• مقاله تحقیقی

اثر مداخله ورزش بر عوامل درگیر بر بیان ژن عوامل تحریکی و مهاری رگ‌زایی به دنبال ایسکمی ریپرفیوژن مجدد عضله قلب

*یعقوب مهری الوار[1]، علیرضا رمضانی[2]، عباسعلی گایینی[3]، فرشته گلاب[4]، ریاض غیرتمند[5]

چکیده

مقدمه: فرایند رگ‌زایی برای موضع آسیب‌دیده در قلب امری حیاتی است. این مطالعه با هدف بررسی اثر مداخله ورزش بر عوامل درگیر بر بیان ژن عوامل تحریکی و مهاری رگ‌زایی به دنبال ایسکمی ریپرفیوژن مجدد عضله قلب صورت گرفته است.

روش بررسی: در این مطالعه ۲۸ رت صحرایی نر ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) به صورت تصادفی در ۴ گروه شم، ایسکمی، تمرین و تمرین- ایسکمی مورد استفاده قرار گرفتند. آنفارکتوس میوکارد با بستن شریان کرونری نزولی به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. برنامه تمرینی روی تردمیل به مدت ۸ هفته، ۳ روز در هفته به مدت ۴۰ دقیقه اجرا شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و تزریقات، موشها بی هوش شده و بافت قلب جدا شد و بیان ژن VEGF، TSP-1، Akt و اپلین برای سلولهای بافت قلب اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اختلاف معناداری بین ۴ گروه در میزان بیان ژن VEGF، TSP-1، Akt و اپلین وجود دارد (p=۰/۰۰۱). نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که سطح بیان ژن VEGF، Akt و اپلین در گروه تمرین ایسکمی افزایش معناداری به نسبت گروه شم، ایسکمی و تمرین ورزشی داشت (p<۰/۰۵). در واقع تمرینات ورزشی در هنگام مداخله ایسکمی می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن اپلین، VEGF و Akt شد. اما خود تمرین ورزشی این تغییر را ایجاد نکرد (p>۰/۰۵). از طرف دیگر نتایج نشان داد که سطح بیان ژن TSP-1 در گروه تمرین ایسکمی، ایسکمی و تمرین ورزشی کاهش معناداری به نسبت گروه شم داشت (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری: تمرینات ورزشی به دنبال مداخله ایسکمی میوکارد سعی در حذف عوامل منفی و افزایش عوامل مثبت رگ‌زایی برای رساندن بافت به تعادل آنژیوژنزی را دارا هستند.

کلمات کلیدی: ایسکمی-ریپرفیوژن، تحریک رگ‌زایی، مهار رگ‌زایی، اپلین، ترومبوسپوندین یک، پروتئین کیناز B

۱.دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی (قلب عروق و تنفس)، تهران، ایران، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی (*مؤلف مسئول)
yaghoob.alvar@alumni.ut.ac.ir
۲.دانشیار، تهران، ایران، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی
۳. استاد، تهران، ایران، دانشگاه تهران
۴. استادیار، تهران، ایران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
۵. تهران، ایران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

فصلنامه علمی پژوهشی ابن سینا / اداره بهداشت، امداد و درمان نهاجا (سال نوزدهم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۶، مسلسل ۶۰)
تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۶

مقدمه

بیماری قلبی- عروقی همچنان از معضلات اصلی بهداشتی کشورهای در حال توسعه است. تنها در ایالات‌متحده آمریکا حدود ۷/۱میلیون نفر از آنفارکتوس میوکارد و ۴/۹میلیون نفر از بیماری‌های احتقانی قلب رنج می‌برند [۱]؛ بنابراین، هرگونه تغییر هرچند کوچک در بهبود و افزایش طول عمر بیماران قلبی، می‌تواند تأثیر بزرگی بر ارتقا سلامت جامعه داشته باشد. ایسکمی میوکارد با انسداد شریان‌های کرونری به وجود می‌آید و با وضعیت‌های بالینی همچون آنژین صدری، ضربان‌های نامنظم، نارسایی قلبی، آنفارکتوس میوکارد یا مرگ ناگهانی تظاهر می‌کند [۲]. رگ‌زایی عروق کرونری در سطح مویرگی (آنژیوژنز)[۱] و رگ‌زایی جانبی (گسترش عروق قلبی)، درمان مطلوبی برای بیماران مبتلا به ایسکمی قلبی به‌حساب می‌آید. رگ‌زایی عروق کرونری و جانبی پیامد سازگاری مزمن به ایسکمی میوکارد است که هدف آن احیاء جریان خون و کارایی میوکارد در ناحیه ایسکمی است. رگ‌زایی برای موضع آسیب‌دیده در قلب امری حیاتی است و نبود آن موجب تأخیر در روند ترمیم می‌گردد [۳]. به طور کلی، مطالعات نشان داده‌اند سلول‌های پیش‌ساز نقش مهمی در بهتر شدن عملکرد انقباضی قلب و چگالی مویرگی در قلب ایسکمی دارد [۴]. چند عامل سلولی-مولکولی به عنوان تعدیل کننده در پاسخ به بازسازی ناحیه ایسکمی در قلب از جمله عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)[۲]، عامل تحریک کننده ماکروفاژ گرانولیسیتی (CM-CSF)[۳]، عامل مشتق از سلول‌های استرومال (SDF-1)[۴]، عامل ناشی از هیپوکسی (HIF1-a)[۵]، اپلین[۶] و آنژیوپویتین -۱ (Ang-1)[۷] فعال می‌شوند. در تقابل با این عوامل، عوامل مهاری نیز مانع از رگ‌زایی و ایجاد سازوکارهای لازم برای افزایش پروتئین‌ها و مولکول‌های درگیر در رگ‌زایی می‌شوند. دو مورد از مهم‌ترین عوامل مهاری رگ‌زایی عبارتند از: اندواستاتین (ES)[۸] و ترومبوسپوندین یک (TSP-1)[۹] [۵]. این عوامل از ضروریات رگ‌زایی و نوزایی عروقی در بافت ایسکمی به شمار می‌روند [۷-۶]. نقش TSP-1 در بافت قلب به عنوان یک مهارگر رگ‌زایی تا کنون به درستی مشخص نشده است. اما اکثر تحقیقات نشان داده‌اند که این عامل از طریق کاهش تکثیر و افزایش آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال موجب مهار رگ‌زایی می‌شود [۷-۵]. عامل مهم دیگری که در روند رگ‌زایی مشارکت فعالی دارد، اپلین است. این فرایند از راه بیش ترشحی عوامل درگیر در آنژیوژنز رخ می‌دهد و سپس با ترشح این عوامل، باعث فعال شدن مسیرهای پیام دهی eNOS[۱۰] /Akt[۱۱] می‌شود و سرانجام به بهتر شدن رگ‌زایی و بازسازی بافت ایسکمی منجر می‌شود [۸].

