



The effect of 8 weeks of endurance training on vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin (ES) protein levels in cardiac tissue of diabetic rats with morphine withdrawal syndrome

Sahraneshin K^a, Saremi A^{ab*}, Malekipooya M^c

^aDepartment of Physical Education, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

^bDepartment of Sports Physiology, Faculty of Sports Sciences, Arak University, Arak, Iran

^cDepartment of Physical Education, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: The effect of 8 weeks of endurance training on vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin (ES) protein levels in cardiac tissue of diabetic rats with morphine withdrawal syndrome. Journal of Cell and Tissue. 2023; 14 (2):128-140.

doi <https://10.52547/JCT/14.2.128>

KEYWORDS

Ram
Semen storage
Sperm viability
Syzygium aromaticum extract

ABSTRACT

Aim: About 80% of deaths caused by diabetes are related to cardiovascular diseases. Diabetes and morphine are the main risk factors for cardiovascular diseases that lead to endothelial dysfunction and defective angiogenesis. Today, many angiogenic and angiostatic factors have been identified that play an important role in cardiovascular health, and the most important of them are VEGF (angiogenic factor) and endostatin (angiostatic factor). In this study, the effect of eight weeks of endurance training on vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin (ES) protein levels in the heart tissue of diabetic male Wistar rats with morphine withdrawal syndrome was investigated.

Material and methods: In this experimental study, 32 male Wistar rats were randomly divided into 4 groups of 8 including diabetes control (D), morphine diabetes (DM), diabetes + endurance training (D.ET) and morphine diabetes+ endurance training (D.M.ET). Then induction of diabetes and addiction to morphine was done. 72 hours after the injection, in order to ensure diabetes, the samples whose blood sugar level was more than 250 mg/dL were considered as diabetic. In order to ensure the dependence of the rats on morphine, at the end of the 21st day, by intraperitoneal injection of naloxone to the samples at the rate of 2 mg/kg of body weight, the signs of withdrawal from addiction such as: jumping, climbing, scratching, teeth grinding, redness around the eyes, diarrhea, tremors, eyelid drooping, erection and standing on two legs for 30 minutes were evaluated. The training groups performed an 8-week endurance training program. At the end of the study, all rats were sacrificed and their heart tissue was removed. VEGF and ES protein levels were measured by ELISA method. Data were analyzed using one-way ANOVA test at a significance level of $p \leq 0.05$.

Results: The results showed that in diabetic and morphine rats, the level of VEGF and ES is significantly lower and higher than other groups, respectively ($P < 0.05$). Also, endurance training is associated with improvement of VEGF and ES values in diabetes + endurance training and morphine diabetes+ endurance training groups ($P < 0.05$). On the other hand, the level of VEGF and ES in group D with D.M.ET showed no significant difference ($P > 0.05$).

* Corresponding author. Tel.:086-32629002; Fax:086-32629002

E-mail address: a-saremi@araku.ac.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/14.2.128>

Received: 29 Jun. 2023; Received in revised form: 29 Aug. 2023; Accepted: 2 Sep. 2023

Original Article

©Author



Conclusion: In the present study, it was shown that eight weeks of endurance training caused a significant increase in VEGF in the heart tissue of diabetic rats with morphine withdrawal syndrome. Also, the level of ES protein as one of the most important internal inhibitory factors of angiogenesis decreased significantly. Our findings show that the intervention of endurance training is likely to be effective and useful in regulating the levels of angiogenic factors in the heart tissue of diabetic and diabetic rats in withdrawal syndrome and as a low-cost non-pharmacological solution in the treatment of cardiovascular diseases caused by addiction and diabetes are recommended to specialists in these fields.



تاثیر ۸ هفته تمرین استقامتی بر سطوح پروتئین فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و اندوستاتین (ES) در بافت قلب موش‌های صحرایی دیابتی همراه با سندروم ترک مورفین

کتایون صحرانشین^۱، عباس صارمی^{۱*}، محمد ملکی پویا^۲

^۱ گروه تربیت بدنی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

^۲ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

^۳ گروه تربیت بدنی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

واژگان کلیدی	چکیده
تمرین استقامتی سندروم ترک مورفین دیابت بافت قلب	<p>هدف: دیابت و مورفین از عوامل خطر اصلی بیماری‌های قلبی عروقی هستند که منجر به اختلال در عملکرد اندوتلیال و رگزایی معیوب می‌شوند. در این مطالعه، تاثیر هشت هفته تمرین استقامتی بر سطوح پروتئین فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و اندوستاتین (ES) در بافت قلب موش‌های صحرایی نر و بیستار دیابتی همراه با سندروم ترک مورفین مورد بررسی قرار گرفت.</p> <p>مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد بیستار به صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی شامل: کنترل دیابت (D)، دیابت مورفین (D.M)، دیابت+تمرین استقامتی (D.ET)، دیابت مورفین+تمرین استقامتی (D.M.ET)، تقسیم شدند. سپس القای دیابت و مورفین انجام شد. گروه‌های تمرین ۸ هفته برنامه تمرین استقامتی اجرا نمودند. در پایان مطالعه همه موش‌های صحرایی قربانی شدند و بافت قلبی آن‌ها جدا شد. سطوح پروتئین VEGF و ES به روش الایزا اندازه‌گیری شدند. داده‌ها با استفاده از آزمون آنوای یک طرفه در سطح معنی‌داری $p \leq 0/05$ مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت.</p> <p>نتایج: ما دریافتیم در موش‌های دیابتی و مورفینی سطح VEGF و ES به ترتیب و به‌طور معنی‌دار کمتر و بیشتر از سایر گروه‌ها است ($p \leq 0/05$). همچنین فعالیت استقامتی با بهبود مقادیر VEGF و ES در گروه‌های D.ET و D.M.ET همراه است ($p \leq 0/05$).</p> <p>نتیجه‌گیری: مطالعه ما نشان می‌دهد که مورفین و دیابت سطوح VEGF و ES را برهم می‌زند و از طرف دیگر به‌نظر می‌رسد تمرینات استقامتی بر روند رگ‌زایی بافت قلب در موش‌های دیابتی و مبتلا به سندروم ترک مورفین اثر محافظتی دارد.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۸	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۰۷	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۱	

