

The Effect of Aerobic Training on Cardiac Expression of Mir-126 in Diabetic and Healthy Rats

Received: 23 December 2015

Revised: 18 February 2016

Accepted: 21 February 2016

ABSTRACT

Hamdollah Hadi^{1*}
AbbasAli Gaeini²
Pejman Mo'tamedi³
Hamid Rajabi⁴

¹Assistant Professor, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Police University, Tehran, Iran.

²Professor, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Tehran University, Tehran, Iran.

³Assistant Professor, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

⁴Associated Professor, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Background: The aim of this study is investigating the effect of aerobic training on cardiac expression of mir-126 in normal and diabetic rats.

Materials and Methods: 35 Rats divided to two categories, diabetic and non-diabetics rats. Then each category of diabetic and non-diabetic animals will be divided to two groups: under training and non-training. Cardiac muscle will be removed and immediately placed into liquid nitrogen. Cardiac expression of mir-126 is investigated in rat cardiac muscle with method of Real-time PCR. For data analysis, One Way ANOVA and Tukey test will be used to find differences between groups

Results: The study results showed diabetes significantly decreased cardiac expression of mir126 and 8 weeks of aerobic training significantly increased cardiac expression of mir126 in healthy and diabetic rats.

Conclusion: Thus, it seems aerobic training can via angiogenic path incurred diabetes improvement. Also, as for results of yielded from this study and kindle regulatory processes by mir126 that via aerobic training be impressed, it is get worth strategy that it can lead in diabetes on development of new therapy methods.

Keywords: aerobic training, angiogenesis, mir126, diabetes

*Corresponding Author:

Hamdollah Hadi

Tel: (+98)9120137489

email: amir.hadi1@gamil.com

تأثیر تمرین هوازی بر میزان بیان mir126 عضله قلبی در رت‌های دیابتی و

سالم

تاریخ پذیرش: ۲ اسفند ۱۳۹۴

تاریخ اصلاح: ۲۹ بهمن ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۲ دی ۱۳۹۴

چکیده

حماده هادی^{*۱}عباسعلی گابینی^۲پژمان معتمدی^۳حمید رجبی^۴

مقدمه: هدف از مطالعه حاضر تعیین تأثیر تمرین هوازی بر میزان بیان mir126 بافت قلبی در موش‌های صحرایی دیابتی و سالم بود.

مواد و روش‌ها: ۴۰ رأس رت به دو دسته دیابتی و سالم تقسیم شدند. دیابت از طریق ترکیب تزریق درون صفاقی استرپنوزوتوسین و مصرف غذای پرچرب ایجاد شد. هر دسته به دو گروه «بدون تمرین هوازی» و «با تمرین هوازی به مدت ۸ هفته» تقسیم شدند. ۴۸ ساعت پس از اتمام دوره تمرینی عضله قلبی رت‌ها تحت شرایط استریل جدا گردید. میزان بیان mir126 به روش Real-Time PCR اندازه‌گیری شد. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌سویه و آزمون تعقیبی توکی انجام شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داد که دیابت موجب کاهش معنی‌دار میزان بیان mir126 در بافت قلبی شده‌است. هم‌چنین، تمرین هوازی به مدت هشت هفته موجب افزایش معنی‌دار میزان بیان mir126 در هر دو دسته سالم و دیابتی شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرین هوازی می‌تواند از طریق فعال‌سازی مسیر آنژیوژنز بافت قلب باعث تعدیل اثرات مخرب بیماری دیابت گردد. لذا فرایندهای تنظیمی به‌وسیله mir126 که متعاقب تمرین هوازی تحت تأثیر قرار می‌گیرند، می‌توانند استراتژی بالارزشی در توسعه روش‌های درمانی جدید برای بیماری دیابت باشند.

کلید واژه‌ها: تمرین هوازی، آنژیوژنز، mir126، دیابت

***نویسنده مسئول:**

حماده هادی

تلفن: ۰۲۱-۹۱۲۰۱۳۷۴۸۹ (+۹۸)

پست الکترونیک:

amir.hadi1@gamil.com

مقدمه

کرونر و غیره با اختلال در آنژیوژنز ارتباط دارند [۳ و ۲]. به‌هرحال، دیابت از نقطه‌نظر عروقی و آنژیوژنز یک بیماری متناقض می‌باشد. مطالعات روی انسان و مدل‌های حیوانی نشان می‌دهند که دیابت از یک‌طرف باعث افزایش آنژیوژنز در اندام‌هایی مانند کلیه و چشم، و از طرف دیگر موجب مهار آنژیوژنز در عروق محیطی و تشکیل عروق جانبی در قلب می‌شود [۵ و ۴]. در تأیید این موضوع، اباسی و همکاران با مطالعه‌ای روی ۴۱۰ فرد مبتلا به بیماری عروق کرونر (

دیابت قندی از نظر بالینی یکی از مهم‌ترین عوامل خطر اختلال‌هایی نظیر نفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی و بیماری‌های قلبی عروقی محسوب می‌شود [۱] به‌علاوه، دیابت با ناهنجاری‌هایی در آنژیوژنز همراه است به‌گونه‌ای که علت 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

تنها یک مطالعه، اثرات تمرین هوازی را بر miRNAهای درگیر در آنژیوژنز بررسی کرده است. ناتان و همکاران، نقش تمرین هوازی شنا را بر بیان mir126، مورد مطالعه قرار دادند [۸] این مطالعه نشان داد تمرین هوازی، باعث افزایش بیان mir126 می‌شود و این امر می‌تواند با آنژیوژنز قلبی ناشی از فعالیت ورزشی بوسیله تنظیم مستقیم مسیر VEGF و تنظیم غیرمستقیم اهداف آن مانند MAPK و PI3K/Akt/eNOS مرتبط باشد [۸].