این فرایندها به هماهنگی چند عامل از جمله عامل‌های سلولی-مولکولی پایین دست، بالا دست و پیام‌های سلولی-مولکولی مختلفی بستگی دارد که بخشی از آنها شناخته شده‌اند و بخشی دیگر به پژوهش بیشتر نیاز دارد. تغییر در ویژگی‌های عملکردی و کارایی این سلول‌ها و پیام رسان‌ها طراحی استراتژی‌های جدیدی نیاز دارد. عقیده بر آن است که آنژیوژنز بر اثر عوامل گوناگونی پدید می‌آید و فعالیت‌های آنژیوژنزی از طریق عوامل تحریک کننده و مهار کننده تنظیم می‌شوند [۹]. یکی از این سازوکارهای اثر گذار بر ترمیم، بازسازی عروق و نوزایی بافت مورد ایسکمی قلب، فعالیت ورزشی است.

فعالیت ورزشی و تمرین‌های ورزشی موجب تشکیل رگ‌های جدید به ویژه در سطح مویرگی می‌شوند. از سویی دیگر، فعالیت ورزشی آثار مفیدی بر دستگاه قلبی عروقی دارد. یکی از این آثار در رابطه با آسیب ایسکمی ریپرفیوژن[۱۲]،

1. Angiogenesis
2. Vascular Endothelial Growth Factor
3. granulocyte macrophage colony stimulating factor
4. Stromal cell-derived factor
5. Hypoxia-Inducible Factor
6. Apelien
7. Angiopoietin -1
8. Endostatin
9. Thrombospondin- 1
10. endothelial nitric oxide synthase
11. Protein Kinase B
12. ischemia reperfusion

کاهش اندازه آنفارکتوس میوکارد بعد از فعالیت ورزشی است. این یافته‌ها، محافظت قلبی ناشی از فعالیت ورزشی را، پس از بهتر شدن عملکرد قلب و نیز عوامل رگ‌زایی را یادآوری می‌کنند [۱۰]. جونز[1] و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی غلظت عضلانی عوامل آنژیوژنیک VEGF-A و آنتی آنژیوژنیک VEGF165b یا VEGF گیرنده ۱ در بیماران عروق محیطی در نتیجه فعالیت بدنی و مقایسه آنها با افراد عادی پرداختند. نتایج نشان داد که تمرین ورزشی همراه با کاهش معنادار سطوح VEGF-A همراه با تمایل به افزایش VEGF گیرنده ۱ همراه بود [۱۱]. همچنین گایینی و همکاران (۱۳۹۳) در پژوهشی به بررسی تغییرات عوامل تحریکی رگ‌زایی ناشی از تمرین مقاومتی فزاینده در رت‌های دیابتی پرداختند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که هشت هفته تمرین مقاومتی تأثیر مثبتی بر عوامل تحریکی رگ‌زایی ندارد [۱۲].

فعالیت ورزشی یک استراتژی غیردارویی قابل اطمینان برای درمان آنفارکتوس قلبی است و اختلالات عملکرد بطن چپ را بعد از آن کاهش می‌دهد. در بیماران قلبی ـ عروقی، فعالیت بدنی ارتباط معناداری با کاهش میزان مرگ و میر دارد، که می‌تواند ناشی از تأثیر مفید فعالیت ورزشی بر عملکرد قلبی ـ عروقی ناشی از افزایش عوامل وابسته به عروق و خون‌رسانی و در نهایت توسعه فرایند آنژیوژنز در ناحیه ایسکمی باشد. بنابراین، با توجه به مطالب ذکر شده در بالا، تاکنون مطالعه‌ای که آنژیوژنز را بعد از ایسکمی – خونرسانی مجدد میوکارد و همین‌طور به دنبال مداخله فعالیت ورزشی و تمرینی شدید بررسی کرده باشد یافت نشد. از طرفی دیگر حلقه گم شده در مسیرهای پیام‌رسانی برای رگ‌زایی به دنبال ایسکمی– خونرسانی مجدد وجود دارد که نقش پروتئین Akt در این مسیر را نشان می‌دهد. اکثر تحقیقات مرتبط به این پروتئین اشاره داشته‌اند ولی این متغیر در پژوهش‌های قبلی اندازه‌گیری نشده است که در این پژوهش ارزیابی خواهد شد. بنابراین پژوهشگران در پژوهش حاضر به دنبال بررسی ابهام تأثیر تمرین تناوبی خیلی شدید (HIIT)[2] به دنبال ایسکمی/ خونرسانی مجدد عضله قلب بر بیان ژن عوامل تحریکی و مهاری آنژیوژنزی هستند.

روش بررسی

در این مطالعه ۲۸ سر موش صحرایی نر ویستار (۲۵۰–۲۰۰ گرم، خریداری شده از دانشگاه علوم پزشکی ایران) مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات [۴ گروه ۷ تایی: کنترل جراحی (شم)، ایسکمی میوکارد، تمرین و تمرین–ایسکمی] در آزمایشگاه استاندارد جوندگان (چرخه ۱۲ ساعت روشنایی– تاریکی و میانگین درجه حرارت ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد) با دسترسی آزادانه به آب و غذا در بیمارستان قلب و عروق شهید رجایی نگهداری می‌شدند.

مدل ایسکمی– ریپرفیوژن و داروهای تزریقی به این صورت بود که ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم (۵۰ mg/kg) بیهوش شدند. پس از تراشیدن ناحیه قفسه سینه موش‌های صحرایی نر ویستار، برای انتوبه کردن بر روی تخت جراحی قرار گرفتند. بعد از انتوبه کردن حیوان به ونتیلاتور[3] (با تواتر تنفسی ۶۰ تا ۷۰ تنفس در دقیقه و حجم جاری ۱۵ mL/kg) وصل شد. برای حفظ دمای بدن حیوان در شرایط فیزیولوژیک (دمای ۳۷ سانتی‌گراد) یک پد و لامپ حرارتی در زیر حیوان قرار داده شد.

توراکتومی چپ در بین ناحیه بین دنده‌ای چهارم انجام شد، عضلات بین دنده‌ای و پری‌کارد جدا شدند تا قلب در معرض دید کامل قرار گیرد. آنفارکتوس میوکارد با بستن شریان کرونری نزولی (LAD) به وسیله نخ بخیه پلی پروپیلن ۶–۰ در ناحیه ۲ میلی‌متر پایین‌تر از منشأ LAD انجام شد. انسداد موفق LAD با تغییرات ECG شامل بالا رفتن قطعه ST، تغییر رنگ و حرکت رأس و دیواره قدامی– جانبی تأیید شد.