۱- مقدمه

سازمان بهداشت جهانی دیابت را به‌عنوان یک اختلال متابولیکی چندگانه که با هایپرگلیسمی (افزایش غیر طبیعی قند خون) مزمن همراه با اختلالات متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین ناشی از نقص در ترشح انسولین، عملکرد انسولین یا هر دو مشخص می‌شود، تعریف کرده است (۱). حدود ۸۰ درصد از مرگ و میرهای ناشی از دیابت به امراض قلبی و عروقی

مربوط می‌شود (۲، ۳). به‌علاوه، بسیاری از تظاهرات بالینی در افراد دیابتی مثل نقص در ترمیم زخم، افزایش خطر رد پیوند، ناهنجاری‌های جنینی در مادران دیابتی، تشکیل ناقص عروق جانبی کرونر و غیره با اختلال در آنژیوژنز (رگ‌زایی) ارتباط دارند (۴). پژوهش‌گران بر این باورند که بیماری دیابت موجب کاهش رشد و توسعه عروق جانبی کرونر، کاهش قطر مویرگ‌ها به فیبر، کاهش ظرفیت انتشار مویرگ‌ها و همچنین اختلال در تنظیم همودینامیک عروق عضلات می‌شود (۵). از طرفی می‌توان گفت که آنژیوژنز وابسته به تعادل دقیق بین تحریک‌کننده‌ها و مهارکننده‌های طبیعی بدن است. به‌طور کلی، این فرآیند تحت تأثیر عوامل مختلف بوده و در برگیرنده یک‌سری رخدادهای سلولی از قبیل مهاجرت، تکثیر و تمایز سلول‌های اندوتلیال و در نهایت تشکیل عروق، بلوغ و بازسازی نهایی آن‌ها است (۶). امروزه ده‌ها نوع فاکتور آنژیوژنیک و آنژیواستاتیک شناسایی شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به VEGF (فاکتور آنژیوژنیک) و اندوستاتین (فاکتور آنژیواستاتیک) اشاره کرد. پروتئین VEGF (فاکتور رشد اندوتلیال عروقی) قوی‌ترین میتوزن مخصوص سلول‌های اندوتلیال است که وقتی به گیرنده‌های خود بر روی سلول‌های اندوتلیال متصل شود، می‌تواند باعث تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌ها شود. همچنین VEGF مانع از مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول‌های اندوتلیال می‌شود (۷). درمقابل، اندوستاتین، پیتیدی با وزن ۲۰ کیلو دالتون از مهم‌ترین عوامل آنژیواستاتیک است که با اتصال به VEGF، مانع عمل کرد آن می‌شود و با کاهش تکثیر و افزایش آپوپتوزیس سلول‌های اندوتلیال و فعال‌سازی عوامل آنژیواستاتیک دیگر، فرآیند آنژیوژنز را کاهش می‌دهد (۶).

یکی از علل گرایش و انگیزه‌های موجود در جامعه به استفاده از مورفین، به‌ویژه در جمعیت میانسال و افرادی که سابقه بیماری‌های دیابت و قلب و عروق دارند، اعتقاد به اثر کاهنده آن بر قند خون و بیماری‌های قلبی عروقی و دیابت است. اعتیاد یکی از معضلات و نگرانی‌های عمده جهان امروز می‌باشد (۸). مطالعات قبلی بیانگر اثر مخرب اعتیاد به ماده مخدر تریاک بر روی کارکرد و ساختار دستگاه‌های مختلف بدن است (۹). مواد افیونی از طریق اتصال به گیرنده‌های جفت شده با پروتئین G در سیستم عصبی مرکزی و بسیاری از اندام‌های دیگر مانند سیستم قلبی عروقی عمل کرد آن‌ها را متاثر می‌سازد (۱۰). مطالعات قبلی نشان داده است که بیماران وابسته به مورفین دارای اختلال عمل کرد سیستم قلبی بطن چپ و کاهش عمل کرد قلب هستند (۱۱). در پژوهشی نشان داده شد که مورفین به‌صورت مستقیم از طریق کاهش التهاب، آنژیوژنز را مهار می‌کند (۱۲). از طرفی شواهد بر این باورند که تمرینات ورزشی باعث تغییرات گوناگونی در عمل کرد قلبی و عروقی می‌شوند که از جمله آن‌ها می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم‌های هوازی و رشد فرآیند آنژیوژنز در عضله قلبی و عضله اسکلتی اشاره کرد (۱۳). تمرینات ورزشی باعث بهبود عمل کرد عروق و نیز عمل کرد قلبی در بیماران دیابتی نیز می‌شود. از آنجایی که قلب دیابتی، VEGF و گیرنده‌های VEGF کمی را بیان می‌کند و القای هایپرگلیسمی تولید مهارکننده‌های آنژیوژنز مانند آنژیوستاتین را افزایش می‌دهد، تمرین استقامتی نیز می‌تواند آنژیوژنز را توسط کاهش سطوح آنژیوستاتین و اندوستاتین پلاسما بهبود بخشد (۱۴). علاوه بر این، ورزش از طریق آزادسازی شبه افیونی درون زاد به ویژه اندورفین‌ها که خود اثر آنتی‌اکسیدانی دارند، موجب کاهش آثار سمی مورفین در کبد و کلیه می‌گردد. همچنین، ورزش می‌تواند موجب محافظت کبد و کلیه در مقابل آثار نامطلوب مورفین در موش صحرایی گردد. علاوه بر این، گزارش‌های ارائه شده در این زمینه حاکی از آن است که ورزش از طریق سیستم اعصاب مرکزی و تحریک در آزادسازی پپتیدهای شبه افیونی درون زاد به خصوص بتا‌اندروفین‌ها نه تنها باعث کاهش اثر سوء مواد اعتیادآور می‌شود بلکه به‌عنوان یک روش درمانی موثر و کارآمد در پیشگیری و احتمالاً درمان برخی از بیماری‌ها از جمله اعتیاد مطرح است (۱۵). در مطالعه بشیری و همکاران نتایج نشان داد که تمرینات استقامتی از طریق افزایش مسیر آنژیوژنیک باعث بهبود در عضله قلبی و سطح سرمی فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود (۱۶). در مطالعه فدایی و همکاران (۱۷) مشاهده شد که ورزش منظم شنا ممکن است روشی بالقوه برای بهبود شدت وابستگی به مورفین در موش‌های صحرایی باشد. در پژوهشی یادگاری و همکاران نشان دادند که تمرین هوازی به‌مدت ۸ هفته علاوه بر موش‌های سالم اثرات ضد دردی در موش‌های وابسته به مورفین متعاقب سندروم ترک دارد. بنابراین می‌تواند برای درمان و یا کاهش درد مفید واقع شود (۱۸). نقش درمانی ورزش در بیماران مبتلا به افزایش فشار خون، افسردگی اعتیاد و دیابت گزارش شده است. از آنجا که ورزش علاوه بر مورفین را کاهش می‌دهد، به‌نظر می‌رسد که در کاهش آثار سمی این ترکیب نیز نقش

داشته باشد (۱۵).

