

# اثربخشی تمرینات ورزشی در فرایند آنژیوژنز در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی

## آنژیوژنز، اسکلروز عروق قلبی و عملکرد قلبی در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی

### مکانیسم های

ملیحه اردکانی زاده<sup>۱</sup> (Ph.D)، کمال رنجبر<sup>۲</sup> (Ph.D)، فرزاد ناظم<sup>۳\*</sup> (Ph.D)

۱- گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

۲- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران

۳- گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

## چکیده

هدف: تاثیر تمرینات ورزشی در فرایند آنژیوژنز در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی نیست. بنابراین هدف از این مطالعه، ارزیابی تاثیر تمرینات ورزشی در فرایند آنژیوژنز در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی می باشد.

روش ها: ۳۰ موش صحرایی و ۳۰ موش فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی (n=۱۰) گروه کنترل و ۱۰ موش فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی (n=۱۰) گروه تمرینی انتخاب شدند. توزیع شدت تمرینات ورزشی در فعالیت هوازی و مدت به مدت ۱۰ هفته پس از اتمام تمرینات، کالیبراسیون و میانگین فاکتورهای رشد قلبی - عروقی در فرایند آنژیوژنز در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی به ترتیب روش ایمنو-نوهی، توشیمی و RT-PCR در ارزیابی آنها گرفت.

یافته ها: کالیبراسیون و میانگین فاکتورهای رشد قلبی - عروقی در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی پس از آنفارکتوس قلبی به طور قابل توجهی کاهش یافت. میانگین کالیبراسیون و میانگین فاکتورهای رشد قلبی - عروقی در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی پس از آنفارکتوس قلبی به طور معناداری افزایش پیدا کرد. هم چنین میانگین بیان HIF-1 و TGF- $\beta$  در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی پس از آنفارکتوس قلبی به طور معناداری افزایش یافت. تغییرات در بیان فاکتورهای VEGF-A، FGF-2 و آنژیو-ستاتین مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که آنفارکتوس قلبی در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی منجر به کاهش چگالی بویرگی و انقباض سلئوس می شود. تمرینات ورزشی در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی منجر به افزایش بیان HIF-1 و TGF- $\beta$  می شود. تمرینات ورزشی در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی منجر به افزایش بیان HIF-1 و TGF- $\beta$  می شود. تمرینات ورزشی در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی منجر به افزایش بیان HIF-1 و TGF- $\beta$  می شود. تمرینات ورزشی در موش های فاقد فاکتورهای رشد قلبی - عروقی منجر به افزایش بیان HIF-1 و TGF- $\beta$  می شود.

کلمات کلیدی: آنژیوژنز، فاکتورهای رشد قلبی - عروقی، ورزش درمانی

جهانی بهداشت (World Health Organization - WHO).

۵۷ میلیون نفر در دنیا در سال ۲۰۰۸ فوت کردند که ۷/۳ میلیون نفر بر اثر بیماری انفارکتوس قلبی بود (۱۲/۸٪ از کل مرگ و میر). در کشورهای پیشرفته دنیا میزان مرگ و میر ناشی از انفارکتوس قلبی در دهه گذشته کاهش یافت. این در

## مقدمه

انفارکتوس قلبی (Myocardial Infarction) (MI) به عنوان شایع ترین علت نارسایی قلب (Heart Failure)، یکی از رایج ترین بیماری های قلبی - عروقی در کشورهای در حال پیشرفت و صنعتی می باشد [۱]. بر اساس گزارش سازمان

آنژیوزنیکی می‌باشند که از طریق تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و عضله صاف و فراخوانی پری سایت‌ها در فرایند آنژیوزنز و آرتریولارژنسیس (Arteriolar genesis) نقش اصلی را بازی می‌کنند. عاملی که در زمان هایپوپرفیوژن میزان بیان ژن فاکتورهای VEGF-A، FGF-2 و TGF- $\beta$  را تنظیم می‌کند، عامل نسخه‌برداری ناشی از هایپوکسی (HIF-1) (Hypoxia inducible factor-1) می‌باشد. هم‌چنین آنژیوستاتین (Angiostatin) شناخته شده‌ترین فاکتور آنژیوستاتیکی می‌باشد که از طریق ممانعت از تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و عضله صاف مانع از شکل‌گیری فرایند آنژیوزنز و آرتریولارژنسیس می‌شود [۱۰، ۱۱].

از طرفی نشان داده شده است که تمرینات ورزشی از طریق فرایند آنژیوزنز و آرتریولارژنسیس به بازسازی انشعابات عروقی در عضله اسکلتی منجر می‌شود. در همین راستا Shin و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که میزان بیان ژن فاکتورهای آنژیژنیک در عضله سولئوس موش‌های چاق به طور معناداری کاهش می‌یابد و تمرینات استقامتی به مدت ۸ هفته موجب افزایش فاکتورهای آنژیژنیک در عضله سولئوس می‌شود [۱۲]. هم‌چنین Lee و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که ۸ هفته فعالیت استقامتی موجب افزایش فاکتورهای آنژیژنیک در عضلات اسکلتی اندام عقبی موش می‌شود [۱۳].

مکانیسم بازسازی انشعابات عروقی در عضلات اسکلتی هنوز مشخص نیست، اما مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این عروقی شدن بافت وابسته به ترکیب نوع فیبر عضله و الگوهای به کارگیری تار عضله در طی فعالیت می‌باشد [۱۴].

