

بیان ژنی گیرنده بتا-۲ آدرنرژیک و سطح FMD در مردان میانسال کم تحرک: اثر هشت هفته فعالیت منظم ورزشی

دکتر بختیار ترتیبیان^{۱*}، بهروز بقایی^۲، امیر منفردان^۳، الناز مسافری^۴

تاریخ دریافت: 1391/07/12 تاریخ پذیرش: 1391/10/01

چکیده

پیش زمینه و هدف: هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر هشت هفته تمرین منظم ورزشی بر بیان ژنی گیرنده بتا-۲ آدرنرژیک (Adrenergic Receptor B2) و سطح FMD (Flow Mediate Dilation) در مردان میانسال کم تحرک می باشد.

مواد و روش ها: تحقیق حاضر از نوع نیمه تجربی با اندازه گیری ها متعدد می باشد. از بین ۹۶ مرد میانسال داوطلب، ۲۰ آزمودنی (۴۰-۵۵ سال) پس اخذ رضایت نامه در تحقیق شرکت داده شدند و سپس به دو گروه تمرین (۱۰ نفر) و گروه کنترل (۱۰ نفر) تقسیم شده و هشت هفته تمرین ورزشی (مدت: ۴۵ دقیقه، سرعت: ۵۰-۶۵ درصد حداکثر ضربان قلب فعالیت، شیب: صفر درجه) را اجرا کردند، و در سه مرحله: پایه، بعد از چهار هفته، و هفت هفته (هشتم) شاخص های فوق (FMD و ADRB2) اندازه گیری شد. برای بررسی mRNA گیرنده ADRB2 از Real time PCR و برای FMD از Pulsed Doppler Velocity Signal استفاده شد.

یافته ها: بیان ژنی ADRB2 بعد از چهار و هشت هفته فعالیت ورزشی افزایش معنی داری در گروه تمرین داشت ($P < 0/001$)، لیکن بیان ژنی این گیرنده در گروه کنترل بعد از چهار هفته کم تحرکی در گروه کنترل افزایش معنی داری یافت ($P < 0/026$) با این حال بعد از هشت هفته کاهش یافت ($P < 0/386$). سطح FMD بعد از چهار و هشت هفته تمرین ورزشی در گروه تمرین افزایش معنی داری یافت ($P < 0/001$). در گروه کنترل نیز سطح بعد از چهار هفته تغییر معنی داری نیافت ($P < 0/310$) اما بعد از هشت هفته سطح آن کاهش معنی داری داشت ($P < 0/010$).

بحث و بررسی: فعالیت منظم ورزشی باعث افزایش بیان ژنی گیرنده ADRB2 و سطح FMD در مردان میانسال می شود، در حالیکه کم تحرکی باعث کاهش این شاخص ها می شود.

کلمات کلیدی: FMD، ADRB2، مردان میانسال، ورزش

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره هفتم، ص ۸۱۷-۸۰۷، ویژه نامه اسفند ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: ارومیه، جاده سرو، دانشگاه ارومیه، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، تلفن: ۰۹۱۴-۹۲۶۵۵۶۸

Email: ba_tartibian@gmail.com

مقدمه

وضعیت فیزیولوژیکی عمومی است که در ایجاد و یا گسترش بیماری هایی همانند تصلب شریان، هیپرتروفی بطن چپ، ضعف احتقانی قلب و سکتة تیز موثر می باشد. این بیماری حتی تهدیدی برای سلامت کلیه ها نیز محسوب شده و باعث ضعف شدید یا نارسایی آنها می گردد. بعلاوه، فشار خون پس از دیابت دومین عامل عمومی فراگیر در جمعیت های بالغ نیز محسوب می شود (۲).

بر اساس گزارش مراکز تحقیقاتی و سلامت، شیوع فشار خون از سیر پیش رونده ای در جوامع مختلف برخوردار است، بطوریکه پرفشار خونی را یکی از مهم ترین خطرات تهدیدکننده سلامت عمومی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه در نظر گرفته اند و بر اساس شواهد موجود حدود ۳۵-۲۵ درصد جمعیت بیشتر از ۱۸ سال جهان و ۶۰ درصد افراد مسن تر از ۶۰ سال مبتلا به پرفشار خونی می باشند (۱). از این رو فشار خون

^۱ دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه ارومیه، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی (نویسنده مسئول)

^۲ کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه ارومیه، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی

^۳ کارشناسی ارشد هماتولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، دانشکده پزشکی

^۴ کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی

از این رو مطالعات مختلف ارتباط بین فشار خون و فعالیت بدنی را برای کاهش خطرات فشار خون مورد بررسی قرار داده‌اند، بطوریکه فعالیت منظم بدنی را به عنوان یک شاخص پیشگیرانه در کنترل فشار خون معرفی کرده‌اند (۳). با این حال به نظر می‌رسد عوامل متعددی همچون فاکتورهای ژنتیکی و غیر ژنتیکی مانند گیرنده بتا ۲ آدرنژیک^۱ و اتساع به واسطه جریان خون^۲ (FMD) نیز به عنوان عامل‌های تعیین کننده در کنترل فشار خون ایفای نقش می‌کنند.