به طوری که مشاهده می‌شود اثرات مضر تریاک (با ماده موثر مورفین) و عوارض ناتوان کننده بیماری دیابت که از جمله تاثیر تخریب کننده بر آنژیوژنز، می‌تواند بافت‌های مختلف بدن از جمله بافت قلبی و عروقی را تحت تاثیر قرار دهد و موجب بیماری‌های قلبی و عروقی گردد. از طرفی در کنار درمان‌های دارویی سایر رویه‌ها همواره مورد توجه پزشکان و در عین حال پژوهشگران این حوزه‌ها بوده است که در این میان تمرینات ورزشی با توجه به اثرات مثبت و درمان غیر دارویی در بیماران دیابتی و اعتیاد مطرح می‌باشد. با توجه به این که تاکنون اثرات ورزش بر بافت قلب در افراد دیابتی همراه با سندروم ترک مورفین مورد بررسی قرار نگرفته، بنابراین فرض مطالعه حاضر برای نخستین بار این بود که ۸ هفته تمرین استقامتی بر سطوح (VEGF) و اندوستاتین (ES) در بافت قلب موش‌های صحرایی نر ویستار دیابتی همراه با سندروم ترک مورفین تاثیر معنی‌دار دارد.

۲- مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نظر هدف کاربردی و از لحاظ شیوه اجرا، تجربی آزمایشگاهی می‌باشد که به صورت پس آزمون با گروه کنترل انجام گرفت. در این پژوهش از ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۸ تا ۱۰ هفته و میانگین وزن 230 ± 30 گرم استفاده شد. موش‌های خریداری شده از دانشگاه بقیه الله در شرایط جدید به مدت دو هفته نگهداری شدند و براساس وزن به صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. سپس تحت پروتکل القای دیابت و مورفین قرار گرفتند. چهار گروه شامل: ۱- گروه دیابتی ۲- گروه دیابتی+سندروم ترک مورفین ۳- گروه دیابتی+تمرین استقامتی ۴- گروه دیابتی+سندروم ترک مورفین+تمرین استقامتی، بود.

شیوه نگهداری و تغذیه

نمونه‌های این مطالعه در آزمایشگاه جوندگان در قفس‌های پلی کربنات شفاف، ساخت شرکت رازی در شرایط استاندارد، با چرخه‌ی روشنایی/تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و میانگین درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و با رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد قرار داشتند. وضعیت آلاینده‌های هوا با توجه به شاخص استاندارد آلاینده‌ها (PSI) در وضعیت سالم قرارداشت. همچنین برای ایجاد تهویه و جریان مناسب هوا از دو دستگاه تهویه هوا بدون صدا استفاده شد. تغذیه نمونه‌ها با استفاده از غذاهای توصیه شده توسط مراکز تولید خوراک دام به صورت پلت از شرکت بهرپرور همراه با بطری‌های آب ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات صورت گرفت. ضمناً دسترسی به غذا و آب به صورت نامحدود بود. در تمام مراحل پژوهش، نمونه‌ها توسط یک نفر جابجا و دست کاری شدند.

پروتکل القای دیابت

برای دیابتی کردن موش‌ها پس از ۱۲ ساعت ناشتا بودن با تزریق درون صفاقی محلول نیکوتین آمید (ساخت شرکت سیگما، آمریکا) محلول شده در نرمال سالین با دوز ۱۲۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن را بعد از ۱۵ دقیقه از محلول استرپتوزوتوسین (ساخت شرکت سیگما، آمریکا) محلول در بافر سیترات ۰/۱ مولار با دوز ۶۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد. ۷۲ ساعت پس از تزریق جهت اطمینان از دیابتی شدن، نمونه‌هایی که میزان قندخون آن‌ها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی لیتر بود به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (۱۹). سطوح قند خون توسط گلوکومتر (بیورر مدل GL42، ساخت کشور آلمان) بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی و به وسیله خون‌گیری از انتهای دم موش‌های صحرایی ارزیابی شد (۲۰).

پروتکل ایجاد سندروم ترک مورفین

پس از تایید دیابتی شدن نمونه های پژوهش حاضر، پروتکل سندروم ترک مورفین انجام گرفت. از روش خوراکی جهت ایجاد وابستگی به مورفین استفاده شد. مورفین با غلظت های متوالی ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر هرکدام برای ۴۸ ساعت، سپس ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر برای بقیه روزها تا روز ۲۱ به آب آشامیدنی حیوانات اضافه شد (۲۱). ضمناً به واسطه طعم تلخ مورفین در این مطالعه با توجه به دیابتی بودن موش‌ها از شیرین کننده مصنوعی مناسب با غلظت ۳ درصد استفاده شد. جهت اطمینان از وابستگی موش‌ها به مورفین در پایان روز ۲۱، با تزریق داخل صفاقی نالوکسان (شرکت سیگما آمریکا) به نمونه‌ها به میزان ۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، علائم ترک اعتیاد از جمله: پریدن، بالا رفتن، خارانیدن، دندان قروچه، قرمزی دور چشم، اسهال، لرزش، افتادگی پلک، نعوظ و روی دو پا ایستادن برای مدت ۳۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۲).

پروتکل تمرین استقامتی

۴۸ ساعت بعد از القای سندروم ترک مورفین، آشناسازی با تردمیل به مدت یک هفته انجام شد. تمرین استقامتی پس از آن بر اساس اصل اضافه بار به مدت ۸ هفته و هر هفته سه جلسه به صورت غیرمتوالی انجام گرفت. تمرین ورزشی شامل دویدن روی نوارگردان به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۱۲ متر در دقیقه با شیب صفر درجه بود. در ادامه ی تمرین، هر هفته ۵ دقیقه به مدت تمرین اضافه شد تا به ۵۰ دقیقه رسید. همچنین سرعت تردمیل در هر هفته ۱ متر در دقیقه اضافه شد تا در نهایت به ۱۸ متر در دقیقه افزایش یافت. در طول دوره تمرین، گرم کردن و سرد کردن به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۷ متر در دقیقه در ابتدا و انتهای تمرین استقامتی انجام شد (۲۳).