با توجه به دانش ما تاکنون تحقیقی که به ارزیابی فاکتورهای آنژیژنیک و آنژیوستاتیک در عضله اسکلتی با انفارکتوس قلبی صورت گرفته باشد، یافت نشد. بنابراین در این تحقیق به ارزیابی تغییرات بیان ژن فاکتورهای آنژیژنیک و آنژیوستاتیک در عضله سولئوس در موش‌های نر مبتلا به انفارکتوس قلبی در پاسخ به تمرینات ورزشی می‌پردازد.

حالی بود که در کشورهای در حال پیشرفت میزان مرگ و میر ناشی از انفارکتوس قلبی به علت تغییر در شیوه زندگی افزایش یافت [۲].

انفارکتوس قلبی هم در انسان و هم در حیوانات منجر به نارسایی احتقانی قلب می‌شود که به صورت خستگی عضلانی اندام‌ها نمود پیدا می‌کند [۳]. این خستگی به وضوح در افزایش سطح فعالیت مشاهده می‌شود، که به نسبت، ناشی از کاهش جریان خون به عضلات اسکلتی می‌باشد [۴]. هایپوپرفیوژن عضله اسکلتی منجر به افزایش شدت کاتابولیسم، کاهش فشار اکسایشی عضله، کاهش Ph درون سلولی، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و سایتوکین‌های التهابی، آپتوسیس سلول و کاهش اکسیژن مصرفی در حین فعالیت ورزشی می‌شود [۵]. هم‌چنین نشان داده شده است که پس از انفارکتوس قلبی عضله دچار آتروفی شده و تارهای نوع IIx به نوع IIb تبدیل می‌شوند [۶].

در همین راستا نشان داده شده است که از مهم‌ترین تغییرات عضله اسکلتی پس از انفارکتوس قلبی، کاهش قابل توجه چگالی مویرگی می‌باشد [۷]. انفارکتوس قلبی میزان چگالی مویرگی عضلات اسکلتی را مستقل از نوع تار کاهش می‌دهد. Ogoh و همکاران نشان دادند که ۴ هفته پس از انفارکتوس قلبی، چگالی مویرگی عضلات سولئوس و بازکننده دراز انگشتان به میزان ۱۸٪ کاهش پیدا کرد [۸].

در تنظیم چگالی مویرگی عضله اسکلتی پیتیدهای درگیر هستند که بعضی از آن‌ها موجب ساخت رگ تازه و بعضی از آن‌ها مانع از تشکیل عروق جدید می‌شوند، که به طور کلی به این فاکتورها به ترتیب فاکتورهای آنژیژنیک و آنژیوستاتیک گفته می‌شود. تعادل بین فاکتورهای آنژیژنیک و آنژیوستاتیک تعیین‌کننده اصلی شکل‌گیری و یا عدم تشکیل عروق جدید می‌باشد [۹]. عامل رشد اندوتلیال عروق (VEGF-A) (Vascular endothelial growth factor)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF-2) (Fibroblast growth factor) و فاکتور تغییردهنده رشد (TGF- $\beta$ ) (Transforming growth factor) مهم‌ترین فاکتورهای

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش صحرایی نر نژاد ویستار با دامنه وزنی ۱۶۰ تا ۱۸۰ گرم و دامنه سنی ۶ تا ۸ هفته‌ای استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط استاندارد (۱۲ ساعت تاریکی/روشنایی، دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵٪) و دسترسی آزاد به آب و غذا قرار داشتند.

نحوه ایجاد ایسکمی قلبی ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم ( $50 \text{ mg/kg ip}$ ) بی‌هوش شدند. ناحیه قفسه سینه آن کاملاً تراشیده شده و بر روی تخت جراحی قرار داده شد و  $200 \text{ U/kg}$  هپارین تزریق گردید. گردن حیوان طوری قرار داده می‌شد تا دست‌یابی به نای برای انتوبه کردن تسهیل شود. بعد از انتوبه کردن، حیوان به دستگاه ونتیلاتور (Small Animal Ventilator, Harvard Model 683-USA) متصل گردید. سپس برشی بر روی قفسه سینه ایجاد کرده تا قلب در معرض دید قرار بگیرد. لازم به ذکر است که در این مرحله باید با دقت برش اعمال می‌گردد تا به ریه چپ و یا قلب آسیبی نرسد. سپس پریکارد را به آرامی پاره کرده و نخ سیلک  $6/0$  با دقت از زیر شریان کرونری قدامی نزولی چپ (Left Anterior Descending (LAD) Coronary Artery) عبور داده می‌شد. کشیدن و بستن نخ موجب ایسکمی دائمی می‌شد. جهت اطمینان از انفارکتی شدن موش از ثبت لید II الکتروکاردیوگرام دستگاه پاورلب استفاده شد. (HARVARD-USA) از انقباضات زودرس بطنی (Premature Ventricular Contraction (PVC) تاکی کاردی میوکارد و بالا رفتن قطعه ST (Elevation ST) به عنوان شاخص‌های MI استفاده شد (شکل ۱). سپس به ترتیب لایه‌های عضلانی و پوست بخیه شدند. بعد از اتمام پروسه حیوان زیر اکسیژن خالص قرار می‌گرفت تا به هوش می‌آمد. بعد از به هوش آمدن حیوان، برای کاهش درد بوپروپنورفین با دوز  $0.5 \text{ mg/kg}$  تزریق شد. هم‌چنین پماد تتراسایکلین در محل بخیه به عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده شد. دمای بدن حیوان در حین عمل جراحی به وسیله پد حرارتی در دامنه  $37 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد حفظ می‌شد. همه مراحل جراحی در گروه

شم انجام شد، اما مرحله انسداد شریان کرونری قدامی نزولی میوکارد انجام نگرفت. بعد از به هوش آمدن کامل حیوانات در قفس قرار گرفته و آب و غذا در اختیارشان قرار داده شد و به حیوان‌خانه منتقل می‌شدند. چهار هفته پس از انفارکتوس قلبی موش‌ها وارد پروتکل تمرینی می‌شدند [۱۵].

