت به انسولین شد، اما اثر معناداری بر انسولین و نیمرخ چربی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نداشت. همچنین ده هفته تمرینات ورزشی موجب افزایش اوج اکسیژن مصرفی و NO در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو شد (۳).

از سویی علاوه‌بر فعالیت‌های ورزشی پژوهشگران بر این عقیده‌اند که رژیم غذایی مناسب و استفاده از ضداکسایش‌های گیاهی در کنار فعالیت‌های ورزشی نقش مهمی در بهبود عوارض ناشی از دیابت دارد (۱). براساس نتایج تحقیقات بنیان‌های آزاد با اختلال در اتساع و انقباض عروقی بر شدت و دوام عروق و از بین رفتن عروق نقش دارند (۸). ولی ضداکسایش‌ها پیش از اینکه آسیبی به بافت‌های بدن وارد شود، آن‌ها را خنثی می‌کنند (۷). دارچین گیاهی با نام علمی Cinnamomum verum است؛ این گیاه از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی است که در طب سنتی به‌عنوان داروی مهم کاربرد داشته است. قسمت‌های مختلف این گیاه از جمله پوست آن خواص درمانی زیادی دارد، به‌طوری‌که مصرف آن سبب تقویت قلب، معده و روده می‌شود. سطح بالای مواد آنتی‌اکسیدان موجود در دارچین سبب می‌شود تا این گیاه به‌عنوان محافظ سلول در برابر آسیب‌های شیمیایی شامل سموم محیطی، کاهش پراکسیدهای لیپیدی و محافظت کبد در برابر انواع فشارآفرین‌ها عمل کند. بدین‌ترتیب دارچین به‌عنوان آنتی‌اکسیدانی مؤثر در افراد چاق مبتلا به دیابت و بیماری‌های قلبی

و سندروم متابولیک می‌تواند ایفای نقش کند (۹). در این زمینه پژوهشگران نشان دادند که مصرف دارچین با سازوکار کاهش فشار اکسایشی و افزایش ظرفیت ضداکسایشی تام موجب افزایش VEGF، عامل رشد فیبروبلاست-۱ (FGF-1) و عامل رشد شبه‌انسولین-۱ (IGF-1) می‌شود (۱۰). همچنین مصرف دارچین موجب بهبود نیمرخ چربی، کاهش فشار اکسایشی و بهبود عملکرد قلبی-عروقی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو می‌شود (۱۱). علاوه‌بر این در راستای بررسی همزمان مکمل‌دهی دارچین و تمرینات ورزشی پژوهشگران نشان داده‌اند استفادهٔ همزمان دارچین و تمرینات هوازی موجب کاهش انسولین و بهبود سطوح قند خون بیماران مبتلا به دیابت نوع دو شد، اما تفاوت معناداری در گروه‌های پژوهش وجود نداشت (۱۲). همچنین هشت هفته تمرین هوازی همراه با مصرف دارچین موجب کاهش انسولین، گلوکز، شاخص مقاومت به انسولین و همچنین بهبود سطوح رتینول متصل به پروتئین ۴ (RBP4) موش‌های صحرایی مبتلا به اختلال گلوکز شد (۱۳).