تشریح ذخیره بافت‌ها و فاکتورهای بیوشیمیایی

تمامی نمونه‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، با ترکیب درون صفاقی کتامین (۱۷۵-mg/kg) و زایلازین (۵-mg/kg) بی‌هوش و کشته و بافت برداری انجام شد. بافت‌ها تحت شرایط استریل با نرمال سالین شسته و به سرعت در مخازن نیتروژن مایع به مدت ۲ دقیقه غوطه ور شدند و جهت انتقال به آزمایشگاه در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سطوح پروتئین شاخص‌های این پژوهش توسط کیت‌های الیزا مخصوص موش صحرائی مطابق دستورالعمل‌های شرکت تولید کننده اندازه‌گیری و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد. برای اندازه‌گیری سطح پروتئین VEGF در بافت قلب از کیت الیزا شرکت آر اند سیستم (R & Systems) ساخت کشور آمریکا به شماره کاتولوگ RRV00 و حساسیت ۴/۸ نانوگرم بر میلی لیتر و برای سنجش ES از کیت کازابیو (CUSABIO) محصول کشور آمریکا با شماره کاتالوگ CSB-E0795r و میزان حساسیت کمتر از ۱/۵۶ نانوگرم بر میلی لیتر طبق دستورالعمل‌های شرکت تولید کننده، استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها در مطالعه حاضر از اصول اخلاقی مورد تایید کمیته اخلاق حیوانات دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد (کد اخلاق: IR.IAU.B.REC.1401.028) پیروی کردند.

۳- آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل یافته‌های تحقیق در بخش آمار توصیفی از میانگین و انحراف معیار استفاده شده است. جهت بررسی نحوه توزیع یافته‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک و در ادامه جهت تجزیه و تحلیل استنباطی در صورت نرمال بودن توزیع از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شده است. برای تعیین نقاط تفاوت بین گروه‌ها و مقایسه‌های دو به دو از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. نمودارها با Graph Pad Prism ترسیم شد و داده‌های تحقیق حاضر با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و سطح معنی داری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

۴- نتایج

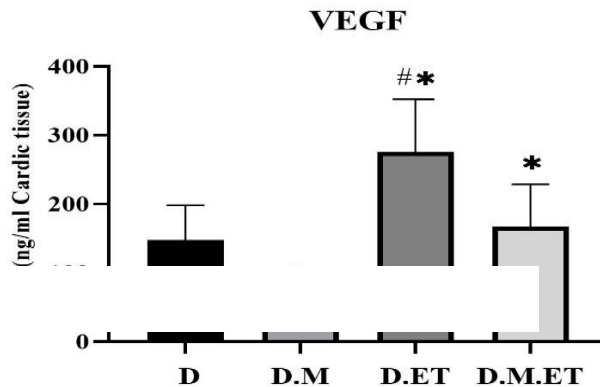
میانگین و انحراف معیار متغیرهای مورد ارزیابی در گروه‌های مختلف و نتایج آنالیز واریانس یک راهه آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: میانگین، انحراف معیار و نتایج آنالیز واریانس یک‌راهه متغیرهای آنژیوژنی بافت قلب در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه						متغیرها
P	F	D.M.ET	D.ET	D.M	D	
۰/۰۰۱	۲۳/۷۵	۱۶۷±۱۳۶۱/۳۰	۲۷۵/۷۶±۸۰/۵۱	۳۹/۲۰±۶۳/۱۲	۱۴۷/۵۰±۲۶/۹۴	(ng/ml) VEGF
۰/۰۰۱	۱۲/۹۶	۱۷/۴±۲۵/۱۴	۶/۳±۲۵/۱۲	۲۸/۱۲±۹۴/۷۵	۱۶/۴±۶۹/۷۶	(ng/ml) ES

D: دیابتی، D.M: دیابتی مورفینی، D.ET: دیابت + تمرین استقامتی، D.M.ET: دیابتی مورفینی + تمرین استقامتی

نتایج و مقایسه بین گروهی متغیر VEGF در نمودار ۱ آمده است. نتایج آنالیز واریانس یک راهه نشان داد که بین گروه‌های مورد بررسی، اختلاف معنی دار وجود دارد ($F=۲۳/۷۵$ و $P=۰/۰۰۱$). سپس بعد از انجام تعقیبی توکی مشاهده شد که سطح VEGF در گروه D.M به‌طور معنی‌دار کم‌تر از گروه‌های D ($P=۰/۰۰۳$)، D.ET ($P=۰/۰۰۱$) و D.M.ET ($P=۰/۰۰۱$) است. همچنین مشاهده شد میزان VEGF در گروه D.ET به‌طور معنی‌دار بیشتر از سایر گروه‌ها می‌باشد ($P=۰/۰۲$). از طرفی سطح VEGF در گروه D با D.M.ET اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P=۰/۸۹۳$).

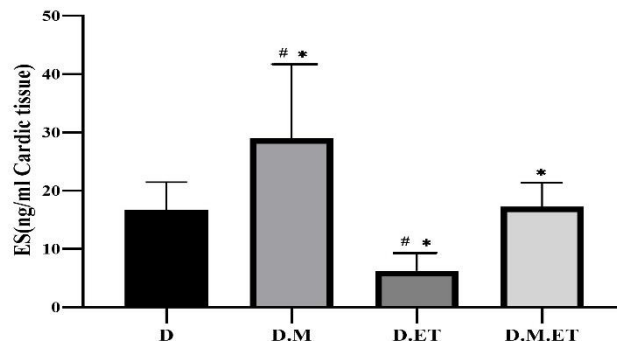


نمودار ۱: سطح VEGF در گروه‌های مورد مطالعه. * تفاوت معنی‌دار نسبت به سایر گروه‌های پژوهش. # تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ($p < ۰/۰۵$). D = کنترل دیابت، D.M = دیابتی مورفینی، D.ET = دیابت + تمرین استقامتی، D.M.ET = دیابتی مورفینی + تمرین استقامتی.

