



تأثیر فعالیت ورزشی هوازی در طی بارداری بر بیان ژن *BCL-2*، *BAX* و *eNOS* در عروق فرزندان نر بالغ موش

اعظم عبدالله پور: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی - قلب و عروق و تنفس، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
 حمید رجبی: استاد و متخصص فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران (*نویسنده مسئول) hrajabi@khu.ac.ir
 گائینی: استاد و متخصص فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
 محمد صوفی آبادی: دانشیار و متخصص فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
 ندا خالدی: استادیار و متخصص فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

فعالیت ورزشی هوازی،

بارداری،

آپوپتوز،

عملکرد اندوتلیال

زمینه و هدف: تغییر در عملکرد عروق به عنوان شاخصی برای بیماری‌های عروقی در نظر گرفته می‌شود. از عوامل موثر بر عملکرد عروق آنزیم *eNOS* و فاکتورهای تنظیم کننده آپوپتوز عروق شامل *BAX* و *BCL-2* می‌باشد. هدف این تحقیق بررسی تأثیر تمرینات هوازی در دوران بارداری بر بیان ژن *BCL-2*، *BAX* و *eNOS* عروق فرزندان نر موش بود.

روش کار: در این پژوهش مداخله‌ای و روش تجربی با طرح پس آزمون با گروه کنترل ۱۰ سر موش ماده ۸ هفته‌ای نژاد اسپراگ داولی به طور تصادفی به دو گروه تمرینی (T) $(8/9 \pm 221)$ گرم و کنترل (C) $(12/8 \pm 223)$ گرم تقسیم شدند. فعالیت ورزشی هوازی بارداری بلافاصله بعد از مشاهده پلاک واژنی به مدت ۲۱ روز و ۵ جلسه در هفته با شدت متوسط (۳۵-۴۵ درصد VO_2max) روی نوارگردان انجام شد، و ۲ روز قبل از زایمان خاتمه یافت. بافت برداری از شریان فمور بچه موش‌های نر در سن ۸ هفتهگی انجام شد. آزمون *t* مستقل جهت مقایسه بین گروه‌ها در سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

یافته‌ها: فعالیت ورزشی هوازی با شدت متوسط در حین بارداری باعث افزایش معنی‌دار در بیان ژن *BCL-2* ($p=0/004$) و کاهش معنی‌دار در بیان ژن *BAX* ($p=0/000$) در بچه موش‌های نر شد، ولی تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *eNOS* ($p=0/494$) ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی هوازی در دوران بارداری می‌تواند میزان آپوپتوز و در نتیجه احتمال اختلال عملکرد عروق را در فرزندان بالغ موش کاهش دهد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه علوم پزشکی قزوین

شیوه استناد به این مقاله:

Abdolahpour A, Rajabi H, Gaeini A, Sofiabadi M, Khaledi N. The effect of aerobic exercise during pregnancy on vascular *BCL-2*, *BAX* and *eNOS* Gene expression in adult male offspring rat. Razi J Med Sci. 2019;26(5):56-66.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) صورت گرفته است.



Original Article

The effect of aerobic exercise during pregnancy on vascular *BCL-2*, *BAX* and *eNOS* gene expression in adult male offspring rat

Azam Abdollahpour, PhD Student in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education, Kharazmi University, Tehran, Iran

Hamid Rajabi, PhD, Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education, Kharazmi University, Tehran, Iran (*Corresponding author) hrajabi@khu.ac.ir

Abbasali Gaeni, PhD, Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education, Tehran University, Tehran, Iran

Mohammad Sofiabadi, PhD, Associate Professor of Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Neda Khaledi, PhD, Assistant Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education, Kharazmi University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Change in vascular function is considered to be an indicator for vascular disease. Effective factors on vascular function are enzyme eNOS and apoptotic regulator factors including BCL-2 and BAX. The purpose of this study was to investigate the effect of aerobic exercise during pregnancy on vascular gene expression of *BCL-2*, *BAX*, and *eNOS* in Sprague dawley rats offspring

Methods: Ten 8-week-old females Sprague Dawley rats were randomly divided into two groups of exercise during pregnancy (T) (221±9.9) and sedentary (C) (223.8±8). The aerobic exercise training was performed immediately after observation of the vaginal plaque for 21 days and 5 sessions per week with moderate intensity (35-45% vo₂ max). About 2 days before delivery, their training program was terminated. Femoral artery samples were collected at 8 weeks of male offspring age. Data was analyzed with independent t-test for between group comparisons. The level of significance was set at p<0.05. Statistical analyses were carried out using the SPSS software (version 16).

Results: The results of the study showed that 21 days of aerobic exercise training with moderate intensity during pregnancy increased significantly mRNA of the *BCL-2* gene (P=0.004), decreased significantly mRNA of the *BAX* gene in male offspring (p=0.000), but there was no significant change in mRNA of the *eNOS* gene (p=0.494).

Conclusion: It seems that moderate aerobic exercise during pregnancy can reduce apoptosis as a result of vascular dysfunction in adult offspring.

Conflicts of interest: None

Funding: Gazvin University of Medical Sciences

Keywords

Aerobic exercise,
Pregnancy,
Apoptosis,
Endothelial function

Received: 13/04/2019

Accepted: 13/07/2019

Cite this article as:

Abdollahpour A, Rajabi H, Gaeni A, Sofiabadi M, Khaledi N. The effect of aerobic exercise during pregnancy on vascular *BCL-2*, *BAX* and *eNOS* gene expression in adult male offspring rat. Razi J Med Sci. 2019;26(5):56-66.

This work is published under [CC BY-NC-SA 3.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/).