با وجود بررسی‌های متفاوت هنوز سازوکار اثر تعاملی تمرینات ورزشی همراه با مکمل‌دهی دارچین بر عوامل مؤثر در آنژیوژنز در بافت قلب به‌خوبی شناخته نشده است، ازاین‌رو به‌نظر می‌رسد انجام مطالعاتی که بتواند اطلاعات بیشتری را در این زمینه در اختیار پژوهشگران قرار دهد، می‌تواند در درمان و پیشگیری از بیماری‌های قلبی- عروقی در بیماران دیابتی مؤثر واقع شود. ازاین‌رو تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر تمرین استقامتی توأم با مصرف عصارهٔ چوب دارچین بر بیان نشانگران آنژیوژنیک در بافت قلب موش‌های صحرایی نر دیابتی‌شده با استروپتوزتوسین (STZ) انجام گرفت.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش: در این تحقیق تجربی و از نوع بنیادی با طرح پس‌آزمون همراه با گروه کنترل تعداد ۳۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدودهٔ وزنی ۲۰۰ تا ۲۳۲ گرم و سن تقریبی ۸-۱۰ هفته، از بخش آزمایشگاه حیوانی دانشگاه علوم پزشکی لرستان تهیه و به‌منظور طی یک دورهٔ هفت‌روزه سازگاری با محیط در بخش آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی این آزمایشگاه نگهداری شدند. شایان ذکر است که تمام اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی در این پژوهش تحت نظارت کمیتهٔ اخلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان با کد (IR.MUK.REC.1398/5008) انجام گرفت و موش‌های صحرایی طی این دوره در شرایط استاندارد از نظر دما (۲۲ تا ۲۴ درجهٔ سانتی‌گراد)، رطوبت نسبی ۵۵ تا ۶۰ درصد، چرخهٔ روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. همچنین از تراشهٔ چوب استریل به‌منظور جذب ادرار و تنظیف کف قفس‌های پلی‌کربنات با قابلیت اتوکلاو استفاده شد. پس از طی دورهٔ سازگاری با محیط تعداد ۲۴ سر موش صحرایی در حالت ۱۲ ساعت ناشتا تحت تزریق ۵۰ mg/kg سم STZ (Sigma, St. Louis, MO) حل‌شده در بافر سیترات (pH: ۴/۵) قرار گرفتند. چهار روز پس از تزریق STZ به‌منظور تشخیص دیابت (دیابت نوع یک) قند خون موش‌های صحرایی با استفاده از گلوکومتر به روش پانچ کردن از دم اندازه‌گیری شد و موش‌های صحرایی با قند خون بالای ۳۰۰ mg/dl به‌عنوان موش دیابتی در نظر گرفته شدند (۱۴). در ادامه ۲۴ سر موش صحرایی دیابتی براساس قند خون ناشتا به گروه‌های کنترل سالم، کنترل دیابتی، گروه دیابتی + مصرف دارچین، گروه دیابتی + تمرین استقامتی، و گروه دیابتی + تمرین استقامتی + مصرف دارچین تقسیم شدند. شایان ذکر است به‌منظور بررسی تأثیرات القای دیابت بر متغیرهای پژوهش تعداد شش سر موش صحرایی سالم در گروه کنترل سالم قرار گرفتند. موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین استقامتی به مدت هشت هفته، پنج جلسه در هفته و هر جلسه به مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه و با سرعت ۱۰ تا ۱۸ متر بر دقیقه به تمرین پرداختند (۱۵). همچنین موش‌های صحرایی گروه‌های مصرف دارچین روزانه ۲۰۰ mg/kg عصارهٔ هیدروالکلی پوست دارچین را به‌صورت گاواژ دریافت کردند (۲۷). در ادامه ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین و مکمل‌دهی، در حالت ۱۶ ساعت ناشتا موش‌های صحرایی با استفاده از کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلوزین (۵ mg/kg) بی‌هوش شدند. پس از تشخیص بی‌هوشی کامل و بی‌دردی، ناحیهٔ شکم موش‌های صحرایی شکافته شد و بافت قلب موش‌های صحرایی توسط متخصصان استخراج شد، پس از توزین و شست‌وشو در محلول ازت مایع قرار گرفت و به‌منظور انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد فریز شد.

روش اجرای پژوهش: روش تمرین استقامتی: در این تحقیق مداخلهٔ تمرین استقامتی با شدت متوسط استفاده شد؛ در این برنامه، گروه‌های تمرین استقامتی روی نوار گردان پنج‌کانالهٔ تکنیک‌آزما به مدت پنج جلسه در هفته و به مدت هشت هفته و هر جلسه به مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه و با سرعت ۱۰ تا ۱۸ متر بر دقیقه معادل ۶۵ تا ۷۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه به تمرین پرداختند. سرعت و مدت تمرین نوار گردان به‌منظور رعایت اصل اضافه بار به‌تدریج افزایش یافت (۱۵).

تهیهٔ عصارهٔ پوست ساقهٔ دارچین: همچنین به‌منظور تهیهٔ عصارهٔ هیدروالکلی پوست ساقهٔ دارچین ابتدا پوست ساقهٔ دارچین از عطاری سطح خرم‌آباد تهیه شد و پس از تأیید کارشناس آزمایشگاه، ابتدا چوب ساقهٔ دارچین با استفاده از دستگاه آسیاب پودر و در ۲۰ سی‌سی الکل اتیلیک طبی ۹۶ درصد حل شد و مخلوط به‌دست‌آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری و در ادامه ترکیب حاصل با استفاده از (دستگاه همزن مغناطیسی (شیکر به مدت چهار دقیقه کاملاً مخلوط شد و روی کاغذ واتمن، صاف شد. کاغذ و پودر باقیمانده روی آن در دستگاه آون با حرارت ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت یکم‌ونیم ساعت خشک شد. عصارهٔ استخراج جهت حذف الکل، عصاره به مدت ۴۸ ساعت در محیط عاری از آلودگی قرار گرفت تا الکل اضافی تبخیر شود. گروه‌های مصرف دارچین روزانه مقدار ۲۰۰ mg/kg از این عصاره استفاده کردند (۱۶).