به نظر می‌رسد بیان mir126 در افراد دیابتی کاهش می‌یابد و فعالیت ورزشی می‌تواند از طریق افزایش mir126، به بهبود عملکرد عروقی در قلب این بیماران کمک کند. با این وجود هیچ مطالعه‌ای اثرات هم‌زمان تمرین ورزشی و دیابت را بر mir126 یا دیگر miRNAهای درگیر در آنژیوژنز قلبی بررسی نکرده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر تمرین هوازی بر میزان بیان mir126 در بافت قلبی موش‌های سالم و دیابتی انجام شد تا به برخی از ابهامات موجود پاسخ دهد.

مواد و روش‌ها

روش تحقیق حاضر از نوع تحقیقات بنیادی-توسعه‌ای می‌باشد که به صورت تجربی با طرح پس‌آزمون با گروه کنترل انجام شد. تعداد ۴۰ رت نژاد ویستار در سن ۴ هفتگی با میانگین وزنی $98/5 \pm 11/9$ گرم، از انستیتو پاستور ایران تهیه و در شرایط دمایی $22^{\circ}C - 20^{\circ}C$ ، رطوبت ۵۰ درصد، محیط کم‌سر و صدا و چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته به صورت انفرادی در هر قفس نگه‌داری شدند. وزن بدن به طور روزانه ثبت و رت‌ها با غذای مخصوص رت و آب تغذیه شدند. بعد از گذشت دو هفته (با هدف سازگاری با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن مطلوب) رت‌ها با میانگین وزنی $10/85 \pm 191/9$ به طور تصادفی به چهار گروه کنترل سالم ($n = 10$)، تمرینی سالم ($n = 10$)، کنترل دیابتی ($n = 10$)، و تمرینی دیابتی ($n = 10$) تقسیم و گروه‌ها بر اساس وزن همسان سازی شدند. در نهایت به دلیل عدم دیابتی شدن (غلظت گلوکز پایین تر از 300 mg/dl) و

۲۰۵ فرد دیابتی و ۲۰۵ فرد غیر دیابتی) مشاهده کردند بیماران دیابتی میزان عروق جانبی کرونر کمتری دارند مطالعات ورنر و همکاران نیز کاهش رشد و توسعه عروق جانبی کرونر در بیماران دیابتی را تأیید می‌کند [۵]. به‌علاوه شواهد نشان می‌دهد که دیابت باعث کاهش قطر مویرگ‌ها، کاهش نسبت مویرگ‌ها به فیبرها، کاهش ظرفیت انتشار مویرگ‌ها و همچنین اختلال در تنظیم همودینامیک عروق عضلات می‌شود [۶].

با وجود افزایش آگاهی از اثرات تخریبی دیابت در مورد آنژیوژنز بافت قلبی، سازوکارهای مولکولی درگیر در این پدیده به‌طور دقیق شناخته نشده‌اند. مطالعات اخیر نقش مهم microRNAها را در پاسخ دستگاه قلبی عروقی به آسیب، التهاب و استرس نشان داده‌اند [۷]. microRNAهای کوچک (۲۱-۲۲ نوکلئوتید) رمزگذاری نشده‌ای هستند که با mRNAهای هدف پیوند می‌شوند و ترجمه آن‌ها را سرکوب می‌کنند.

تاکنون بیش از ۷۰۰ microRNA در ژنوم انسان شناسایی شده است [۸] نشان داده شده است که بیش از یک سوم ژن‌های انسان توسط microRNAها تنظیم می‌شوند. یکی از این microRNAهای ویژه، mir126 است که بیشتر در بافت قلب بیان می‌شود. همچنین، mir126 به عنوان یک miRNA ویژه اندوتلیال شناخته می‌شود، زیرا مهم‌ترین و بهترین نقش را در کنترل آنژیوژنز و یکپارچگی عروقی بازی می‌کند [۸] mir126 به صورت مستقیم دو تنظیم کننده منفی مسیر VEGF را سرکوب می‌کند. این دو مسیر عبارت‌اند از

۱- Sprouty-related protein (Sprd-1) که یک سرکوب کننده درون سلولی مسیر Ras/MAPK می‌باشد و زیرواحد ۲ تنظیمی فسفو اینوزیتول تری کیناز (PIK3R2) که به صورت منفی فعالیت مسیر PIK3/Akt/eNOS را تنظیم می‌کند [۱۰].

بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند تمرین ورزشی باعث افزایش آنژیوژنز در افراد سالم و بیماران دیابتی می‌شود. با این وجود تاکنون

جدول ۱: شمای کلی طرح تحقیق

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

گلوکز بالاتر از ۳۰۰ mg/dl به عنوان دیابت در نظر گرفته شد و رت‌های واجد شرایط وارد تحقیق شدند.