نامه تمرین شامل تمامی چهار هفته بعد از عمل جراحی، موش‌هایی که زنده مانده بودند در سه گروه شم (Sham،  $n=10$ )، گروه کنترل انفارکتوس شده (Con-MI،  $n=10$ )، و گروه تمرینی انفارکتوس شده (Ex-MI،  $n=10$ )، توزیع شدند. موش‌هایی که در گروه تمرینی قرار گرفتند چهار هفته پس از انفارکتوس قلبی فعالیت خود را با دویدن بر روی تردمیل به مدت ۱۰ هفته، هر هفته ۵ جلسه و هر جلسه ۵۰ دقیقه با سرعت ۱۷ متر بر دقیقه شروع کردند. در حالی که گروه شم و گروه کنترل انفارکتوس شده در طول کل دوره آزمایش هیچ‌گونه فعالیت ورزشی نداشتند. برای سازگاری تدریجی با فعالیت ورزشی، جلسات هفته اول به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه بود. مدت و شدت تمرین به تدریج افزایش پیدا کرد تا به ۵۰ دقیقه در جلسه و سرعت ۱۷ متر بر دقیقه رسید (هفته پنجم). این شدت تا هفته دهم تمرین ثابت ماند [۱۶، ۱۷].

برای ارزیابی چگالی مویرگی، نسبت مویرگ به تار و میزان بیان ژن فاکتورهای  $\text{TGF-}\beta$ ،  $\text{FGF-2}$ ،  $\text{VEGF-A}$ ،  $\text{HIF-1}$  و آنژیوستاتین، ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و ۱۴ هفته پس از MI، رت‌ها با کلروفورم بی‌هوش شدند، سپس قسمت میانی عضله سولئوس از اندام تحتانی (پای راست) حیوان برداشته شد و سپس بلافاصله در میکروتیوب‌های RNAase Free منتقل و در دمای  $80^\circ\text{C}$  - نگهداری شدند. هم‌چنین جهت ارزیابی چگالی مویرگی و نسبت مویرگ به تار نمونه‌های بافتی در قالب‌های پارافینی در دمای  $20^\circ\text{C}$  - نگهداری شد. لازم به ذکر است که در گروه شم و گروه تمرینی انفارکتی شده مرگ و میر وجود نداشت، اما در گروه کنترل انفارکتی شده ۲ سر رت تلف شدند.

محلول بالایی اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. محلول سانتریفیوژ شده را داخل میکروتیوب‌های جدید قرار داده و به آن ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه کردیم و به مدت ۳۰ ثانیه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ و محلول ته تیوب دور ریخته شد. سپس با اضافه کردن ۷۰۰ میکرولیتر بافر شستشودهنده اولیه (اتانول) به مدت ۳۰ ثانیه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد و محلول ته تیوب دور ریخته شد. مجدداً با اضافه کردن ۷۰۰ میکرولیتر بافر شستشودهنده ثانویه (اتانول) به مدت ۳۰ ثانیه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ محلول ته تیوب دور ریخته شد. سپس مجدداً برای برداشتن اتانول باقی‌مانده به مدت ۲ دقیقه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد.

جهت شستشوی RNA محلول بالا را در میکروتیوب‌های RNase-free ریخته و به آن ۴۰ تا ۵۰ میکرولیتر بافر شستشودهنده اضافه گردید و به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. برای تخلیص و پاک‌سازی RNA محلول بالا را به مدت ۱ دقیقه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. سپس RNA تمام حاصل در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد. تمام مراحل کار زیر هودی که از قبل آماده شده بود (استریل شده با الکل ۷۵ درصد و نور UV) انجام می‌شد، غیر از مراحل که نیاز بود میکروتیوب‌های حاوی مواد، سانتریفیوژ و یا ورتکس شوند.

جهت سنتز cDNA، ابتدا ۱ تا ۱ میکروگرم RNA تمام را با آب مقطر به حجم ۲۰ میکرولیتر رساندیم. محصول ایجاد شده را با برنامه زیر در دستگاه ترموسایکر انکوبه شد. یک دقیقه در دمای ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۴ دقیقه در دمای ۴۲ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد (مرحله ساخت cDNA توسط آنزیم ترانس کریپتاز معکوس RT (Reverse Transcriptase) و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (جهت غیرفعال کردن RT). سپس نمونه‌ها در دمای ۲۰- نگهداری شد. نمونه‌ها را به آرامی در دستگاه Real Time PCR (Rotor Gene 3000-UK گذاشته و PCR (Polymerase chain reaction صورت گرفت.

