

Phosphorylated connexin 43 protein level changes in the experimental diabetic rat's thoracic aorta

Farzam Sheikhzadeh Hesari^{1*},
Nazli Khajehnasiri²

1. Associate Professor, Department of Animal Biology,
Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz,
Tabriz, Iran

2. Ph. D. Student, Department of Physiology, Faculty
of Biological Science, Shahid Beheshti University,
Tehran, Iran

(Received: Feb. 21, 2013 - Accepted: Aug. 14, 2016)

تغییرات میزان کانکسین ۴۳ فسفریله در آئورت سینه‌ای موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت تجربی

فرزام شیخ‌زاده حساری^{۱*}، نازلی خواجه نصیری^۲

۱. دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز،

تبریز، ایران

۲. دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه

شهید بهشتی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۵/۲۴)

چکیده

مشکلات قلبی - عروقی، به‌عنوان یکی از عوارض بسیار رایج در بیماری دیابت محسوب می‌شود. کانکسین‌ها غالب‌ترین زیرواحدهای موجود در ساختار اتصالات شکافدار می‌باشند که در برقراری ارتباطات بین سلولی حائز اهمیت هستند. با در نظر داشتن نقش مؤثر کانکسین در آئورت، این سوال در ذهن ایجاد می‌شود که آیا تغییر در سطح کانکسین ۴۳ فسفریله آئورت سینه‌ای بیماران دیابتی رخ می‌دهد یا نه؟ در این بررسی ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ با محدوده وزنی (۳۰۰±۵۰) گرم به طور تصادفی به دو گروه ده تایی کنترل و گروه دیابتی تقسیم شدند. با تزریق داخل صفاقی ۶۰mg/kg استرپتوزوتوسین موش‌های صحرایی به دیابت نوع ۱ مبتلا گشتند. گروه کنترل نیز به همان نسبت سالیان نرمال دریافت کردند. پس از ۶۰ روز، بعد از بیهوشی آئورت سینه‌ای جدا و بلافاصله فریز گردید، سپس توسط متد الیزا کانکسین مزبور مورد سنجش قرار گرفت. در این بررسی افزایش معنی‌داری در سطح کانکسین ۴۳ فسفریله در گروه دیابتی مشاهده شد ($P < 0.05$). افزایش کانکسین فسفریله و تنظیم کاهشی کانکسین ۴۳ با کاهش ارتباطات سلولی از خلال اتصال شکافدار و نیز القاء آپوپتوز می‌تواند یکی از علل مشکلات قلبی - عروقی در بیماران دیابتی محسوب گردد.

Abstract

A cardiovascular problem is one of the common complications of diabetes. Connexin is the predominant protein subunit in gap junction structure which is important in communication between cells. Considering the role of connexin, this question can be created in the mind whether changes in phosphorylated connexin 43 occurs in diabetics thoracic aorta or not? 20 male Wistar rats (300±50g) were randomly divided into two groups (n=10): control and diabetic group. Diabetes mellitus was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/Kg). After 60-days, rats were anaesthetized and then thoracic aorta was isolated and immediately Freeze, at the end phosphorylated connexin 43 levels were measured by ELISA method. In this study, a significant increase in the level of connexin 43 is observed in the diabetic group ($P < 0.05$). Increased phosphorylated connexin 43 levels and downregulation of it, with the loss of cell communication through gap junction and induction of apoptosis, can be one cause of cardiovascular problems in diabetes patients.

Keywords: Diabetes, Thoracic aorta, Phosphorylated connexin 43.

واژه‌های کلیدی: دیابت، آئورت سینه‌ای، کانکسین ۴۳ فسفریله.