پروتکل تمرینی

بر اساس مطالعه لئوسکو و همکاران [۱۰] تمرین استقامتی به مدت ۸ هفته، ۶ جلسه در هفته بر روی نوار گردان موتوردار انجام شد (جدول ۲).

سنجش متغیرهای وابسته:

پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرین و پس از ناشتایی شبانه، نمونه گیری انجام شد. موش‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۷۵ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلوزین (۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس قفسه سینه حیوان شکافته شد و برای آزار کمتر حیوانات، خون مستقیم از قلب گرفته شد. عضله قلبی آن‌ها تحت شرایط استریل جدا شد. بافت مورد نظر بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد. نمونه خون که مستقیماً از قلب گرفته شده، در لوله‌های فالتون جمع آوری و داخل یخچال نگه داری شد. پس از انعقاد، نمونه‌های خون با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سرم آن جداسازی شد و جهت مراحل بعدی به فریزر با دمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد انتقال یافت.

مرگ موش‌ها در طول دوره تمرین از گروه کنترل سالم ۹ رأس، تمرینی سالم ۱۰ رأس، کنترل دیابتی ۸ رأس و تمرینی دیابتی ۸ رأس باقی ماندند که در تجزیه و تحلیل داده‌ها جهت سنجش بیان ژن وارد شدند. شمای کلی طرح تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است.

نحوه ایجاد دیابت نوع ۲

دیابت در این تحقیق از طریق ترکیب مصرف غذای پرچرب و تزریق استرپتوزوتوسین ایجاد شد نیکویی و همکاران [۹] از این روش در ایجاد دیابت نوع ۲ استفاده کردند. غذای مورد استفاده شامل ۵۸ درصد چربی، ۲۵ درصد پروتئین و ۱۷ درصد کربوهیدرات بود. این ترکیب غذایی به وسیله محقق به صورت دست ساز تهیه گردید. رت‌های گروه دیابتی به مدت دو هفته تحت مصرف غذای پرچرب قرار گرفتند، در حالی که گروه‌های سالم غذای طبیعی مصرف می‌کردند. بعد از آن تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان ۳۵ mg/Kg حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد بعد از ۶ ساعت ناشتایی در دو گروه دیابتی انجام گرفت [۹]. ۴۸ ساعت بعد از تزریق دارو، نمونه خونی از چشم حیوان جمع آوری و جداسازی سرم انجام شد و غلظت گلوکز با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. غلظت

جدول ۲: پروتکل تمرین استقامتی با شدت متوسط بر روی نوار گردان

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

جدول ۳: تغییرات گلوکز سرمی در چهار گروه مورد مطالعه پس از دیابتی شدن و پس از اتمام ۸ هفته تمرین استقامتی

دوره	پس از دیابتی شدن	پس از اتمام تمرین استقامتی
کنترل سالم	۱۰۱/۶ ± ۲/۲۵ †	۱۰۳ ± ۲/۷۳
تمرین سالم	۱۰۲/۷۵ ± ۲/۳۹ †	۱۰۴ ± ۲/۶۳
کنترل دیابتی	۳۳۶/۸۸ ± ۵/۹۲ ††	۳۵۸/۳۸ ± ۶/۸۵
تمرین دیابتی	۳۳۱/۷۵ ± ۴/۶۵ *	۲۴۱/۶۲ ± ۵/۳۲

† تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های سالم و گروه‌های دیابتی قبل و پس از اتمام ۸ هفته تمرین هوازی
 †† تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل دیابتی و گروه تمرین دیابتی پس از ۸ هفته تمرین هوازی
 * تفاوت معنی‌دار پس از القای دیابت و پس از اتمام ۸ هفته تمرین استقامتی

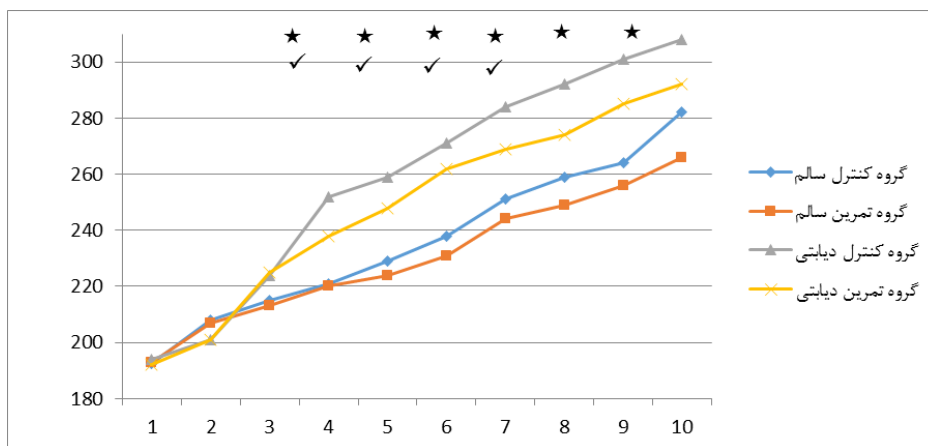
یافته‌ها

تغییرات وزن

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

مقادیر گلوکز سرمی

مقادیر گلوکز سرمی موش‌های صحرائی پس از القای دیابت و پس از هشت هفته تمرین استقامتی در جدول ۳ ارائه شده است. القای



شکل ۱. تغییرات وزن بدن در گروه‌های مختلف تحقیق؛ * تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل دیابتی با گروه‌های سالم، † تفاوت معنی‌دار بین گروه دیابتی تمرین با گروه‌های سالم

آماده سازی نمونه‌های بافتی:

ابتدا نمونه‌ها از حالت انجماد خارج شدند و مدتی در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها وزن شدند و مقدار ۵۰-۱۰۰ میلی گرم از هر نمونه در میکروتیوب ۵/۱ میلی لیتر قرار داده شده و کدگذاری شدند. نمونه‌ها روی یخ گذاشته شدند تا دیگر مراحل کار انجام گیرد.