اتساع به واسطه جریان خون یا (FMD) از مشخصه‌های بسیار موثر بررسی پدیده فشار خون و پرفشار خونی محسوب می‌شود، هنگامی که جریان خون از طریق مویرگ‌ها افزایش می‌یابد، مویرگ‌ها متسع شده و این پدیده به عنوان اتساع به واسطه جریان خون یا FMD نامیده می‌شود. در فرایند اتساع عروقی، اندوتلیوم مویرگ‌های خونی نقش اساسی در تنظیم تون عروقی و حفظ هموستاز قلبی-عروقی بازی می‌کنند، بطوریکه ضعف اتساع عروقی به وابسته آسیب اندوتلیوم، با پدیده تسلب شریان و عوامل خطر ساز بیماری‌های قلبی عروقی همراه می‌باشد (۴ و ۵). بنابراین به نظر می‌رسد که بهبود عملکرد اندوتلیوم با کاهش فشار خون همراه باشد، بگونه ای که حفظ سلامت آن در پیشگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی و خصوصا پرفشار خونی کمک موثر خواهد نمود. از این رو با توجه به اثرات مثبت فعالیت ورزشی بر آسیب اندوتلیوم، این احتمال وجود دارد که فعالیت ورزشی منظم در کنترل فشار خون و پیشگیری از پرفشار خونی و سایر بیماری‌های قلبی و عروقی، مفید و چاره ساز باشد (۶)، علارغم آن، بررسی‌های به عمل آمده اثر مثبت فعالیت‌های ورزشی بر روی عملکرد FMD در حیوانات آزمایشگاهی نیز گزارش کرده‌اند (۷)، با این حال نتایج گزارشات تحقیقی در ارتباط با FMD و فعالیت بدنی در انسان چشمگیر و روشن نبوده و ابهامات زیادی را به دنبال داشته است (۸) و سازوکاری که ورزش از طریق آن FMD را در آزمودنی انسان بهبود می‌بخشد و در نیز اثر ورزش بر FMD در افراد مسن به خصوص نژاد آسیایی و ایرانی، کاملا مشخص نیست.

از طرفی دیگر بررسی مطالعات پیشین موید نشان می‌دهد که گیرنده‌های آدرنژیک^۳ که طبقه‌ای از گیرنده‌های جفت شده پروتئین G می‌باشند اتساع عروقی را تحت تاثیر قرار می‌دهند، این گیرنده‌ها تحت تاثیر کاتکولامین‌ها^۴ به ویژه نورآدرنالین (نوراپی نفرین) و آدرنالین (اپی نفرین) قرار دارند (۹). دو گیرنده اصلی از

این گیرنده‌ها وجود دارند که به گیرنده‌های آلفا^۵ و بتا^۶ (β-receptor با ADRB) طبقه بندی می‌شوند، که هرکدام از این گیرنده‌ها نیز مشتمل بر زیر رده‌های جانبی دیگری است (۱۰). هنگامی که آدرنالین با گیرنده‌های آلفا آدرنورسپتور واکنش نشان دهد باعث انقباض دیواره عروق می‌شوند، در حالی که سطوح پایین اپی نفرین باعث تحریک گیرنده های B آدرنژیک شده و اتساع عروق را به همراه خواهد داشت (۱۱). شواهدی وجود دارد که Adrenergic Receptor B2 (ADRB2) یا بتا ۲ آدرنژیک بر روی پاره‌ای از ویژگی‌های فیزیولوژیکی در تنظیم فشار خون تاثیر می‌گذارد، که احتمالا به دلیل اثر اتساع عروقی ناشی از کاتکولامین های در گردش خون می‌باشد (۱۲ و ۱۳). محققین نقش گیرنده‌های بتا آدرنژیک را در پاسخ به فعالیت ورزشی بر روی حیواناتی که در یک جلسه تمرین به فعالیت واداشته شده بودند، گزارش نموده‌اند (۱۴). با این حال تحقیقاتی که مبین تغییرات mRNA ADRB2 در آزمودنی‌ها انسان و به خصوص افراد میانسال باشد و اثر تمرینات ورزشی طولانی مدت را بر روی آن بررسی کرده محدود بوده و نتایج روشنی در دست نیست.

با در نظر گرفتن موارد فوق و با بررسی سایر گزارشات تحقیقی می‌توان به این نکته دست یافت که تغییرات ایجاد شده در سطح FMD و بیان ژنی ADRB2 در آزمودنی‌های انسان و به خصوص در افراد میانسال که در دوره‌های طولانی مدت از فعالیت‌های ورزشی شرکت کرده باشند به روشنی مشخص نیست و تحقیقاتی اندکی در این زمینه به انجام رسیده است، به ویژه در نژاد و اقوام ایرانی چنین تحقیقی یافت نشد. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر هشت هفته فعالیت منظم ورزشی بر بیان ژنی گیرنده ADRB2 و سطح FMD در مردان میانسال کم تحرک می‌باشد.

مواد و روش کار

جامعه آماری پژوهش حاضر، از مردان میانسال (۴۰ تا ۵۵ سال) شهرستان ارومیه که سابقه انجام هیچ نوع فعالیت بدنی منظم را نداشته‌اند تشکیل می‌شود. بدین ترتیب، از تعداد ۹۶ نفر مرد میانسال که طی فراخوان به عمل آمده جهت شرکت در پژوهش حاضر اعلام آمادگی کرده بودند، تعداد ۲۰ آزمودنی انتخاب و به صورت تصادفی در دو گروه تجربی (۱۰ نفر) و گروه کنترل (۱۰ نفر) قرار گرفتند (افراد دارای سابقه بیماری از شرکت در تحقیق حذف گردیدند). آزمودنی‌های تحقیق بر اساس تکمیل

^۱ ADRB2

^۲ Flow-Mediated Dilatation (FMD)

^۳ Adrenergic Receptor

^۴ Catecholamine

^۵ α-receptor

^۶ β-receptor

فرم رضایت نامه و آگاهی کامل از اهداف پژوهش در مراحل مختلف تحقیق شرکت نمودند.

در تحقیق حاضر پس از آنکه آزمودنی‌های داوطلب حائز شرایط شرکت در تحقیق مشخص شدند، متغیرهای زمینه‌ای مانند؛ قد (متر)، وزن (کیلوگرم)، سن (سال)، درصد چربی بدن (درصد) ضربان قلب (ضربان در دقیقه)، فشار خون استراحت (میلی متر جیوه)، و وضعیت غذایی در حالت پایه اندازه گیری شدند. در مرحله بعد از آزمودنی‌های در شرایط پایه و ناشتا به منظور بررسی سطح پایه بیان ژنی ADRB2 به مقدار ۴ سی سی خون وریدی جمع آوری شد. همچنین در حالت پایه، سطح FMD نیز در هر دو گروه از مردان میانسال و در شرایط یکسان اندازه گیری گردید. در مرحله بعد آزمودنی‌های گروه تجربی و گواه آزمون اصلاح شده بروس را جهت بر آورد توان هوازی بیشینه اجرا نمودند. سپس آزمودنی‌های گروه تجربی بر اساس جدول زمانی تمرینات، در برنامه تمرینی ۸ هفته‌ای شرکت کردند. در پایان ۴ هفته اول و نیز پایان ۸ هفته تمرین؛ مجدداً از ورید بازویی گروه گواه و گروه تجربی خونگیری دوم و سوم به عمل آمد و سطح FMD نیز در این زمان‌ها، مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت.