۸۰:۸۱ ستوشیمی، چگالی مویرگی و نسبت مویرگ به تار عضله سولتوس به وسیله رنگ‌آمیزی همتوکسیلین و ائوزین (Hematoxilin & Eosin) (H & E) مشخص شد. در این روش ابتدا از بلوک‌های پارافینی سلئوس توسط میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. نمونه‌ها را روی لام قرار دادیم و مراحل پارافین‌زدایی را انجام دادیم. بدین منظور ابتدا نمونه لام‌ها را به مدت نیم ساعت در آون (Oven) در دمای  $56^{\circ}\text{C}$  ماند. سپس دو دفعه (هر بار به مدت ۵ دقیقه) در زایلین قرار دادیم. در ادامه در الکل ۱۰۰٪، ۷۰٪، ۵۰٪، ۳۰٪ و آب مقطر انجام دادیم (هر کدام به مدت ۳ دقیقه). سپس شستشو در محلول بافر سیترات انجام شد و آن‌گاه به مدت ۱۵ دقیقه در مایکروفر با درجه حرارت  $100^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند.

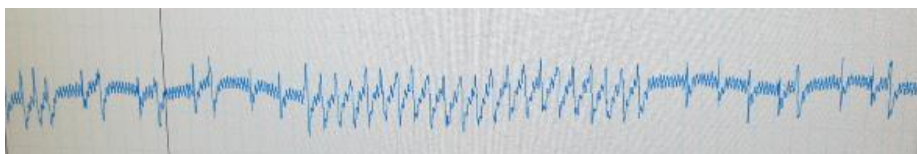
در ادامه لام‌ها را بیرون آورده تا خنک شود. در این مرحله آب اضافی کنار نمونه‌ها را از کنار لام پاک کردیم. در نهایت لام‌ها به روش H & E رنگ‌آمیزی شدند. رنگ‌آمیزی H&E به ترتیب شامل شناورسازی در دو ظرف گزیلول (هر یک ده دقیقه) الکل ۹۶٪ (۵ دقیقه) الکل ۱۰۰٪ (۵ دقیقه)، همتوکسیلین (۱۰ دقیقه) بعد وارد کردن در ظرف اسید الکل و کربنات لیتیم و سه مرحله شستشو با آب و ائوزین (۳ دقیقه) وارد کردن در ظرف الکل ۹۶٪ و ۱۰۰٪ و در نهایت شفاف‌سازی در دو ظرف گزیلول بود. پس از خشک کردن نمونه‌ها، لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BX53, Shinjuku, Tokyo, Japan) عکس گرفته شد. سپس به وسیله نرم‌افزار ImageJ چگالی مویرگی در یک میلی‌متر مربع اندازه‌گیری شد [۱۸].

۱. استخراج mRNA: برپرسی بیان ژن توسط Real Time PCR ابتدا به میزان ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده تریزول (TRIzol Reagent) را به ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های بافتی فریز شده اضافه کردیم و در دستگاه هموژنایزر هموژن شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده را به نمونه‌های هموژن‌نایز شده اضافه کردیم. نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ کردیم. سپس ۵۰۰ میکرولیتر کلروفورم را به

A, FGF-2, TGF- $\beta$ , HIF-1 و آنژیوستاتین در جدول ۱ نشان داده شده است.

روش آماری بعد از اثبات نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk، برای نشان دادن اختلاف معناداری بین گروهی از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه با سطح معناداری  $P < 0.05$  استفاده شد. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  گزارش شد.

هم‌چنین در این پژوهش از ژن beta actin به عنوان ژن کنترل استفاده شد. برای جداسازی و استخراج RNA از کیت (Total RNA Purification Kit, Jana Biosciense GmbH, Germany)، جهت سنتز cDNA از کیت (AccuPowerCycleScript RT PreMIX, BIONEER-USA) و PCR Real Time توسط (YTA SYBER Green و qPCR Master Mix طبق دستورالعمل شرکت‌های سازنده استفاده شد. هم‌چنین طوالی طراحی پرایمر ژن‌های VEGF-



شکل ۱. انقباضات زودرس بطنی (PVC) و تاکی کاردی بطنی (V Tach) ثبت شده توسط ECG پس از انسداد شریان LAD

جدول ۱. توالی ژن‌های مورد مطالعه

ژن	RT-PCR مورد استفاده برای
HIF-1	F: 5'-ATGACCACTGCTAAGGCATCAGC-3' F: 5'-AGGTAAAGGCTCCTTGGATGAGC-3'
VEGF-A	F: 5'-ATC TTT CAT CGG ACC AGT CG-3' R: 5'-CCC AGA AGT TGG ACG AAA AG-3'
FGF-2	F: 5'-CAG AAG CTC CTG CAA AAA GG-3' R: 5'-AGT CTG CAG CTC CTC CAC AT-3'
TGF- $\beta$	F: 5'-GGATACCAACTATTGCTTCAGCTCC-3' R: 5'-AGGCTCCAAATATAGGGGCAGGGTC-3'
Angiostatin	F: 5'-GAC CTC TGG TTT GCT TCG AG-3' R: 5'-TTG GTT TGA TTG CTG TCA GG-3'
Beta Actin	F: 5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3' R: 5'-CTC TCA GCT GTG GTG AA-3'

معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه دارد ( $P=0.01$ ). در همین راستا نتایج نشان داد که نسبت مویرگی به تار در عضله سولتوس در پاسخ به تمرینات ورزشی نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد ( $P=0.01$ ) اما نسبت به گروه شم تفاوت معناداری نداشت ( $P=0.08$ ) (شکل ۳).