1. Jones

2. High-intensity interval training

3. Small Animal Ventilator, Harvard Model 683-USA

۳۰دقیقه بعد از بسته بودن LAD، ریپرفیوژن انجام شد و جریان خون دوباره به میوکارد تأیید شد. سپس قفسه سینه و لایه‌های عضلانی با بخیه زدن بسته شدند. حیوانات بوپرونورفین (0.05 mg/kg ip) و پماد موضعی تتراسایکلین دریافت کردند. بعد از خارج کردن تراشه، حیوانات در زیر اکسیژن خالص قرار می‌گرفتند و گرم نگه داشته می‌شدند تا زمانی که به شکل کامل به هوش بیایند. عمل جراحی شم نیز اجرا شد که حیوانات انتوبه شده و تنها تحت عمل توراکتومی قرار گرفتند و هیچ‌گونه عمل بسته شدن LAD صورت نگرفت [۸].

موش‌های صحرایی نر ویستار پس از جراحی به مدت ۴ هفته دوره بازیافت را طی کردند. در هفته سوم و چهارم دوره بازیافت موش‌های صحرایی نر ویستار با تردمیل توسط راه رفتن آرام آشنا شدند (با سرعت m/min ۵، به مدت ۵ دقیقه و ۳ روز در هفته). در پایان هفته چهارم آزمون ظرفیت ورزشی از تمامی موش‌های صحرایی نر ویستار توسط آزمون فعالیت ورزشی بیشینه (VO_2max) اندازه‌گیری شد [۱۴-۱۳].

اندازه‌گیری VO_2max در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بر اساس مطالعه هویدال و همکاران انجام گرفت. به این صورت که هر رت ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۱۰متر در دقیقه مرحله گرم کردن را سپری می‌کردند، سپس آزمون فزاینده ورزشی آغاز می‌شد، هر دو دقیقه سرعت تردمیل ۰/۰۳ m/sec به صورت خودکار افزایش می‌یافت، تا زمانی که رت‌ها قادر به ادامه فعالیت ورزشی نبودند. با توجه به سرعت نهایی بدست آمده در انتهای آزمون بیشینه و بر اساس مطالعه هویدال و همکاران سرعت مورد نظر در شدت‌های برنامه تمرینی بدست آمد [۱۴-۱۳].

برنامه تمرینی روی تردمیل طراحی شده ویژه حیوانات (ساخت شرکت دانش سالار ایرانیان، تهران)، ۳ روز در هفته به مدت ۴۰ دقیقه بود که شامل ۵ دقیقه گرم کردن و سرد کردن با شدت ۴۰ تا ۵۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی و ۳۰ دقیقه دویدن تناوبی بود. هر تناوب شامل ۴ دقیقه دویدن با شدت خیلی بالا (تقریبا ۸۵ تا ۹۰٪ VO_2max) و ۲ دقیقه ریکاوری فعال (تقریبا با شدت ۵۰ تا ۶۰٪ VO_2max) بود. شدت تمرین در طی هفته‌ها بر اساس مطالعات گذشته و ارتباط بین سرعت دویدن و VO_2max تنظیم شد. بنابراین، شدت تمرینی در هر هفته m/sec ۰/۰۲ افزایش می‌یافت [۱۴-۱۳].

استخراج RNA از بافت نمونه با استفاده از Qiazol (کیت Qiagen، آلمان) با توجه به توصیه سازنده استخراج شد. به منظور از بین بردن احتمالی آلودگی RNA با DNA از آنزیم DNase عاری از RNase استفاده شد. مقادیر لازم بر حسب غلظت RNA استخراج شده تعیین شد. بدین ترتیب به ازای یک میکروگرم RNA استخراج شده یک میکرولیتر DNase (Fermentase,1µl) و یک میکرولیتر بافر10 x اضافه شد و حجم محلول با آب تیمار شده با DEPC به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا آنزیم غیر فعال شود. غلظت RNA به روش اسپکتروفتومتری UV (اپندورف[1]، آلمان) تعیین شد. جهت ساخت cDNA به ۰/۲-۱ میکروگرم RNA استخراج شده ۱ میکرولیتر Oligo dt اضافه شد. حجم نهایی این مرحله باید ۱۲ میکرلیتر باشد. بدین ترتیب اگر RNA غلیظتر بود مقدار کمتری از آن برداشته شد و با آب تیمار شده با DEPC به حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. واکنش به مدت ۵ دقیقه در۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس بلافاصله درون یخ گذاشته شد. به میکروفیوژ، ۴ میکرولیتر بافر X5، ۲ میکرولیتر dNTP و ۱ میکرولیتر RNasin اضافه شد تا حجم نهایی به ۱۹ میکرولیتر برسد. محلول واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. یک میکرولیتر آنزیم RT به واکنش اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای متوقف کردن واکنش، میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد

1. Eppendorff

قرار داده شد. cDNA حاصل روی یخ قرار داده شد و تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای طراحی پرایمرها ابتدا توالی mRNA مربوط به ژن VEGF، Akt، اپلین و TSP-1 با استفاده از سایت NCBI استخراج شد. پرایمرها توسط نرم افزارکامپیوتری Allel ID ساخته شد و سپس هر پرایمر توسط نرم افزار BLAST جهت اطمینان از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفت. پرایمرها توسط شرکت سیناکولن ساخته شد. در این تحقیق از ژن بتا اکتینین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

توالی پرایمرهای مورد نظر:

ژن VEGF	Rat VEGF F: 5- GTAGACACACCCACCCACATAC -3 Rat VEGF R: 5-TGAAGACACCAATAACATTAGCAGAG -3	
ژن Akt	Rat Akt F: 5-GAACGAGTTTGAGTACCTGAAGC-3 Rat Akt R: 5-ATGGCATAGTAGCGACCTGTG-3	
ژن TSP-1	Rat TSP-1F: 5- GCCTCTCCTGTGACGAACTATC -3 Rat TSP-1R: 5- CTTTGCGAATGCTGTCCTGTAG -3	
ژن Apelien	Rat APELIN F: 5- TCTGTTCTATTGCCGCTGGTTC -3 Rat APELIN R: 5- CTGACTTTCTGTGGGTTGTTTGG -3	

هر واکنش PCR با استفاده از روش مستر میکس[1] و SYBR Green در دستگاه سکانس شرکت اپلاید بیوسیستم[2] طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. برای تمامی ژن‌های مورد مطالعه نیز ژن رفرنس یعنی بتااکتینین جهت به دست آوردن دمای مناسب انلینگ[3] گرادیان دمایی انجام گردید. همچنین جهت بررسی اثربخشی پرایمرها، منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن (سری‌های رقیق شده DNA) رسم گردید. نمودار ملتینگ[4] نیز جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن مرجع تقریبا برابر بود. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول‌های $\Delta\Delta Ct$ و ۲- $\Delta\Delta Ct$ میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمال سازی شد.