برنامه فعالیت بدنی:

برآورد توان هوازی بیشینه:

در طرح حاضر، جهت برآورد توان هوازی آزمودنی‌ها، از آزمون اصلاح شده بروس با بهره گیری از دستگاه نوار گردان (NordicTrack, USA) انجام شد. این آزمون شامل پروتکل ۱۰ مرحله‌ای با سرعت ۲/۷۴ کیلومتر در ساعت و شیب ۱۰ درجه آغاز شد و و تاجایی که آزمودنی قادر به ادامه دادن فعالیت نباشد ادامه یافت بطوریکه شیب به ۲۸ درصد و سرعت به ۱۲/۰۷ کیلومتر رسید و آزمون به طور میانگین ۲۷ دقیقه به طول انجامید (۱۵).

اندازه گیری حداکثر اکسیژن مصرفی VO₂max (۱۵):

$$14/8 - (1/379 \times T) + (0/451 \times T^2) - (0/12 \times T^3)$$

زمان اجرای آزمون به دقیقه و کسری از دقیقه (تست T= بروس)

برنامه فعالیت بدنی هشت هفته‌ای:

در این مرحله، آزمودنی‌ها پس از گرم کردن عمومی، و با نظارت آزمون گر ها، در برنامه تمرینی که شامل دویدن هوازی با شدت متوسط (۵۵ تا ۶۵ درصد حداکثر ضربان قلب فعالیت) بود و به مدت ۸ هفته به طول می‌انجامید شرکت نمودند؛ این تمرینات ۴ روز در هفته و هر جلسه در محدوده زمانی ۴۰-۵۰ دقیقه اجرا شد. مجدداً در ۲۴ ساعت از پایان دوره تمرین، آزمون اصلاح شده

بروس به منظور بررسی تغییرات حداکثر اکسیژن مصرفی آزمودنی‌ها تکرار شد.

روش آزمایشگاهی بیان ژنی ADRB2:

جداسازی RNA:

جداسازی RNA با به کار بردن کیت QIAamp RNA (50) Blood Mini Kit به شماره کاتالوگ ۵۲۳۰۴ طبق دستورالعمل شرکت سازنده با تغییرات جزئی انجام شد.

(۱) ۲۰۰ میکرولیتر از بافر RPE به ازای هر نمونه با ۸۰۰ میکرولیتر از اتانول مطلق مخلوط شد.

(۲) ۳۵۰ میکرولیتر از بافر RLT به ازای هر نمونه با ۳۵ میکرولیتر از ۲-مرکاپتواتانول مخلوط شد.

(۳) ۵۰۰ میکرولیتر از خون محیطی تام با ۱۰۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده سلول مخلوط و در دمای ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد.

(۴) مخلوط حاصل در دور ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شد.

(۵) مایع رویی تخلیه و روی رسوب سلولی مرحله ۳ و ۴ تکرار شد.

(۶) ۳۵۰ میکرولیتر از بافر RLT آماده شده روی رسوب سلولی اضافه و رسوب به صورت کامل باز شد.

(۷) لیزات حاصل به صورت کامل روی ستون‌های QIAshredder منتقل و در دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد.

(۸) روی لیزات رد شده از ستون QIAshredder ۳۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه و به آرامی مخلوط شد.

(۹) مقدار ۷۰۰ میکرولیتر از مخلوط به دست آمده روی ستون QIAamp منتقل و در دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد.

(۱۰) مقدار ۷۰۰ میکرولیتر بافر RW1 روی ستون، پس از تعویض کردن لوله جمع کننده، اضافه و در دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد.

(۱۱) پس از تعویض کردن لوله جمع کننده، ۵۰۰ میکرولیتر از بافر RPE آماده شده روی ستون اضافه و در دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد.

(۱۲) مرحله ۱۱ تکرار شد.

۸- واکنش با قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه پایان پذیرفت و نمونه در فریزر -70 درجه نگهداری شد.

Real-time PCR

برای اندازه گیری میزان بیان ژنی از دستگاه مربوطه Corbett- Rotor gene- 6000 (Corbett., Australia) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی شده و توسط بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی 80nm مورد استفاده قرار گرفتند.

پرایمرها:

واکنش‌های بر مبنای استفاده از رنگ Syber green I انجام شد (جدول ۱ و ۲). رنگ Syber green طی واکنش Real-time PCR به DNA دو رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند. واکنش در حجم نهایی 20μl و بر اساس مقادیر نشان داده شده در جدول با اضافه 2μl cDNA انجام شد.

به عنوان بلانک از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود، استفاده شد و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC water افزوده شد. همه مراحل در روی یخ انجام گردید. برای جلوگیری از آلودگی، مراحل تهیه مخلوط‌ها و نیز مرحله افزودن cDNA در زیر هود لامینار به صورت جداگانه انجام گرفت.

در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve)، بدست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا، ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن β -actin به عنوان رفرنس محاسبه شد.

اندازه گیری FMD

در دمای محیط ۲۲-۲۴ درجه سانتی گراد برای ایجاد تحریک جریان در شریان بازویی، کاف دستگاه اندازه گیری فشارخون در قسمت بالای ساعد آزمودنی‌ها قرار داده شد. سپس تصویر در حالت استراحت گرفته و جریان خون توسط میانگین زمان pulsed doppler velocity signal (ساخت آمریکا، Triton Technology Model 202) در حجم نمونه‌ای میان شریان محاسبه گردید. سپس ایسکمی شریان با inflate کردن کاف به ۵۰mmHg بیش از فشار سیستولی، به مدت ۵ دقیقه انجام شد و تصاویر طولی شریان از ۳۰ ثانیه قبل تا ۲ دقیقه بعد از نزول افت کاف گرفته شد. برای بررسی سرعت پرخونی، بلافاصله پس از آزاد کردن کاف (حداکثر تا ۱۵ ثانیه) midartery pulsed doppler signal گرفته و به طور همزمان تصاویر طولی دو بعدی از شریان

۱۳) پس از متقل کردن ستون روی تیوب ۱/۵ سی سی، مقدار ۵۰ میکرولیتر آب مقطر DNase/RNase free روی ستون اضافه و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد.