مقایسه نتایج تغیرات بیان فاکتورهای آنژیوژنیک در آنژیوژنیک سولتوس به گروه تمرین ۲۰ در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که در هفته تمرینات ورزشی نتایج آنالیز RT-PCR نشان داد که ده هفته تمرینات ورزشی استقامتی میزان بیان ژن HIF-1 و TGF- $\beta$  را در عضله سولتوس به طور معناداری نسبت به گروه کنترل به ترتیب افزایش و کاهش داد ( $p < 0.05$ ). اگر چه نتایج نشان داد که

## نتایج

تغیرات چگالی مویرگی سولتوس همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است میزان چگالی مویرگی عضله سولتوس در میان گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معناداری نداشت ( $P=0.003$ ,  $F=9.42$ ). چگالی مویرگی در گروه کنترل نسبت به گروه شم به طور معناداری کاهش پیدا کرد ( $P=0.003$ ). هم‌چنین ده هفته فعالیت میزان چگالی مویرگی عضله سولتوس را نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش داد ( $P=0.025$ ), اما تفاوتی با گروه شم نداشت ( $P=0.069$ ).

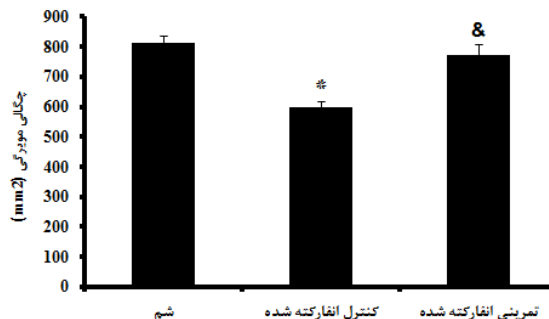
تغیرات نسبت مویرگی سولتوس نتایج آنالیز آماری نشان داد که نسبت مویرگی به تار تفاوت

## بحث و نتیجه‌گیری

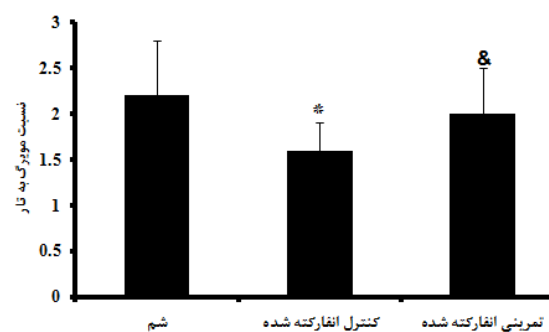
نتایج نشان داد که چگالی مویرگی عضله سولتوس، ۱۴ هفته پس از انفارکتوس قلبی به میزان ۲۶٪ کاهش پیدا کرد. این یافته موافق نتایج Ogo و همکاران است که نشان دادند، ۴ هفته پس از انفارکتوس قلبی چگالی مویرگی عضله کند انقباض سلئوس به میزان ۱۸٪ کاهش پیدا کرد [۸]. هم‌چنین در این مطالعه نشان داده شد که ده هفته فعالیت استقامتی پس از انفارکتوس قلبی، نسبت مویرگ به تار و چگالی مویرگی عضله سولتوس را به ترتیب به میزان ۲۵٪ و ۲۸٪ افزایش داد. که این یافته در راستای نتایج Veiga و همکاران ۲۰۱۲ است که نشان دادند چگالی مویرگی عضله سولتوس در پاسخ به ده هفته فعالیت استقامتی با شدت ۵۰ تا ۷۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی به طور معناداری افزایش پیدا کرد [۱۹]. در همین راستا Kannus و همکاران نشان دادند که ۸ هفته فعالیت استقامتی چگالی مویرگی کاهش یافته در پاسخ به کم‌تحركی را به طور معناداری در عضله سولتوس را افزایش می‌دهد [۲۰]. اما این یافته مخالف نتایج Suzuki و همکاران ۲۰۰۶ است که نشان دادند در پاسخ به ۶ هفته فعالیت استقامتی چگالی مویرگی عضله سولتوس در موش‌های سالم تغییر نکرد. علت این اختلاف احتمالاً ناشی از اختلاف در مدت زمان تمرینی باشد (در مطالعه Suzuki مدت تمرین ۶ و در مطالعه حاضر مدت تمرین ۱۰ هفته بود) [۲۱].

مکانیسم مولکولی دقیق تغییرات فاکتورهای درگیر در فرایند آنژیوزنز در پاسخ به تمرین استقامتی در موش‌های با انفارکتوس قلبی مشخص نیست. به منظور دستیابی به یک بیش عمیق‌تر در مورد تغییرات فاکتورهای درگیر در فرایند رگ‌زایی در این مطالعه ما میزان بیان ژن فاکتورهای تنظیم‌کننده در فرایند آنژیوزنز را مورد ارزیابی قرار دادیم. نتایج RT-PCR در این مطالعه برای اولین بار نشان داد که ده هفته تمرین استقامتی در مقایسه با گروه کنترل، میزان بیان ژن HIF-1 در عضله سولتوس موش‌های با انفارکتوس قلبی به طور معناداری افزایش پیدا کرد. این در حالی بود که میزان بیان ژن VEGF-A و FGF-2 در پاسخ به فعالیت تغییر

میزان آنژیوستاتین افزایش پیدا کرد اما این میزان تغییر معنادار نبود ( $p=0/1$ ). هم‌چنین میزان بیان ژن VEGF و FGF در پاسخ به فعالیت در عضله سولتوس نسبت به گروه کنترل تغییر نکرد ( $p=0/4$ ) (شکل ۴).