میزان بیان mir126 به وسیله روش Real-Time PCR مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. برای کمی سازی مقادیر بیان ژن مورد نظر از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد. اندازه‌های لازم از طریق مراحل زیر به دست آمد و در فرمول قرار داده شد و مقادیر تغییرات چند-برابری محاسبه گردید.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{مرجع}} - Ct_{\text{ژن هدف}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{نمونه تجربی}} - \Delta Ct_{\text{نمونه کنترل}}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{میزان تغییرات بیان نسبت به گروه کنترل}$$

جزئیات روش اجرای Real-Time PCR، استخراج و سنجش غلظت RNA در فایل الحاقی شماره ۱ (قابل دسترسی از وبسایت مجله) تشریح شده اند.

روش تجزیه و تحلیل آماری

برای سنجش نرمال بودن داده‌ها، از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. برای مقایسه داده‌ها بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک سویه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS 19 در سطح معنی داری $p < 0/05$ استفاده شد.

جدول ۴: میانگین مقادیر بیان mir126 بافت قلبی گروه های مورد مطالعه پس از دوره تمرینی

گروه	پس از دیابتی شدن
کنترل سالم	۱ *††
تمرین سالم	۳/۷۸ ± ۰/۸۹ **
کنترل دیابتی	۰/۵۶ ± ۰/۱۱ †
تمرین دیابتی	۱/۱۳ ± ۰/۲۳ *

مقادیر به صورت تغییرات چند برابری (fold change) نسبت به گروه کنترل و در نتیجه بدون واحد می باشد

* نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سالم و تمرین سالم
** نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه تمرین سالم و تمرین دیابتی
† نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل دیابتی و تمرین دیابتی
†† نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه کنترل سالم و کنترل دیابتی

دیابت موجب افزایش معنی دار گلوکز سرمی در گروه های کنترل دیابتی و تمرین دیابتی گردید. هم چنین هشت هفته تمرین استقامتی باعث کاهش معنی دار گلوکز سرمی در گروه تمرین دیابتی گردید.

جدول ۴ میانگین مقادیر mir126 عضله قلبی در چهار گروه کنترل سالم، تمرین سالم، کنترل دیابتی و تمرین دیابتی را نشان می دهد. نتایج تحلیل واریانس یک سویه نشان داد که تفاوت معنی داری بین چهار گروه مورد مطالعه وجود دارد ($p < 0/001$) و ($F = 415/972$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تفاوت معنی داری بین گروه کنترل سالم و تمرین سالم، به نفع گروه تمرین سالم ($p < 0/001$)، کنترل سالم و کنترل دیابتی، به نفع گروه کنترل سالم ($p = 0/001$) و کنترل دیابتی و تمرین سالم، به نفع گروه تمرین سالم ($p < 0/001$) و هم چنین کنترل دیابتی و تمرین دیابتی به نفع گروه تمرین دیابتی ($p < 0/001$) وجود دارد، در حالی که تفاوت معنی داری بین گروه کنترل سالم و تمرین دیابتی ($p = 0/930$) مشاهده نشد.

بحث و نتیجه گیری

هدف مطالعه حاضر، تعیین تأثیر تمرین هوازی بر میزان بیان mir126 در بافت قلبی رت های سالم و دیابتی بود. اولین یافته این مطالعه نشان داد که دیابت موجب کاهش معنی دار میزان بیان mir126 بافت قلبی موش های صحرائی شد. گزارش های قبلی بر نقش mir126 در سلول های اندوتلیال نرمال تمرکز کرده بودند [۱۲ و ۱۱]. مطالعات قبلی بیان کرده بودند که حذف mir126 موجب کاهش انسجام عروقی شده و موجب اختلال در تکثیر و مهاجرت سلول های اندوتلیال و کاهش آنژیوژنز می شود. با این وجود بررسی های اخیر تأثیر سودمند mir126 در موارد رگ زایی پاتولوژیک را نشان داده اند [۱۳]. mir126 به عنوان یک ژن