۱۴) پس از سانتریفوژ کردن در دور ۱۰۰۰ در دقیقه به مدت ۲ دقیقه، RNA جهت سنتز cDNA آماده شد.

ساخت cDNA:

از کیت RevertAIDTM First Standard cDNA synthesis (Fermentas, Canada) برای ساخت cDNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده به صورت زیر استفاده شد:

۱- 1μl RNA و 1μl از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شده و توسط DEPC-treated (Cinna gen., Iran) water به حجم 9μl رسید.

۲- 1μl DNase به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن 1 ml از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر -70 درجه قرار گرفت.

۳- تیوب مربوطه به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و 14000 g سانتریفوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردید.

۴- به تیوب مربوطه 11μl DEPC-treated water و 1μl oligi (dt) Primer یا Random hexamer Primer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید.

۵- 2μl dNTP و 4μl reaction buffer 5X و 10mM mix Ribolock Ribonuclease و 1μl Transcription Inhibitor(Fermentas., Canada) به تیوب افزوده شد و پس از سانتریفوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید.

۶- 1μl آنزیم RverertAidTM H Minus به تیوب قبل افزوده شد.

۷- در ادامه در صورت استفاده از پرایمر oligo (dt)، ۶ دقیقه در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از Random hexamer primer، ابتدا ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوباسیون صورت گرفت.

از سوی دیگر عدم فعالیت منظم ورزشی (کم تحرکی) نیز به مدت ۴ هفته باعث افزایش بیان ژنی ADRB2 در گروه کنترل شد ($P < 0.026$) (جدول ۴)، با این حال با افزایش مدت زمان کم تحرکی، بیان ژنی ADRB2 در هفته هشتم کاهش یافت ($P < 0.031$) (جدول ۴).

همچنین نتایج تست تعقیبی Bonferroni نشان داد که چهار هفته تمرین هوازی شدت متوسط باعث افزایش معنی دار در سطح FMD می‌شود ($P < 0.001$)، که این افزایش در اثر هشت هفته فعالیت هوازی شدت متوسط نیز مشاهده گردید ($P < 0.001$) (نمودار ۱). با این حال بررسی‌های آماری تحقیق حاضر نشان داد که چهار هفته عدم فعالیت منظم ورزشی باعث کاهش سطح FMD در مردان میانسال کم تحرک (گروه کنترل) می‌شود با این حال این تغییرات معنی دار نبود ($P > 0.310$)، اما هشت هفته عدم فعالیت منظم ورزشی (کم تحرکی) باعث کاهش معنی دار در سطح FMD در مردان میانسال گروه کنترل شد ($P < 0.010$) (نمودار ۱).

علاوه بر این نتایج آزمون آماری Mann-Whitney نیز نشان داد که بین افراد گروه تمرین و گروه کنترل در حالت پایه از نظر سطح mRNA ی گیرنده ADRB2 تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > 0.072$). با این حال آزمون ANCOVA نشان داد که در اثر چهار هفته و نیز هشت فعالیت هوازی شدت متوسط تفاوت معنی داری بین دو گروه تمرین و گروه کنترل وجود دارد، بطوریکه افراد گروه تمرین دارای سطح بیشتری از گیرنده ADRB2 بودند (به ترتیب: $P < 0.014$ و $P < 0.001$) (جدول ۵).

همچنین بررسی‌های آماری نشان داد که از نظر سطح FMD، بین افراد گروه تمرین و گروه کنترل در حالت پایه تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P > 0.349$). با این حال آزمون ANCOVA آشکار ساخت که بعد از چهار و هشت هفته بین دو گروه تفاوت معنی داری وجود دارد، بطوریکه افراد گروه تمرین از سطح FMD بیشتری برخوردار بودند ($P < 0.001$) (جدول ۵).

بازویی در هنگام استراحت، ایسکمی توسط کاف و پرخونی واکنشی در فاصله ۵ تا ۱۰ سانتی متر بالای آرنج بازوی راست گرفته شد. سپس عکس‌های گرفته شده بر روی یک tspe ذخیره گردید و میانگین اندازه تمامی عکس‌های قابل تفسیر در دوره ۱ دقیقه، به عنوان حد پایه‌ای برای قطر شریان در حالت استراحت استفاده شد. بالاترین مقدار FMD با شناسایی تمامی عکس‌های پس از نزول یا deflation با بزرگ‌ترین میانگین قطر و استفاده از این مقدار برای محاسبه درصد تغییرات از میزان پایه مورد محاسبه قرار گرفتند.

روش آماری:

در تحقیق حاضر از آزمون کلموگروف-اسمرینف (Kolmogorov-Smirnov) برای تعیین توزیع طبیعی داده‌ها استفاده گردید. برای مقایسه تفاوت‌های بین دو گروه (تمرین و کنترل) از آزمون Mann-Whitney در حالت استراحت و از آزمون ANCOVA در مراحل بعدی استفاده شد. تاثیر فعالیت هوازی شدت متوسط و عدم فعالیت منظم ورزشی بر روی پارامترهای مختلف تحقیق حاضر با استفاده از روش Mixed Model (آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) انجام گرفت و از تست تعقیبی بنفرونی (Bonferroni) برای مقایسه محل اختلاف در مراحل مختلف فعالیت با حالت پایه استفاده شد. تمامی آنالیزهای آماری تحقیق حاضر در سطح معنی داری $P \leq 0.05$ با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و Excel 2010 انجام یافت.

یافته‌ها

در جدول ۳ مشخصات فیزیولوژیک گروه تمرین و گروه کنترل مشخص شده است. نتایج بررسی‌های آماری مویید آن است که بیان ژنی ADRB2 در اثر ۴ هفته فعالیت ورزشی شدت متوسط افزایش معنی داری داشته است ($P < 0.001$) (جدول ۴) که این روند افزایشی در سطح ADRB2 mRNA با گذشت ۸ هفته از دوره تمرینات ورزشی افزایش بیشتری یافت ($P < 0.001$) (جدول ۴).