توصیف کمی داده‌ها با استفاده از شاخص‌های پراکندگی مرکزی از قبیل میانگین و خطای استاندارد انجام شد و جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و جهت بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. هم چنین برای بررسی تغییرات معنی‌داری هریک از متغیرهای تحقیق، بین گروه‌های مختلف، از روش آنالیز واریانس یک راهه و در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار آماری از آزمون تعقیبی بونفرونی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد. سطح معناداری برای تمام محاسبات $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

یافته‌ها

در انتهای مطالعه (پس از مداخلات مربوطه) وزن حیوانات در بین گروه‌های مختلف تفاوت معناداری با یکدیگر داشت ($p<۰/۰۵$). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که وزن بدن در گروه تمرین-ایسکمی نسبت به گروه شم افزایش معنادار داشت ($p<۰/۰۵$). وزن قلب بین گروه های ایسکمی و شم با گروه تمرین ورزشی تفاوت معناداری را نشان داد. همچنین بین گروه‌های تمرین-ایسکمی با گروه های شم و ایسکمی تفاوت معناداری مشاهده شد در حالی که در وزن قلب بین تمرین-ایسکمی با گروه تمرین ورزشی اختلاف معناداری مشاهده نشد. نسبت وزن قلب به وزن بدن در بین گروه‌های مختلف تفاوت معناداری با یکدیگر نداشت در حالی که نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن در گروه تمرین-ایسکمی نسبت به گروه‌های شم و ایسکمی افزایش معنادار داشت درحالی که با گروه تمرین ورزشی اختلاف معناداری وجود نداشت (جدول ۱).

آنالیز واریانس یک راهه انجام شد و با توجه به مقدار F محاسبه شده (۳۶/۷،۵/۹، ۶۷/۷ و ۱۸/۴) و معنی‌دار بودن آن در سطح $p=۰/۰۰۱$، تفاوت معناداری بین سطوح VEGF، TSP-1، اپلین و Akt در گروه‌های مختلف پژوهش با ۹۹٪

1. PCR master mix, Applied Biosystems
2. Applied Biosystems, Sequence
3. Annealing
4. Melting

جدول ۱. مشخصات وزن بدن و قلب رت‌ها قبل و بعد از مداخله در همه گروه‌ها

متغیرها	گروه‌ها:	ایسکمی	تمرین-ایسکمی	تمرین	شم	مقدار p
وزن بدن قبل از مداخله (g)		۲۲۹/۶ ± ۷/۸	۲۳۲/۲ ± ۷/۶	۲۲۸/۶ ± ۵/۹	۲۱۴/۴ ± ۴/۵	۰/۲۶۳
وزن بدن بعد از مداخله (g)		۲۸۷/۶ ± ۴/۹	۳۱۴/۸ ± ۶/۲ †	۲۸۷ ± ۷/۳	۲۷۰/۸ ± ۱۳/۴	۰/۰۱۸
وزن قلب (mg)		۹۹۲ ± ۴۴/۸#	۱۲۹۲ ± ۴۰/۶ †*	۱۱۰۸ ± ۵۵/۲	۹۵۰ ± ۲۰/۹ #	۰/۰۰۱
نسبت وزن قلب به وزن بدن (mg/g)		۳/۴ ± ۰/۱	۳/۹ ± ۰/۳	۳/۸ ± ۰/۱	۳/۵ ± ۰/۱	۰/۲۶۱
وزن بطن چپ (mg)		۷۱۰/۸ ± ۳۹/۰	۹۹۶/۶ ± ۳۴/۵ †*	۸۱۷/۲ ± ۵۶/۴ †	۶۱۸/۲ ± ۲۰/۳	۰/۰۰۱
نسبت وزن بطن چپ به وزن بطن چپ (mg/g)		۲/۴ ± ۰/۱	۳/۱ ± ۰/۲ †*	۲/۸ ± ۰/۱	۲/۴ ± ۰/۱	۰/۰۰۵

داده‌ها با میانگین و خطای استاندارد نشان داده شده‌اند. از آنالیز واریانس یک راهه برای بررسی تفاوت‌های بین گروهی استفاده شده است.(سطح معناداری ۰/۰۵> p) (علایم نشان دهنده اختلاف بین گروهی است): * گروه‌ها در مقایسه با گروه ایسکمی؛ † گروه‌ها در مقایسه با گروه شم؛ # گروه‌ها در مقایسه با گروه تمرین

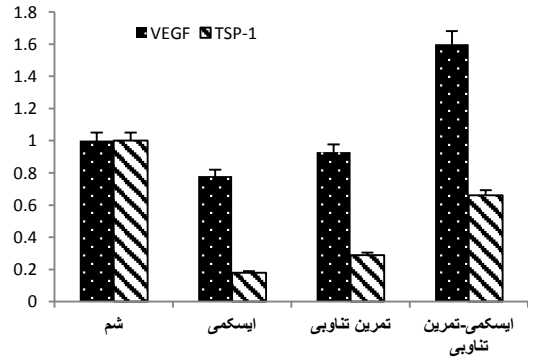
اطمینان تأیید شد. با توجه به جدول ۲، نتایج آزمون آنالیز واریانس یک راهه نشان داد که اختلاف معناداری بین ۴ گروه در میزان بیان ژن TSP-1،VEGF ، اپلین و Akt وجود دارد.

برای بررسی تعیین محل اختلاف در میزان بیان ژن TSP-1 و VEGF از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد (نمودار ۱). نتایج آزمون بونفرونی نشان داد که سطح بیان ژن VEGF در گروه تمرین-ایسکمی افزایش معناداری به نسبت گروه شم (p=۰/۰۴)، ایسکمی (p=۰/۰۰۲) و تمرین ورزشی (p=۰/۰۰۹) داشت. همچنین نتایج نشان داد که اختلافی بین گروه تمرین تناوبی با گروه ایسکمی و گروه شم وجود ندارد. در واقع تمرینات ورزشی در هنگام مداخله ایسکمی می‌تواند منجر به افزایش بیان ژنVEGF شود. اما خود تمرین ورزشی این تغییر را ایجاد نکرد. از طرف دیگر نتایج نشان داد که سطح بیان ژن TSP-1 در گروه تمرین-ایسکمی، ایسکمی (p=۰/۰۰۱) و تمرین (p=۰/۰۰۱) کاهش معناداری به نسبت گروه شم داشت. اما میزان کاهش در گروه تمرین- ایسکمی به نسبت سایر گروه‌ها در مقایسه با گروه شم کمتر بود.