روش‌های آزمایشگاهی: استخراج RNA کل از بافت‌های فریزشدهٔ قلب با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت یکتا تجهیز (ترایزول به یک میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری RNase free) و مطابق با روش شرکت سازندهٔ کیت (یکتا تجهیز) انجام گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد و همچنین دستگاه نانودراپ بررسی شد. پس از استخراج RNA کمیت و کیفیت آن با روش UV اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ ارزیابی شد. در روش اسپکتروفتومتری غلظت نمونهٔ RNA، با استفاده از تعیین جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین خلوص RNA از محاسبهٔ نسبت A260/A280 استفاده شد (C (μg/μl) = A۲۶۰ × ε × d /۱۰۰۰). نمونه‌های دارای OD مناسب (محدودهٔ ۱/۸ تا ۲) برای انجام مراحل بعد انتخاب شدند. ساخت رشتهٔ اول cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت یکتا تجهیزآزما (Biofact) و مطابق با روش شرکت سازندهٔ کیت انجام گرفت. به‌منظور طراحی آغازگرهای PCR توالی ژن‌های مربوط به ژن‌های eNOS، VEGFA و Edn1 مربوط به موش صحرایی از نژاد نروژی از بانک ژن پایگاه NCBI، دریافت شد. آغازگرهای PCR با استفاده از نرم‌افزار 7AlleleID و به‌صورت exon-junction طراحی شد تا تکثیر تنها از روی الگوی cDNA صورت گیرد. میزان اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی‌شده با استفاده از نرم‌افزار Primer-BLAST موجود در پایگاه NCBI بررسی شد. فهرست آغازگرهای طراحی‌شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

واکنش Real time PCR با استفاده از مسترمیکس سایبرگرین شرکت یکتا تجهیزآزما و در دستگاه ترموسایکلر Rotor-Gene Q شرکت Qiagen صورت گرفت. از ژن دائمی بتا اکتین به‌عنوان ژن مرجع برای توزیع طبیعی داده‌ها استفاده شد. محاسبهٔ داده‌های بیانی حاصل از واکنش با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ کمی‌سازی شده و تغییرات بیان ژن نسبت به نمونه‌های شاهد محاسبه شد. این محاسبه باید برای تمامی نمونه‌های هدف و نمونه‌های کالیبرکننده (کنترل یا شاهد) انجام گیرد.

$$\Delta C_T \text{ (sample)} = C_T \text{ target gene} - C_T \text{ reference gene}$$

$$\Delta C_T \text{ (calibrator)} = C_T \text{ target gene} - C_T \text{ reference gene}$$

در مرحله بعد میزان $\Delta\Delta C_T$ هر نمونه با کم کردن میزان ΔC_T کالیبراتور از ΔC_T نمونه هدف بدست می‌آید.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ (sample)} - \Delta C_T \text{ (calibrator)}$$

در صورتیکه راندمان تکثیر ژن هدف و ژن کنترل داخلی قابل مقایسه باشد، سطح طبیعی شده بیان ژن هدف با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردد:

$$\text{Normalized target gene expression level in sample} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های مورد بررسی

نام آغازگرها	توالی آغازگرها	طول قطعه تکثیری(جفت باز)	دمای اتصال(درجه سانتی‌گراد)
ACTB-F	5'-CCACACTTTCTACAATGAGC-3'	۱۶۹	۵۵/۴
ACTB-R	5'-ATACAGGGACAACACAGC-3'		
Ednoteline1-F	5'-GACAAAGAACTCCGAGCCCAAAG-3'	۱۶۱	۵۵/۹
Ednoteline1-R	5'-GAGGTCTTGATGCTGTTGCTGATG-3'		
eNOS-F	5'-GCCTGAGCAGCACAAGAGTTAC-3'	۱۵۲	۵۷/۷
eNOS-R	5'-CCAGCCCAAACACACAGAACC-3'		
VEGFA-F	5'-CAATGATGAAGCCCTGGAGTG-3'	۱۵۲	۵۴/۹
VEGFA-R	5'-TTGTTCTATCTTTCTTTGGTCTGC-3'		

تحلیل آماری: برای تجزیه‌وتحلیل یافته‌های پژوهش حاضر نخست طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک آزمون شد. در ادامه به‌منظور تجزیه‌وتحلیل استنباطی و بررسی تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و برای بررسی تفاوت بین گروه‌های پژوهش از آزمون تعقیبی Tukey در نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۲ استفاده شد و سطح معناداری برای تمام تجزیه‌وتحلیل‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