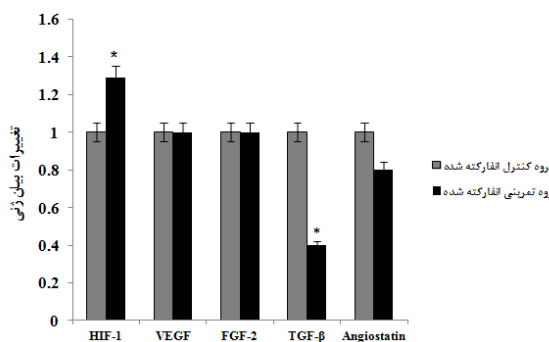


شکل ۲. میزان چگالی مویرگی در گروه‌های مورد مطالعه، \*نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه شام، & نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل انفارکته شده. داده‌ها به صورت Mean  $\pm$  SEM گزارش شده است.



شکل ۳. نسبت مویرگ به تار در گروه‌های مورد مطالعه، \*نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه شام، & نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل انفارکته شده. داده‌ها به صورت Mean  $\pm$  SEM گزارش شده است.

شکل ۴. مقایسه میزان بیان ژن فاکتورهای آنژیوزنیک و آنژیوستاتیک در



عضله سولتوس موش‌های تمرین کرده انفارکته شده و موش‌های کنترل انفارکته شده در حضور ژن فرنیس (بتا آکتین). \* نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل انفارکته شده. داده‌ها به صورت Mean  $\pm$  SEM گزارش شده است.

فرایند نسخه‌برداری است یا ناشی از تغییر در نیمه عمر این فاکتور می‌باشد. در این مطالعه میزان بیان ژن HIF-1 عضله سولئوس در پاسخ به فعالیت به طور معناداری افزایش پیدا کرده بود، اما میزان بیان ژن VEGF و FGF-2 که توسط HIF-1 رونویسی می‌شوند، تغییر نکرد. اگر چه هایپوکسی تنظیم‌کننده مهم نسخه‌برداری میزان VEGF است، اما محققان نقش آن را در بیان ژن VEGF حین فعالیت را زیر سوال برده‌اند. در همین راستا برین و همکاران افزایش معنادار میزان بیان ژن VEGF را در موش‌های سالم در حین فعالیت علی‌رغم عدم ایجاد شرایط هایپوکسی را گزارش کردند [۲۳]. این نتایج نشان می‌دهد که سایر فاکتورها مانند کشش عضله و فشار برشی تنظیم‌کننده بیان ژن VEGF در پاسخ به فعالیت می‌باشند. از آنجایی که فشار برشی، هایپوکسی و محرک‌های مکانیکی عامل‌های اصلی برای بیان ژن VEGF و FGF-2 می‌باشند، اما هنوز مشخص نیست که در پاسخ به تمرینات ورزشی کدام یک از این فاکتورها نقش اصلی را در تنظیم بیان ژن VEGF و FGF-2 در مدل موش‌های با انفارکتوس قلبی ایفا می‌کند. در همین راستا نشان داده شده است که نیتریک اکساید میزان بیان ژن HIF-1 را علی‌رغم عدم وجود هایپوکسی را افزایش می‌دهد [۲۴]. این تغییرات نشان می‌دهد که در پایان فعالیت علی‌رغم افزایش چگالی مویرگی عضله سولئوس میزان VEGF و FGF-2 عضله تغییر نمی‌کند و تداوم افزایش چگالی مویرگی هم‌زمان با تداوم فعالیت می‌تواند ناشی از MCP-1 و افزایش ANG-2/ANG-1 عضله سولئوس باشد [۲۲].

تناقض ظاهری بین افزایش چگالی مویرگی با کاهش ۳ برابری  $TGF-\beta$  و عدم تغییر بیان ژن‌های VEGF و FGF-2 را می‌توان از این دیدگاه مورد بررسی قرار داد که تمرینات ورزشی موجب کاهش فشار اکسیژن در عضله سولئوس شده و این افت فشار منجر به فرایند آتریوژنز شود. در ادامه با توسعه شبکه خون‌رسانی و افزایش نسبت مویرگ به تار، این افت فشار از بین رفته و در نتیجه سیگنال‌های حاصله از فیبر عضلانی برای سنتز VEGF، FGF-2 کاهش می‌یابد، که این

معناداری نکرد. هم‌چنین نتایج نشان داد میزان آتریوستاتین عضله سولئوس در پاسخ به فعالیت تغییر معناداری نکرد. این تغییرات به ظاهر متناقض در میزان بیان ژن فاکتورهای آتریوژنیک، در حالی اتفاق افتاده است که در عضله سولئوس چگالی مویرگی پس از تمرینات ورزشی به میزان ۲۸٪ افزایش یافته است. اما این یافته‌ها در راستای تغییرات بیان شده توسط مطالعه Lloyd و همکاران در سال ۲۰۰۳ می‌باشد [۲۲]. در همین راستا Lloyd و همکاران نشان دادند که در پاسخ به ۴ هفته تمرینات استقامتی میزان بیان ژن VEGF و گیرنده‌های آن در عضله سولئوس در پایان فعالیت تغییر نکرد. اما میزان MCP-1 و نسبت ANG-2/ANG-1 افزایش پیدا کرد [۲۲]. لازم به ذکر است که ANG-2 یک فاکتور متزلزل‌کننده دیواره عروق جهت جوانه زدن و ANG-1 ثبات‌دهنده دیواره عروق و در نهایت امتناع‌کننده از تشکیل شدن جوانه می‌باشد. بنابراین افزایش نسبت ANG-2/ANG-1 نشان‌دهنده توسعه فرایند آتریوژنز و کاهش این نسبت نشان‌دهنده عدم تشکیل عروق جدید می‌باشد.