سرکوب کننده تومور در سلول های سرطان ریه با تأثیر مهاری بر بیان VEGF شناخته شده است [۱۴]. اخیراً نشان داده شده است که mir126 در خون افراد مبتلا به بیماری سرخرگ کرونری [۱۵] و هم چنین در سلول های پیش ساز اندوتلیال در بیماران دیابتی [۱۶] [تنظیم منفی می شود. مطالعه حاضر نشان دهنده کاهش معنی دار میزان بیان mir126 بافت قلبی بر اثر دیابت بود. این مشاهده هم راستا با مطالعه پان پان یه و همکاران [۱۷]، یانگ لی و همکاران [۱۹] و زامپتاکی [۱۸] می باشد. پان پن یه و همکاران [۱۷]، در مطالعه خود نشان دادند که mir126 در سلول های تحت شرایط هایپوکسی در مقایسه با شرایط نورموکسی، کاهش معنی داری یافت. هم چنین بیان mir126 در بافت رتینای موش های دیابتی کاهش یافته بود. نتایج این مطالعه بیان گر این بود که mir126 تحت شرایط هایپوکسی در هر دو وضعیت آزمایشگاهی و طبیعی، تنظیم منفی می شود و ممکن است رگ زایی ناشی از هایپوکسی را به وسیله به تعویق انداختن پیشرفت چرخه سلولی و مهار بیان VEGF و MMP-9 متوقف سازد [۱۷].

زامپتاکی و همکاران [۱۸] نیز کاهش بیان mir126 پلاسمایی را در بیمارانی با دیابت نوع دو گزارش کردند. آن ها تنظیم منفی ۱۲ miRNA پلازما را در آزمودنی های دیابتی گزارش کردند (mir 24, 21, 20b, 15a, 191, 197, 223, 320, 126, 150, 28-3p). این محققان بیان کردند که در میان این miRNAها، mir126 به عنوان یک پیش بین دیابت ملیتوس عمل می کند [۱۸]. یانگ لی و همکاران [۱۹] در مطالعه خود، که از ۱۸۲ آزمودنی با اختلال تحمل گلوکز (IGT)، ۷۵ آزمودنی با اختلال در گلوکز ناشتایی (IFG)، ۱۶۰ بیمار با دیابت نوع دوم تازه تشخیص داده شده و ۱۳۸ فرد سالم استفاده کردند، به این نتیجه رسیدند که mir126 سرمی در آزمودنی های IGT/IFG و بیماران دارای دیابت نوع دوم نسبت به آزمودنی های سالم به طور معنی داری پایین تر بود. پس از شش ماه درمان (کنترل رژیم غذایی و فعالیت ورزشی در آزمودنی های IGT/IFG، کنترل انسولین و رژیم غذایی و فعالیت ورزشی در بیماران دیابت نوع دوم)، mir126 سرمی معنی داری افزایش پیدا کرد. این نتایج، استفاده از mir126 سرمی را به عنوان یک بیومارکر برای شناسایی زود هنگام بیماران دیابتی و هم چنین تشخیص پاسخ های درمانی، توصیه می کند [۱۹].

در تناقض با یافته های مطالعه حاضر کارولینا و همکاران افزایش mir144, 192 و 29a را در خون تام بیماران دیابتی گزارش کردند، در حالی که هیچ تغییری در مقدار mir126 یافت نشد [۲۰]. دلیل تناقض یافته های مطالعه کارولینا با یافته های حاضر، ممکن است به نمونه های متفاوت اندازه گیری (خون در برابر بافت قلبی) و هم چنین نحوه دیابتی کردن آزمودنی ها (تزریق STZ به تنهایی در

زیر واحد تنظیمی ۲ فسفو اینوزیتول تری کیناز (PIK3R2) که به صورت منفی فعالیت مسیر PIK3/Akt/eNOS را تنظیم می کند [۱۰]. فیش و همکاران نیز در مطالعه خود دریافتند که فسفوریلاسیون ERK1/2 و AKT ناشی از VEGF در سلول هایی که mir126 در آن ها مختل شده است، تضعیف می شود [۲۲]. مطالعه ناتان و همکاران، نیز ارتباط بین mir126، VEGF و PI3KR2 را نشان داد [۸].

نتایج مطالعه حاضر هم چنین نشان داد که میزان بیان mir126 بافت قلبی در رت های سالم و دیابتی پس از ۸ هفته تمرین هوازی افزایش معنی داری را نشان می دهد. اگرچه مشخص شده است تمرین ورزشی آنژیوژنز را از طریق سازوکارهای گوناگون افزایش می دهد، با این وجود تنها یک مطالعه اثرات تمرین هوازی را بر miRNA درگیر در آنژیوژنز (mir126) بررسی کرده است. در این راستا، ناتان و همکاران، نقش تمرین هوازی شنا را بر بیان mir126 مطالعه کرده اند [۸]. این مطالعه نشان داد تمرین هوازی، باعث افزایش بیان mir126 می شود و این امر می تواند با آنژیوژنز قلبی ناشی از فعالیت ورزشی از راه تنظیم غیرمستقیم مسیر VEGF و تنظیم مستقیم اهداف آن که با افزایش در مسیرهای آنژیوژنز مانند MAPK, PI3K/Akt/eNOS هم گرا می شود، مرتبط باشد [۸]. فاکتور رشد اندوتلیال عروق و گیرنده های آن به عنوان مهم ترین فاکتورها در طی فرآیند آنژیوژنز شناخته شده اند VEGFR1 و VEGFR2 به ترتیب به عنوان فاکتورهای ضد آنژیوژنز و آنژیوژنز می باشد.