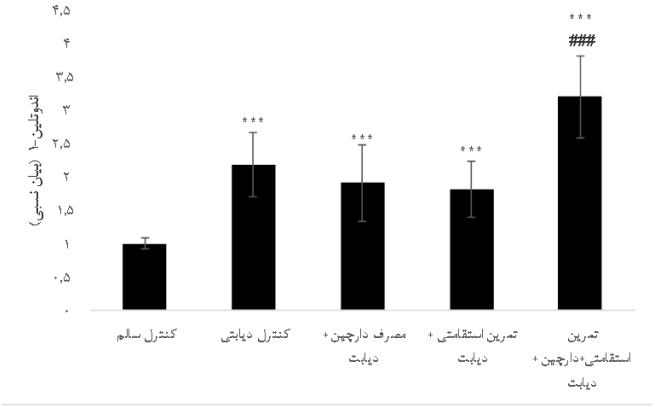
نتایج

سطوح متغیرهای پژوهش در شکل ۱ تا ۳ ارائه شده است. در ادامه نتایج تحلیل واریانس یکراهه نشان داد تفاوت معناداری در سطوح اندوتلین-۱ (P=۰/۰۰۱ و F=۱۶/۸۷)، eNOS (P=۰/۰۰۱ و F=۶/۱۹) و VEGF (P=۰/۰۰۱ و F=۹/۲۹) در گروه‌های پژوهش وجود دارد.

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد سطوح بیان ژنی اندوتلین-۱ در گروه کنترل سالم به‌طور معناداری کمتر از گروه کنترل + دیابت بود (P=۰/۰۰۲). همچنین سطوح اندوتلین-۱ در گروه تمرین استقامتی + دارچین + دیابت بالاتر از گروه کنترل + دیابت بود (P=۰/۰۰۸). ولی تفاوت معناداری در گروه‌های دارچین + دیابت (P=۰/۸۴) و تمرین استقامتی + دیابت (P=۰/۶۵) در مقایسه با گروه کنترل + دیابت وجود نداشت. همچنین سطوح اندوتلین - ۱ در گروه تمرین استقامتی + دارچین + دیابت به‌طور معناداری بالاتر از گروه‌های تمرین استقامتی+ دیابت (P=۰/۰۰۱) و مصرف دارچین+ دیابت (P=۰/۰۰۱) بود. همچنین تفاوت معناداری در گروه تمرین استقامتی+ دیابت در مقایسه با گروه مصرف دارچین + دیابت مشاهده نشد (P=۰/۹۹) (شکل ۱).

سطوح eNOS در گروه کنترل + دیابت به‌طور معناداری بالاتر از گروه کنترل سالم بود (P=۰/۰۰۴)، اما تفاوت معناداری در eNOS در گروه‌های تمرین استقامتی+ دیابت (P=۰/۲۷)، صرف دارچین + دیابت (P=۰/۹۹) و تمرین استقامتی +مصرف دارچین+ دیابت P=۰/۳۳) در مقایسه با گروه کنترل + دیابت مشاهده نشد. تفاوت معناداری در سطوح بیان ژنی eNOS در گروه تمرین استقامتی+ دیابت در مقایسه با گروه مصرف دارچین+ دیابت مشاهده نشد (P=۰/۱۵). همچنین تفاوت معناداری در سطوح eNOS در گروه تمرین استقامتی+ مصرف دارچین+ دیابت در مقایسه با گروه‌های تمرین استقامتی + دیابت (p=۰/۹۹) و مصرف دارچین+ دیابت (P=۰/۳۳) مشاهده نشد (شکل ۲).

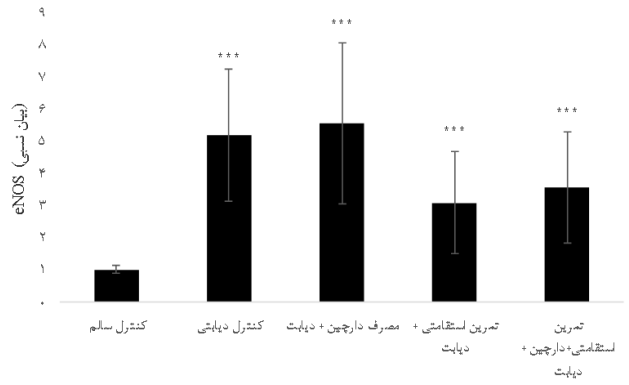
سطوح VEGF در گروه کنترل + دیابت در مقایسه با گروه کنترل سالم وجود نداشت (P=۰/۰۸)، همچنین تفاوت معناداری در سطوح VEGF در گروه‌های مصرف دارچین+ دیابت (P=۰/۲۱)، تمرین استقامتی + دیابت (P=۰/۳۵) و تمرین استقامتی + دارچین+ دیابت (P=۰/۱۲) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. تفاوت معناداری در سطوح VEGF در گروه تمرین استقامتی + دیابت (P=۰/۹۹) و تمرین استقامتی + مصرف دارچین + دیابت (P=۰/۹۹) در مقایسه با گروه مصرف دارچین+ دیابت مشاهده نشد. همچنین تفاوت معناداری بین گروه تمرین استقامتی+ دیابت در مقایسه با تمرین استقامتی+ دارچین+ دیابت (P=۰/۹۷) وجود نداشت (شکل ۳).