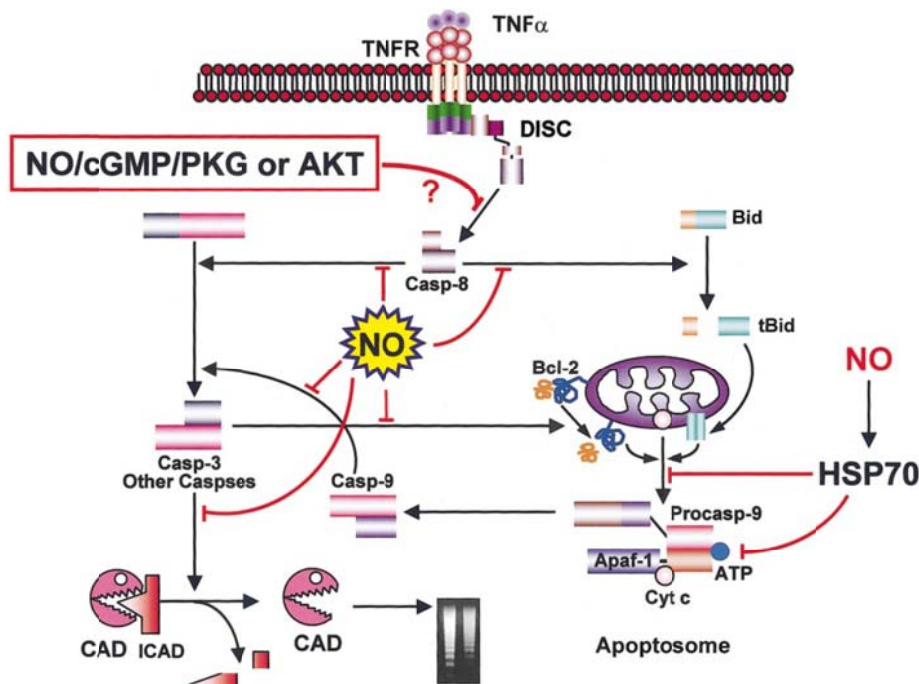
می‌شود. سیگنالینگ آپوپتوزی، مسیرهای سیگنالینگ اختصاصی به راه می‌اندازد که شامل فعالیت پروتئازها می‌باشد، که با تغییرات ویژگی‌های مورفولوژیکی دنبال می‌شود. این تغییرات شامل تغلیظ هسته و سیتوپلاسم، تورم غشاء سیتوپلاسمی، تخریب DNA و در نهایت تکه شدن سلول به اجسام آپوپتوزی که در انتها این اجسام فاگوسیتوز می‌شوند. شروع آپوپتوز در اثر القاء سیگنالینگ مرگ شامل $\text{TNF-}\alpha$ ، Fas و گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد (۱۸).

مطالعات نشان می‌دهد که NO در غلظت‌های فیزیولوژیکی از مرگ سلول‌های اندوتلیال که به وسیله محرک‌های گوناگون شامل $\text{TNF-}\alpha$ و گونه‌های فعال اکسیژن تحریک می‌شوند، جلوگیری می‌کند (۱۹). پروتئین ضد آپوپتوزی BCL-2 تنظیم‌کننده بالا دستی فعالیت BAX می‌باشد. در سلول‌های سالم، BAX به صورت مونومرهایی در سیتوزول و غشاء بیرونی میتوکندری قرار دارد و پروتئین ضد آپوپتوز، با BAX مرتبط شده و فعالیت آن را سرکوب می‌کند و به این شکل از انتشار ستوکروم C از میتوکندری به سیتوپلاسم و شروع آپوپتوز جلوگیری می‌کند (شکل ۱) (۲۰).

در حال حاضر مهم‌ترین علت مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه، بیماری‌های قلبی و عروقی اینک خطر گسترش بیماری‌های قلبی-عروقی از محیط رحم شروع می‌شود، تعیین نقش فعالیت ورزشی در جلوگیری از گسترش بیماری‌های قلبی-عروقی فرزند حیاتی است (۲۲). در همین راستا به نظر می‌رسد رفتار مادران در دوران بارداری سلامت فرزند را در دوران بزرگسالی تحت تاثیر قرار می‌دهد. تحقیقات نشان داده است که در پاسخ به فعالیت ورزشی مادر طی دوران بارداری، خطر بیماری‌های قلبی-عروقی و سرطان در فرزندان کاهش یافته است (۲۳). مشخص شده است که انجام فعالیت ورزشی طولانی بیان ژن NOS3 را در سلول‌های اندوتلیال آنورت موش افزایش می‌دهد (۲۴). از طرفی به خوبی مشخص شده است که افزایش

دوران بارداری از بخش‌های مهم زندگی زنان به حساب می‌آید که می‌تواند از جوانب مختلف از جمله فعالیت بدنی (۱) بر سلامت نوزاد موثر باشد (۳ و ۲). تحقیقات نشان داده‌اند که می‌توان با تغذیه مطلوب و فعالیت زنان در دوران بارداری و قبل از آن از ابتلای نوزادان به بسیاری از بیماری‌های متابولیکی (۴-۲) و قلبی عروقی (۵) به میزان زیادی جلوگیری کرد. به نظر می‌رسد فعالیت بدنی می‌تواند در دوران بارداری بدون دخالت ترکیبات شیمیایی، موجب تغییرات بلندمدت در فنوتیپ و در نتیجه سلامت دوران جنینی و بزرگسالی شود (۴-۲). در مطالعه‌ای تغییرات استئوژنیک و نیم‌رخ لیپیدی فرزندان در پی فعالیت ورزشی ارادی مادر حین بارداری مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج مثبتی را نشان داد (۶). همچنین بهبود هموستاز گلوکز و حساسیت به انسولین (۷ و ۸) بهبود عملکرد شناختی و جلوگیری از اختلال متابولیک در بچه‌ها در پی فعالیت ورزشی دوران بارداری مشخص شده است (۹ و ۴). برخی تحقیقات نیز نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی در زمان بارداری بر شاخص‌های مختلف سلامت جنین، شامل رشد، استرس، و وزن هنگام تولد، موثر است (۱۰-۱۲). همچنین مشاهده شده است که فعالیت بدنی بر تعداد سلول‌های خونی بندناف که در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود اثرگذار می‌باشد (۹).