جدول شماره (۱): توالی پرایمرهای مورد استفاده در بیان ژنی ADRB2

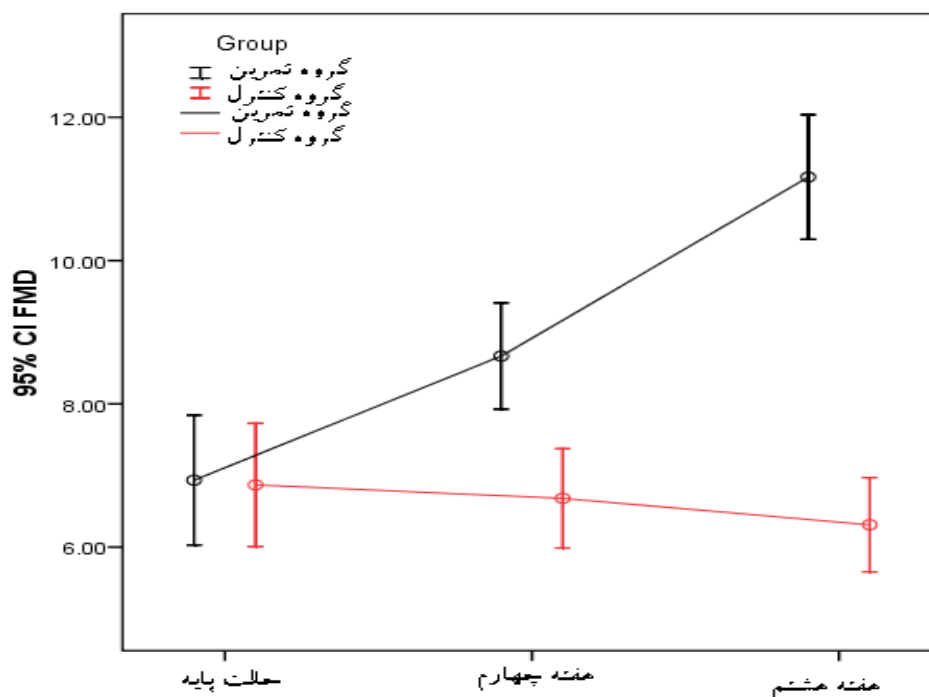
hADRB2 Forward	5'-GGAAGTGGCAGGCACCGCGA-3'
hADRB2 Reverse	5'-CGAGCGGACGCCTGGAAGCC-3'
hB.actine Forward	5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACG-3'
hB.actine Reverse	5'-GTAGTTTCGTGGATGCCACA-3'

جدول شماره (۲): واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green I

SYBER green Real time PCR master mix(Takara)	10µl
Forward primer (5pmol/ µl)	./25 µl
Reverse Primer (5pmol/ µl)	./25 µl
DEPC treated water	8/5 µl
cDNA/Water	1 µl
Final volume	20 µl

جدول شماره (۳): شاخص‌های فیزیولوژیک در گروه تمرین و کنترل

گروه کنترل		گروه تمرین		متغیر
بعد از هشت هفته	حالت پایه	بعد از هشت هفته	حالت پایه	
میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	
۴۴/۹۲±۳/۷۲	۴۴/۹۲±۳/۷۲	۴۹/۹۱±۳/۱۷	۴۹/۹۱±۳/۱۷	سن (سال)
۸۱/۸±۵/۶۳	۸۰/۸±۵/۲۶	۷۹/۸۱±۷/۳۴	۸۱/۱۳±۷/۷۲	وزن (kg)
۲۹/۰۱±۳/۶۴	۲۹/۱۲±۳/۲۳	۴۷/۳۱±۵/۱۵	۳۰/۴۹±۵/۴۱	Vo2max (ml/kg/min)
۲۶/۸۱±۴/۰۹	۲۵/۹۲±۴/۴۱	۲۵/۶۵±۳/۵۴	۲۶/۳۰±۳/۳۱	BMI (kg/m ^۲)
۷۱/۲±۷/۵۸	۶۸/۷±۷/۶۰	۶۴/۹۰±۱۰/۱۹	۶۹/۸۱±۱۳/۷۰	ضربان قلب استراحت (تعداد)
۱۲۸/۷±۱۴/۹۶	۱۲۸/۵±۱۳/۰۲	۱۲۰/۴۵±۹/۶۸	۱۲۷/۳۶±۱۲/۶۱	فشار خون سیستولی استراحت (میلی متر/جیوه)



نمودار شماره (۱): تغییرات FMD در گروه تمرین و کنترل در مراحل مختلف

جدول شماره (۴): بیان ژنی ADRB2 در مراحل مختلف در گروه تمرین و کنترل (Fold) (بر اساس آزمون Bonferroni)

P1 (مقایسه هفته چهارم با حالت پایه) و P2 (مقایسه هفته هشتم با حالت پایه)

سطح معنی داری $P \leq 0.05$	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین (دامنه)	مراحل مختلف اندازه گیری بیان ژنی ADRB2
گروه تمرین			
P1= 0.001	0.37 $\pm$ 0.47	0.41 به 1.15 (-0.44 تا 0.41)	حالت پایه
P2= 0.001	1.57 $\pm$ 0.37	1.63 به 2.19 (0.87 تا 0.63)	هفته چهارم
	3.73 $\pm$ 0.68	3.79 به 3.83 (0.7 تا 0.79)	هفته هشتم
گروه کنترل			
P1= 0.026	0.11 $\pm$ 0.02	-0.03 به 0.22 (-0.82 تا 0.79)	حالت پایه
P2= 0.386	1.18 $\pm$ 0.38	1.17 به 1.73 (0.47 تا 0.47)	هفته چهارم
	0.52 $\pm$ 0.61	0.35 به 2.11 (-0.11 تا 0.35)	هفته هشتم

جدول شماره (۵): مقایسه بیان ژنی ADRB2 و سطح FMD در دوره‌های مختلف بین گروه تمرین و گروه کنترل (بر اساس آزمون Mann-Whitney و ANCOVA)