از سویی، نتایج و مقایسه بین گروه‌ها در مورد متغیر ES در نمودار ۲ مشاهده می‌شود. با استفاده از آزمون واریانس یک راهه ($F=۱۲/۹۶۹$ و $P=۰/۰۰۰$) مشاهده شد اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها وجود دارد. سپس بعد از انجام تعقیبی توکی مشاهده شد که سطح ES در گروه D.ET به‌طور معنی‌دار کم‌تر از گروه‌های D ($P=۰/۰۲$)، D.M ($P=۰/۰۰۳$) و D.M.ET ($P=۰/۰۰۱$) است.

همچنین مشاهده شد میزان ES در گروه D.ET به‌طور معنی‌دار کمتر از سایر گروه‌ها می‌باشد ($P=0/04$). از طرفی سطح ES در گروه D با D.M.ET اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P=0/99$).

ES



نمودار ۲. سطح VEGF در گروه‌های مورد مطالعه. * تفاوت معنی‌دار نسبت به سایر گروه‌های پژوهش. # تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل ($P < 0/05$). D.M: دیابتی مورفینی. D.ET: دیابت + تمرین استقامتی. D.M.ET: دیابتی مورفینی + تمرین استقامتی.

۵- بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزایش سطوح پروتئین VEGF و کاهش ES بافت قلبی موش‌های صحرایی در گروه‌های تمرین این مطالعه (کنترل دیابت+تمرین) و (دیابت سندروم ترک مورفین + تمرین) نسبت به گروه کنترل دیابت معنی‌دار می‌باشد. بنابراین یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ۸ هفته تمرین استقامتی باعث افزایش فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و کاهش اندوستاتین در بافت قلب موش‌های صحرایی دیابتی و دیابتی همراه با سندروم ترک مورفین شده است. اما نکته قابل ذکر در این مطالعه در هر دو شاخص اندازه‌گیری شده تفاوت معنی‌داری در گروه دیابت+سندروم ترک مورفین+تمرین (D.M.ET) در مقایسه با گروه کنترل دیابت (D) مشاهده نشد.

در بررسی پیشینه تحقیقاتی مطالعه حاضر گزارش‌های زیادی در مورد اثرات تمرین ورزشی بر شاخص‌های آنژیوژنز سلولی بافت‌های مختلف در شرایط دیابت وجود دارد. اما طبق بررسی‌های انجام شده ما، این نخستین مطالعه در مورد اثرات تمرین استقامتی بر سطوح پروتئین فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و اندوستاتین در بافت قلب موش‌های صحرایی دیابتی همراه با سندروم ترک مورفین است. هر دو نوع دیابت وابسته و غیروابسته به انسولین باعث اختلالات قلبی و عروقی شده و سبب بروز بیماری‌های شریان کرونری یا پرفشارخونی سیستمیک، ایست قلبی، بیماری شریانی محیطی و آسیب عضله ی قلبی (میوپاتی قلبی)، تشکیل ناقص عروق جانبی کرونری و آترواسکلروز پیش‌رونده در شریان‌های بزرگ می‌شود (۲۴). هم‌ایستایی بین مولکول‌های آنتی آنژیوژنیک با منشا داخلی و پروآنژیوژنیک موجب حفظ تعادل آنژیوژنیک می‌شود، در حالی که در اختلالاتی نظیر دیابت، این تعادل آنژیوژنیک با کاهش بیان عامل رشد اندوتلیال عروقی و افزایش عوامل آنژیواستاتیک (از جمله اندوستاتین) به نفع فنوتیپ آنتی آنژیوژنیک تغییر می‌یابد (۲۵). در بیماران دیابتی، سطوح فاکتور القایی از هایپوکسی (HIF-1) و VEGF در قلب کاهش می‌یابد و به‌نظر می‌رسد نقش این دو پروتئین در فعال کردن فرآیند آنژیوژنری بعد از ایسکمی میوکارد در افراد دیابتی نیز کاهش می‌یابد. دیابت اثر مهاری بر رشد عروق قلبی دارد و از طریق افزایش فشار اکسیداتیو باعث اختلال در آنژیوژنز می‌گردد (۲۶).