مطالعات زیادی ارتباط حیاتی بین سلامت عروق و استعداد ابتلا به بیماری‌های گرفتگی عروق را نشان می‌دهد (۱۳ و ۱۴). در حقیقت تغییر در عملکرد عروق به عنوان یک شاخص برای بیماری‌های عروقی در نظر گرفته می‌شود (۱۵ و ۱۶). در این راستا اسید نیتریک (Nitric Oxide-NO) یکی از عواملی است که برای عملکرد طبیعی اندوتلیوم عروق، حیاتی است (۱۷). زیرا تعداد زیادی از مطالعات نقش ضدآپوپتوزی و محافظت‌کننده NO در سلول‌های اندوتلیال را نشان داده است. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، با حوادث بیوشیمیایی و ساختاری متفاوتی از نکروز مشخص



شکل ۱- مسیر سیگنالینگ آپوپتوز و نقش ضدآپوپتوزی NO

همچنین سطوح پروتئین *BCL-2* در گروه آزمایشی بالاتر و سطوح پروتئین *BAX* پایین تر از گروه کنترل بوده است (۲۸). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که نسبت *BAX/BCL-2* بطورمعنی داری با افزایش سن تنظیم مثبت می‌شود و به طور مشخصی انجام تمرینات ورزشی باعث کاهش این نسبت در بطن چپ می‌شود (۲۹). این اطلاعات اشاره می‌کند که قلب مسن نسبت به قلب جوان مستعد آپوپتوز می‌باشد و تمرینات ورزشی درازمدت فعالیت ضدآپوپتوزی را در قلب مسن ایجاد می‌کند (۳۰). همچنین در مطالعه‌ای مشخص شد شش هفته فعالیت بدنی در آب منجر به کاهش معنی-دار در بیان ژن کاسپاز ۳ در بافت میوکاردی موش‌ها شد که نشان‌دهنده کاهش آپوپتوز در بیماری‌های قلبی می‌باشد (۳۱).

با توجه به اثرات مثبت فعالیت ورزشی بر سلامت قلب - عروق، توجه به فعالیت ورزشی در دوران بارداری و بررسی اثرات آن بر فرزندان یکی از عناوین بحث برانگیز و پیچیده می‌باشد. بنابراین نیاز به تحقیقات مناسب در زمینه اثر تمرینات هوازی مادر بر سلامت قلب و عروق فرزندان به عنوان مکانیزم احتمالی کاهش آپوپتوز در سلول‌های اندو تلیال و حفظ یکپارچگی سلول‌ها و

در جریان خون درحین فعالیت ورزشی منجر به تغییرات اصطلاحی در اندوتلیوم می‌شود که فراهمی زیستی NO را از طریق تنظیم مثبت ژن آنزیم *eNOS* افزایش می‌دهد که منجر به عملکرد بهتر اندوتلیال شده و اثرات محافظت کننده در برابر گرفتگی عروق در فرزندان پس از تولد داشته است (۲۵). در مجموع، تغییرات ناشی از فعالیت ورزشی در ساختار اندوتلیال و زیست شیمی آن به وسیله افزایش در استرس برشی ایجاد می‌شود که اجازه می‌دهد مکانیزم‌های محافظتی از قبیل آنزیم‌های آنتی اکسیدان و فاکتورهای ضد آپوپتوز تنظیم مثبت شده و فاکتورهای پیش آپوپتوز تنظیم منفی شوند (۲۶).

در پژوهشی اثر تمرینات استقامتی بر بیان ژن *BCL-2* و *BAX* در قلب موش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن *BAX* و نسبت *BAX/BCL-2* در گروه تمرین پایین تر بود اما مقدار *BCL-2* تفاوت معنی داری نداشت (۲۷). در مطالعه دیگری اثر تمرینات هوازی بر میزان آپوپتوز در قلب هایپرتروفی شده مرضی مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که انجام فعالیت هوازی در موش‌های پرفشار خون در مقایسه با گروه کنترل منجر به افزایش بیان ژن *eNOS* شده و

کردن، و در انتهای هر جلسه نیز به مدت ۱ دقیقه و با سرعت ۸ متر بر دقیقه به منظور سرد کردن، بر روی تردمیل دویدند. پروتکل اصلی تمرین هفته اول با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه شروع شد، و در هفته سوم به ۱۲ متر بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه رسید. به منظور جلوگیری از اعمال فشار ناگهانی ابتدای هر هفته به مقدار یک متر بر دقیقه به سرعت، و هر دو تا سه روز نیز به مقدار دو تا سه دقیقه به زمان دویدن اضافه شد (جدول ۱). در تمام دوران تمرین سعی بر این بود که هیچ‌گونه استرسی به رت‌های باردار وارد نشود و حیوانات تنها با تیمار دم تحریک به دویدن می‌شدند. در انتها نیز با توجه به شرایط ظاهری موش‌ها، دو روز قبل از زایمان از پروتکل خارج شدند تا آماده زایمان شوند (۲۶). گروه کنترل هم مشابه گروه تمرین در طول مدت بارداری هر هفته ۵ جلسه بر روی تردمیل خاموش در ساعت‌های مشخص قرار می‌گرفتند تا در شرایط مشابه گروه تمرینی قرار بگیرند. به طور میانگین از هر مادر حدود ۱۲ موش متولد شد. ابتدای هر هفته وزن موش‌ها و غذای مصرفی آن‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم (A&D EK5100i Japan) کنترل می‌شد. بعد از ۲۱ روز (PND = ۲۱) نوزادان از شیر گرفته و بچه موش‌های نر و ماده هر مادر از هم جدا شدند و تا هشت هفتهگی (PND = ۵۶) مراقبت شدند. سپس بچه موش‌های نر با ترکیب کتامین-زایلانین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده (۳۴) و شریان فمور موش‌ها در شرایط استریل جدا، داخل میکروتیوپ‌های RNS/DNS free و سپس داخل تانک نیتروژن مایع قرار گرفته و برای آزمایش‌های بعدی به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند.