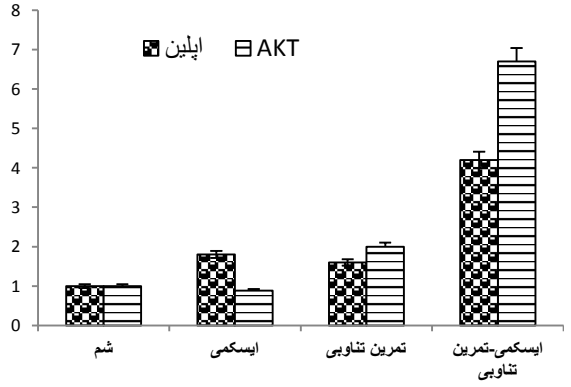
همچنین برای بررسی تعیین محل اختلاف در میزان بیان ژن اپلین و Akt از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد (نمودار ۲). نتایج آزمون بونفرونی نشان داد که سطح بیان ژن اپلین و Akt در گروه تمرین ایسکمی افزایش معناداری به نسبت گروه شم (p=۰/۰۰۱)، ایسکمی (p=۰/۰۰۱) و تمرین (p=۰/۰۰۱) داشت. همچنین نتایج نشان داد که اختلافی بین گروه تمرین با گروه ایسکمی میوکارد و گروه شم وجود ندارد. در واقع تمرینات ورزشی در هنگام مداخله ایسکمی می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن اپلین و Akt شود اما خود تمرین ورزشی این تغییر را ایجاد نکرد. از طرفی دیگر نتایج نشان داد که به دنبال مداخله ایسکمی افزایش معناداری در میزان بیان ژن اپلین به نسبت گروه شم وجود داشت (p=۰/۰۲۵).

جدول ۲- نتایج آزمون آنالیز واریانس یک راهه

متغیر	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	سطح معناداری	ضریب اتا
ژن VEGF	۲۲/۲	۳	۷/۴	۷/۹	*۰/۰۰۲	۰/۵۹۹
ژن TSP-1	۱۴۶۳۸/۳	۳	۴۸۷۹/۴	۳۶/۵	*۰/۰۰۱	۰/۹۹۹
ژن Apelin	۲۹۱۹۸/۰۰۲	۳	۹۷۳۲/۶	۶۷/۷	*۰/۰۰۱	۰/۹۱۹
ژن Akt	۱۷۳۴/۱	۳	۵۷۸/۰۶	۱۸/۴	*۰/۰۰۱	۰/۹۹۹



نمودار۱- میزان تغییرات بیان ژن VEGF به دنبال مداخلات ایسکمی و ورزش به نسبت گروه شم



نمودار۲- میزان تغییرات بیان ژن اپلین و Akt به دنبال مداخلات ایسکمی و ورزش به نسبت گروه شم

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از مزایای بارز برنامه تمرینی، توانایی آن در حفظ برون‌ده قلبی با کاهش پرتپشی و افزایش نیروی انقباضی عضله قلبی ناشی از ایسکمی میوکارد است. تغییرات ناشی از ایسکمی میوکارد در سطح مولکولی به احتمال زیاد ریشه در بیان و یا فعالیت پروتئین های متعدد درگیر در حفظ یا تنظیم عوامل مهاری و تحریکی رگ‌زایی دارد. که نتایج پژوهش حاضر اثرگذاری تمرینات ورزشی بر نوزایی عروق قلبی را نشان می‌دهد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد سطح بیان ژنVEGF در گروه تمرین–ایسکمی افزایش معناداری به نسبت سایر گروه‌ها (شم، ایسکمی و تمرین تناوبی) داشت. اما نتایج مربوط به بیان ژن TSP-1 کاملاً با نتایج VEGF متفاوت بود. همچنین نتایج نشان داد که اختلافی بین گروه تمرین تناوبی با گروه ایسکمی میوکارد و گروه شم وجود نداشت. در واقع تمرینات ورزشی در هنگام مداخله ایسکمی می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن VEGFشود. اما خود تمرین ورزشی این تغییر را در رت‌های سالم ایجاد نکرد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج پژوهش رنجبر و همکاران (۲۰۱۵) مخالف و ناهسوست [۱۰]. و با نتایج پژوهش زائو و همکاران (۲۰۱۰) و آل‌نبی و همکاران (۲۰۱۲) موافق و همسوست [۱۶–۱۵]. رنجبر و همکارانش (۲۰۱۵) نشان دادند در اندازه سکته بین گروه‌های ورزشی و مکمل و ایسکمی میوکارد تفاوت معناداری مشاهده نشده است. هم چنین، نتایج آنها نشان داد مکمل ال–آرژنین به همراه فعالیت ورزشی مانع از کاهش بیان ژن VEGF می‌شود [۱۰]. در واقع نتایج رنجبر و همکاران نشان دادند که تمرینات استقامتی منجر به کاهش عامل رشد اندوتلیال عروقی می‌شود. از دلایل اختلاف نتایج پژوهش حاضر با نتایج رنجبر و همکاران (۲۰۱۵) احتمالاً به نوع شدت تمرینی و نوع مکمل‌دهی برگردد [۱۰]. در واقع در این پژوهش از مداخله تمرینات تناوبی شدید با شدت بالای تقریبا ۸۵ تا ۹۰٪ VO_2max در تناوب‌های شدید (به مدت ۴ دقیقه طول کشیده) استفاده شده است. اما در پژوهش ذکر شده حداکثر شدت تمرینی ۶۰٪ VO_2max اجرا شده است. آل‌نبی و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند گیرنده VEGF به طور معناداری در موش‌های بی‌تحرک آنفارکتوسی همراه با افزایش بیشتر از آن در گروه تمرین و آنفارکتوس مشاهده شد [۱۶]. مهمترین و نخستین زنجیره در فرایند توسعه عروقی که تا کنون شناسایی شده است، افزایش تولید VEGF است. عامل محرک آنژیوژنز، چه هایپوکسی یا ایسکمی باشد و چه عامل همودینامیک، از طریق افزایش VEGF سبب تحریک فرایند آنژیوژنز می‌شود. به عنوان مثال هایپوکسی از طریق افزایش HIF سبب افزایش فعالیت eNOS و افزایش تولید VEGF می‌شود [۸]. هم چنین عامل همودینامیکی نظیر فشار برشی (که به دنبال فعالیت ورزشی مخصوصا فعالیت‌های شدید و با فشار بالا رخ می‌دهد) نیز، از طریق فعالسازی کانال‌های یونی به ویژه کانال‌های پتاسیمی موجب افزایش تولید نیتریک اکساید (NO)[1] می‌شود. NO نیز سبب تولید گیرنده‌های VEGF بیشتر می‌شود [۱۷].