شکل ۱. سطوح بیان ژنی اندوتلین-۱ در گروه‌های پژوهش

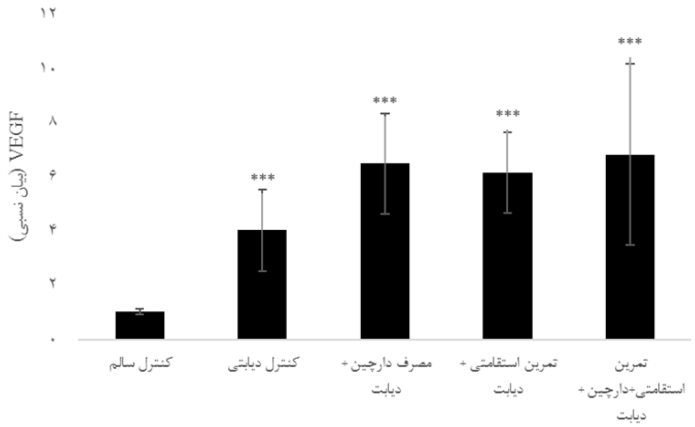
*** (p=۰/۰۱) تفاوت معنادار نسبت به گروه‌های کنترل سالم، کنترل دیابتی، تمرین استقامتی+ دیابت، تمرین استقامتی+ دیابت +دارچین

(p=۰/۰۰)) تفاوت معنادار نسبت به گروه‌های کنترل دیابتی، مصرف دارچین،+ دیابت تمرین استقامتی+ مصرف دارچین + دیابت



شکل ۲. سطوح بیان ژنی eNOS در گروه‌های پژوهش

*** (p=۰/۰۱) تفاوت معنادار نسبت به گروه‌های کنترل سالم، کنترل + دیابت، تمرین استقامتی+ دیابت، تمرین استقامتی+دارچین+ دیابت



شکل ۳. سطوح بیان ژنی VEGF در گروه‌های پژوهش

*** (p=۰/۰۱) تفاوت معنادار نسبت به گروه‌های کنترل سالم، کنترل دیابتی، تمرین استقامتی+ دیابت، تمرین استقامتی+ دارچین+ دیابت

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد القای دیابت موجب افزایش بیان ژنی eNOS، VEGF و اندوتلین-۱ در بافت قلب موش‌های صحرایی شد.

همچنین تمرین استقامتی اثر معناداری بر سطوح بیان ژنی eNOS، VEGF و اندوتلین-۱ در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نداشت. براساس نتایج تحقیقات عوامل متفاوتی مانند عوامل مکانیکی، متابولیکی، هورمونی، میزان شدت فعالیت ورزشی در کاهش یا افزایش VEGF اثرگذار باشد، زیرا فعالیت ورزشی با سازوکار استرس برشی، فشار خون وارد بر دیوارهٔ عروق، تجمع متابولیت‌ها و کشش عضلانی وارد بر سلول و عروق ناشی از انقباض یا اثر متقابل موجب فعال‌سازی آنژیوژنز می‌شود. علاوه‌بر این به‌نظر می‌رسد هایپرلیپیدمی، هیپرگلیسمی و افزایش التهاب در اثر انباشت بیش از حد گلوکز در بافت و سلول‌های اندوتلیال متعاقب دیابت و ایجاد لخته‌های خون و ترومبوز در رگ‌ها از میزان گردش خون بکاهد و عوامل آنژیوژنیکی فرصت و شرایط بروز نیابند و این امر مانع رگ‌زایی و ایجاد عروق جدید متعاقب فعالیت ورزشی شوند (۱۷). در خصوص اثر تمرینات ورزشی بر عوامل آنژیوژنیک تحقیقاتی انجام گرفته است، همسو با تحقیق حاضر چهار هفته، سه جلسه در هفته تمرین مقاومتی اثر معناداری بر سطوح پلاسمایی NO، VEGF و VEGFR۱ موش‌های صحرایی نداشت (۱۸). از سویی ناهمسو با پژوهش حاضر هشت هفته، پنج جلسه در هفته تمرینات تداومی و تناوبی موجب افزایش عوامل پروآنژیوژنیک (TGFβ1، MMP2 و VEGF) و کاهش عامل آنتی‌آنژیوژنیک TIMP2 موش‌های صحرایی سالم و مبتلا به دیابت شد (۱۷). همچنین هشت هفته، شش جلسه تمرین و هر جلسه ۶۰ دقیقه تمرین تداومی با نوار گردان در شیب ۱۰ درصد موجب افزایش سطوح پروتئینی VEGF قلبی در موش‌های صحرایی دیابتی شد (۱۹)؛ نتایج این تحقیقات با نتایج تحقیق حاضر همسو نبودند، به‌نظر می‌رسد تعداد جلسات تمرینی در هفته، شدت تمرین و شیوهٔ اندازه‌گیری متغیرها دلایل احتمالی تناقض نتایج مطالعات باشد. افزایش بیان ژن و پروتئین VEGF موجب کاهش پروتئین AKT و بیان پروتئین eNOS متعاقب تمرینات ورزشی می‌شود. این بیان که از مسیرهای پیام‌رسانی مهم مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیالی است، موجب افزایش بیان VEGF شده و بیان هر دو ژن به افزایش رشد عروق جانبی و بهبود انبساط اندوتلیال در قلب دیابتی (۷) و افزایش غلظت پلاسمایی اندوتلین -۱ (۳) متعاقب تمرینات ورزشی منجر می‌شود.