تأثیر فعالیت بدنی بر روی فاکتور رشد اندوتلیال عروق خون نیز دارای نتایج متناقض است. برخی مطالعات نشان دادند که فعالیت تمرینی حاد (استفاده از چرخ کارسنج با بار ۴۰ وات و افزایش ۲۰ وات در هر دقیقه) میزان فاکتور رشد اندوتلیال عروق سرم را افزایش می دهد [۲۳] در حالی که برخی دیگر عدم تغییر این فاکتور و حتی کاهش غلظت آن را گزارش کردند [۲۴].

کاهش VEGF سرم به دنبال فعالیت حاد لزوماً به این معنی نیست که فعالیت بدنی میزان تولید VEGF را کاهش می دهد، امکان دارد که کاهش موقتی این فاکتور در پاسخ به تمرین ناشی از اتصال VEGF به گیرنده های موجود بر روی سلول های اندوتلیال باشد. این اتصال محرکی برای ایجاد فرآیند آنژیوژنز در عضله قلبی و اسکلتی است [۲۵]. همچنین در پژوهشی دیگر نشان داده شد که افزایش میزان VEGF سرم، دو ساعت بعد از فعالیت می تواند ناشی از انتقال VEGF عضله اسکلتی به داخل جریان خون باشد [۲۶]. کراوس و همکاران در تحقیقی نشان دادند که پس از دو و چهار ساعت فعالیت هوازی در افراد فعال و غیرفعال سطح VEGF

برابر مصرف غذای پرچرب به همراه تزریق STZ در مطالعه حاضر) مرتبط باشد. یانگ لی و همکاران [۲۱] نیز در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که mir126 ادراری، در بیماری با دیابت نوع دوم همراه با نفروپاتی دیابتی به طور معنی داری بالاتر بود. همچنین بیان کردند که درمان دارویی و ورزش، mir126 ادراری را در بیماران دیابت نوع دوم همراه با نفروپاتی دیابتی کاهش داد. در کل این محققان عنوان کردند که mir126 در ادرار پایدار است و می تواند به عنوان یک بیومارکر نفروپاتی دیابتی و هم چنین نشانگر پاسخ درمانی مورد استفاده قرار گیرد [۲۱]. یکی از دلایل احتمالی این تناقض، می تواند وجود نفروپاتی دیابتی علاوه بر دیابت نوع دوم در آزمودنی های یانگ و همکاران باشد. در حالی که در مطالعه ما، وجود نفروپاتی دیابتی مشخص نشده است. دومین دلیل تناقض یافته های یانگ و همکاران با مطالعه حاضر را می توان به نوع نمونه برداری مرتبط دانست. به طوری که در مطالعه یانگ، mir126 ادراری مورد بررسی قرار گرفته است، در حالی که در مطالعه حاضر، mir126 در بافت قلبی بررسی شده است. بر اساس نتایج مطالعه یانگ و همکاران، این احتمال وجود دارد که mir126 ادراری از سلول ها منشأ می گیرد (به وسیله آگزوزوم ها ترشح می شود). هنگام ترک سلول ها، miRNAها با مولکول های دیگر ارتباط پیدا کرده و بنابراین از تخریب آن ها جلوگیری می شود. احتمالاً، miRNAها از سلول های آسیب دیده اپی تلایال کلیه یا سلول های آسیب دیده اندوتلیال عروق گلو مریولی به داخل ادرار، نشت پیدا کند. بنابراین این موضوع می تواند میزان mir126 ادراری پایین تر مطالعه یانگ لئو و همکاران را توصیف کند.

در مطالعه چانگ لی دو و همکاران [۳۵]، محققان برای نخستین بار تنظیم منفی بیان mir126-3p در سرطان سلول کبد را نشان دادند. طبق ارزیابی های عملکردی آن ها مشخص شد که mir126-3p نقش حیاتی در فرایندهای آنتی متاستاز و آنتی آنژیوژنز در شرایط آزمایشگاهی بازی می کند. این محققان در نتایج خود عنوان کردند که mir126-3p، متاستاز و آنژیوژنز را به ترتیب به وسیله هدف قرار دادن LRP6 و PI3KR2 مهار می کند. آن ها نشان دادند که مقدار mir126-3p همبستگی معکوسی با LRP6 و PI3KR2 در بافت های سرطانی سلول کبدی دارد. با توجه به نتایج به دست آمده می توان بیان کرد که مسیر mir126-3p-PI3KR2-Akt ممکن است به عنوان یک هدف درمانی محتمل، حداقل بر اساس آنژیوژنز عمل کند. mir126 به صورت مستقیم دو تنظیم کننده منفی مسیر VEGF را سرکوب می کند. این دو مسیر عبارت اند از: Sprouty-related protein 1 (Sprd-1) که یک سرکوب کننده درون سلولی مسیر Ras/MAPK می باشد و