اطلاعات مربوط به توالی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از بانک اطلاعاتی Primer3 و NCBI و جستجوی بهترین پرایمر فروارد و ریورس، سپس ارزیابی کیفیت و اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده با استفاده از پرایمر بلاست، و در نهایت بررسی احتمال تشکیل دایمر توسط نرم افزار ژن رانر انجام شد. بعد از طراحی پرایمر، از روش Real Time PCR برای بررسی بیان ژن استفاده شد، بافت‌های جدا شده برای بررسی بیان ژن‌های *BCL-2*، *BAX* و *eNOS* با استفاده

در نتیجه بهبود عملکرد اندوتلیال و کاهش احتمال ابتلاء به گرفتگی عروق احساس می‌شود. از این رو پژوهش حاضر با توجه به نبود پژوهش‌های کافی در این زمینه، با هدف بررسی تاثیر فعالیت هوازی مادر به عنوان مداخله‌ای ایمن و پیشگیری کننده در دوران بارداری بر مقادیر بیان ژن *BCL-2*، *Bax* و *eNOS* در عروق فرزندان موش نر انجام شد.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع مداخله‌ای و روش تجربی با طرح پس‌آزمون با گروه کنترل بود. ۱۰ سر موش صحرایی ماده نژاد اسپراگدولی با ۶ هفته سن و میانگین وزنی ۱۶۰ گرم، از مرکز انستیتو پاستور رازی (کرج) خریداری و بعد از انتقال به حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی قزوین در دوره‌های ۱۲:۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، دسترسی آزاد به آب و غذا، درجه حرارت محیط 23 ± 1 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 50 ± 10 درصد نگهداری شدند. تمام آزمایش‌ها بر اساس دستورالعمل کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی قزوین طراحی گردید (کد اخلاق: IR.QUMS.REC.1396.288). حیوانات بعد از رسیدن به وزن مطلوب برای بارداری (۸ هفته سن و وزن تقریبی $10/85 \pm 222$ گرم) به طور تصادفی به گروه‌های تمرین حین بارداری (T) و کنترل (C) تقسیم گردیدند. یک هفته قبل از بارداری موش‌ها به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه با انجام فعالیت دو روی دستگاه تردمیل با نحوه انجام کار آشنا شدند. بعد از یک هفته آشنایی با تردمیل، موش‌های ماده هر گروه به صورت جداگانه برای جفت‌گیری در کنار موش‌های نر قرار گرفتند. روز مشاهده پلاک واژینال بعنوان روز اول بارداری در نظر گرفته شد (۳۲) و بلافاصله موش‌های باردار وارد پروتکل تمرین هوازی به مدت ۲۱ روز شدند. برنامه فعالیت هوازی حین بارداری موش‌ها بر روی تردمیل و بدون شیب اجرا شد. شدت فعالیت متوسط (۳۵ تا ۴۵ درصد VO_2max) بر اساس سرعت دویدن روی تردمیل مشخص شد (۳۳). فعالیت هوازی به مدت تقریبی ۲۱ روز، ۵ روز در هفته و روزانه یک جلسه انجام شد. در ابتدای هر جلسه موش‌ها به مدت ۳ دقیقه و با سرعت ۸ متر بر دقیقه به منظور گرم

جدول ۱- جدول پروتکل تمرین هوازی در حین بارداری

هفته اول بارداری	هفته دوم بارداری	هفته سوم بارداری
زمان دویدن = ۱۰ دقیقه	زمان دویدن: ۲۰ دقیقه	زمان دویدن: ۳۰ دقیقه
سرعت: ۱۰ متر بر دقیقه	سرعت دویدن: ۱۱ متر بر دقیقه	سرعت دویدن: ۱۲ متر بر دقیقه

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

Factors	Primer forward and reverse	Size(bp)
BCL-2	FW5'- GGGAGAGTCAACAGGGAGA-3' Rv5- CTTCAGAGACAGCCAGGAGA-3'	177
BAX	FW5'- GCAAACCTGGTGCTCAAGG-3' Rv5'- CAGCCACAAAGATGGTCA-3'	183
eNOS	FW5'- ACAGCCAACACACCAAGTC-3 Rv5- CTGGGTCATGGATTGCTTTG-3	196
GAPDH	FW5'- AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3 Rv5' - CATACTCAGCACCAGCATCACC	121

گرفتند (۳۶). کارایی پرایمرها بعد از تهیه رفتهای ۱ به ۱۰ از ژن ها و با استفاده از منحنی استاندارد، همان گونه که در فرمول مشخص شده است، ارزیابی شد.

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

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

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

جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد و برای مقایسه تفاوت گروه‌ها از آزمون t مستقل استفاده شد. سطح معنی‌داری برای تمامی گروه‌ها $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

یافته‌ها

نتایج آزمون شاپیروویلک طبیعی بودن توزیع داده‌ها را در دو گروه آزمایشی و کنترل نشان داد (جدول ۳). در ادامه از آزمون t مستقل جهت بررسی موارد مورد نظر استفاده شد. با توجه به عدم معنی‌داری آزمون لوین از آزمون t مستقل با فرض تساوی واریانس‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که میانگین مقادیر BCL-2 mRNA در شیریان فمور فرزندان نر گروه تمرین حین بارداری (0.0001 ± 0.00023) بیشتر از میانگین گروه کنترل (0.0002 ± 0.00073) می‌باشد ($p < 0.004$). لذا، به نظر می‌رسد فعالیت هوازی

از محلول کیازول (۱ میلی‌لیتر) (ترایزول ساخت شرکت کیاژن) (Cat # ۷۹۳۰۶)، و به صورت دستی هموزن شدند. سپس طبق دستورالعمل شرکت کیاژن، و با شستشو توسط کیازول (ترکیب فنولی)، RNA کل از بافت‌های هموزن شده استخراج گردید. به منظور بررسی درجه خلوص RNA استخراج شده، از دستگاه نانودراپ استفاده شد، و مشخص شد که A260/A280 نزدیک به ۲ می‌باشد.