نتایج نشان داد مصرف دارچین اثر معناداری بر سطوح بیان ژنی eNOS، VEGF و اندوتلین-۱ در بافت قلب موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نداشت. وجود متیل هیدروکسی چالکون یا عامل تقویت‌کنندهٔ انسولین در گیاه دارویی دارچین موجب افزایش فسفریلاسیون گلوکز، فعال کردن مسیرهای کینازی، مهار مسیرهای فسفاتازی گیرنده‌های انسولین، افزایش پاسخ سلول‌های چربی به انسولین، و افزایش بیان آنزیم گلیکوژن سنتتاز به کاهش قند خون، کاهش التهاب و مهار فشار اکسایشی منجر می‌شود (۲۰). پژوهش‌های پیشین تأثیرات ضدالتهابی و ضداکسایشی دارچین را به‌خوبی نشان داده‌اند، به‌گونه‌ای که مصرف دارچین و سینام آلدهید با سازوکار افزایش آنزیم‌های ضداکسایشی، سبب مهار عامل نکروزدهندهٔ تومور (TNF)، مهار آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ (COX2) و در نتیجه مهار تولید پروستاگلاندین E می‌شود. همچنین عصارهٔ دارچین موجب مهار آنزیم eNOS می‌شود تا در محل التهاب مانع افزایش NO شوند، که این مسئله به کاهش التهاب در عروق کمک می‌کند (۲۱). با توجه به معنادار نبودن اثر دارچین بر متغیرهای پژوهش حاضر پژوهشگران اشاره کرده‌اند که هنوز اطلاعات کافی برای تأیید تأثیرات ضددیابتی دارچین وجود ندارد، زیرا تفاوت‌های ژنتیکی تأثیرگذار بر ابتلا به دیابت، مقدار مصرفی دارچین، طول دورهٔ مصرف دارچین از عوامل مهم در تأثیرات مطلوب دیابت هستند (۲۲). از آنجا که در تحقیق حاضر سطوح VEGF و eNOS متعاقب تزریق STZ افزایش یافت، به‌نظر می‌رسد معنادار نبودن تغییرات بیان ژنی این متغیرها به سطوح پایه وابسته باشد. در این زمینه مصرف ۵۰۰ mg/kg عصارهٔ دارچین اثر معناداری بر شاخص‌های گلایسمیک بیماران مبتلا به دیابت نوع دو نداشت (۲۲)از سویی مصرف ۶۰mg/kg دارچین موجب بهبود شاخص‌های قندی در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت شد (۲۰). همچنین در تحقیقی پژوهشگران نشان دادند که مصرف دارچین با سازوکار بتاآدرنرژیک به بهبود سوخت‌وساز گلوکز و چربی و با

فسفریلاسیون PI3K به فعال‌سازی مسیر پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن (MAPK) منجر شده و این امر به افزایش بیان گیرندهٔ VEGF و حتی سطوح پروتئینی آن منجر می‌شود (۲۳).