نتایج این تحقیق کاهش سطوح VEGF را پس از القای دیابت نشان داد که همسو با یافته‌های مطالعات اسمیت و همکاران (۲۷) و هازاریکا و همکاران (۲۸) است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که انسولین می‌تواند از طریق فعال کردن مسیر PI3 Kinase/Akt، بیان VEGF را افزایش دهد. بنابراین تغییرات در سطوح انسولین می‌تواند یک مکانیسم بالقوه برای کاهش بیان VEGF میوکارد در شرایط دیابت نوع ۲ و نقص در بیان VEGF در نتیجه‌ی مقاومت انسولینی باشد. همچنین نتایج مطالعه حاضر افزایش اندوستاتین پس از القای دیابت را نشان داد که همسو با نتایج ما سودا و همکاران گزارش کردند بیان اندوستاتین در بیماران مبتلا به دیابت همراه با بیماری عروق کرونر، ۲/۰۲ برابر بیماران غیر مبتلا به دیابت است (۲۹). از سویی، نتایج مطالعه حاضر ناهمسو با مطالعه اسماعیلی و همکاران (۱۳۹۷) است که گزارش کردند القای دیابت موجب کاهش اندوستاتین در بافت قلب رت‌های دیابتی می‌شود (۲۷). از آن‌جا که در زمان انجام فعالیت ورزشی سلول‌های اندوتلیال تحت کشش قرار می‌گیرند، سرعت رهاسازی VEGF افزایش می‌یابد (۳۰). این افزایش اثرات مفیدی بر بیان VEGF در شرایط پاتولوژیکی مانند دیابت اعمال می‌کند (۳۱). مطالعات نشان داده‌اند که اجرای تمرین استقامتی باعث کاهش مقاومت به انسولین و افزایش حساسیت انسولینی بیماران دیابتی در هر دو مدل انسانی و حیوانی می‌گردد و این اثر می‌تواند در فعال شدن مسیر پیام‌دهی آنژیوژنز در قلب موثر باشد. تمرین استقامتی باعث افزایش شبکه‌ی مویرگی عضله قلب می‌شود (۲۴). در این ارتباط نتایج تحقیق ما نشان داد که ۸ هفته تمرین استقامتی در گروه‌های دیابت + تمرین (D.ET) در مقایسه با گروه کنترل دیابت (D) ضمن کاهش اندوستاتین و همزمان افزایش VEGF احتمالاً موجب بهبود آنژیوژنز در بافت قلب می‌شود. هم‌راستا با مطالعه حاضر، سوری و همکاران (۳۲) نشان دادند که تمرینات استقامتی موجب افزایش معنی‌دار VEGF در بافت قلبی می‌شود و احتمالاً این تغییر اثرات مثبتی بر فرآیندهای تنظیمی آنژیوژنیک در بیماران دیابتی دارد. گزارش شده است که فعالیت‌های ورزشی با شدت متوسط تا زیاد، از طریق افزایش متابولیسم عضله قلبی و ایجاد شرایط کمبود اکسیژن بافتی، موجب تحریک HIF و بهبود آنژیوژنز قلبی از طریق افزایش بیان VEGF می‌شود. (۲۷) ناهمسو با نتایج این تحقیق، اسپوندر و همکاران (۳۳) در تحقیق خود گزارش نمودند تمرین روی دوچرخه کارسنج، سطوح اندوستاتین سرمی مردان و زنان مبتلا به دیابت را به میزان ۱۵/۰۵ و ۱۰/۵۹ درصد افزایش می‌دهد. بریتوکس و همکاران (۱۴) کاهش اندوستاتین به دنبال فعالیت‌های ورزشی را گزارش کردند که با نتایج مطالعه‌ی حاضر همسو می‌باشد. نورشاهی و همکاران (۷) نیز نشان دادند که اگر چه تمرینات هوازی بیان اندوستاتین سرم موش‌های سالم را کاهش می‌دهد اما همچنان نسبت VEGF به اندوستاتین در نتیجه‌ی سازگاری به دویدن روی تردمیل بطور معنی‌داری افزایش داشته است. مکانیسم کاهش ES، در پاسخ به تمرینات ورزشی هنوز واضح و معلوم نیست، اما این احتمال داده می‌شود که تمرینات ورزشی میزان دگرگونی و ماتریکس برون سلولی را کاهش می‌دهد و این امر ممکن است مانع از جدا شدن اندوستاتین از کلاژن شود (۱۴). در مطالعه‌ی دیگر نشان داده شد که مورفین سبب ورود کلسیم، افزایش کلسترول خون و مهار VEGF و نهایتاً اسپاسم عروقی و ایسکمی میوکارد می‌شود (۳۴). از طرفی در پژوهشی مورفین با دوز بالا باعث اختلال در رگزایی، افزایش استرس اکسیداتیو در تحرک سلول‌های پیش ساز اندوتلیال شد و بر اثر مضر بودن بالقوه مورفین با دوز بالا بر رگزایی پس از تجویز سیستمیک تاکید دارد (۳۵). نتایج تحقیقات قبلی بیانگر این موضوع است که تریاک به‌طور بالقوه به‌عنوان منبع رادیکال‌های آزاد شناخته شده است. علاوه بر این تریاک و متابولیت آن مانند مورفین با تحویل مستقیم گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و تحریک تولید ROS درون‌زا از طریق تحریک سلول‌های التهابی، استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهند. علاوه بر این، مورفین می‌تواند به‌طور مستقیم فعالیت دفاعی آنتی‌اکسیدانتی را در بدن کاهش دهد. به‌نظر می‌رسد که تشکیل ROS یکی از مکانیسم‌های اصلی در پس سوء مصرف مورفین است که با کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی از جمله کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز مرتبط است (۳۴). مورفین همچنین باعث آزاد شدن نشان‌گرهای پیش التهابی (مانند TNF- α) می‌شود

و در نتیجه می‌تواند باعث آسیب بافتی شود (۳۶). در مطالعه زینی‌وند و پورشا نظری (۳۷) نشان داده شد که احتمال عوارض قلبی و عروقی هم زمان با اعتیاد افزایش خواهد یافت و ترک اعتیاد موجب بهبود میزان تراکم مویرگی نشد. محققان در تحقیقات متعدد خطر مواد مخدر بر روی ایسکمی قلبی را مورد مطالعه قرار داده‌اند، از جمله مارتینیک و همکاران (۳۸) در مطالعه خود به رابطه اعتیاد و افزایش ایسکمی قلبی اشاره کردند. نا همسو با مطالعه ما در پژوهش چان و دیا نیز گلوکز خون موش‌هایی که مورفین دریافت کرده بودند، نسبت به گروه شاهد، پایین‌تر گزارش شده است (۳۹). بعضی مطالعات حیوانی نیز افزایش میزان قند خون را در بعضی حیوانات پس از تجویز مورفین گزارش کرده‌اند (۸). در مطالعه هاشی گوچی و همکاران (۴۰) نیز میزان قند خون به‌طور معنی‌داری در خرگوش‌های دریافت‌کننده مورفین بالاتر از گروه شاهد بود. یافته‌های این مطالعات با یافته‌های ما همخوانی دارد. زیرا نتایج مطالعه حاضر در گروه دیابت سندروم ترک مورفین (D.M)، افزایش سطوح پروتئین ES، متعاقب کاهش VEGF مشاهده شد. اما نتایج مطالعه صالحی و همکاران (۳۶) بیانگر این موضوع بود که ورزش استقامتی و مقاومتی هم‌زمان به‌طور معنی‌داری استرس اکسیداتیو و تغییرات مورفولوژیک روده را در موش‌های قطع مصرف نرمال کرد بر اساس یافته‌های آنها تمرینات مختلف ورزشی به‌طور قابل توجهی استرس اکسیداتیو را در موش‌های صحرایی معتاد کاهش می‌دهد، درحالی‌که اعتیاد به مورفین به‌طور قابل توجهی استرس اکسیداتیو در روده را افزایش داد که با نتایج مطالعه ما همسو می‌باشد. زیرا نتایج ما نیز نشان داد که تمرین‌های استقامتی باعث کاهش معنی‌دار سطوح پروتئین ES و افزایش VEGF در بافت قلب موش‌های صحرایی دیابتی و دیابتی همراه با سندروم ترک مورفین شده است که از دلایل آن می‌توان احتمالاً بهبود میزان تراکم مویرگی، افزایش دفاع آنتی‌اکسیداتیو و کاهش استرس اکسیداتیو اشاره کرد. همچنین یافته‌های علمی حاکی از آن است که ورزش و فعالیت بدنی، نه تنها اثرات سوء مواد اعتیاد آور را کاهش می‌دهد بلکه به‌عنوان یک روش درمانی مناسب و کارآمد در پیش‌گیری و احتمالاً درمان اعتیاد مطرح است (۱۸). زرین کلام و حیدریان پور (۲۰۱۷) به این نتیجه رسیدند که تمرینات استقامتی و هم‌زمان ممکن است با افزایش سطح آلبین سرم، اثرات محافظتی قلبی بر موش‌های وابسته به مورفین داشته باشد. بنابراین می‌توان فعالیت‌های بدنی را برای پیشگیری از اختلالات قلبی به بیماران وابسته به مورفین توصیه کرد (۴۱). از طرفی نتایج پژوهش احمدی و همکاران (۴۲) نشان داد که تمرین هوازی در گروه مورفین + تمرین، شدت علائم سندروم ترک مورفین را در مقایسه با گروه مورفین بدون تمرین کاهش داد که نشان‌دهنده نقش ورزش در مهار استفاده از مورفین است. بنابراین ورزش به‌عنوان یک عامل کمک‌کننده با ارزش در درمان اعتیاد و بهبود وضعیت افراد معتاد در سندروم ترک مطرح است (۲۱). از محدودیت‌های پژوهش حاضر با توجه به توسعه بیماری دیابت در جوامع مختلف عدم اندازه‌گیری دیگر عوامل تحرکی آنژیوژنز (NO, FGF, MMPs) و مهار آنژیوژنز (TSP-1, IL-4) به دلیل هزینه‌های مالی بالا می‌باشد. احتمالاً اندازه‌گیری دیگر عوامل آنژیوژنی درک واضح‌تری از مسیرهای سیگنالینگ آنژیوژنی را برای ما مشخص نماید. همچنین برای آگاهی از مکانیسم تأثیر تمرینات ورزشی بر بیماری دیابت، تعیین نوع تمرین و شدت و مدت زمان تمرین در بازه‌های زمانی مختلف پیشنهاد می‌شود.