در مرحله بعد، سنتز cDNA از روی RNAهای استخراج شده با استفاده از دستورالعمل کیت Aid First Strand Revert cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific) (Cat# K1622)، انجام شد. سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ژن های BCL-2، BAX و eNOS به روش quantitative Real time PCR و با استفاده از ژن کنترل GAPDH مورد بررسی قرار گرفتند (۳۵). جفت بازهای موجود در پرایمرهای استفاده شده در جدول ۲ آورده شده است.

فرایند تکثیر شامل یک چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه جهت واسرشتگی اولیه cDNA ساخته شده، و ۴۰ چرخه دو مرحله‌ای برای هر چرخه Real-Time PCR می‌باشد که به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه تنظیم شدند. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta \Delta Ct}$ مورد ارزیابی قرار

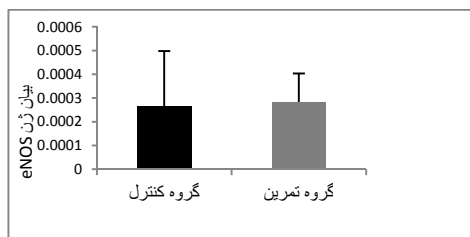
جدول ۳- بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها

متغیرها	گروه‌ها	Statistic	Df	Sig.	Shapiro- Wilk
BCL-2	تمرین	۰/۸۵	۶	۰/۱۷	
	کنترل	۰/۹۴	۵	۰/۷۰	
BAX	تمرین	۰/۹۲	۶	۰/۵۰	
	کنترل	۰/۹۰	۵	۰/۴۱	
eNOS	تمرین	۰/۹۱	۶	۰/۴۶	
	کنترل	۰/۹۴	۵	۰/۶۷	

جدول ۴- مقایسه mRNA ژن‌های BCL-2، BAX و eNOS در بافت عروق دو گروه کنترل و تمرین

متغیر	گروه	میانگین	انحراف استاندارد	t	Df	*P
BCL-2	تمرین	۰/۰۰۰۲۳	۰/۰۰۰۱۰	۳/۷۹۷	۱۰	*./۰۰۴
	کنترل	۰/۰۰۰۰۷۳	۰/۰۰۰۰۲۰			
BAX	تمرین	۰/۱۶۰۶	۰/۰۴۹۵	۵/۴۶۷	۱۰	*./۰۰۰
	کنترل	۰/۳۰۹۰	۰/۰۴۴۳			
eNOS	تمرین	۰/۰۰۰۲۸	۰/۰۰۰۱۱	۰/۷۱۰	۹	۰/۴۹۴
	کنترل	۰/۰۰۰۲۷	۰/۰۰۰۰۶			

*نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل



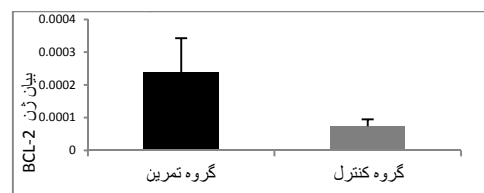
نمودار ۳- تفاوت eNOS mRNA بین گروه تمرین و کنترل

از طرفی مقایسه میانگین مقادیر بیان mRNA eNOS بین گروه تمرین حین بارداری ($0/00028 \pm 0/00011$) و گروه کنترل ($0/00027 \pm 0/00006$) با سطح معنی‌داری $p < 0/05$ نشان داد که میانگین‌ها با هم تفاوت معنی‌داری ندارند ($p < 0/494$) (جدول ۴) (نمودار ۳).

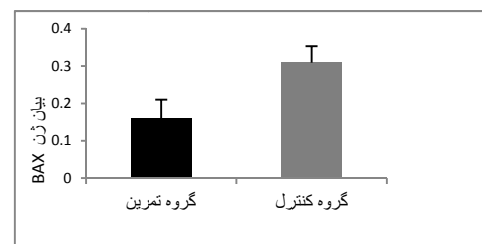
بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر که به دنبال بررسی تغییرات بیان برخی ژن‌های مرتبط با گرفتگی عروق فرزندان موش‌های نر مادران فعال در دوران بارداری بود، نشان داد که یک دوره فعالیت ورزشی هوازی با شدت متوسط در دوران بارداری موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن BCL-2 و کاهش معنی‌دار بیان ژن BAX در گروه تمرین حین بارداری و عدم تفاوت معنی‌دار در بیان ژن eNOS بین دو گروه تمرین حین بارداری و گروه کنترل

با شدت متوسط حین بارداری می‌تواند بیان ژن BCL-2 را بطور معنی‌داری افزایش دهد (جدول ۴) (نمودار ۱). همچنین نتایج تحقیق با سطح معنی‌داری $p < 0/05$ نشان داد که میانگین مقادیر BAX mRNA در شریان فمور فرزندان نر گروه تمرین حین بارداری ($0/1606 \pm 0/0495$) کمتر از میانگین گروه کنترل ($0/3090 \pm 0/0443$) است ($p < 0/001$). لذا، انجام فعالیت هوازی با شدت متوسط حین بارداری بیان ژن BAX را بطور معنی‌داری کاهش می‌دهد (جدول ۴) (نمودار ۲).



نمودار ۱- تفاوت BCL-2 mRNA بین گروه تمرین و کنترل



نمودار ۲- تفاوت BAX mRNA بین گروه تمرین و کنترل

معنی دار ضربان فشار همراه است. این موضوع در سراسر سیکل قلبی یک افزایش کشش ریتمیک اندوتلیال و عضلات صاف عروقی را ایجاد می کند و مطالعات پیشنهاد می کند که این کشش ریتمیک یک فنوتیب سلول اندوتلیال ضد آتروژنیک را از طریق تنظیم مثبت *eNOS mRNA*، پروتئین و فعالیت ذاتی آنزیمی ایجاد می کند (۱۴). در خصوص بررسی اثر فعالیت ورزشی در دوران بارداری بر عملکرد اندوتلیال بچه ها مشخص شد در نوزادان ماده خوک مادران فعال پاسخ استراحتی وابسته به اندوتلیوم (برادی کینین) در زمان تولد بیشتر از گروه بی تحرک بود (۱۶) و شل شدن سلول های عضلات صاف عروق در واکنش به نیترو پروسید سدیم کاهش یافت (۲۲). انجام فعالیت ورزشی در دوران بارداری باعث افزایش ضربان قلب و جریان خون جنین می شود. روشن است که تغییر در محرک همودینامیک می تواند منجر به تنظیم تغییرات اپی ژنتیکی شامل متیلاسیون DNA و تغییرات هیستون ها شود. افزایش نیروی برشی اریتروسیت های در حال حرکت در مواجهه با اندوتلیوم، میزان فعالیت زیستی NO را از طریق تنظیم مثبت و افزایش فعالیت ذاتی *eNOS*، افزایش می دهد (۱۶).