مقدمه

دیابت شیرین شامل گروهی از اختلالات متابولیک شایع است که وجه مشترک آن‌ها در فنوتیپ هایپرگلیسمی می‌باشد (Longo et al., 2005). میزان وقوع این بیماری در دو دهه گذشته به نحو چشم‌گیری افزایش یافته است. شیوع بیماری‌های قلبی-عروقی در افراد مبتلا به دیابت شیرین نوع یک و دو، بیش از افراد سالم است، به‌گونه‌ای که عوارض قلبی-عروقی به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر در میان این بیماران محسوب می‌گردد (Longo et al., 2005). اکثر عوارض عروقی ناشی از دیابت، از اختلالات عملکردی اندوتلیال و استرس اکسیداتیو نشأت می‌گیرند (Mehta et al., 2006; Orasanu & Plutzky, 2009). سلول‌های اندوتلیال عروق توسط اتصالات سلولی که در تنظیم نفوذپذیری آنها نقش دارند، به هم متصل می‌شوند (Dejana et al., 1995). یکپارچگی ساختاری و عملکردی اندوتلیال بر حفظ هومئوستاز بافت و عملکرد عروقی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. عملکرد متنوع اندوتلیوم به فعالیت هماهنگ سلول‌های منفرد وابسته است که توسط اتصالات شکاف‌دار میانجی‌گری می‌شود. اتصالات شکاف‌دار در حقیقت از مجموعه کانال‌های پروتئینی که ارتباط بین سلول‌های مجاور را برقرار می‌سازد، تشکیل گشته است. پروتئین کانال‌های اتصالات شکاف‌دار را کانکسین می‌نامیده (Yah et al., 2000). اتصالات شکاف‌دار در بسیاری از مکانیسم‌های فیزیولوژیک دارای نقش بسزایی هستند. کوپلینگ سلول‌های اندوتلیال عروق از طریق هدایت سیگنال‌های الکتریکی، در تسهیل هدایت پاسخ‌های وازوموتور در طول شریان‌ها دارای نقش مؤثری می‌باشند (Rummery et al., 2002). به‌علاوه اتصالات شکاف‌دار در تنظیم تون عروقی (Christ et al., 1996) تکثیر و مهاجرت سلول‌های عروقی (Simon et al., 2003) نیز مؤثر واقع می‌گردند. از این‌رو

اتصالات شکاف‌دار در توسعه و بروز مشکلات عروقی بسیار حائز اهمیت هستند. یکی از غالب‌ترین کانکسین‌های موجود در اندوتلیوم عروق کانکسین ۴۳ می‌باشد (Isakson et al., 2006). به‌طور کلی هدایت از خلال اتصالات شکاف‌دار به وسیله فسفریلاسیون که توسط پروتئین کینازها صورت می‌گیرد، تنظیم می‌شود (Kwak et al., 1996). به عبارت دیگر ایزوفرم اپسیلون پروتئین کیناز C با فسفریله کردن کانکسین ۴۳ نقش مهمی در تنظیم نفوذپذیری اتصالات شکاف‌دار ایفا می‌کند. مطالعات از افزایش فعالیت ایزوفرم اپسیلون پروتئین کیناز C در بیماران دیابتی خبر می‌دهند (Kuroki et al., 1998). در این مطالعه با در نظر داشتن نقش مؤثر کانکسین ۴۳ به‌عنوان زیر واحد اصلی کانال‌های اتصالات شکاف‌دار موجود در آئورت سینه‌ای، و نیز شیوع بیماری‌های عروقی در بین بیماران دیابتی، این سوال در ذهن ایجاد می‌شود که آیا تغییر در سطح کانکسین ۴۳ فسفریله در آئورت سینه‌ای بیماران دیابتی رخ می‌دهد یا نه؟

مواد و روش‌ها

حیوانات

بر اساس مطالعات پیشین در زمینه دیابت، ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی (300 ± 50) گرم، از حیوان‌خانه دانشکده داروسازی دانشگاه تبریز خریداری شده و به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده علوم دانشگاه تبریز انتقال یافتند. موش‌ها به مدت دو هفته برای رسیدن به حالت پایه و رفع استرس در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. در طول دوره آزمایش دمای محل نگهداری موش‌ها برابر با $22 \pm 2^\circ\text{C}$ بود و همچنین موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (۷ صبح تا ۷ شب) در حالی که دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند، نگهداری شدند.

گروه بندی

موش‌ها به‌طور تصادفی به دو گروه ده تائی ذیل تقسیم شدند:

گروه کنترل (C)، به این گروه هیچ گونه تیماری اعمال نگردید.

گروه دیابتی (D)، این گروه با تزریق ۶۰ mg/kg استرپتوزوتوسین به دیابت مبتلا شدند.