۶- نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر نشان داده شد که هشت هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنی‌دار VEGF در بافت قلب موش‌های صحرایی دیابتی همراه با سندروم ترک مورفین شد. همچنین میزان سطوح پروتئین ES به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بازدارنده‌ی درونی آنژیوژنز کاهش معنی‌داری داشت. یافته‌های ما نشان می‌دهد که احتمالاً مداخله تمرین استقامتی در تنظیم میزان سطوح فاکتورهای آنژیوژنزی بافت قلب موش‌های دیابتی و سندروم ترک موثر و مفید است و به‌عنوان یک راه‌کار غیر دارویی کم هزینه در درمان بیماری‌های قلب و عروقی ناشی از اعتیاد و دیابت به متخصصین در این زمینه‌ها توصیه می‌شود.

۷- تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج رساله‌ی دکتری فیزیولوژی ورزشی، با کد اخلاق IR.IAU.B.REC.1401.028 بوده که با تایید معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد اجرا شده است. همچنین نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را از مسئولین دانشگاه و تمامی اساتید و مسئولین محترم آزمایشگاه سارا تبریز و افرادی که در زمینه انجام این پژوهش مساعدت نمودند، اعلام می‌داریم.

۸- منابع

- Cheedipudi SM, Hu J, Fan S, Yuan P, Karmouch J, Czernuszewicz G. Exercise restores dysregulated gene expression in a mouse model of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*. 2020;116 (6):1199-213.
- Bertoni AG, Hundley WG, Massing MW, Bonds DE, Burke GL, Goff Jr DC. Heart failure prevalence, incidence, and mortality in the elderly with diabetes. *Diabetes care*. 2004;27 (3):699-703.
- Ernande L, Derumeaux G. Diabetic cardiomyopathy: myth or reality? *Archives of cardiovascular diseases*. 2012;105 (4):218-25.
- Martin A, Komada MR, Sane DC. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal research reviews*. 2003;23 (2):117-45.
- Gaeini A, Mo'tamedi P. The Effect of Aerobic Training on Cardiac Expression of Mir-126 in Diabetic and Healthy Rats. *Journal of Police Medicine*. 2016;5 (1):69-78.
- Mansouri K, Seifi P, Mostafaie A, Mohammadi-Motlagh HR. Study of the mechanisms and causes related to angiogenesis. *Scientific journal of Kurdistan university of medical sciences*. 2012;17 (2).
- Nourshahi M, Hedayati M, Nemati J, Ranjbar K, Gholamali M. Effect of 8 weeks endurance training on serum vascular endothelial growth factor and endostatin in wistar rats. *Koomesh*. 2012;13 (4).
- Esmaeili NA, Khodadadi A, Sayadi AA. The effect of narcotics on blood sugar, triglycerides and cholesterol in drug-dependants. 2004.
- Loei MA, Mami S, Parviz SA. The effect of the opium addiction on histological structure of liver and kidney in rabbits. *Journal of Ilam University of Medical Sciences* 2013, 21 (3): 39-45
- Sobanski P, Krajnik M, Shaqura M, Bloch-Boguslawska E, Schäfer M, Mousa SA. The presence of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors in human heart tissue. *Heart and vessels*. 2014;29:855-63.
- Kleinz MJ, Baxter GF. Apelin reduces myocardial reperfusion injury independently of PI3K/Akt and P70S6 kinase. *Regulatory peptides*. 2008;146 (1-3):271-7.
- Singleton P, Mirzapozova T, Hasina R, Salgia R, Moss J. Increased μ -opioid receptor expression in metastatic lung cancer. *British journal of anaesthesia*. 2014;113 (suppl_1):i103-i8.
- Tang K, Xia FC, Wagner PD, Breen EC. Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2010;170 (1):16-22.
- Brixius K, Schoenberger S, Ladage D, Knigge H, Falkowski G, Hellmich M. Long-term endurance exercise decreases antiangiogenic endostatin signalling in overweight men aged 50–60 years. *British journal of sports medicine*. 2008;42 (2):126-9.
- Ahmadzadeh M, Sarkaki A, Farboud Y, Mohammadian B, Rahim F. Effect of exercise on morphine-induced toxicity in rat liver and kidney. *Jundishapur scientific medical journal*. 2012;11 (3):325-33.
- Bashiri J, Gaeini A, Hadi H. Endurance training affects muscular angiogenesis and serum VEGF concentration in diabetic rats. *Koomesh*. 2015;17 (1).