بود که هشت هفته تمرین هوازی موجب افزایش معنی دار میزان بیان mir126 در حیوانات سالم و دیابتی می‌شود؛ بنابراین به نظر می‌رسد تمرین هوازی می‌تواند از طریق مسیر mir126/VEGF/PI3KR2 باعث بهبود بیماران دیابتی گردد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر که نشان دهنده توسعه میانجی‌های آنژیوژنز توسط تمرین هوازی هم در قلب سالم و هم در شرایط دیابتی می‌باشد، می‌توان بیان کرد که تمرین هوازی ممکن است به عنوان یک درمان غیردارویی برای بهبود پرفیوژن قلب مورد استفاده قرار گیرد. یافته‌های به دست آمده دانش ما را در مورد سازوکارهای آنژیوژنز در دیابت و تمرین هوازی افزایش می‌دهد و پیشنهاد می‌کند که mir126 و مسیر مرتبط با آن (PI3K/Akt/eNOS) یک هدف درمانی احتمالی برای شرایط پاتولوژیکی درگیر در آنژیوژنز باشند. با این وجود با توجه به مطالعات اندک روی mir126، دیابت و تمرین ورزشی، برای روشن شدن دیگر سازوکارهای درگیر، نیاز به مطالعات بیشتر احساس می‌شود.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر، مستخرج از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی می‌باشد. بدین وسیله از مسئولین محترم دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه خوارزمی و تمامی افرادی که زمینه انجام تحقیق حاضر را فراهم نمودند، نهایت تقدیر و تشکر را داریم.

منابع

- Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Ramazani M. The Effect of Chronic Oral Feeding of *Apium graveolens* on Learning and Memory in Diabetic Rats. *Journal of Medicinal Plants*. 2008;3(27):98-105.
- Martin A, Komada MR, Sane DC. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal research reviews*. 2003 Mar 1;23(2):117-45.
- Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC. 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 Jun 30;164(6):1935-47. 2004;164(6):1935-47.
- Abacı A, Oğuzhan A, Kahraman S, Eryol NK, Ünal Ş, Arınç H, Ergin A. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation*. 1999 May 4;99(17):2239-42.
- Werner GS, Ferrari M, Betge S, Gastmann O, Richartz BM, Figulla HR. Collateral function in chronic total coronary occlusions is related to regional myocardial function and duration of occlusion. *Circulation*. 2001 Dec 4;104(23):2784-90.
- Hazarika S, Dokun AO, Li Y, Popel AS, Kontos CD, Annex BH. Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus differ-

افزایش یافته است [۲۷]. در مطالعه دیگر لیود و همکارانش نیز به بررسی آنژیوژنز و فاکتورهای آن با استفاده از برنامه تمرینی نوارگردان (۴ بار در روز به مدت ۲۴ روز) بر روی عضلات اسکلتی رت‌ها پرداختند. در این مطالعه نتایج آن‌ها نشان داد پدیده رگ زایی در دوازدهمین روز تمرین در رت‌ها اتفاق افتاده است. همچنین آن‌ها افزایش بیان ژن VEGF را نیز در طی اولین ساعت برنامه تمرینی گزارش کردند. در این مطالعه پیشنهاد شده است که افزایش مقدار پروتئین فاکتور رشد اندوتلیال عروق منجر به ایجاد پدیده رگ زایی می‌شود. با این وجود با پیشرفت تمرین، اگرچه بیان پروتئین فاکتور رشد اندوتلیال عروق کاهش یافته بود، اما پدیده رگ زایی هم چنان اتفاق افتاد [۲۸].

مطالعات قبلی بیان کردند که تمرین حاد می‌تواند موجب تنظیم فاکتورهای آنژیوژنزی به خصوص فاکتور رشد اندوتلیال عروق در عضلات اسکلتی شوند [۳۰ و ۲۹]. افزایش در بیان و سطح پروتئین فاکتور رشد اندوتلیال عروق باعث ایجاد تراکم مویرگی در سطح عضلات اسکلتی می‌گردد. همچنین اثر تمرین بر فاکتور رشد اندوتلیال عروق در افراد دیابتی نیز نشانگر افزایش سطح این فاکتور در این بیماران بود. مطالعات دیگر با برنامه‌های تمرینی متفاوت (شامل یک جلسه تمرین و همچنین تمرین استقامتی) نیز نتایجی حاکی از افزایش بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروق و گیرنده‌های آن‌ها و همچنین بهبود میزان تراکم مویرگی ارائه دادند. همچنین سازوکارهای تأثیر تمرین هوازی بر آنژیوژنز با توجه به مسیر mir126، می‌توان به کاهش میزان پروتئین PI3KR2 اشاره کرد که نتایج مطالعه ناتان و همکاران نیز این مورد را نشان داده است [۸]. به نظر می‌رسد افزایش بیان mir126 پس از هشت هفته تمرین استقامتی با کاهش بیان PI3KR2 همراه است و این عامل نیز می‌تواند با میزان بیان فاکتورهای درگیر در مسیر PI3K/Akt/eNOS در ارتباط باشد. به گونه‌ای که در مطالعه ناتان و همکاران نیز نتایج بیانگر ارتباط افزایش بیان mir126 در اثر تمرین هوازی با کاهش بیان PI3KR2 و هم چنین افزایش بیان پروتئین PI3K، فسفوریلاسیون AKT و eNOS بوده است [۳۱]. برخی مطالعات نشان داده‌اند که NO می‌تواند با واسطه VEGF رگ زایی را تحریک کند [۳۳ و ۳۲]. بر عکس نتایج مطالعات دیگر نشان داده‌اند که VEGF با واسطه گیرنده VEGFR1 روی سلول‌های اندوتلیال سبب افزایش بیان NO شده و تولید mRNA آنزیم eNOS را زیاد کرده و بدین ترتیب سبب تقویت رگ‌زایی گردیده است [۳۴].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دیابت نوع دوم موجب کاهش معنی دار میزان بیان mir126 می‌شود. هم چنین نتایج حاکی از آن