القاء دیابت

القاء دیابت با تزریق داخل صفاقی ۶۰ mg/kg استرپتوزوتوسین تا هنگام افزایش گلوکز خون به میزان ۲۵۰ mg/dl انجام گرفت، که در سالین نرمال استریل حل شده بود (Muralidhara et al., 2007). ۴۸ ساعت پس از القاء، با ایجاد جراحی کوچک در انتهای دم موش‌ها، گلوکز خون ناشتای آن‌ها به کمک دستگاه گلوکومتر الگانس اندازه گیری شد. گلوکز خون بالای ۲۵۰ mg/dl به عنوان شاخصه دیابتی شدن مد نظر قرار گرفت (Ozkan et al., 2005). در ضمن در موش‌های صحرایی که استرپتوزوتوسین دریافت کرده بودند، پر ادراری و پرنوشی مشهود بود به همین دلیل موش‌های این گروه به صورت دوتایی در یک قفس نگهداری شدند. لازم به ذکر است که گروه کنترل نیز به همان نسبت سالین نرمال استریل دریافت نمودند (Ozkan et al., 2005).

اندازه‌گیری شاخصه متابولیکی بدن

گلوکز خون ناشتای تمامی گروه‌ها، یک هفته قبل و بعد از القای دیابت با ایجاد جراحی کوچک در انتهای دم موش‌ها به کمک دستگاه گلوکومتر الگانس اندازه‌گیری شد. همچنین موش‌ها به صورت هفتگی در تمامی طول دوره آزمایش وزن شدند (تمامی اندازه‌گیری‌ها در ساعت معینی از روز انجام گرفت).

نمونه‌برداری

تمامی موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین

و زایلازین (۵ mg/kg) بیهوش گردیدند (Ayoub et al., 2009). سپس آئورت سینه‌ای از قفسه سینه خارج گردیده، توسط سالین نرمال استریل سرد شستشو داده شدند و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز گشتند. نمونه‌ها در فریزر ۸۰°C- تا زمان تهیه هموژن نگهداری شدند. همچنین برای اطمینان از القاء نکروز در سلول‌های بتای پانکراس، نمونه‌های بافتی پانکراس نیز تهیه شد.

مطالعه بافت‌شناسی

جهت مطالعات بافت‌شناسی، قطعاتی به ضخامت ۰/۵ سانتی‌متر از غدد پانکراس جدا و بعد از شستشو با سرم نرمال به مدت ۲۴ ساعت در داخل فرمالین بافر ۱۰٪ پایدار شدند. سپس ضمن انجام مراحل گوناگون آماده سازی بافت، با استفاده از دستگاه اتوتکنیکون و تهیه قالب‌های پارافینی، مقاطعی به ضخامت ۶ میکرون تهیه و با استفاده از روش رنگ‌آمیزی متداول هماتوکسلین وائوزین (H & E)، مطالعه انجام شد. مقاطع رنگ‌آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری مطالعه و فتومیکروگراف‌های لازم از آن‌ها تهیه گردید (Banan khojasteh et al., 2011).

سنجش الایزا

بافت‌های آئورت سینه‌ای از فریزر ۸۰°C- خارج شد و به روی هرکدام از نمونه‌ها ۶۰۰ میکرولیتر فسفات بافر سالین سرد (ice cold ۱٪) که در طول شب در فریزر ۱۸°C- نگهداری شده بود اضافه گردید. سپس توسط هموژنایزر دستی بافت هموژن تهیه شد، با سانتریفیوژ یخچال دار (دمای ۴°C) با دور 5000 × g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و در آخر بلافاصله مایع‌روبی یا سوپرناتانت آن جدا و براساس دستورالعمل کیت الایزای کانکسین ۴۳ فسفریله (Cosabio CSB-E17273r) مورد سنجش قرار گرفت.

آنالیز آماری

داده‌های وزن بدن، گلوکز خو در ابتدا و انتهای دوره آزمایش توسط آنالیز (Paired T test) و داده‌های وزن بدن، گلوکز خون و اپتیکال دانسیته کانکسین ۴۳ فسفریله بین دو گروه مورد مطالعه توسط آنالیز (Independend T test) به وسیله نرم افزار SPSS-16 تعیین و نمودارهای مربوطه از طریق نرم‌افزار Excel 2010 رسم گردیدند.