17. Fadaei A, Gorji HM, Hosseini SM. Swimming reduces the severity of physical and psychological dependence and voluntary morphine consumption in morphine dependent rats. *European journal of pharmacology*. 2015;747:88-95.
18. Yadegari F, Heidarianpour A, Nazem F. Effects of regular swimming exercise on the pain threshold following withdrawal syndrome in morphine-dependent rats. *Physiology and Pharmacology*. 2011;15 (2):288-94.
19. Saremi A, Yousfvand Z, Parastesh M, Bayat M, Gahreman D. Aerobic training mitigates the negative impact of diabetes on fertility. *Andrologia*. 2022; 54 (1): 1-9.
20. Saremi A, Bayat M, Sadegh M, Amiri J. The Impact of a Resistance Training Period on Lipasin Plasma Level and Lipid and Metabolic Profile in Obese Rats. *Journal of Inflammatory Diseases*. 2019; 23 (3) :202-213.
21. Jalalvand A, Heydarian Pour A and Almasi J. Acute effect of swimming exercise on withdrawal syndrome sign in addicted mice. *Journal of Medical Sciences and Sanitary-Therapeutic Services of Sabzevar*. 2013;69 (3):373-9.
22. Salmanzadeh F, Fathollahi Y, Semnianian S, Shafizadeh M, Kazemnejad A. Dependence on morphine leads to a prominent sharing among the different mechanisms of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Brain research*. 2003;963 (1-2):93-100.
23. Yousefi M-R, TaheriChadorneshin H. The effect of moderate endurance training on gastrocnemius retinol-binding protein 4 and insulin resistance in streptozotocin-induced diabetic rats. *Interventional Medicine and Applied Science*. 2018;10 (1):59-63.
24. Vali Zadeh S, Motamedi P, Karami H, Rajabi H. The effects of endurance training on gene expression of VEGF and VEGFR2 of cardiac tissue in Type 2 diabetic male wistar. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2018;21 (6):107-18.
25. Bitar MS, Al-Mulla F. Upregulation of CREM/ICER suppresses wound endothelial CRE-HIF-1 α -VEGF-dependent signaling and impairs angiogenesis in type 2 diabetes. *Disease models & mechanisms*. 2015;8 (1):65-80.
26. Marfella R, Esposito K, Nappo F, Siniscalchi M, Sasso FC, Portoghese M, et al. Expression of angiogenic factors during acute coronary syndromes in human type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53 (9):2383-91.
27. Esmaeili S, Minasian V, Karamii H, Bayat M. The effects of exercise training on vascular endothelial growth factor and endostatin gene expression in cardiac tissue of rats with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Isfahan Medical School*. 2018;36 (491):909-16.
28. Hazarika S, Dokun AO, Li Y, Popel AS, Kontos CD, Annex BH. Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 *Circ Res*. 2007; 101(9):948-56.
29. Sodha NR, Clements RT, Boodhwani M, Xu S-H, Laham RJ, Bianchi C. Endostatin and angiostatin are increased in diabetic patients with coronary artery disease and associated with impaired coronary collateral formation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009;296 (2):H428-H34.
30. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9 (2):267-85.
31. Erekat NS, Al-Jarrah MD, Al Khatib AJ. Treadmill exercise training improves vascular endothelial growth factor expression in the cardiac muscle of type I diabetic rats. *Cardiology research*. 2014;5 (1):23.
32. Soori R, CHoobine S. Effect of endurance training on VEGF protein level in tissue of cardiac muscle in STZ-induced diabetic Wistar rats. *Yafteh*. 2018;20 (3):110-24.
33. Sponder M, Dangl D, Kampf S, Fritzer-Szekeres M, Strametz-Juranek J. Exercise increases serum endostatin levels in female and male patients with diabetes and controls. *Cardiovascular diabetology*. 2014;13:1-6.
34. Karimi A, Cheraghi M, Sedighi M. Morphine and Opium Addiction and Their Effects on the Heart and Related Heart Diseases. *Yafteh*. 2021;23 (2).
35. Lam C-F, Chang P-J, Huang Y-S, Sung Y-H, Huang C-C, Lin M-W, et al. Prolonged use of high-dose morphine impairs angiogenesis and mobilization of endothelial progenitor cells in mice. *Anesthesia & Analgesia*. 2008;107 (2):686-92.
36. Salehi I, Zarrinkalam E, Mirzaei F, Oshaghi EA, Ranjbar K, Asl SS. Effects of resistance, endurance, and concurrent exercise on oxidative stress markers and the histological changes of intestine after morphine withdrawal in rats. *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*. 2018;6 (2):44-9.
37. Zeinivand M, Pourshanazari A, Hassanshahi G. Coronary angiogenesis during morphine and nicotine withdrawal in two-kidney one clip hypertensive (2K1C) rats. *Bratislava Medical Journal*. 2015;116 (9):554-9.
38. Martiniuk AL, Lee C, Lam T, Huxley R, Suh I, Jamrozik K, et al. The fraction of ischaemic heart disease and stroke attributable to smoking in the WHO Western Pacific and South-East Asian regions. *Tobacco Control*. 2006;15 (3):181-8.

39. Chan M-Y, Dai S. Morphine treatment and intravenous glucose tolerance tests in mice. *Pharmacological research*. 1989;21 (4):353-8.
40. Hashiguchi Y, Molina PE, Abumrad NN. Modulation of metabolic effects of morphine-6-glucuronide by morphine-3-glucuronide. *Brain research bulletin*. 1995;38 (4):325-9.
41. Zarrinkalam E, Heidarianpour A. Effect of 8-Week Aerobic, Strength and Concurrent Training on Circulating Apelin in Morphine-Dependent Rats. *Medical Laboratory Journal*. 2017;11 (5):27-32.
42. Ahmadi S, Radahmadi M, Alaei H, Ramshini E. Effect of aerobic exercise on morphine self-administration and pain modulation in rats. *Advanced biomedical research*. 2018;7.