ADRB2 mRNA	سطح FMD
سطح معنی داری $P \leq 0.05$	سطح معنی داری $P \leq 0.05$
P ≥ 0.072	P ≥ 0.349
P ≤ 0.014	P ≤ 0.001
P ≤ 0.001	P ≤ 0.001
مراحل مقایسه	مراحل مقایسه
حالت پایه	حالت پایه
هفته چهارم	هفته چهارم
هفته هشتم	هفته هشتم

بحث و نتیجه گیری

مطالعات نشان می‌دهد که میانسالی و سالمندی با افزایش احتمال پرفشار خونی و اختلالات در اندوتلیوم و گسترش بیماری‌های قلبی و عروقی همراه است (۱۶ و ۱۷)، که در ایجاد پرفشار خونی، اختلال در اتساع عروقی سهم بسیار مهمی را ایفا می‌نماید، مطالعات نیز نشان می‌دهد که میانسالی و سالمندی با کاهش در اتساع عروقی همراه است (۱۸). از این رو با توجه به اینکه گیرنده ADRB2، گیرنده اتساعی می‌باشد و FMD نیز میزان اتساع عروقی را مشخص می‌سازد، لذا این احتمال وجود دارد که کاهش در سطح این شاخص‌ها (ADRB2 و FMD) همراه با فرایند میانسالی به وقوع یابد. آنچنان که در بررسی نمونه‌های خونی و سطح FMD (هر دو گروه تمرین و کنترل) در حالت پایه در تحقیق حاضر، چنین نتیجه‌ای حاصل شد و افراد هر دو گروه (تمرین و کنترل) از سطح نسبتاً پایینی از گیرنده ADRB2 و شاخص FMD برخوردار بودند. با این حال به علت

محدود بودن گستره تحقیقات در زمینه بیان ژنی ADRB2 در نمونه‌های انسانی و به خصوص افراد میانسال، عواملی که احتمال موثر بودن آن‌ها در افزایش یا کاهش بیان ژن این گیرنده وجود دارد هنوز به روشنی مشخص نیست، با این حال برخی از مطالعات گزارش کرده‌اند که گیرنده ADRB2 تحت تاثیر غلظت اپی نفرین و نوراپی نفرین قرار می‌گیرد (۱۹ و ۲۰)، لذا کاهش در سطوح این هورمون‌ها منجر به تحریک گیرنده ADRB2 خواهد شد. از طرفی دیگر سایر بررسی‌ها نیز نشان می‌دهد که حساسیت به اپی نفرین تحت تاثیر سن اشخاص قرار گرفته و با میانسالی روند افزایشی پیدا می‌کند (۲۱)، و با توجه به اینکه این هورمون تحریک کننده گیرنده‌های انقباضی آلفا می‌باشند، و سطح تحریک گیرنده‌های بتا آدرنرژیک نیز با افزایش آن کاهش پیدا می‌کند، لذا افزایش فشار خون در افراد میانسال و مسن دور از انتظار نیست. از طرفی دیگر محققین معتقدند که سطوح نیتریک اکسید نیز در حفظ اتساع عروقی از طریق افزایش Shear stress نقش مهمی

را ایفا می‌نماید، بطوریکه این آنزیم از طریق تحریک اندوتلیوم منجر به اتساع عروقی و افزایش سطح Shear stress می‌شود (۲۲). بطوریکه برخی از مطالعات گزارش کرده‌اند که FMD تحت تاثیر Shear stress قرار دارد (۲۳)، و از آنجایی که کاهش سطوح NO و Shear stress در بسیاری از افراد با سن بالا گزارش شده است، لذا می‌توان پیش بینی کرد که با افزایش سن سطح FMD نیز کاهش پیدا کند (۲۴ و ۲۵).

از طرفی دیگر این احتمال وجود دارد که سطح FMD و بیان ژنی ADRB2 تحت تاثیر عدم فعالیت بدنی نیز قرار گیرند، با توجه به سطح بالایی از اپی نفرین و سطح پایین از NO که در حالت استراحت در افراد کم تحرک در مقایسه با افراد ورزشکار وجود دارد (۲۶)، لذا این امکان وجود دارد که کم تحرکی از طریق افزایش اپی نفرین منجر به کاهش تحریک گیرنده‌های ADRB2 و از طریق کاهش سطح NO منجر به کاهش FMD شود (۲۷)، و هر اندازه شدت کم تحرکی بیشتر باشد احتمال کاهش اتساع عروقی نیز بیشتر خواهد بود. نتایج تحقیق حاضر نیز که هشت هفته روی آزمودنی‌های میانسال انجام یافت نشان داد که هشت هفته عدم فعالیت منظم ورزشی باعث کاهش سطح گیرنده ADRB2 و کاهش سطح FMD می‌شود، کاهشی که با گذشت زمانی بیشتری از تحقیق روند بیشتری می‌یابد، بطوریکه در بررسی آزمودنی‌ها در هفته چهارم کاهش اندکی در سطح FMD گزارش گردید، لیکن در هفته هشتم این کاهش روند بیشتری یافت، اما آنچه که دور از انتظار بود افزایش بیان ژنی ADRB2 در هفته چهارم از کم تحرکی بود، حال آنکه انتظار کاهش در بیان ژنی این گیرنده در این مرحله از تحقیق وجود داشت، لذا بررسی‌های ما نشان داد که دوره کوتاهی از استراحت در افراد میانسال نیز می‌تواند به افزایش بیان ژنی گیرنده ADRB2 منجر شود که در این مورد به علت محدود بودن تحقیقات نمی‌توان دلایل روشنی را ارائه نمود، لیکن می‌توان این نکته را در نظر گرفت که عوامل ناشناخته دیگری هستند که بیان ژنی ADRB2 را در افراد کم در دوره کوتاهی از کم تحرکی تحت تاثیر قرار می‌دهد، تحقیق حاضر همچنین مشخص ساخت که در صورت ادامه یافتن عدم تحرک بدنی به هشت هفته بیان ژنی ADRB2 کاهش می‌یابد با توجه به اینکه تحقیقات در زمینه بیان ژنی ADRB2 و سطح FMD در نمونه‌های انسانی و به خصوص مطالعه طولانی مدت بر روی این شاخص‌ها بسیار محدود می‌باشد لذا به به تحقیقات بیشتری در این مورد نیاز است تا به نتایج قطعی تری دست یافت.

با در نظر گرفتن مطالب قبلی و در نظر گرفتن اثرات ورزش در حفظ سلامت اندوتلیوم و کاهش عوامل آسیب رسان به دیواره عروق، لذا پیش بینی می‌شود که تمرینات ورزشی اثرات مثبتی بر

روند کاهش بیان ژنی ADRB2 و سطح FMD در اثر میانسالی داشته باشد، چنانچه که گفته شد NO از عوامل موثر بر اتساع عروقی می‌باشد، با این حال HDL نیز در کنار NO عامل موثری در سلامت عروق به شمار می‌رود، علاوه بر این مطالعات پیشین نیز نشان می‌دهد که فعالیت‌های منظم ورزشی بر سطوح NO و HDL اثر مثبتی داشته و باعث افزایش سطوح استراحتی این شاخص‌های می‌شود (۲۶ و ۲۸)، از این رو تمرینات ورزشی از طریق افزایش بیان ژنی NO و افزایش سطح HDL باعث حفظ اتساع و سلامت اندوتلیوم و دیواره عروق می‌گردد، لذا این فرضیه مطرح می‌شود که سطوح FMD نیز که وابسته به اتساع عروق بوده و به نحوی نشان دهنده آن نیز می‌باشد تحت تاثیر ورزش قرار گیرد، چنانچه در تحقیق حاضر چنین فرضیه‌ای تحقق یافت و سطح FMD در اثر تمرین ورزشی افزایش معنی داری یافت، بطوریکه با گذشت زمان بیشتری از دوره تمرینات سطح FMD افزایش بیشتری یافت، که اثر شدت و مدت تمرین را بر FMD نشان می‌دهد.

بنابراین این امکان را نیز وجود دارد که بیان ژنی ADRB2 تحت تاثیر تمرینات ورزشی قرار گیرد، بررسی‌های تحقیق حاضر نشان داد که تمرینات منظم ورزشی باعث افزایش معنی دار در سطح mRNA گیرنده ADRB2 می‌شود، بطوریکه در هفته چهارم از دوره تمرینات این افزایش مشاهده شد و با گذشت هشت هفته از تمرینات روند افزایشی بیشتری پیدا کرد.

با این حال مقایسه شاخص‌های فوق در بین دو گروه تمرین و کنترل نیز مهم به نظر می‌رسد، بررسی‌های آماری تحقیق حاضر نشان داد که بین بیان ژنی ADRB2 در هفته چهارم از تحقیق در دو گروه تمرین و کنترل تفاوت معنی داری وجود دارد و گروه تمرین از سطح بیشتری از بیان ژنی این گیرنده برخوردار بودند، از این رو می‌توان گفت ۴ هفته تمرین ورزشی تاثیر بیشتری در مقایسه با ۴ هفته کم تحرکی دارد، این روند در هفته هشتم از فعالیت که شدت فعالیت افزایش بیشتری داشت نیز رخ داد و گروه تمرین از سطح بالایی از بیان ژنی این گیرنده برخوردار به وند و در حالت کلی نیز ۸ هفته کم تحرکی اثر منفی بر بیان ژنی ADRB2 داشت، از سوی دیگر مقایسه سطح FMD نیز در بین دو گروه نشان داد که گروه تمرین از سطح بالایی از این شاخص در هفته‌های چهارم و هشتم برخوردار بودند و با گذشت مدت زمان و شدت بیشتری از تمرینات تفاوت بین دو گروه بیشتر بود.

در نهایت نیز این سوال مطرح می‌شود که چه نوع تمرینی و با چه شدتی می‌تواند در افزایش اتساع عروقی موثر باشد؟ و یا به عبارت دیگر تمرینات با چه شدت و مدتی شروع و ادامه یابند تا به بهترین نتیجه ممکن دست یافت؟ بررسی‌ها نشان می‌دهد

افزایش معنی دار تر این شاخص‌ها در هفته‌های هشتم بود. بنابراین ذکر این نکته حائز اهمیت خواهد بود که با افزایش آمادگی جسمانی و قلبی و عروقی بیان ژنی ADRB2 و سطح FMD نیز افزایش بیشتری می‌یابد، و بالعکس کاهش آمادگی جسمانی به کاهش در شاخص‌های ژنی و خونی موثر فشار خون همراه خواهد بود. در تحقیق حاضر VO2max و BMI از شاخص‌های مناسب نشان دهنده آمادگی جسمانی هستند، که افزایش VO2max و کاهش BMI با افزایش در بیان ژنی ADRB2 و سطح FMD در گروه تمرین همراه بود، در حالیکه در گروه تمرین عکس این تغییرات رخ داد. با این حال به نظر می‌رسد به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز است تا به نتایج دقیق‌تری دست یافت.

مقاله حاضر بخشی از طرح شماره ۸۹۰۰۴۱۸۳ صندوق حمایت از پژوهشگران و فن‌آوران کشور می‌باشد، در تحقیق حاضر سطوح NO و ایپی نفرین و نوراپی نفرین اندازه‌گیری نشده‌است، که پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات آینده مورد توجه محققین قرار گیرد.

در پایان نویسندگان این مقاله مراتب سپاسگزاری خویش را از شرکت کنندگان در این پژوهش و همچنین آزمایشگاه پلاسمای تبریز اعلام می‌دارند.

References:

1. News website of Salamat News, 1389/10/3. (Persian)
2. Xiuqing G, Suzanne C, Kent DT, Jinrui C, Randall H. Hypertension Genes Are Genetic Markers for Insulin Sensitivity and Resistance. *J Hypertension* 2005; 45: 799-803.
3. Ve´ronique AC, Robert HF. Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. *J Hypertension* 2005; 46: 667-75.
4. Jiro M. Low frequency regular exercise improves flow-mediated dilatation of subjects with mild hypertension. *J Hypertens Res* 2005; 28: 315-21.
5. Hashimoto M, Kozaki K, Eto M. Association of coronary risk factors and endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery. *J Hypertens Res* 2000; 23: 233-8.

فعالیت‌های ورزشی در صورتی در جلوگیری از پرفشار خونی موثر خواهند بود که از شدت متوسطی برخوردار باشند (۲۹)، اما دست یابی به چنین شدتی نیز به سادگی میسر نخواهد بود. بررسی‌های ما در این تحقیق نشان داد که بهترین نتیجه در دست یابی به تعدیل عوامل ایجاد کننده پرفشار خونی و کاهش شانس ابتلا به این بیماری در مردان میانسال زمانی خواهد بود که تمرینات با شدت پایین تر و ملایم‌تر شروع شده و با افزایش آمادگی قلبی و تنفسی شدت تمرینات ورزشی تا ۶۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی پیش رود و مدت زمان اجرای فعالیت‌های ورزشی نیز در هر جلسه در ارتباط با شدت تمرین به مرور افزایش یابد. چنانچه در تحقیق حاضر به علت اینکه آزمودنی‌های گروه تمرین در ابتدای دوره تمرینات همانند گروه کنترل از آمادگی قلبی و تنفسی پایینی برخوردار بودند، لذا هفته‌های اول دوره تمرینات ورزشی با شدت پایین تر و مدت زمانی کمتری در هر جلسه همراه بود که هدف از این کار عدم تحت فشار قرار دادن آزمودنی‌ها به دلیل آمادگی جسمانی ناکافی آن‌ها بود، با این حال این شدت پایین از تمرینات ورزشی نیز با افزایش بیان ژنی ADRB2 و سطح FMD همراه بود، که با مشاهده نمونه‌های خونی و سطح FMD در هفته چهارم مشاهده گردید، که بعد از هفته چهارم به دلیل دستیابی آزمودنی‌ها به آمادگی جسمانی مطلوب، شدت و مدت زمانی اجرای فعالیت ورزشی در هر جلسه نیز افزایش یافت، که نتیجه آن

6. Woodman CR, Thompson MA, Turk JR, Laughlin MH. Endurance exercise training improves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hypercholesterolemic male pigs. *J Appl Physiol* 2005; 99: 1412-21.
7. Wang J, Wolin MS, Hintze TH. Chronic exercise enhances endothelium mediated dilation of epicardial coronary artery in conscious dogs. *J Circ Res* 1993; 73: 829-38.
8. Erdem K, Huseyn O, Hulya A. Endothelial flow-mediated dilatation and exercise capacity in highly trained endurance athletes. *J Tohoku Exp Med* 2005; 205: 45-51.
9. Witter FR, Zimmerman AW, Reichmann JP, Connors SL. In utero beta 2 adrenergic agonist exposure and adverse neurophysiologic and behavioral outcomes. *J Am Obstet Gynecol* 2009; 201: 553-9.

10. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *J Science* 2007; 318: 1258-65.
11. Konkar AA, Zhai Y, Granneman JG. Beta1-adrenergic receptors mediate beta3-adrenergic-independent effects of CGP 12177 in brown adipose tissue. *J Mol Pharmacol* 2000; 57: 252-8.
12. Tomaszewski M, Brain NJ, Charchar FJ, Wang WY, Lacka B, Padmanabahn S. Essential hypertension and beta2-adrenergic receptor gene: linkage and association analysis. *J Hypertension* 2002; 40: 286-91.
13. John HE, Antonio MM, Rachel MS. The arg16/gly b2 adrenergic receptor polymorphism is associated with altered cardiovascular responses to isometric exercise *Physiological Genomics*. 2004; 16: 323-8.
14. Leosco D, Iaccarino G, Cipolletta E, De Santis D, Pisani E, Trimarco V, et al. Exercise restores beta-adrenergic vasorelaxation in aged rat carotid arteries. *J Am Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: 369-274.
15. Tartibian B. Assessment of physiological index in sport. Tehran: Teymourzade Press; 2006. P. 39-41. (Persian)
16. Pyke KE, Tschakovsky ME. Peak vs. total reactive hyperemia: which determines the magnitude of flow-mediated dilation. *J Appl Physiol* 2007; 102: 1510-19.
17. Jennifer D, Yvette Cy, Taimour L. Altered Beta2 Adrenergic receptor gene expression in human clinical hypertension. *J Biol Res Nurs* 2009; 11: 17-26
18. Alexandre SS, Angelina Z. Physical exercise, β -adrenergic receptors, and vascular response. *J Vasc Bras* 2010; 9: 47-56.
19. Warne T, Moukhametzianov R, Baker JG. The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta (1)-adrenergic receptor. *J Nature* 2011; 469: 241-6.
20. Donato AJ, Lesniewski LA, Delp MD. Ageing and exercise training alter adrenergic vasomotor responses of rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol* 2007; 579: 115-25.
21. Zouhal H, Jacob C, Delamarche P, Gratas-Delamarche A. Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *J Sports Med* 2008; 38: 401-23.
22. Ulker P, Yaras N, Yalcin O, Celik-Ozenci C, Johnson PC. Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. *J Nitric Oxide* 2011; 24: 184-91
23. Jaume P, Blair J, Sean N, Daniel W. Adjusting Flow-Mediated Dilation for Shear Stress Stimulus Allows Demonstration of Endothelial Dysfunction in a Population with Moderate Cardiovascular Risk. *J Vasc Res* 2009;46: 592-600
24. Queen LR, Ferro A. Beta-adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1070-83.
25. Higashi Y, Yoshizumi M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *J Pharmacol Ther* 2004; 102: 87-96.
26. Graham DA, Rush JW. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 2004; 96: 2088-96.
27. Klonizakis M, Tew G, Michaels J, Saxton J. Impaired micro vascular endothelial function is restored by acute lower-limb exercise in post-surgical varicose vein patients. *J Microvasc Res* 2009; 77: 158-62.

-
28. Nazmi S. Effect of endurance exercise training on blood lipids in young men. J Afr Pharmacy Pharmacology 2012; 6: 216-20.
29. Lamina S. Therapeutic exercise and hypertension. J Int Multi-Disciplinary 2008;2: 249-61.