نتایج

نتایج بافت‌شناسی

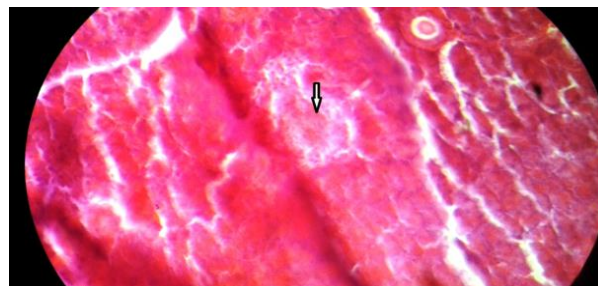
مطالعه میکروسکوپی مقاطع بافتی تهیه شده از غده پانکراس وجود نکروز در سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس را نشان داد (شکل ۱).

نتایج گلوکز خون و وزن بدن

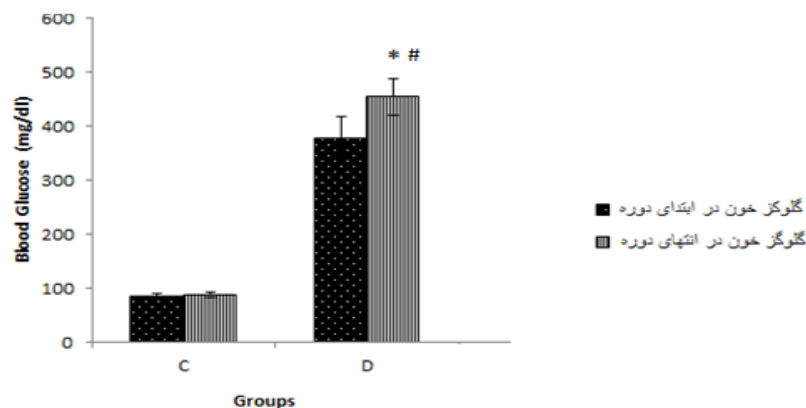
قبل از القاء دیابت تفاوت معنی‌داری در گلوکز و وزن

بدن گروه کنترل و دیابتی مشاهده نشد، در حالی که یک هفته بعد از القاء گلوکز خون گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت ($P < 0.05$). با این وجود در انتهای دوره، میانگین گلوکز خون ناشتای موش‌های گروه کنترل در حدود $(88/3 \pm 5/2 \text{ mg/dl})$ بود که نسبت به گلوکز خون گروه دیابتی $(455/5 \pm 33/8 \text{ mg/dl})$ تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). لازم به ذکر است که گلوکز خون ناشتای موش‌های گروه دیابتی در طی دوره آزمایش، افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$) (نمودار ۱).

میانگین وزن بدن در گروه دیابتی ساکن در زمان شروع دوره برابر با $281/3 \pm 10/2 \text{ g}$ بود که در پایان دوره به $183/0 \pm 10/1 \text{ g}$ رسید که این کاهش معنی‌داری است ($P < 0.05$) (نمودار ۲). در حالی که در وزن بدن موش‌های گروه کنترل در انتهای دوره نسبت به زمان شروع تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.



شکل ۱. غده پانکراس؛ ناحیه نکروز شده با فلش نشان داده شده است (H&E، $\times 400$).

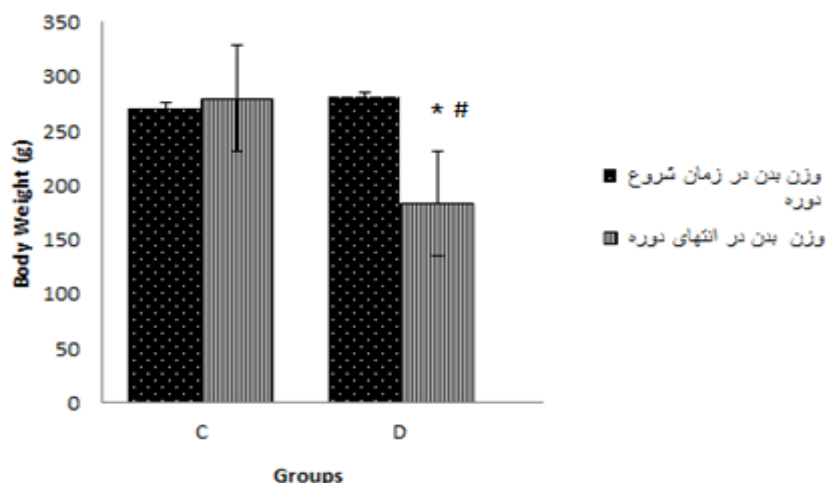


نمودار ۱. میانگین \pm خطای استاندارد گلوکز خون در بین گروه کنترل (C) و گروه دیابتی (D) در ابتدا و انتهای دوره. * اختلاف معنی‌دار را در داخل یک گروه در ابتدا و انتهای دوره نشان می‌دهد ($P < 0.05$). # اختلاف معنی‌دار را در بین دو گروه مورد مطالعه نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