یکی دیگر از یافته های مشاهده شده در پژوهش حاضر افزایش معنی دار در بیان ژن *BCL-2* و کاهش معنی دار در بیان ژن *BAX* در شریان فمور بچه موش های نر بود. همان طور که اشاره شد فعالیت ورزشی با زیاد کردن جریان خون و استرس برشی منجر به افزایش تولید NO و تنظیم مثبت ذاتی فعالیت آنزیم *eNOS* می شود (۳۹). یکی از اثرات NO تاثیر بر میزان ژن های مرتبط با آپوپتوز عروق مثل *BAX* و *BCL-2* می باشد. پروتئین های خانواده *BCL-2* مسیر آپوپتوز درونی را تنظیم می کنند. این پروتئین ها به دو زیر گروه تقسیم می شوند شامل پروتئین های ضد آپوپتوز مثل *BCL-x*، *BCL-2* و پروتئین های پیش آپوپتوزی مثل *BAX*. در سلول های سالم، *BAX* به صورت مونومرایی در سیتوزول و غشاء بیرونی میتوکندری قرار دارد. پروتئین های ضد آپوپتوز *BCL-2* و *BCL-x1* تنظیم کننده های بالادستی فعالیت *BAX* هستند. در سلول های سالم، پروتئین های ضد آپوپتوز، با *BAX* و *BAK* مرتبط شده و فعالیت آنها را سرکوب می کنند

در بافت رگ فمور فرزندان نر موش ها شد. تاکنون مطالعه ای یافت نشده است که به بررسی تاثیر فعالیت ورزشی هوازی دوران بارداری بر بیان ژن *BCL-2*، *BAX* و *eNOS* پرداخته باشد ولی در مطالعات جداگانه ای تاثیر فعالیت ورزشی در زمان بارداری بر عملکرد سلول های اندوتلیال و عضلات صاف عروق فرزندان موش ها مورد بررسی قرار گرفته است (۱۶ و ۲۲). بر اساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر بیان ژن *eNOS* در رگ فمور بچه موش های نر گروه مادران فعال در دوره بارداری نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نداشت. نتایج حاصل از تحقیق در رابطه با اثر فعالیت ورزشی بر بیان ژن *eNOS* در موش های غیر باردار نشان می دهد که ۴ هفته تمرین ورزشی موش ها سطوح پروتئین *eNOS* را در بافت آئورتی افزایش داده است (۳۷). همچنین در پژوهش دیگری که بر روی موش ها انجام شد پس از ۳ هفته فعالیت ورزشی مقدار *eNOS mRNA* در بافت بطن چپ قلب افزایش یافت (۳۸). در پژوهش حاضر در ظاهر بیان ژن *eNOS* افزایش معنی داری نداشت اما می توان احتمال داد که یا توجه به پژوهش های مرتبط، افزایش در فعالیت ذاتی *eNOS* فعال اتفاق افتاده باشد، بدون اینکه نیاز به افزایش در مقدار آن باشد. در نتیجه میزان NO غیر فعال را کاهش داده و میزان قابلیت زیستی NO را افزایش می دهد (۳۹).

سطوح *eNOS* در سلول های اندوتلیال به طور موثری بوسیله تغییر در ثبات *eNOS mRNA* تنظیم می شود. نتایج تحقیقات نشان می دهد که فعالیت *eNOS* از طریق فسفوریلاسیون آن تنظیم می شود. جایگاه های متفاوتی در *eNOS* می تواند فسفوریله شود که جایگاه مهم آن ser1177 در *eNOS* انسان می باشد. این جایگاه به سرعت در اثر استرس برشی فسفوریله می شود (۴۰). فسفوریله شدن این جایگاه بر اثر استرس برشی به وسیله فعال شدن مسیر *AKT* و *PKA* (۴۱) اتفاق می افتد. فعالیت ورزشی افزایش قدرتمندی در جریان خون به قلب و عضلات ایجاد می کند. این افزایش ها در جریان خون در طی فعالیت ورزشی نیروی استرس برشی را ایجاد کرده و همان طور که اشاره شد منجر به افزایش فعالیت ذاتی آنزیم *eNOS* می شود (۱۴). افزایش جریان خون در طی ورزش همچنین با افزایش

(۴۲).

پیش زمینه شروع گرفتگی عروق می باشد، جلوگیری می کند.

با استناد به نتایج به دست آمده از این پژوهش و توجه به نتایج مطالعات پیشین می توان نتیجه گرفت که فعالیت هوازی مادر در دوران بارداری احتمال ابتلا به گرفتگی عروق و در نتیجه اختلال عملکرد عروق فرزندان را در دوران بزرگسالی کاهش دهد.

با توجه به وجود محدودیت در زمینه مالی، امکان استفاده از نمونه های بیشتر و اندازه گیری سایر ژن های مرتبط با آپوپتوز امکان پذیر نبود.

البته جهت نتیجه گیری بهتر پیشنهاد می شود پژوهش های دیگری با القاء گرفتگی عروق در بچه موش های نر انجام شده و در آن عوامل دیگری که بر میزان آپوپتوز اثرگذار است بررسی شود (اندازه گیری پروتئین های شوک حرارتی، اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانتی، اندازه گیری فعالیت کاسپاز ۳).