نتایج پژوهش حاضر در رابطه با متغیر TSP-1 با نتایج پژوهش هویر و همکاران (۲۰۱۲) موافق و همسوست. هویر و همکاران (۲۰۱۲) در پژوهشی به بررسی نقش ۴ هفته تمرین هوازی بر تغییرات عوامل درگیر در رگ‌زایی پرداخت. نتایج پژوهش آنها نشان داد ۴ هفته فعالیت هوازی منجر به میزان کاهش غیرمعنادار بیان ژن TSP-1 شد [۱۸]. همبستگی بالای TSP-1 با تراکم مویرگی ناشی از عدم فعالیت ورزشی نشان می‌دهد که TSP-1، و یا شاید به عبارت کلی‌تر تنظیم کننده منفی آنژیوژنز می‌تواند نقش کلیدی تعیین کننده‌ای در تنظیم تعادل رگ‌زایی داشته باشد. TSP-1 به میزان زیادی موجب مهار تولید NO و سیگنال‌دهی NO می‌شود. شواهد مولکولی بیش از پیش نقشی محوری TSP-1، از طریق تعامل با گیرنده CD47 خود با میل ترکیبی بالا، در کنترل پاسخ های سلول عروقی به شیوه‌ای وابسته به NO و مستقل از NO را

1. Nitric Oxide

نشان می‌دهند که موجب محدود کردن جریان خون و پرفیوژن بافتی هنگام سلامت و بیماری می‌شود [۱۰]. از بین رفتن سیگنال‌دهی NO در سلول‌های عروقی، یافته‌ای مشترک در بیماری‌های قلبی و عروقی است [۲۰]. کاهش تولید NO می‌تواند منجر به بروز ایسکمی شدیدتر شود. در واقع به دنبال فعالیت ورزشی میزان NO افزایش می‌یابد که این نیز یک سازوکار بازخوردی است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد به دنبال ایسکمی میزان TSP-1 به نسبت گروه شم کاهش معناداری یافته است. همچنین نتایج نشان داد که تمرین ورزشی می‌تواند مانع از کاهش بیش از حد این عامل شود و در واقع بافت قلب را به سمت یک تعادل رگ‌زایی پیش می‌برد [۲۱].

TSP-1 موجب تغییر در عملکرد NO می‌شود. در واقع این عامل با اتصال به جایگاه پیوندی نیتریک اکساید موجب مهار آن می‌شود. هموستاز قلبی- عروقی و سلامت آن از طریق فعل و انفعالات متعادل قلب حفظ می‌شود، این فعل و انفعالات موجب تولید جریان خون و ارتباط متقابل بین اجزای سلولی از جمله عروق خونی می‌شود [۲۲]. در مرکز این ارتباط متقابل، سلول‌های اندوتلیال قرار دارند که NO را تولید می‌کنند و باعث تحریک آرامش لایه انقباضی سلول‌های عضله صاف عروق خونی می‌شوند. در بیماری‌های قلبی عروقی این تعامل متعادل مختل شده و سیگنال‌دهی NO از بین می‌رود. پژوهش‌های صورت گرفته در طول چند سال گذشته نشان می‌دهد تنظیم NO از آنچه قبلاً تصور می‌شد بسیار پیچیده‌تر است [۲۳].

TSP-1 به عنوان تنظیم‌کننده‌ای حیاتی در آنژیوژنز از طریق اثر متقابل با VEGF محسوب می‌شود. جداسازی مستقیم VEGF با واسطه‌گری TSP-1، اتصال رقابتی TSP1 به هپارین سولفات پروتئوگلیکان ها و اندوسیتوز این پروتئین کمپلکس به وسیله گیرنده مربوط به LDL پروتئین-۱ عواملی دخیل هستند. با این حال، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که گیرنده VEGF سلول های اندوتلیال یعنی VEGFR2 اساساً با CD47 سطح سلول مرتبط است. TSP-1، در اتصال به CD47، این تعامل سازنده که موجب مهار فسفوریلاسیون VEGFR2 و سیگنال‌دهی پایین دست می‌شود را تغییر می‌دهد. بنابراین TSP-1 موجب محدود کردن سیگنال‌دهی وابسته به NO و همچنین مستقل از NO، با واسطه‌گری Akt تحریک شده با VEGF می‌شود [۲۴-۲۱]. وقتی خون رسانی به بافت قلب در مقابل نیاز این بافت به اکسیژن کافی نباشد ایسکمی رخ می‌دهد. در یک میوکارد نرمال بین تقاضای اکسیژن[1] و اکسیژن‌رسانی توسط عروق خون یک بالانس برقراراست که این بالانس علاوه بر حالت استراحت در حالتهای ورزش و یا حالتهای هیجانی نیز برقرار است. در پاسخ به افزایش تقاضای اکسیژن یک افزایش مناسب در اکسیژن‌رسانی ایجاد شده و اکسیژن مورد نیاز بافت را تأمین می‌کند [۲۵].

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطح بیان ژن اپلین در گروه تمرین ایسکمی نسبت سایر گروه‌های مطالعه (شم، ایسکمی و تمرین ورزشی افزایش معناداری داشت. همچنین نتایج نشان داد که اختلافی بین گروه تمرین تناوبی با گروه ایسکمی میوکارد و گروه شم در بیان ژن اپلین وجود نداشت. در واقع تمرینات ورزشی در هنگام مداخله ایسکمی می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن اپلین شود اما خود تمرین ورزشی این تغییر را ایجاد نکرد. از طرفی دیگر نتایج نشان داد که به دنبال مداخله ایسکمی افزایش معناداری در میزان بیان ژن اپلین به نسبت گروه شم مشاهده شد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج رایت و همکاران (۲۰۰۹) و پتکین و همکاران (۲۰۱۰) موافق و همسوست [۲۷-۲۶] و با نتایج چاندراسکاران و همکارن (۲۰۱۰) مخالف و ناهسوست [۲۸]. رایت و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که اعمال یک برنامه تمرین شنای یک ساعته در موش‌های سالم در مقایسه با گروه کنترل، میزان mRNA آپلین بافت قلبی و پلاسمایی در پاسخ به ورزش، ۴ برابر افزایش می‌یابد [۲۸]. اپلین قلبی به وسیله هیپوکسی بیش بیان

1. Oxygen demand

ژنی می‌شود. در ایسکمی میوکارد هم اپلین و هم گیرنده آن افزایش بیان ژنی را نشان می‌دهند [۹]. نتایج تحقیقات نشان داده‌اند که افزایش اپلین به دنبال ایسکمی میوکارد و یا آنفارکتوس آن خطرناک است. در واقع افزایش این پپتید موجب اختلالاتی در تجمع پلاک‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های عضله صاف می‌شود. در این بیماران اپلین توانایی ایجاد انسداد در عروق کرونر قلبی را دارد [۲۷]. نتایج پژوهش حاضر در رابطه با مداخله تمرین ورزشی با نتایج پژوهش زونگ و همکاران ۲۰۰۵ موافق و همسوست. در واقع نتایج نشان داد به دنبال تمرین ورزشی میزان اپلین افزایش داشته است. به دنبال فعالیت ورزشی همانطور که قبلاً اشاره شد با توجه به شدت تمرین میزان خونرسانی به بافت‌های عضلانی افزایش می‌یابد. این افزایش خونرسانی نیازمند سازوکار رگ‌گشایی و رگ‌زایی در این بافت‌ها است [۲۹].