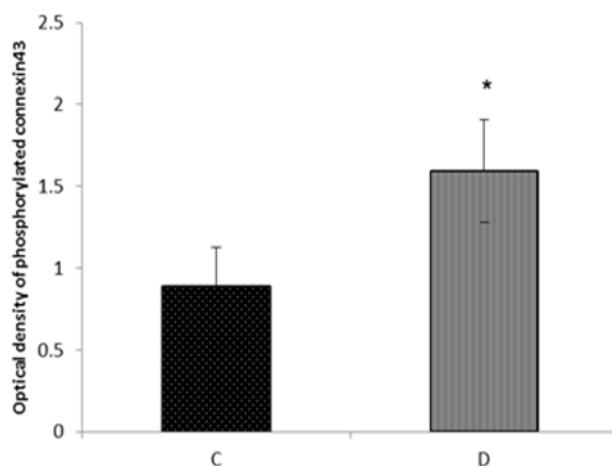
نتایج اپتیکال دانسیته کانکسین ۴۳ فسفریله

از نتایج دیگر این بررسی می‌توان به افزایش معنی‌دار سطح کانکسین ۴۳ فسفریله در آئورت سینه‌ای

موش‌های صحرائی گروه دیابتی نسبت به موش‌های گروه کنترل اشاره نمود ($P < 0.05$) (نمودار ۳).



نمودار ۲. میانگین \pm خطای استاندارد وزن بدن در بین گروه کنترل و گروه دیابتی در ابتدا و انتهای دوره. * اختلاف معنی‌دار را در داخل یک گروه در ابتدا و انتهای دوره نشان می‌دهد ($P < 0.05$). # اختلاف معنی‌دار را در بین دو گروه مورد مطالعه نشان می‌دهد ($P < 0.05$).



نمودار ۳. میانگین \pm خطای استاندارد اپتیکال دانسیته کانکسین ۴۳ فسفریله در بین گروه کنترل (C) و گروه دیابتی (D). * اختلاف معنی‌دار در بین دو گروه آزمایش را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

این یافته با نتایج سایر مطالعات در این زمینه هم خوانی دارد (Akbarzadeh *et al.*, 2007; Atalay *et al.*, 2004; Deblieux *et al.*, 1993). از آنجایی که ناقلین گلوکز ۲ (GLUT2) در سلول‌های بتای پانکراس، کبد و کلیه یافت می‌شوند و وظیفه انتقال گلوکز به داخل سلول‌های بتا را عهده دار

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تاثیر دیابت نوع یک القا شده توسط استروپتوزوتوسین (STZ) بر تغییرات شاخصه‌های متابولیک (گلوکز خون و وزن بدن) پرداخته شد. نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار مقادیر گلوکز خون در موش‌های صحرائی گروه دیابتی می‌باشد (نمودار ۱).

سوربیتول توسط آنزیم سوربیتول دهیدروژناز، با مصرف NAD^+ به فروکتوز اکسید می‌گردد، عقیده بر این است که افزایش تولید سوربیتول و تبدیل آن به فروکتوز، نسبت NADH/NAD^+ را افزایش می‌دهد. این نسبت تغییر یافته باعث فعال‌سازی PKC و مهار آنزیم گلیسرو آلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز می‌شود و در نهایت گلیکولیز را مختل می‌کند، بدین ترتیب مصرف گلوکز نیز کاهش می‌یابد (Ranis *et al.*, 2011)، که این کاهش مصرف گلوکز سبب می‌شود که در افراد دیابتی مصرف چربی‌ها و پروتئین‌ها برای تولید انرژی افزایش یابد. به‌طور خلاصه کاهش ذخیره‌سازی کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها و نیز افزایش مصرف چربی‌ها و پروتئین‌ها زمینه لازم را برای بروز کاهش وزن در افراد دیابتی فراهم می‌سازد. اما هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی تأثیر دیابت نوع ۱ القاء شده توسط استرپتوزوتوسین بر روی میزان فسفریلاسیون کانکسین ۴۳ در آئورت سینه‌ای بود. که نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تزریق استرپتوزوتوسین موجب افزایش معنی‌داری در سطح پروتئین کانکسین ۴۳ فسفریله در آئورت سینه‌ای موش‌های صحرایی دیابتی نسبت به گروه کنترل می‌گردد (نمودار ۳)، و با نتایج اکثر مطالعاتی که در زمینه بررسی تغییرات پروتئین کانکسین ۴۳ فسفریله در شبکه (Fernandes *et al.*, 2004) و بافت‌های دیگر نظیر میوسیت‌های بطنی (Lin *et al.*, 2006; Howarth *et al.*, 2008)، صورت گرفته، هم‌راستا می‌باشد. همچنین مطالعات پیشین ما نیز نشان دادند که سطح کانکسین ۴۳ فسفریله در شبکه و میوسیت‌های بطن چپ موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت افزایش می‌یابد که به کمک ورزش متوسط و منظم این افزایش تقلیل نشان می‌دهد (Hesari & Khajehnasiri, 2013; Sheikhzadeh *et al.*, 2014). نتایج بررسی‌های پیشین نشان داده بودند که میزان فعالیت ایزوفرم اپسیلون پروتئین کیناز C که

هستند، این‌گونه برداشت می‌شود که استرپتوزوتوسین از طریق ناقصین گلوکز ۲ وارد سلول‌های بتای پانکراس می‌گردد (Fukumoto *et al.*, 1998) و از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد که آنان نیز به نوبه خود سطح سلولی نوکلئوتیدها و ترکیبات مرتبط با آنان را کاهش می‌دهند، زمینه لازم را برای تکه‌تکه شدن DNA سلول‌های بتای پانکراس در موش صحرایی فراهم می‌نماید. تمامی موارد ذکر شده خود گواهی است بر سرعت بالای نکروز در سلول‌های بتا پانکراس که آن نیز ناشی از ورود استرپتوزوتوسین به داخل این سلول‌ها است (Yamamoto *et al.*, 1981). بنابراین این چنین استنباط می‌شود که STZ از طریق القاء نکروز در سلول‌های بتای پانکراس (شکل ۱) و کاهش تعداد این سلول‌ها موجب کاهش سطح انسولین و به تبع آن افزایش سطح گلوکز خون می‌گردد.

از دیگر یافته‌های این بررسی می‌توان به بروز کاهش وزن پیشرونده در گروه دیابتی اشاره نمود (نمودار ۲). که این نتیجه نیز با نتایج بررسی‌های دیگر هم‌راستا می‌باشد (De angelis *et al.*, 2000). از دلایل مهم که در کاهش وزن افراد دیابتی دخیل می‌باشند می‌توان به کاهش سطح انسولین، افزایش میل ترکیبی آنزیم آلدولاز ردوکتاز به گلوکز (Ranis *et al.*, 2011) و نیز به کاهش آب بدن که ناشی از پلی‌اوری می‌باشد (Howarth *et al.*, 2007) اشاره کرد. انسولین یک هورمون آنابولیک است و در ذخیره کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها دارای نقش بسزایی است از این‌رو این هورمون را هورمون فراوانی می‌نامند، اما در بیماران دیابتی نوع ۱ سطح هورمون انسولین کاهش می‌یابد که نتیجه آن نیز کاهش ذخیره‌سازی ترکیبات مذکور است. از طرفی در شرایط نرمال، آنزیم آلدولاز ردوکتاز میل ترکیبی پایینی نسبت به گلوکز دارد اما در طی هیپرگلیسمی، گلوکز اضافی توسط آنزیم آلدولاز ردوکتاز، با اکسید کردن NADPH، به سوربیتول احیا می‌شود و

در فسفریلاسیون و در نتیجه تنظیم نفوذپذیری اتصالات شکافدار حائز اهمیت می‌باشد، در طی بیماری دیابت و نیز هایپرگلیسمی، افزایش می‌یابد (Kuroki *et al.*, 1998). در نتیجه استرپتوزوتوسین با بالابردن سطح گلوکز خون و در نتیجه افزایش فعالیت ایزوفرم اپسیلون پروتئین کیناز C میزان کانکسین ۴۳ فسفریله را در آئورت سینه‌ای افزایش می‌دهد، که نتیجه هایپر فسفریلاسیون کانکسین ۴۳، افزایش تجزیه پروتئوزومی کانال‌های اتصالات شکافدار است که آن نیز هدایت از خلال اتصالات شکافدار را با مشکل مواجه می‌سازد (Kuroki *et al.*, 1998; Howarth *et al.*, 2008). همچنین مطالعات نشان داده بودند که تنظیم کاهشی کانکسین ۴۳ در سلول‌های اندوتلیال عروق، هدایت اتصالات شکافدار را کاهش می‌دهند

(Inoguchi *et al.*, 1995). این کاهش هدایت از خلال کانال‌های اتصالات شکافدار، نشر مولکول‌های کوچک و یون‌های را که برای تکثیر سلول‌ها و حفظ هموستاز داخل سلولی ضروری می‌باشد را با مشکل روبرو می‌سازد (Salameh *et al.*, 2005; Herve *et al.*, 2007). از آنجایی که یکی از اساسی‌ترین کانکسین‌های عروق، کانکسین ۴۳ می‌باشد می‌توان اینگونه استنباط نمود که هایپرگلیسمی با افزایش میزان فسفریلاسیون و تجزیه پروتئوزومی آن، هدایت اتصالات شکافدار را کاهش می‌دهد که این امر نیز احتمالاً با ایجاد اختلال در هموستاز و تون عروقی، و نیز القای آپوپتوز زمینه لازم را برای ایجاد عوارض قلبی-عروقی ناشی از دیابت نظیر آترواسکلروزیس و افزایش فشار شریانی را هموار می‌سازد.

REFERENCES

- Akbarzadeh, A.; Norouziyan, D.; Mehrabi, M.; Jamshidi, S.; Farhangi, A.; Allah Verdi, A.; Mofidian, S.; Lame Rad, B.; (2007). Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*; 22(2): 60-64.
- Atalay, M.; Oksala, N.; Laaksonen, D.; Khanna, S.; Nakao, C.; Lappalainen, J.; Roy, S.; Hanninen, O.; Sen, C.; (2004). Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *J Appl Physiol*; 97: 605-611.
- Ayoub, R.; (2009). Effect of exercise on spatial learning and memory in male diabetic rats. *Int J Diabetes & Metabolism*; 17: 93-98.
- Banan Khojasteh, SM.; Khajehnasiri, N.; (2011). The histological study of parotid and submandibular salivary glands of the porcupine (*Erinaceus concolor*). *Journal of Biological Science*; 13: 1-6.
- Christ, GJ.; Spray, DC.; el-Sabban, M.; Moore, LK.; Brink, PR.; (1996). Gap junctions in vascular tissues: evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. *Circ Res*; 79: 631-646.
- De Angelis, K.; Oliveira, A.; Dall Ago, P.A.; Peixoto, P.; Gadonski, G.; Lacchini, S. *et al.*; (2000). Effects of exercise training on autonomic and myocardial dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Brazilian Journal of medical and biological research*; 33: 635-641
- Deblieux, P.; Barbee, R.; Mcdonough, K.; Shepherd, R.J.; (1993). Exercise training improves cardiac performance in diabetic rats. *Biol Med*; 203: 209-213.
- Dejana, E.; Corada, M.; Lampugnani, MG.; (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 9: 910-918.
- Fernandes, R.; Girao, H.; Pereira, P.; (2004). High glucose down-regulates intercellular communication in retinal endothelial cells by enhancing degradation of connexin 43 by a proteasome-dependent mechanism. *J Biol Chem*; 279: 27219-27224.
- Fukumoto, H.; Seino, S.; Imura, H.; Seino, Y.; Eddy, R.; Fukushima, Y.;

- Byers, M.; Shows, T.; Bell, G.; (1988). Tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 85: 5434-5438
- Hesari, F.S.; Khajehnasiri, N.; (2013). Phosphorylated Connexin 43 Protein Levels Attenuation in the Retina of Adult Diabetic Male Rats, by Regular Moderate Exercise. *Journal of Physiology and Pharmacology Advances*; 3(8): 199-206.
- Herve, JC.; Bourmeyster, N.; Sarrouilhe, D.; Duffy, HS.; (2007). Gap junctional complexes: from partners to functions. *Prog Biophys Mol Biol*; 94: 29-65.
- Howarth, FC.; al-Ali, S.; Al-Sheryani, S.; Al-Dhaheeri, H.; Al-Junaibi, S.; Al-mugaddum, F.; Qureshi, M.; (2007a). Effects of voluntary exercise on heart function in streptozotocin-induced diabetic rat. *Int J Diabetes & Metabolism*; 15: 32-37.
- Howarth, F.; Chandler, N.; Khariche, S.; Tellez, J.; Greener, I.; Yamanushi, T. *et al.*; (2008). Effects of streptozotocin-induced diabetes on connexin43 mRNA and protein in ventricle muscle. *Mol cell biochem*; 319: 105-114.
- Inoguchi, T.; Ueda, F.; Umeda, F.; Yamashita, T.; Nawata, H.; (1995). Inhibition of intercellular communication via gap junction in cultured aortic endothelial cells by elevated glucose and phorbol ester. *Biochem Biophys Res Commun*; 208: 492-497.
- Isakson, BE.; Damon, DN.; Day, KH.; Liao, Y.; Duling, BR.; (2006). Duling, Connexin40 and connexin43 in mouse aortic endothelium: evidence for coordinated regulation *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 290: 1199-120
- Kuroki, T.; Inoguchi, T.; Umeda, F.; Ueda, F.; Naeata, H.; (1998). High glucose induces alteration of gap junction permeability and phosphorylation of connexin 43 in cultured aortic smooth muscle cells. *Diabetes*; 48: 931-936.
- Kwak, BR.; Jongsma, H.; (1996). Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *J Mol. Cell. Biochem*; 157: 93-99.
- Lin, H.; Ogawa, K.; Imanaga, L.; Tribulova, N.; (2006). Remodeling of connexin 43 in the diabetic rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*; 290: 69-78.
- Longo, K.; Jameson, B.; Hauser, F.; (2005). *Harrison's principles of internal medicine: 12th Edition*. New York: McGraw-Hill.
- Mehta, JL.; Rasouli, N.; Sinha, AK.; Molavi, B.; (2006). Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *Int J Biochem Cell Biol*; 38: 794-803.
- Muralidhara, S.; Peerapatdit, T.P.; (2007). Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. *Int. J. Androl*; 30: 508-518.
- Orasanu, G.; Plutzky, J.; (2009). The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol*; 53: 35-42.
- Ozkan, Y.; Yilmaz, O.; Oztürk, A.; Erşan, Y.; (2005). Effects of triple antioxidant combination (vitamin E, vitamin C and alpha-lipoic acid) with insulin on lipid and cholesterol levels and fatty acid composition of brain tissue in experimental diabetic and non-diabetic rats. *Cell Biol Int*; 29: 754-760.
- Ranis, J.; Jai, S.; (2011). Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. *Free radical Biology & Medicine*; 50: 34-39.
- Rummery, NM.; McKenzie, KU.; Whitworth, JA.; Hill, CE.; (2002). Decreased endothelial size and connexin expression in rat caudal arteries during hypertension. *J Hypertens*; 20: 247-253.

- Salameh, A.; Dhein, S.; (2005). Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer? *Biochim Biophys*; 1719: 36-58.
- Sheikhzadeh Hesari, F.; Khajehnasiri, N.; Banan Khojasteh, SM.; Ghadiri Soufi, F.; Dastranj, A.; (2014). Attenuation of Phosphorylated Connexin-43 Protein Levels in Diabetic Rat Heart, by Regular Moderate Exercise. *Archives of Iranian Medicine*; 17(8): 569-573.
- Simon, AM.; McWhorter, AR.; (2003). Decreased intercellular dye-transfer and downregulation of non-ablated connexins in aortic endothelium deficient in connexin 37 or connexin 40. *J Cell Sci*; 116: 2223-2236.
- Yamamoto, H.; Chigata, Y.; Okamoto, H.; (1981). DNA strand breaks in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin. *Biochem Biophys Res Commun*; 103: 1014-1020.
- Yeh, HI.; Chang, HM.; Lu, WW.; Lee, YN.; Ko, YS.; Severs, NJ.; Tsai, CH.; (2000). Age-related alteration of gap junction distribution and connexin expression in rat aortic endothelium. *J Histochem Cytochem*; 48: 1377-1390.