تقدیر و تشکر

این پژوهش برگرفته از طرح تحقیقاتی از دانشگاه علوم پزشکی قزوین می باشد که در تاریخ ۲ آذر ۱۳۹۶، با کد ۱۵۱۰۷ تصویب شده است. در این راستا از تمام عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش همیاری کردند کمال تشکر را دارم. از جناب آقای دکتر پیمانی، معاون پژوهشی و دانشیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین، جناب آقای دکتر رجایی و دکتر فروغی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین، و خانم ریحانه زرباف دکتری فیزیولوژی ورزشی که شرایط تسهیل انجام این پروژه را فراهم کردند بسیار سپاسگزارم.

References

1. Eclarinal JD, Zhu S, Baker MS, Piyarathna DB, Coarfa C, Fiorotto ML, et al. Maternal exercise during pregnancy promotes physical activity in adult offspring. The Federation of American Societies for Experimental Biology. FASEB J; 2016.30(7):2541-8.
2. Zhang J, Zhou X, Yuan H, Niu Y, Di F, Fu L. Paternal lifestyle influence susceptibility to high-fat diet-induced metabolic disorders among male offspring of C57BL/6 mice. Int J Clin Exp Med; 2017.10(1):1715-24.
3. Laker RC, Wlodek ME, Connelly JJ, Yan Z.

در خصوص تاثیر فعالیت ورزشی در زمان غیربارداری بر بیان ژن های BCL-2 و BAX مطالعاتی موجود است. در مطالعه افشار جعفری مشخص شد که انجام سه ماه فعالیت ورزشی هوازی توسط موش ها بیان ژن پروتئین پروآپوپتوز BAX در میوسیت های قلبی را کاهش داد که همراستا با تحقیق حاضر است اما تغییری در بیان ژن BCL-2 ایجاد نشد (۲۷). در مطالعه دیگری اثر تمرینات هوازی بر میزان آپوپتوز در قلب های پرتروفی شده مورد بررسی قرار گرفت که مشخص شد بیان ژن eNOS و سطوح پروتئین BCL-2 افزایش داشته و سطوح پروتئین BAX کاهش را نشان می دهد که با نتایج این پژوهش همراستا می باشد (۲۸).

NO از چند مسیر منجر به کاهش آپوپتوز سلول های اندوتلیال می شود. بر اساس مطالعات مشخص شده است که NO از طریق اس-نیتروزیله کردن کاسپاز ۱ و ۳ در سلول های اندوتلیال مانع از فعالیت بخش پروتئاز کاسپازها شده و از بروز آپوپتوز جلوگیری می کند (۴۳). همچنین NO سطوح بیان ژن BCL-2 را افزایش داده و مانع از قابلیت نفوذپذیری منافذ غشاء میتوکندری شده و از رهائش سیتوکروم C داخل سیتوزول ممانعت می کند، در نتیجه از تشکیل آپوپتوزوم و فعال شدن کاسپاز ۹ جلوگیری می کند (۴۴). همچنین مشخص شده کاهش مقدار BAX می تواند آپوپتوز را به وسیله کوچک کردن منافذ قابل نفوذ میتوکندری کاهش دهد (۲۸).

عملکرد بد اندوتلیال عروق که به وسیله کاهش فراهمی زیستی و فعالیت زیستی NO آشکار می شود به عنوان اولین اتفاق در فرآیند گرفتگی عروق در نظر گرفته می شود (۴۵). فعالیت ورزشی میزان جریان خون و در نتیجه استرس برشی را تقویت کرده و فعالیت عناصر سازنده eNOS را تنظیم مثبت می کند و در نتیجه هم مقدار تولید و هم فعالیت زیستی NO را افزایش می دهد (۴۶). از این رو NO اثرات ضدآپوپتوزی را در درون عروق تقویت می کند. در پژوهش حاضر به نظر می رسد فعالیت زیستی آنزیم eNOS بدون افزایش در مقدار آن باعث افزایش بیان ژن BCL-2 و کاهش بیان ژن BAX شده و در نتیجه از ایجاد آپوپتوز که