مطالعات صورت گرفته در زمینه میزان بیان ژن فاکتورهای آتریوژنیک در پاسخ به تمرینات استقامتی نشان داده‌اند که تغییرات بیان ژن فاکتورهای درگیر در فرایند آتریوژنز در طی روزهای اول فعالیت بسیار چشم‌گیر می‌باشد و با ادامه فعالیت این میزان تغییرات تعدیل می‌شود تا این‌که در پایان تمرینات به حالت پایا (Steady State) در می‌آیند. در همین راستا نشان داده شده است که VEGF و FGF-2 در مراحل اولیه فرایند آتریوژنز درگیر می‌شوند و با تداوم ساخت عروق خونی جدید نقش این فاکتورها کم رنگ‌تر می‌شود [۲۲]. میزان بیان ژن VEGF در ابتدای فعالیت (روز پنجم) به حداکثر مقدار خود می‌رسد و با تداوم فعالیت، میزان بیان ژن VEGF علی‌رغم توسعه و ادامه فرایند آتریوژنز کاهش و میزان گیرنده‌های آن یعنی VEGFR-1، VEGFR-2 و VEGFR-3 افزایش می‌یابد (اوج تعداد گیرنده‌های VEGF، ۸ روز پس از شروع فعالیت می‌باشد). هنوز مشخص نیست که آیا پاسخ موقت mRNA VEGF به فعالیت استقامتی ناشی از کاهش

## منابع

- [1] Brown DA, Jew KN, Sparagna GC, Musch TI, Moore RL. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *J Appl Physiol* (1985) 2003; 95: 2510-2518.
- [2] Cheraghian B, Nedjat S, Mansournia MA, Majdzadeh R, Mohammad K, Vaez-Mahdavi MR, et al. Different patterns of association between education and wealth with non-fatal myocardial infarction in Tehran, Iran: A population-based case-control study. *Med J Islam Repub Iran* 2015; 29: 160.
- [3] Thomas DP, Hudlicka O, Brown MD, Deveci D. Alterations in small arterioles precede changes in limb skeletal muscle after myocardial infarction. *Am J Physiol* 1998; 275: H1032-H1039.
- [4] Minotti JR, Christoph I, Oka R, Weiner M, Wells L, Massie B. Impaired skeletal muscle function in patients with congestive heart failure. Relationship to systemic exercise performance. *J Clin Invest* 1991; 88: 2077.
- [5] JC E. Low-frequency electrical stimulation of skeletal muscles in patients with chronic heart failure. *Scripta Medica* 2002;75:203-208.
- [6] Delp MD, Duan C, Mattson JP, Musch TI. Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure. *J Appl Physiol* (1985) 1997; 83: 1291-1299.
- [7] Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 1992; 85: 1751-1759.
- [8] Ogoh S, Hirai T, Nohara R, Taguchi S. [Adaptation in properties of skeletal muscle to coronary artery occlusion/reperfusion in rats]. *Nihon Seirigaku Zasshi* 2001; 64: 225-236.
- [9] Nourshahi M, Hedayati M, Ranjbar K. The correlation between resting serum leptin and serum angiogenic indices at rest and after submaximal exercise. *Regul Pept* 2012; 173: 6-12.
- [10] Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. Tumour angiogenesis and angiogenic inhibitors: a review. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: XE01-XE05.
- [11] Huang D, Lan H, Liu F, Wang S, Chen X, Jin K, Mou X. Anti-angiogenesis or pro-angiogenesis for cancer treatment: focus on drug distribution. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 8369-8376.
- [12] Shin KO, Bae JY, Woo J, Jang KS, Kim KS, Park JS, et al. The effect of exercise on expression of myokine and angiogenesis mRNA in skeletal muscle of high fat diet induced obese rat. *J Exerc Nutrition Biochem* 2015; 19: 91-98.
- [13] Lee I, Hüttemann M, Kruger A, Bollig-Fischer A, Malek MH. (-)-Epicatechin combined with 8 weeks of treadmill exercise is associated with increased angiogenic and mitochondrial signaling in mice. *Front Pharmacol* 2015; 6: 43.
- [14] White FC, Bloor CM, McKirnan MD, Carroll SM. Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. *J Appl Physiol* (1985) 1998; 85: 1160-1168.
- [15] Melo SF, Fernandes T, Baraúna V, Matos KC, Santos AA, Tucci PJ, Oliveira EM. Expression of microRNA-29 and collagen in cardiac muscle after swimming training in myocardial-infarcted rats. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33: 657-669.
- [16] 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. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 385-394.

نشان از کنترل فیدبک منفی عضله برای ساخت عروق خونی جدید دارد [۲۵] (همان‌طور که میزان بیان  $\beta$ -TGF, ۳/۲ برابر کاهش پیدا کرد). از طرفی این امکان وجود دارد که افزایش میوگلوبین و افزایش غلظت هموگلوبین در پاسخ به تمرینات ورزشی نیز از افت فشار اکسیژن جلوگیری و در نهایت بیان ژن فاکتورهای آنژیوژنیک کم شود [۲۶].

البته لازم به ذکر است که این احتمال وجود دارد ساخت عروق جدید عضله سولئوس در پاسخ به فعالیت ناشی از ترشح VEGF و FGF-2 ترشح‌یافته از سایر بخش‌های عضله سولئوس مانند سلول‌های ماهواره‌ای، سلول‌های اندوتلیال و ماکروفاژها باشد. البته در این زمینه به مطالعات بیش‌تری نیاز است [۲۷].

علاوه بر اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن فاکتورهای آنژیوژنیک در پاسخ به تمرینات ورزشی پس از انفارکتوس قلبی، اندازه‌گیری میزان پروتئین فاکتورهای آنژیوژنیک نیز کمک شایانی در تبیین فرایند آنژیوزنز در عضله اسکلتی می‌نماید. بنابراین یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های این مطالعه عدم اندازه‌گیری میزان پروتئین شاخص‌های آنژیوژنیک و آنژیوستاتیک در عضله سولئوس می‌باشد.

به طور کلی در این مطالعه نشان داده شد که انفارکتوس قلبی منجر به کاهش قابل توجه چگالی مویرگی و نسبت مویرگ به تار در عضله کند انقباض سلئوس می‌شود و ده هفته تمرینات استقامتی با شدت متوسط همراه با افزایش بیان ژن HIF-1، کاهش بیان ژن  $\beta$ -TGF و عدم تغییر VEGF، FGF-2 و اندوستاتین، منجر به احیای چگالی مویرگی و نسبت مویرگ به تار و بازگشت به سطح نرمال می‌شود.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله محققین از کلیه عزیزانی که در تمامی مراحل تحقیق ما را یاری رساندند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.



in response to exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H1668-H1678.

[23] Breen E, Johnson E, Wagner H, Tseng H, Sung L, Wagner P. Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *J Appl Physiol* (1985) 1996; 81: 355-3561.

[24] Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 2000; 95: 189-197.

[25] Richardson R, Wagner H, Mudaliar S, Saucedo E, Henry R, Wagner P. Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H772-H778.

[26] Olfert IM, Breen EC, Mathieu-Costello O, Wagner PD. Skeletal muscle capillarity and angiogenic mRNA levels after exercise training in normoxia and chronic hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 2001; 91: 1176-1184.

[27] Delavar H, Nogueira L, Wagner PD, Hogan MC, Metzger D, Breen EC. Skeletal myofiber VEGF is essential for the exercise training response in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014; 306: R586-R595.

[17] Ranjbar K, Nazem F, Nazari A. Effect of exercise training and L-arginine on oxidative stress and left ventricular function in the post-ischemic failing rat heart. *Cardiovasc Toxicol* 2016; 16: 122-129.

[18] Capoccia BJ, Shepherd RM, Link DC. G-CSF and AMD3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis in vivo through a paracrine mechanism. *Blood* 2006; 108: 2438-2445.

[19] Veiga ECdA, Portes LA, Bocalini DS, Antonio EL, Santos AAd, Santos MH, Silva FA, Tucci PJF. Cardiac implications after myocardial infarction in rats previously undergoing physical exercise. *Arq Bras Cardiol* 2013; 100: 37-43.

[20] Kannus P, Jozsa L, Järvinen TL, Kvist M, Vieno T, Järvinen TA, et al. Free mobilization and low-to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol* (1985) 1998; 84: 1418-1424.

[21] Suzuki J. L-arginine supplementation causes additional effects on exercise-induced angiogenesis and VEGF expression in the heart and hind-leg muscles of middle-aged rats. *J Physiol Sci* 2006; 56: 39-44.

[22] Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL. Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle

## Effects of 10 weeks endurance exercise on mRNA expressions of angiogenesis factors of skeletal muscle following myocardial infarction in rats

Malihe Ardakanizade (PhD)<sup>1</sup>, Kamal Ranjbar (PhD)<sup>2</sup>, Farzad Nazem (PhD)<sup>\*3</sup>

1- Faculty of physical education and sport science, Damghan University, Damghan, Iran

2- Dept. of Physical Education and Sport Science, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran

3- Faculty of physical education and sport science, Bu –Ali Sina University, Hamedan, Iran

(Received: 17 Nov 2015; Accepted: 29 Oct 2016)

**Introduction:** The effect of exercise training on skeletal muscle angiogenesis in myocardial infarction rats is not yet clear. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of exercise training on the gene expressions of angiogenesis factors in the soleus muscle following myocardial infarction (MI) in rats.

**Material and Methods:** Four weeks after the MI surgical procedures, 30 Wistar male rats were divided to the following groups: sham, MI-control and MI-exercise. The rats were subjected to aerobic training with moderate intensity for 10 weeks. After the last exercise-training session, soleus capillary density and the expression of angiogenic gene factors were measured by immunohistochemistry and RT-PCR, respectively.

**Results:** Capillary density and capillary to fiber ratio (C/F) significantly decreased 14 weeks after MI. Exercise training significantly increased capillary density and C/F ratio in soleus muscle. Furthermore, HIF-1 and TGF- $\beta$  gene expression respectively increased and decreased, but, VEGF, FGF-2 and angiostatin gene expression did not changed in soleus muscle after training.

**Conclusion:** Results showed that MI significantly decreased soleus muscle capillary density. Furthermore, 10 weeks moderate endurance exercise ameliorate capillary density and C/F ratio, parallel to HIF-1 up regulation, TGF- $\beta$  down regulation and unchanged VEGF, FGF-2 and angiostatin gene expression in soleus muscle after myocardial infarction.

**Key Words:** Myocardial Infarction, Angiogenesis Inducing Agents, Exercise, Exercise Therapy.

\* Corresponding author. Tel: +98 09181117911

Farzadnazem1@yahoo.com