- ential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *Circulation research*. 2007 Oct 26;101(9):948-56.
7. Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nature Reviews Cardiology*. 2009 Jun 1;6(6):418-29.
 8. Da Silva Jr ND, Fernandes T, Soci UP, Monteiro AW, Phillips MI, de Oliveira EM. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Medicine and science in sports and exercise*. 2012 Aug;44(8):1453-62.
 9. Nikooie R, Rajabi H, Reza G, Atabi F, Omidfar K. The effect of endurance training on mitochondrial and sarcolemma lactat transporters in skeletal and cardiac muscles in diabetic rats. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*. 2012;11(3):223-36.
 10. Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, Zincarelli C, Sanzari E, Ciccarelli M, Galasso G, Altobelli GG. Exercise promotes angiogenesis and improves β -adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovascular Research*. 2007 Jan 1.
 11. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Developmental cell*. 2008 Aug 12;15(2):261-7.
 12. Kuhnert F, Mancuso MR, Hampton J, Stankunas K, Asano T, Chen CZ, Kuo CJ. Attribution of vascular phenotypes of the murine *Egfl7* locus to the microRNA miR-126. *Development*. 2008 Dec 15;135(24):3989-93.
 13. Bai Y, Bai X, Wang Z, Zhang X, Ruan C, Miao J. MicroRNA-126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization via regulating angiogenic growth factors. *Experimental and molecular pathology*. 2011 Aug 31;91(1):471-7.
 14. 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 Nov 30;66(2):169-75.
 15. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation research*. 2010 Sep 3;107(5):677-84.
 16. Meng S, Cao JT, Zhang B, Zhou Q, Shen CX, Wang CQ. Downregulation of microRNA-126 in endothelial progenitor cells from diabetes patients, impairs their functional properties, via target gene *Spre1*. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012 Jul 31;53(1):64-72.
 17. Ye P, Liu J, He F, Xu W, Yao K. Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression. *Int J Med Sci*. 2013 Dec 10;11(1):17-23.
 18. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation research*. 2010 Sep 17;107(6):810-7.
 19. Liu Y, Gao G, Yang C, Zhou K, Shen B, Liang H, Jiang X. The role of circulating microRNA-126 (miR-126): a novel biomarker for screening prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *International journal of molecular sciences*. 2014 Jun 12;15(6):10567-77.
 20. Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PLoS one*. 2011 Aug 1;6(8):e22839.
 21. Liu Y, Gao G, Yang C, Zhou K, Shen B, Liang H, Jiang X. Stability of miR-126 in Urine and Its Potential as a Biomarker for Renal Endothelial Injury with Diabetic Nephropathy. *International journal of endocrinology*. 2014 Apr 17;2014.
 22. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, Ivey KN, Bruneau BG, Stainier DY, Srivastava D. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Developmental cell*. 2008 Aug 12;15(2):272-84.
 23. Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haïne SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VF, Hoymans VY, Conraads VM. A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *Journal of applied physiology*. 2008 Apr 1;104(4):1006-13.
 24. Gu JW, Gadonski G, Wang J, Makey I, Adair TH. Exercise increases endostatin in circulation of healthy volunteers. *BMC physiology*. 2004 Jan 16;4(1):2.
 25. Kraus RM, Stallings HW, Yeager RC, Gavin TP. Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men. *Journal of Applied Physiology*. 2004 Apr 1;96(4):1445-50.
 26. Höffner L, Nielsen JJ, Langberg H, Hellsten Y. Exercise but not prostanoids enhance levels of vascular endothelial growth factor and other proliferative agents in human skeletal muscle interstitium. *The Journal of physiology*. 2003 Jul 1;550(1):217-25.
 27. Kraus WE, Torgan CE, Duscha BD, Norris JA, Brown SA, Cobb FR, Bales CW, Annex BH, Samsa GP, Houmard JA, Slentz CA. Studies of a targeted risk reduction intervention through defined exercise (STRIDE). *Medicine and science in sports and exercise*. 2001 Oct;33(10):1774-84.
 28. Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL. Angi-

- ogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003 May 1;284(5):H1668-78.
29. Breen EC, Johnson EC, Wagner H, Tseng HM, Sung LA, Wagner PD. Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *Journal of Applied Physiology*. 1996 Jul 1;81(1):355-61.
30. Gavin TP, Spector DA, Wagner H, Breen EC, Wagner PD. Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2000 Apr 1;88(4):1192-8.
31. Du C, Lv Z, Cao L, Ding C, Gyabaah OA, Xie H, Zhou L, Wu J, Zheng S. MiR-126-3p suppresses tumor metastasis and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by targeting LRP6 and PIK3R2. *J Transl Med*. 2014 Sep 22;12(259):10-186.
32. Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S, Esumi H. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*. 1997 Dec;15(4):437-42.
33. Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION*. 2003 Jan 1;50(1):49-60.
34. van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*. 1997 Feb 18;95(4):1030-7.
35. Du C, Lv Z, Cao L, Ding C, Gyabaah OA, Xie H, Zhou L, Wu J, Zheng S. MiR-126-3p suppresses tumor metastasis and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by targeting LRP6 and PIK3R2. *J Transl Med*. 2014 Sep 22;12(259):10-186.