- Epigenetic origins of metabolic disease: the impact of the maternal condition to the offspring epigenome and later health consequences. *Food Sci Hum Wellness*; 2013.2(1):1-11.
4. Mathias PC, Elmhiri G, de Oliveira JC, Delayre-Orthez C, Barella LF, Tófolo LP, et al. Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. *Eur J Nutr*; 2014.53(3):711-22.
 5. Chung E, Joiner HE, Skelton T, Looten KD, Manczak M, Reddy PH. Maternal exercise upregulates mitochondrial gene expression and increases enzyme activity of fetal mouse hearts. *Physiol Rep*; 2017.5(5):e13184.
 6. Gaeini AA, Shafiei Neek L, Choobineh S, Baghaban Eslaminejad M, Satarifard S, Sayahpour FA, et al. Preconception endurance training with voluntary exercise during pregnancy positively influences on remodeling markers in female offspring bone. *J Matern-Fetal Neo M*; 2016.29(22):3634-40.
 7. Stanford KI, Lee M-Y, Getchell KM, So K, Hirshman MF, Goodyear LJ. Exercise before and during pregnancy prevents the deleterious effects of maternal high-fat feeding on metabolic health of male offspring. *Diabetes*; 2015.64(2):427-33.
 8. Carter LG, Qi NR, De Cabo R, Pearson KJ. Maternal exercise improves insulin sensitivity in mature rat offspring. *Med Sci Sport Exerc*; 2013.45(5):832.
 9. Onoyama S, Qiu L, Low HP, Chang C-I, Strohsnitter WC, Norwitz ER, et al. Prenatal maternal physical activity and stem cells in umbilical cord blood. *Med Sci Sports Exerc*; 2016.48(1):82.
 10. Clapp JF. Exercise in pregnancy: a brief clinical review. *Fetal Matern Med Rev*. 1990;2(1):89-101.
 11. Rosa BV, Firth EC, Blair HT, Vickers MH, Morel PC. Voluntary exercise in pregnant rats positively influences fetal growth without initiating a maternal physiological stress response. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 2011.300(5):R1134-R41.
 12. Ferraro ZM, Gaudet L, Adamo KB. The potential impact of physical activity during pregnancy on maternal and neonatal outcomes. *Obstet Gynecol Surv*; 2012.67(2):99-110.
 13. Williams SJ, Hemmings DG, Mitchell JM, McMillen IC, Davidge ST. Effects of maternal hypoxia or nutrient restriction during pregnancy on endothelial function in adult male rat offspring. *J Physiol*; 2005.565(1):125-35.
 14. Newcomer SC, Thijssen DH, Green DJ. Effects of exercise on endothelium and endothelium/smooth muscle cross talk: role of exercise-induced hemodynamics. *J Appl Physiol*; 2011.111(1):311-20.
 15. Poston L. Influences of maternal nutritional status on vascular function in the offspring. *Curr Drug Targets*; 2007.8(8):914-22.
 16. Newcomer S, Taheripour P, Bahls M, Sheldon R, Foust K, Bidwell C, et al. Impact of porcine maternal aerobic exercise training during pregnancy on endothelial cell function of offspring at birth. *J Dev Orig Health Dis*; 2012.3(1):04-9.
 17. Zeiher AM. Endothelial vasodilator dysfunction: pathogenetic link to myocardial ischaemia or epiphenomenon? *The Lancet*; 1996.348:S10-S2.
 18. Kim Y-M, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem*; 1997.272(49):31138-48.
 19. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ice)-like and cysteine protease protein (cpp)-32-like proteases. *J Exp Med*; 1997.185(4):601-8.
 20. Lee SJ, Kim KM, Namkoong S, Kim CK, Kang YC, Lee H, et al. Nitric oxide inhibition of homocysteine-induced human endothelial cell apoptosis by down-regulation of p53-dependent Noxa expression through the formation of S-nitrosohomocysteine. *J Biol Chem*; 2005.280(7):5781-8.
 21. Firoozrai M, Sharifi AM, Najafi M, Hosseini Gohari L. Angiotensin converting enzyme(ACE) activity, levels of lipids and apolipoproteins in patients with coronary artery disease. *Razi J Med Sci*; 2008.14(57):151-6.
 22. Clifford KA. The effects of maternal exercise during pregnancy on the vascular smooth muscle cell function of offspring. *Coll Health Hum Sci*; 2012.
 23. Blaize AN, Pearson KJ, Newcomer S. Impact of maternal exercise during pregnancy on offspring chronic disease susceptibility. *Exerc Sport Sci Rev*; 2015.43(4):19
 24. Yang AL, Tsai SJ, Jiang MJ, Jen CJ, Chen Hi. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta. *J Biol Sci*; 2002.9(2):149-55.
 25. Laughlin MH, Newcomer SC, Bender SB. Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. *J Appl Physiol*; 2008.104(3):588-600.
 26. Marsh SA, Coombes JS. Exercise and the endothelial cell. *Int. J. Cardiol*. 2005;99(2):165-9.
 27. Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. Effect of exercise training on Bcl-2 and Bax gene expression in the rat heart. *Gene Cell Tissue*; 2015.2(4).
 28. Lee YI, Cho JY, Kim MH, Kim KB, Lee DJ, Lee KS. Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. *Eur J Appl Physiol*; 2006.97(2):216-24.
 29. Kwak HB, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart.

Federation of American Societies for Experimental Biology. *FASEB J*; 2006.20(6):791-3.

30. Sonfi FG, Farajnia S, Aslanabadi N, Ahmadiasl N, Alipour M, Alipour M, et al. Long-term exercise training affects age-induced changes in HSP70 and apoptosis in rat heart. *Gen Physiol Biophys*; 2008.27(4):263.

31. Akbari M, Shahidi F, Rajabi H, Kashef M, Mazaheri Z. The simultaneous effect of six weeks forced swimming and crocin supplementation on the expression of 3-cardiomyocyte genes 3 in male rats infected with hydrogen peroxide. *Razi J Med Sci*; 2018.25(9):0.

32. da Silva SG, de Almeida AA, Fernandes J, Lopim GM, Cabral FR, Scerni DA, et al. Maternal exercise during pregnancy increases BDNF levels and cell numbers in the hippocampal formation but not in the cerebral cortex of adult rat offspring. *PLoS One*; 2016.11(1):e0147200.

33. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.*; 2007.14(6):753-60.

34. Jemiolo B, Trappe S. Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. *Biochem Biophys Res Commun*; 2004.320(3):1043-50.

35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*; 2001.25(4):402-8.

36. Camarillo I, Clah L, Zheng W, Zhou X, Larrick B, Blaize N, et al. Maternal exercise during pregnancy reduces risk of mammary tumorigenesis in rat offspring. *Eur J Cancer Prev*; 2014.23(6):502.

37. Green DJ, Maiorana A, O'driscoll G, Taylor R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol*; 2004.561(1):1-25.

38. Kojda G, Cheng YC, Burchfield J, Harrison DG. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation*; 2001.103(23):2839-44.

39. Wang J, Wolin MS, Hintze TH. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *Circ Res*; 1993.73(5):829-38.

40. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 2003.284(1):R1-R12.

41. Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms role of protein kinase A *J Biol Chem*; 2002.277(5):3388-96.

42. Snyder CM, Shroff EH, Liu J, Chandel NS.

Nitric oxide induces cell death by regulating anti-apoptotic BCL-2 family members. *PLoS One*; 2009.4(9):e7059.

43. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*; 2001.282(5):1075-9.

44. Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *BMB Rep*; 2002.35(1):116-26.

45. Bahls M, Sheldon RD, Taheripour P, Clifford KA, Foust KB, Breslin ED, et al. Mother's exercise during pregnancy programmes vasomotor function in adult offspring. *Int J Clin Exp Physiol*; 2014.99(1):205-19.

46. Di Francescomarino S, Sciartilli A, Di Valerio V, Di Baldassarre A, Gallina S. The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports Med*; 2009.39(10):797-812.