نتایج نشان داد سطوح بیان ژنی اندوتلین-۱ در گروه تمرین استقامتی+مصرف دارچین به‌طور معناداری بالاتر از گروه کنترل دیابتی بود، اما تفاوت معناداری در سطوح بیان ژنی VEGF، eNOS در گروه تمرین استقامتی+مصرف دارچین در مقایسه با گروه کنترل دیابتی وجود نداشت. براساس نتایج تحقیقات اثر تمرینات ورزشی بر آنژیوژنز به میزان التهاب و اختلالات متابولیکی پایه (۱۷) و مصرف دارچین به عواملی مانند ویژگی‌های ژنتیکی، مقدار مصرفی دارچین، طول دورهٔ مصرف در میزان فعال‌سازی آنژیوژنز وابسته است (۲۲). با وجود این تحقیقات در خصوص اثر مصرف دارچین بر رگ‌زایی در بیماران دیابتی محدود بوده و هنوز سازوکار آن به‌خوبی شناخته نشده است. همچنین در تحقیق انجام‌گرفته بر عصارهٔ آبی الکلی پوست دارچین بر آنژیوژنز، دلیل انتخاب این گیاه را ترکیبات فنولی فلاونوئیدی گیاه بیان شده است (۲۴). بر این اساس می‌توان گفت ترکیبات فنولی به¬دلیل خواص ضداکسایشی، نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی بنیان‌های آزاد، فرونشانی اکسیژن‌های فعال یا پراکسیدازهای تجزیه‌کننده دارند (۲۵) و تأثیراتی که در ترمیم و رگ‌زایی و افزایش ژن‌های آنژیوژنز دارند (این ژن‌ها با اتصال بر سلول‌های اندوتلیال موجب تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها می‌شوند و آنژیوژنز اتفاق می‌افتد) به وجود ترکیبات ضداکسایشی و فلاونوییدی گیاه نسبت داد (۲۶). با وجود این به‌نظر می‌رسد تمرینات ورزشی و عصارهٔ پوست دارچین از مسیرهای متفاوتی بر سطوح بیان ژنی VEGF و eNOS اثر می‌گذارند. اما در پاسخ به جبران تأثیرات مخرب دیابت در سلول‌های اندوتلیال و نقش التهاب بر مهار سازوکارهای بیان VEGF به‌نظر می‌رسد معنادار نبودن اثر تمرین، دارچین و تعامل تمرین و دارچین به عوامل التهابی وابسته باشد. اما با توجه به عدم اندازه‌گیری عوامل التهابی و نیمرخ چربی در تحقیق حاضر که از محدودیت‌های تحقیق بود، پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی این متغیرها نیز ارزیابی شوند. همچنین با توجه به تفاوت محل و شیوهٔ اندازه‌گیری این متغیرها به‌نظر می‌رسد عدم اندازه‌گیری سطوح پروتئینی این متغیرها نیز از دیگر محدودیت‌های تحقیق باشد. ازاین‌رو پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی هم سطوح پلاسمایی، سطوح بافتی و سطوح بیان ژنی در کنار هم ارزیابی شوند. به‌نظر می‌رسد تمرین استقامتی با روش تحقیق حاضر و عصارهٔ پوست دارچین با این مقدار اثر معناداری بر نشانگرهای آنژیوژنز بافت قلب موش‌های صحرایی ندارند، هرچند با توجه به محدودیت اطلاعات در خصوص سازوکار اثر STZ بر آنژیوژنز در بافت قلب به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز است.

تشکر و قدردانی

مقالهٔ حاضر برگرفته از رسالهٔ دکتری رشتهٔ فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج است که در سال ۱۳۹۸ توسط شورای پژوهش این واحد دانشگاهی تصویب شده است. ازاین‌رو از تمامی کسانی که در انجام این پژوهش کمک کردند، سپاسگزاریم.

منابع

1. Salehi OR, Hosseini SA, Farkhaie F, Farzanegi P, Zar A. The Effect of Moderate Intensity Endurance Training with Genistein on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Tumor Necrosis Factor-Î±in Diabetic Rats. J Nutr Fasting Heal. 2019;7(1):44–51.
2. Gaeini A, Mo'tamedi P. The Effect of Aerobic Training on Cardiac Expression of Mir-126 in Diabetic and Healthy Rats. J Police Med. 2016;5(1):69–78.
3. Ghardashi Afousi AR, Gaeini A, Gholami Borujeni B. The effect of aerobic interval training on endothelial vasculature function in type 2 diabetes patient. Iran J Rehabil Res. 2016;2(3):27–39.
4. 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. Iran J Nutr Sci Food Technol. 2018;13(2):21–30.
5. Zinman B, Ruderman N, Campaigne BN, Devlin JT, Schneider SH. Physical activity/exercise and diabetes mellitus. Diabetes Care. 2003;26:S73.
6. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature. 1988;332(6163):411–415.
7. Guang-da X, Yun-lin W. Regular aerobic exercise training improves endothelium-dependent arterial dilation in patients with impaired fasting glucose. Diabetes Care. 2004;27(3):801–802.

parison of the effect of eight weeks of moderate continus and sever interval training on cardiac angiogenesis in wistar male dieabeic rats. Iran J Diabetes Metab. 2019;18(5):236–245.
18. Shekarchizadeh P, Khazaei M, Gharakhanlou R, Karimian J, Safarzadeh AR. The Effects of Resistance Training on Plasma Angiogenic Factors in Normal Rats. J isfahan Med Sch. 2012;30(176): 1-9.
19. Hadi H, Gaeini A, Mo'tamedi P, Rajabi H. The effect of aerobic training on VEGF expression in diabetic rats. Med J Tabriz Uni Med Sci Heal Serv. 2017;39(5):81–90.
20. Hosseini Se, Shojaei St, Hosseini Sa. The effects of cinnamon on glycemic indexes and insulin resistance in adult male diabetic rats with streptozotocin. Yafteh. 2015;16(4):70–78.
21. Dashti-Rahmatabadi MH, Vahidi Merjardi AR, Pilavaran AA, Farzan F. Antinociceptive effect of cinnamon extract on formalin induced pain in rat. SSU_Journals. 2009;17(2):190–199.
22. Mirfeizi M, Mehdizadeh Tourzani Z, Mirfeizi SZ, Asghari Jafarabadi M, Rezvani H, Shoghi M. Effects of cinnamon on controlling blood glucose and lipids in patients with type II diabetes mellitus: A double blind, randomized clinical trial. Med J mashhad Univ Med Sci. 2014;57(3):533–541.
23. Yuan X, Han L, Fu P, Zeng H, Lv C, Chang W, et al. Cinnamaldehyde accelerates wound healing by promoting angiogenesis via up-regulation of PI3K and MAPK signaling pathways. Lab Investig. 2018;98(6):783–798.
24. Inbaneson SJ, Sundaram R, Suganthi P. In vitro antiplasmodial effect of ethanolic extracts of traditional medicinal plant Ocimum species against Plasmodium falciparum. Asian Pac J Trop Med. 2012;5(2):103–106.
25. Niazi F, Tehranipour M. The Effects of Total Extract Ocimumbasilicumon VEGF Gene Expression Changes in Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Angiogenesis. SSU_Journals. 2017;25(8):629–640.
26. Zadhoush F. Physiological role of adenosine and its receptors in tissue hypoxia-induced. Physiol Pharmacol. 2012;16(3):209–221.
8. Thérond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2000;3(5):373–384.
9. Anderson RA. Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity: plenary lecture. Proc Nutr Soc. 2008;67(1):48–53.
10. Seyed Ahmadi SG, Farahpour MR, Hamishehkar H. Topical application of Cinnamon verum essential oil accelerates infected wound healing process by increasing tissue antioxidant capacity and keratin biosynthesis. Kaohsiung J Med Sci. 2019;35(11):686–694.
11. Qin B, Panickar KS, Anderson RA. Cinnamon: potential role in the prevention of insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes. J Diabetes Sci Technol. 2010;4(3):685–693.
12. Arabmomeni A, Haji Hidari M. Comparing the Effects of Three Methods, Cinnamon Supplementation, Aerobic Exercise and Concurrent (Aerobic Exercise-Supplement) on Serum Glucose, Insulin and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients. Med J mashhad Univ Med Sci. 2019;62(2):1430–1439.
13. Abdi A, Farzanegi P, Abaszade H, Habibi M. Effect of 8 weeks aerobic training with cinnamon extract on retinol binding protein 4 (RBP4) and insulin resistance in rats fed with high-fructose. J Neyshabur Univ Med Sci. 2018;5(4):52–61.
14. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. Hear Lung Circ. 2003;12(1):44–50.
15. Dashti Khavidaki M H, Faramarzi M, Azamian Jazi A, Banitalebi E. Effect of endurance training intensity (low, moderate and high) on the expression of skeletal muscle ATGL protein and serum levels of insulin and glucose in male diabetic rats. SJKU. 2018; 23 (2):92-102.
16. Soleimani P, Chegini R, Sadeghi M, Younesi F, Zafari F. Evaluation of Hydroalcoholic Extract of Cinnamon Effect on Testicular Tissue and Fertility of Busulfan-Induced Oligo-Spermic Model Rats. JBUMS. 2019; 21 (1) :196-200.
17. Shahidi F, Yazdani F, Gaieni A, Karimi P. Com-