اما در رابطه با میزان تغییرات بیان ژن Akt، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطح بیان ژن Akt در گروه تمرین-ایسکمی افزایش معناداری به نسبت سایر گروه‌های مطالعه (شم، ایسکمی، و تمرین ورزشی) داشت. همچنین نتایج نشان داد که اختلافی بین گروه تمرین تناوبی با گروه ایسکمی میوکارد و گروه شم وجود نداشت. Akt (یا پروتئین کیناز B) فعال شده با فسفریله کردن پروتئین‌های BAD و کاسپاز ۹ سبب مهار آپوپتوز می‌شود. Akt با تأثیر بر فعالیت و بیان P21 و P27 و سیکلین D، سبب پیشرفت سیکل سلولی می‌شود. همچنین Akt، با فسفریله کردن نیتریک اکساید سنتتاز اندوتلیالی آن را فعال کرده و منجر به مهاجرت سلولی می‌شود [۳۳-۳۰]. Akt به عنوان واسطه‌های اصلی عمل فسفاتیدیل اینوزیتول تری فسفات عمل می‌کنند پروتئین کیناز B فعال با مهار فعالیت مسیرهای پیام رسان مرگ، بقاء سلول را افزایش داده و سایر پروتئین‌ها و کینازهای دخیل در انتقال گلوکز و سوخت و ساز گلیکوژن را تنظیم می‌کند. که در نهایت منجر به مهاجرت تکثیر و رشد سلولی و در نهایت احتمالاً رگ‌زایی می‌شود [۳۱]. فعالیت ورزشی با افزایش کلسیم درون سلولی و فاکتورهای رشد و همچنین فاکتور رشد شبه انسولینی منجر به فعال‌سازی مسیرهای درگیر در فعال سازی Akt می‌شود که در نهایت همانطور که گفته شد، این مسیر منجر به حفظ و بقای سلول‌های اندوتلیالی در عروق بافت قلب می‌شوند و از آپوپتوز این سلول‌ها جلوگیری می‌کنند [۳۲]. در نهایت این فرایندها به عروق زایی و نوزایی مویرگی در بافت قلب رت‌های ایسکمی شده منجر می‌شود. همانگونه که نتایج پژوهش حاضر نشان داد به دنبال مداخله ایسکمی فرایند آپوپتوزی و کاهش عملکرد Akt در گروه ایسکمی به نسبت گروه شم مشاهده می‌شود. هرچند این تغییرات از لحاظ آماری معنادار نیست. دیگر یافته‌های پژوهش حاضر نشان از افزایش بیان ژن Akt در گروه تمرین ورزشی به نسبت شم و ایسکمی است که به نقش فعالیت ورزشی باید اشاره داشت [۳۳-۳۰].

به دنبال فعالیت ورزشی مخصوصاً فعالیت ورزشی تناوبی در بیماران مبتلا به ایسکمی میوکارد تغییرات فیزیولوژیکی و همودینامیکی فراوانی رخ می‌دهد. شیر استرس[1] یا نیروی برشی که در تغییرات سرعت جریان خون و فرایندهای درگیر در دیواره عروق اتفاق می‌افتد یک فاکتور مهم تنظیم کننده رگ‌زایی در مداخله تمرینات ورزشی است. این نیروی همودینامیکی گیرنده‌های مکانیکی زیادی را در سلول‌های آندوتلیال از جمله اینتگرین، گیرنده‌های پروتئینی G، مولکول‌های چسبنده سلولی، کانال‌های یونی و گیرندهای تیروزین کینازی را فعال می‌کند. نیروی برشی همچنین منجر به فعال‌سازی مسیرهای مولکولی زیادی از جمله پروتئین کینازC، FAK [2] (کیناز چسبنده سلولی)، GTPases و MAPK[3] (پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن) می‌شود [۳۶-۳۴]. عوامل اپلین، TSP-1، VEGF و NO نقش بسیار مهمی را در رگ‌زایی ناشی از شیر استرس ایفا می‌کنند. شیر استرس منجر به فعال‌سازی NO از طریق فعال‌سازی Akt

1. Shear stress
2. Foukal antigen kinase
3. Guanosine triphosphate

می‌شود که منجر به فسفوریلاسیون P38 و در نهایت فرایند رگ‌زایی می‌شود [۳۶-۳۵].

همانگونه که پژوهش حاضر نشان داد تمرینات تناوبی به دنبال مداخله ایسکمی میوکارد سعی در حذف عوامل منفی و افزایش عوامل مثبت رگ‌زایی برای رساندن بافت به یک تعادل آنژیوژنزی است. در واقع زمانی که ایسکمی رخ می‌دهد عوامل مهاری آنژیوژنزی به نسبت عوامل آنژیوژنزی فعال‌تر هستند. اما زمانی که فعالیت ورزشی به عنوان یک مداخله بیرونی اعمال شد تأثیرات مثبت آن برای بهبود این تعادل آنژیوژنزی مشهود و نمایان بود. به نظر می‌رسد تمرین ورزشی یک مداخله اثرگذار برای بهبود و درمان بیماران مبتلا به ایسکمی میوکار است که نیاز به تحقیقات بیشتری در آینده دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه دوره دکتری نویسنده مسئول استخراج شده است. بدین وسیله از تمامی مسئولین و کارشناسان آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه ایران (سرکار خانم‌ها بیتا کوهنوردپور و لیلا ریاحی پور) و سایر کسانی که ما را در انجام مطلوب این پژوهش یاری دادند، سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Nordlie MA, Wold LE, Kloner RA. Genetic contributors toward increased risk for ischemic heart disease. Journal of molecular and cellular cardiology. 2005; 39(4):667-679.
2. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. American journal of physiology-heart and circulatory physiology. 2011; 301(5):H1723-H1741.
3. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 2014; 129(3):399-410.
4. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. Circulation. 2001; 103(5):634-637.
5. Almeida I, Oliveira Gomes A, Lima M, Silva I, Vasconcelos C. Different contributions of angiostatin and endostatin in angiogenesis impairment in systemic sclerosis: a cohort study. Clinical and experimental rheumatology. 2016; 34 Suppl 100(5):37-42.
6. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. The journal of experimental medicine. 2001; 193(9):1005-1014.
7. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, et al. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. Annals of the New York Academy of Sciences. 2001; 938(1):36-47.
8. Li L, Zeng H, Chen J-X. Apelin-13 increases myocardial progenitor cells and improves repair postmyocardial infarction. American journal of physiology-heart and circulatory physiology. 2012; 303(5):H605-H618.
9. Gustafsson T, Kraus WE. Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. Frontiers in bioscience. 2001; 6:D75-D89.
10. Ranjbar K, Nazem F, Nazari A, Gholami M, Nezami AR, Ardakanizade M, et al. Synergistic effects of nitric oxide and exercise on revascularisation in the infarcted ventricle in a murine model of myocardial infarction. EXCLI journal. 2015; 14:1104-1115.
11. Jones WS, Duscha BD, Robbins JL, Duggan NN, Regensteiner JG, Kraus WE, et al. Alteration in angiogenic and anti-angiogenic forms of vascular endothelial growth factor-A in skeletal muscle of patients with intermittent claudication following exercise training. Vascular medicine. 2012; 17(2):94-100.
12. Gaeini AA, Bahramian A, Javidi M. The effect of eight weeks of resistance training on stimulatory and inhibitory factors of cardiac microvascular injuries in wistar diabetic rats. Metabolism and exercise. 2013; 3(1):21-32. [Persian]

13. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation. 2007; 14(6):753-760.
14. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo Ø, Haram PM, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. Circulation. 2007; 115(24):3086-3094.
15. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Reactive oxygen species promote angiogenesis in the infarcted rat heart. International journal of experimental pathology. 2009; 90(6):621-629.
16. El Nabi WMH, Kamha EMS. The possible physiological role of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor–1 (VEGFR-1) in adrenaline-induced myocardial infarction in rats with and without exercise. Journal of American Science. 2012; 8(3):334-342.
17. Prior BM, Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL. Exercise-induced vascular remodeling. Exercise and sport sciences reviews. 2003; 31(1):26-33.
18. Hoier B, Hellsten Y. Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. Microcirculation. 2014; 21(4):301-314.
19. Roberts DD, Miller TW, Rogers NM, Yao M, Isenberg JS. The matricellular protein thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via CD47. Matrix biology. 2012; 31(3):162-169.
20. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. Archives of pharmacal research. 2009; 32(8):1103-1108.
21. Aiken J, Roudier E, Ciccone J, Drouin G, Stromberg A, Vojnovic J, et al. Phosphorylation of murine double minute-2 on Ser166 is downstream of VEGF-A in exercised skeletal muscle and regulates primary endothelial cell migration and FoxO gene expression. The FASEB Journal. 2016; 30(3):1120-1134.
22. Audet GN, Fulks D, Stricker JC, Olfert IM. Chronic delivery of a thrombospondin-1 mimetic decreases skeletal muscle capillarity in mice. PloS One. 2013; 8(2):1-9.
23. Baum O, Vieregge M, Koch P, Gül S, Hahn S, Huber-Abel FAM, et al. Phenotype of capillaries in skeletal muscle of nNOS-knockout mice. American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology. 2013; 304(12):R1175-R1182.
24. Chu L-Y, Ramakrishnan DP, Silverstein RL. Thrombospondin-1 modulates VEGF signaling via CD36 by recruiting SHP-1 to VEGFR2 complex in microvascular endothelial cells. Blood. 2013; 122(10):1822-1832.
25. Koeppen BM, Stanton BA. Berne & Levy physiology. 6th ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier; 2010.
26. Wright D, Sutherland L. Exercise increases apelin expression in white adipose tissue. Medicine & science in sports & exercise. 2009; 41(5):38.
27. Pitkin SL, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Modulation of the apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis in man. British journal of pharmacology. 2010; 160(7):1785-1795.
28. Chandrasekaran B, Kalra PR, Donovan J, Hooper J, Clague JR, McDonagh TA. Myocardial apelin production is reduced in humans with left ventricular systolic dysfunction. Journal of cardiac failure. 2010; 16(7):556-561.
29. Zeng X-X, Wilm TP, Sepich DS, Solnica-Krezel L. Apelin and its receptor control heart field formation during zebrafish gastrulation. Developmental cell. 2007; 12(3):391-402.
30. Aoki M, Blazek E, Vogt PK. A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001; 98(1):136-141.
31. Fruman DA, Rameh LE, Cantley LC. Phosphoinositide binding domains: embracing 3-phosphate. Cell. 1999; 97(7):817-820.
32. Scheid MP, Duronio V. Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998; 95(13):7439-7444.
33. Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Asaoka Y, Guleng B, Jazag A, et al. Absence of PIK3CA hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. Oncogene. 2006; 25(20):2950-2952.
34. Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, et al. Exercise promotes angiogenesis and improves beta-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. Cardiovascular research. 2008; 78(2):385-394.
35. Chaanine AH, Hajjar RJ. AKT signalling in the failing heart. European journal of heart failure. 2011; 13(8):825-829.
36. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. Circulation research. 2002; 90(12):1243-1250.

The effect of exercise intervention on angiogenesis gene expression (inducing and inhibiting factors) following myocardial ischemia-reperfusion

* Mehrialvar Y[1], Ramazani A[2], Gaeini A[3], Golab F[4], Gheiratmand R[5]

Abstract

Background: Angiogenic process is vital to cure the injured parts of the heart. This study was conducted with the aim to investigate the effect of exercise intervention on the expression of inducing and inhibiting factors involved in the angiogenic and antiangiogenic properties following myocardial ischemia-reperfusion.

Materials and methods: In this study, 28 male Wistar rats (200-250 g) were randomly used in four groups: 1) sham; 2) ischemia; 3) exercise; and 4) exercise-ischemia. Myocardial Infarction (MI) was induced by descending coronary artery ligation for 30 minutes. Treadmill exercise program was performed for eight weeks, three days per week, and 40 minutes per day. The mice were anesthetized and the cardiac tissue was isolated 48 hours after the last training session and injections. Gene expression of VEGF, TSP-1, AKt, and Apelin was measured for heart tissue cells.

Results: The results showed that there is a significant difference between the four groups in the gene expression levels of VEGF, TSP-1, AKt, and Apelin ($p=0.001$). Bonferroni post-hoc test showed that the gene expression levels of VEGF, AKt, and Apelin increased significantly in the exercise-ischemia group compared to sham, ischemia, and exercise groups ($p<0.05$). In fact, exercises during ischemia intervention may lead to increase the gene expression of Apelin, VEGF, and AKt. However, exercise did not make this change itself ($p>0.05$). On the other hand, the results showed a significant decrease in gene expression level of TSP-1 in exercise-ischemia, ischemia, and exercise groups compared to the sham group ($p<0.05$).

Conclusion: Exercise following myocardial ischemia intervention tends to remove the negative factors and increase the positive factors of angiogenesis to make the tissue achieving the angiogenic balance.

Keywords: Ischemia-Reperfusion Injury, Angiogenesis Stimulators, Angiogenic Inhibitors, Apelin, TSP-1, Protein Kinase B

1. Associate professor, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran
(*Corresponding Author)

2. Professor, University of Tehran, Tehran, Iran

3. PhD student at exercise physiology (cardiovascular and pulmonary sciences), Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran

4. Assistant professor, Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5. Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran