DOI: 10.22100/jkh.v14i3.2287

مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و فاکتور رشد اندوتلیالی عروق و بیان پروتئین مولکول چسبنده سلول اندوتلیالی رت‌ها بعد از انفارکتوس میوکارد

حکیمه اکبری*[۱]، سیروس چوبینه[۲]، علی اکبرنژاد[۳]، نسیم نادری[۴]

۱- دانشگاه تهران- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- گروه فیزیولوژی ورزشی- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی.

۲- دانشگاه تهران- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- گروه فیزیولوژی ورزشی- دانشیار.

۳- دانشگاه تهران- دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی- گروه فیزیولوژی ورزشی- دانشیار.

۴- مرکز آموزشی- تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی- پژوهشکده قلب و عروق- دانشیار.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۰۸/۲۶

چکیده

مقدمه: *انفارکتوس میوکارد یکی از مهمترین علل مرگ ومیر در جهان است که با کاهش حجم مویرگی و کشیدگی بطن چپ در ناحیه انفارکته همراه است. رشد عروق و مویرگ‌های جدید پس از MI امری ضروری است. مکانیسم آنژیوژنز ناشی از ورزش بعد از ایسکمی میوکارد هنوز به خوبی تبیین نشده است. بنابراین هدف این پژوهش بررسی اثر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) و مولکول چسبنده سلول اندوتلیالی پلاکت (PECAM-1/CD31) بعد از انفارکتوس میوکارد است.*

مواد و روش‌ها: *۱۳ رت نر ویستار ۱۰-۱۲ هفته با میانگین وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شدند. سپس تحت عمل جراحی برای انسداد سرخرگ کرونری چپ (LAD) قرارگرفتند. رت‌ها به دو گروه تمرین تناوبی شدید (HIIT) (۴۲ دقیقه دویدن تناوبی روی تردمیل ۴ دقیقه با ۹۰-۸۵ درصد و ۳ دقیقه با ۵۰-۴۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته) و گروه کنترل (بدون تمرین) تقسیم شدند. برای اندازه‌گیری بیان ژن eNOS, VEGF از روش RT-Real time PCR و از روش وسترن بلات برای بیان پروتئین CD31 استفاده شد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ داده ها تحلیل شد.*

نتایج: *تفاوت معناداری بین دو گروه کنترل و تجربی (تمرین تناوبی شدید) در شاخص eNOS (P= ۰/۰۰۱) وجود داشت. بیان ژن eNOS در گروه HIIT (۸/۴۳) بیشتر از گروه کنترل (۲/۸۵) بود. تفاوت معناداری بین دو گروه کنترل و HIIT در شاخص VEGF (P=۰/۰۵) وجود داشت. بیان ژن VEGF در گروه HIIT (۰/۰۹۷) بیشتر از گروه کنترل (۰/۰۱۹) بود. نتایج آزمون t مستقل برای فاکتور CD31 نشان می‌دهد که تفاوت معناداری بین دو گروه کنترل و تناوبی شدید (P=۰/۰۱) وجود داشت. بیان پروتئین CD31 در گروه HIIT (۱/۳۴۵) بیشتر از گروه کنترل (۰/۶۲۶) بود.*

نتیجه‌گیری: *۸ هفته تمرین تناوبی شدید با ۹۰-۸۵٪ حداکثر اکسیژن مصرفی می‌تواند میزان بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و فاکتور رشد اندوتلیالی عروق و بیان پروتئین مولکول چسبنده سلول اندوتلیالی را افزایش دهد.*

واژه‌های کلیدی: آنژیوژنز، انفارکتوس میوکارد، **eNOS**، **CD31**، **VEGF**، تمرین تناوبی شدید.

***نویسنده مسئول:** سمنان خیابان رسالت- رسالت سوم پلاک ۵۹ طبقه اول ، **تلفن:** ۰۹۱۲۷۳۲۰۹۹۵، **نمابر:** ۰۲۳۳۳۴۳۵۰۸۷، **Email:** akbari.ha12@gmail.com

ارجاع: اکبری حکیمه، چوبینه سیروس، اکبرنژاد علی، نادری نسیم. تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و فاکتور رشد اندوتلیالی عروق و بیان پروتئین مولکول چسبنده سلول اندوتلیالی رت‌ها بعد از انفارکتوس میوکارد. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۸؛۱۴(۳):۱۶-۲۲.

مقدمه

انفارکتوس میوکارد (MI: Myocardial infarction) یکی از مهمترین علل مرگ و میر در جهان است. سالانه میلیون‌ها نفر در اثر MI جان خود را از دست می‌دهند. انسداد کرونر با قطع جریان خون عروق کرونری بعد از محل انسداد همراه است و ناحیه‌ای از عضله قلبی فاقد جریان خون می‌ماند و یا جریان خون اندکی دریافت می‌کند در این وضعیت عضله قلبی نمی‌تواند به فعالیتش ادامه دهد و انفارکته می‌شود. ایسکمی میوکاردی حاد موجب افزایش اکسیژن واکنشی و فعال‌سازی سیگنالینگ سلولی زیان‌آور می‌شود که بیان سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها را در سلول‌های اندوتلیال افزایش می‌دهد و منجر به نفوذ سلول‌های التهابی به ناحیه انفارکته می‌شود (۱). مرگ میوسیت‌های قلبی و از دست دادن مویرگ‌ها در ناحیه انفارکته و نزدیک آن بازشکل‌گیری پیشرونده میوکارد فعال باقی مانده را افزایش می‌دهد، بنابراین بازشکل‌گیری بطن چپ و ایجاد بافت فیبروز را افزایش می‌دهد و موجب اتساع بطن چپ و در نتیجه نارسایی قلبی می‌شود. رشد عروق و مویرگ‌های جدید پس از MI رویدادی حیاتی در فرایند هایپرتروفی جبرانی در بخش زنده میوکارد است (۲). آنژیوژنز فرآیند شکل‌گیری عروق خونی جدید است که با فاکتورهایی نظیر (VEGF(Vascular endothelial growth factor، eNOS (endothelial constitutive nitric oxide synthase) و PECAM-1 (Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) میانجی‌گری می‌شود. VEGF عاملی حیاتی برای آنژیوژنز میوکارد و بازسازی میوکارد بعد از انفارکتوس میوکارد است (۶-۳). فاکتور رشد اندوتلیال عروق مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیال و ایجاد شبکه ویرگی جدید را افزایش می‌دهد و برای تمایز سلول‌های اندوتلیالی ضروری است (۷).

CD31(PECAM) به‌عنوان مارکر خاص اندوتلیالی، نه تنها به‌عنوان مولکول چسبنده عمل می‌کند بلکه در مسیر سیگنالینگ درون سلولی شرکت می‌کند که بر مکانیسم‌های چسبنده سلول‌های گوناگون و فعالیت و بیان eNOS اثرگذار است. CD31 در پاسخ به تنش برشی در تنظیم eNOS شرکت می‌کند. تولید NO، برای هموستاز قلبی و عروقی لازم است. NO در بسیاری از فرایندهای سلولی مانند تنظیم تون عروقی، تکثیر سلولی و آنژیوژنز نقش دارد. eNOS تولید NO (Nitric oxide) را از ال آرژنین کاتالیز می‌کند (۸). حذف ژنتیکی eNOS منجر به افزایش فشار خون (۹ و ۱۰)، آنژیوژنز ناقص، بازشکل‌گیری غیرطبیعی عروق و شتاب گرفتن آترواسکلروز می‌شود (۱۱).

عوامل بسیاری مانند هایپوکسی، متابولیت‌ها، وازودیلاتورها و انقباض عضلانی بر آنژیوژنز اثرگذارند. نقش فعالیت بدنی در سلامتی تأیید شده است. تمرین ورزشی عملکرد اندوتلیالی را با وازودیلیشن و بهبود عملکرد وازوموتوری ارتقاء می‌دهد. ورزش با افزایش رشد عروق و بازشکل‌گیری در شرایط فیزیولوژیک می‌تواند خون‌رسانی عروق کرونری را افزایش دهد (۱۲ و ۱۳). علاوه‌بر این، ورزش در بیماران قلبی عروقی علایم بیماری را کاهش می‌دهد (۱۴). بازتوانی قلبی در مقایسه با مراقبت معمول، ۲۰٪ مرگ و میر کلی و ۲۶٪ مرگ و میر قلبی را کاهش می‌دهد (۱۵). ورزش اثرات مفیدی بر عروق کرونر مانند تقاضای اکسیژن میوکاردی، عملکرد اندوتلیالی، تون خودکار، مارکرهای التهابی و رشد عروق جانبی کرونری دارد (۱۶ و ۱۷). تمرین ورزشی در مدل موش سلول‌های پیش ساز اندوتلیال را افزایش داد و آنژیوژنز را بهبود بخشید (۱۸). تمرین ورزشی بعد از MI ناحیه انفارکته را کاهش می‌دهد و تراکم مویرگی را افزایش می‌دهد (۱۹). تمرین تناوبی شدید با خصیصه زمان کمتر تمرین و نتایج چشمگیری که در تغییرات فیزیولوژیک دارد اخیرا بیشتر مورد توجه محققان قرار گرفته است. این نوع تمرین محرکی قوی برای سازگاری عضلانی و قلبی و عروقی است که به افزایش متابولیسم و حساسیت به انسولین، اصلاح نیمرخ لیپیدی و کاهش وزن منجر می‌شود (۲۰ و ۲۱). با وجود این، اثرات HIIT (High intensity interval training) بر آنژیوژنز میوکارد در ایسکمی قلبی به خوبی شناخته نشده است. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر HIIT بر میانجی‌های آنژیوژنزی مانند eNOS, CD31, VEGF بعد از MI است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش با کد اخلاق ۳۰۳ به موافقت کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم ورزشی ایران رسیده است. پژوهش از نوع بنیادی و روش انجام آن تجربی است. ۱۳ رت نر ویستار با میانگین سنی ۱۲-۱۰ هفته و میانگین وزنی بین ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شدند. پس از یک هفته نگهداری در محیط آزمایشگاه تحت عمل جراحی برای انسداد سرخرگ کرونری چپ (LAD) قرار گرفتند. برای ارزیابی MI از اکوکاردیوگرافی استفاده شد. براساس EF (Ejection fraction) و FS (Fraction of Shorthening) حاصل از اکوکاردیوگرافی MI تأیید شد. EF برای گروه کنترل و تجربی (HIT=۵۴/۰۵±۴/۷۶، control=۲۳/۵±۰۲/۵۰) و FS برای دو گروه (HIT=۲۶/۷۸±۳/۲۹، FS:control=۲۸/۹۷±۲/۹۶). رت‌ها با FS≤۳۵٪ برای مطالعه انتخاب شدند (۲۲ و ۲۳). رت‌ها به‌طور تصادفی به دو گروه تجربی (تمرین تناوبی شدید HIIT) و گروه کنترل تقسیم شدند.

سپس رت‌ها بر اساس دستورالعمل استراحت و مراقبت حیوانات آزمایشگاهی مورد درمان قرار گرفتند. غذای مخصوص و آب در محیط زندگیشان قرار داده شد. آنها در محلی با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۶۰-۴۰٪ و با حفظ سیکل شبانه‌روزی (۱۲ ساعت شب و ۱۲ ساعت روز) نگه‌داری شدند. بعد از یک هفته استراحت رت‌ها برای

سازگاری با تمرین دو هفته دویدن روی تردمیل از ۱۰ –۳۰ دقیقه به‌طور فزاینده (از سرعت ۵متر در دقیقه شروع شد و در انتهای هفته دوم به ۱۰ متر در دقیقه رسید) تمرین کردند. در انتهای هفته دوم آزمون VO2max انجام شد. بعد از دو روز استراحت رت‌ها ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته بر روی تردمیل با شیب ۰ درجه دویدند. ۵ دور ۴ دقیقه‌ای دویدن با VO^{2}max %90-85 با ۳ دقیقه استراحت فعال بین دورها با شدت VO^{2}max%40 انجام شد. در هر جلسه تمرینی قبل و بعد از دوره تمرینی ۵ دقیقه گرم کردن و سرد کردن با VO^{2}max٪۵۰ اجرا شد (۲۲ و ۲۳). رت‌ها ۴۸ ساعت بعد از اجرای پروتکل با کتامین و زایلازین بیهوش و سپس تشریح شدند. بیان ژن eNOS, VEGF با استفاده از Real Time-qPCR سنجیده شد. برای ارزیابی CD31 از شیوه وسترن بلات استفاده شد.

ابتدا حیوان را با کتامین + زایلازین D بی‌هوش و قسمت سینه اصلاح و با الکل ۷۰٪ محل جراحی ضد عفونی گردید. سپس حیوان را به حالت خوابیده به پشت بر روی تخت مخصوص جراحی رت فیکس و دست‌ها و پاهای حیوان بسته شد سپس با استفاده از اتوسکوپ شماره ۳ و آنژیوکت سبز حیوان اینتوبه شد و حیوان به دستگاه ونتیلاتور (inter med Bear) متصل شد (نسبت دم به بازدم ۱به ۲ و ۹۰–۸۰ نفس در دقیقه با حجم ۸ml) قفسه سینه در فضای بین دنده‌ای سوم و چهارم را با استفاده از قیچی به طول ۱۰ میلی‌متر برش داده شد. با این برش رگ LAD به‌صورت یک spike ضربان دار قرمز روشن که در قسمت میانی دیواره قلب از زیر دهلیز چپ تا رأس قلب جریان دارد مشخص شد. رگ LAD را به کمک نخ بخیه پلی پروپیلن ۰/۶به اندازه ۲–۱ میلی‌متر پایین‌تر از نوک دهلیز چپ بسته و با زدن دو گره در این نقطه آن را کاملاً بسته شد. انفارکتوس دیواره قدامی بطن چپ به‌وسیله تغییر رنگ ناگهانی (بی‌رنگ شدن) میوکارد تأیید شد. افزایش میزان ST نیز بعد از لیگاسیون مشاهده شد. سپس قفسه سینه، لایه‌های عضلانی و پوست با استفاده از نخ بخیه پرولن ۰/۵ در سه لایه دوخته شد. و سپس پوست حیوان با نخ بخیه پرولن ۰/۳ بخیه زده شد. زمانی که رت‌ها به هوش آمدند آنها از دستگاه ونتیلاتور جدا شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت رت‌ها مجدداً بیهوش شدند و با دستگاه اکو vivid7 پروب s۱۰ (مگاهرتز) اکو جهت تعیین انفارکتوس میوکارد انجام شد. در ضمن سفازولین و ترامادول به‌عنوان آنتی‌بیوتیک و مسکن روزی دو بار یک روز قبل از شروع جراحی و به مدت ۳ روز بعد از جراحی تزریق شد.

RT-qPCR: برای بررسی بیان ژن‌های VEGF, eNOS، در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک PCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. این تکنیک دارای ۴ مرحله اساسی می‌باشد:

۱. RNA کل از سلول‌های جمع‌آوری شده در هر گروه استخراج گردید. جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت‌ها در همه گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن، آلمان) انجام گرفت.

۲. با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کلیه پرایمرهای طراحی شده مربوطبه تمامی ژن‌ها، مورد بررسی قرار گرفت و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام گرفت.

۳. cDNA حاصل جهت حذف DNA ژنومی با آنزیم DNase I تیمار شد.

۴. به روش PCR Real time تکثیر گردید.

توالی پرایمر مطالعه شده VEGF, eNOS:

r-Vegf-f	AGATGGTGAGAGAGATGGTGT
r-Vegf-r	AGATGGTTGATGGCTTAGATTAG
ENOS R	AAGATTGCCTCGGTTTGTTG
ENOS F	TATTTGATGCTCGGGACTGC

وسترن بلات:

برای سنجش CD31 از روش وسترن بلات استفاده گردید. در این روش ابتدا پروتئین‌های سلولی از بافت ایسکمی قلب استخراج شدند. سپس بر روی ژل پلی آکریل آمید ران به مدت ۲–۳ ساعت در ولتاژ ۱۰۰ران شد. پس از ران کردن ژل برای مرحله انتقال آماده شد.

در مرحله انتقال:

۱– ابتدا کاغذ نیترو سلولز را به اندازه موردنیاز بریده و به همراه پدهای دستگاه و اسفنج‌ها در داخل بافر ترانسفر قرار گرفت.

۲– کاغذ نیترو سلولز را به همراه ژل و اسفنج‌ها و پدهای دستگاه به‌صورت ساندویچی سوار کرده ودر داخل تانک قرادادە و به مدت ۱ ساعت در ۳۵۰ آمپر الکتروفورز شد.

۳–پس از انتقال کاغذ نیتروسلولز را با استفاده از بافر TBS به مدت ۵–۱۰ دقیقه شستشو داده شد.

۴–در این مرحله کاغذ نیترو سلولز به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق در بافرTBS (یا بلاکینگ) غوطه‌ور شد.

۵– کاغذ نیتروسلولز را با استفاده از بافر TBS برا چندین بار شستشو داده شد.

۶-سپس کاغذ نیترو سلولز را به مدت ۱-۲ ساعت در دمای اتاق با آنتی‌بادی اولیه (Biorbyt)OrB10314 رقیق شده در بافر TBS انکوبه شد (رقت آنتی‌بادی ۱/۱۰۰۰).

۷- کاغذ نیتروسلولز را با استفاده از بافر TBS برا چندین بار شستشو داده شد.

۸- سپس کاغذ نیترو سلولز را به مدت ۱-۲ ساعت در دمای اتاق با آنتی‌بادی ثانویه (abcam)AB6721 رقیق شده در با فر TBS انکوبه شد (رقت آنتی‌بادی ۱/۳۰۰۰).

۹- کاغذ نیتروسلولز را با استفاده از بافر TBS برای چندین بار شستشو داده شد.

۱۰-در این مرحله کاغذ نیتروسلولز با محلول سوبسترا (DAB) به مدت ۱-۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد تا باند موردنظر نمایان شود.

۱۱- در مر حله آخر پس از نمایان شدن باند می‌توان کاغذ را با آب مقطر شستشو داد.

برای توصیف داده‌ها از آمار توصیفی و برای مقایسه گروه‌ها در متغیرهای پژوهش از آزمون t مستقل استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای انجام کارهای آماری از نرم‌افزار آماری SPSS16 استفاده شد.

نتایج

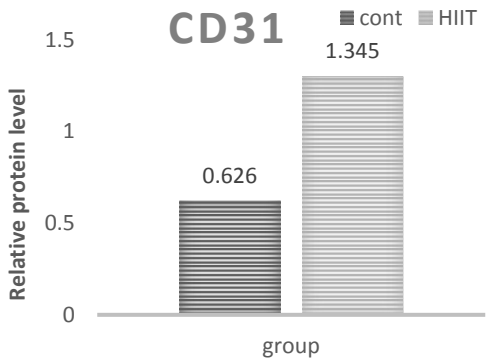
داده‌های آماری توصیفی و نتایج t مستقل برای VEGF, eNOS در جدول ۱ ارایه شده است. نتایج آزمون وسترن بلات برای CD31 در شکل ۱ نشان داده شده است. ابتدا طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلک انجام گرفت. باتوجه به طبیعی بودن توزیع داده ها آزمون t مستقل برای مقایسه میانگین‌ها انجام شد. نتایج t مستقل نشان می‌دهد که تفاوت معناداری بین دو گروه کنترل و HIIT در شاخص eNOS (P=۰/۰۰۱) وجود دارد. بر طبق جدول ۱ شاخص eNOS در گروه HIIT (۸/۴۳) بیشتر از گروه کنترل (۲/۸۵) بود. تفاوت معناداری بین دو گروه کنترل و HIIT در شاخص VEGF (P=۰/۰۵) وجود دارد. بر طبق جدول ۱ شاخص VEGF در گروه HIIT (۰/۰۹۷) بیشتر از گروه کنترل (۰/۰۱۹) بود.

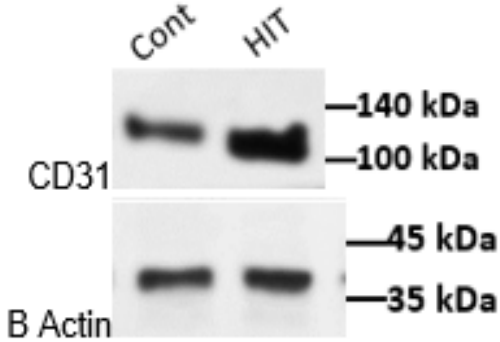
در شکل برای کنترل میزان پروتئین CD31 در دو گروه، پروتئین B Actin مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱- مقایسه میانگین و انحراف استاندارد eNOS, VEGF در دو گروه کنترل و تمرین تناوبی شدید

متغیر	گروه	N	کمینه	بیشینه	میانگین	انحراف استاندارد	P.V
eNOS							
	کنترل	۶	۱/۹۵	۴/۱۶	۲/۸	۱/۲	۰/۰۰۱
	HIIT	۷	۲/۲۷	۸/۳۹	۸/۴	۲/۲	
VEGF							
	کنترل	۶	۰/۰۱۴	۰/۰۲۲	۰/۰۱۹	۰/۰۰۴۸	۰/۰۵
	HIIT	۷	۰/۰۶۲	۰/۱۵	۰/۰۹۷	۰/۰۴۸	

سطح معناداری در P≤۰/۰۵ است.





شکل ۱- نتایج آزمون وسترن بلات برای مقایسه CD31 در دو گروه کنترل و تمرین تناوبی شدید

نتایج آزمون t مستقل برای فاکتور CD31 نشان می‌دهد که تفاوت معناداری بین دو گروه کنترل و تناوبی شدید (P=۰/۰۱) وجود دارد. شاخص CD31 در گروه HIIT (۱/۳۴۵) بیشتر از گروه کنترل (۰/۶۲۶) بود.

بحث

به‌طور کلی براساس یافته‌های تحقیق حاضر، هشت هفته تمرین تناوبی شدید می‌تواند میزان بیان ژن eNOS, VEGF و میزان بیان پروتئین CD31 را در رت‌ها بعد از انفارکتوس میوکارد افزایش دهد. نتایج این مطالعه با مطالعه هالووی و همکاران متناقض است در مطالعه ذکر شده تمرین استقامتی تداومی منجر به افزایش فاکتور آنژیوژنیک eNOS,

VEGF و در نهایت آنژیوژنز می‌شود ولی تمرین تناوبی شدید افزایش معناداری در آنژیوژنز را در پی‌نداشت (۲۴). نتایج هم‌راستا با این پژوهش، کربلایی‌فر و همکاران (۲۰۱۶) بیان می‌کند که شش هفته تمرین تناوبی شدید افزایش معناداری را در بیان ژن VEGF موجب شد (۲۵). ذکایی و همکاران (۲۰۱۷) نشان می‌دهد که هشت هفته تمرین تناوبی شدید منجر به افزایش معناداری در فاکتورهای آنژیوژنیک eNOS, VEGF, HIF-1(hypoxia-induced factor) شد (۲۶). دلیل وجود تناقض بین مطالعات گذشته می‌تواند ناشی از تفاوت بین پروتکل‌های تمرینی و عدم‌کنترل عوامل تحریکی و مهاری دخیل در فرآیند آنژیوژنز باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فاکتورهای آنژیوژنیک VEGF در گروه HIIT بیشتر از گروه کنترل بود. تمرین تناوبی با القای هایپوکسی می‌تواند بر آنژیوژنز نقش داشته باشد. در واقع یکی از مهمترین محرک‌ها برای آنژیوژنز هایپوکسی است. هایپوکسی ایجاد شده با تمرین تناوبی شدید (۲۷) موجب رهایی سایتوکاین‌های آنژیوژنیک و گیرنده‌های آنها مانند VEGF, Flt-1, Flk-1 می‌شود. VEGF مهمترین عامل رشدی در آنژیوژنز فیزیولوژیک است و آنژیوژنز را در ایسکمی میوکارد و MI افزایش می‌دهد (۳ و ۴). علاوه بر این ورزش با تحریک FGF2 (Fibroblast growth factor 2) و افزایش فعالیت آن، میزان تولید نیتریک اکساید (NO) را در اندوتلیوم افزایش می‌دهد (۲۸). با این وجود تنش برشی ناشی از تمرین ورزشی سبب تحریک فعال‌سازی eNOS و تولید NO در اندوتلیوم می‌شود (۲۹ و ۳۰). تنش برشی از طریق فعال‌سازی کانال‌های یونی به‌ویژه کانال‌های پتاسیمی سبب افزایش NO می‌شود این تغییرات موجب افزایش گیرنده‌های تیروزین کینازی PDGFR2 (۳۱) و فسفریله شدن گیرنده Tie2 (۳۲) می‌شود. در طی مراحل اولیه آنژیوژنز، تنظیم افزایشی VEGF و VEGFR2 به تنش برشی و آزاد شدن NO وابسته است. عوامل دیگری هم بر آنژیوژنز اثر گذارند CD31 یکی از این عواملی است که بر بیان eNOS و تعیین محل قرارگیری آن مؤثر است CD31 با اثر بر عوامل مهاری مسیر آنژیوژنز و مهار آنها علاوه بر خاصیت چسبندگی برای ایجاد مویرگ می‌تواند بر آنژیوژنز اثر گذارد (۳۳). مطالعه ویلسون ۲۰۱۸ نشان می‌دهد که شنا با شدت کم تا متوسط منجر به افزایش فاکتورهای اندوتلیالی مانند CD31 و افزایش تراکم مویرگی بعد از هشت هفته تمرین تناوبی کم تا متوسط شده است. ولی تمرین تناوبی شدید افزایش معناداری در CD31 و تراکم مویرگی نشان نداد (۳۴). CD31 به‌عنوان نشانگر سلول‌های اندوتلیال شناخته شده است. سلول‌های اندوتلیال نقش حیاتی در عملکرد اندوتلیال دارند. تنظیم منفی بیان پروتئین CD31 در سلول‌های اندوتلیال موجب فسفریلاسیون ناقص eNOS می‌شود (۳۵) تحقیقات نشان داده‌اند که CD31 در فعال‌سازی eNOS از طریق تعامل مستقیم پروتئین با پروتئین در اتصال سلول با سلول مهم است (۳۵ و ۳۶). افزایش CD31 با افزایش تراکم مویرگی ایجاد شده هم راستا است.

به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که هشت هفته تمرین تناوبی شدید با ۹۰–۸۵٪ حداکثر اکسیژن مصرفی روی تردمیل به مدت ۴۲ دقیقه فاکتورهای آنژیوژنزی را افزایش داد. با این وجود تحقیقات بیشتری در این زمینه لازم است تا بتوان این نوع تمرین را پیشنهاد داد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در آزمایشگاه فیزیولوژی ورزش دانشکده تربیت بدنی دانشگاه تهران اجرا گردید لذا از کلیه اساتید گروه فیزیولوژی ورزش دانشکده تربیت بدنی دانشگاه تهران و همکاران محترم پژوهشی و از کارکنان و اساتید بیمارستان قلب و عروق شهید رجایی که در اجرای این پژوهش ما را یاری رساندند تقدیر و تشکر می‌نمایم. این پژوهش با کد ۳۰۳ در کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم ورزشی ایران تأیید شده است.

References

1. Fielder JTT. MicroRNAs in Myocardial infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2013;33:201-5. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300137
2. Anversa PBC, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial infarction in rats.Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. .Circ Res 1986;58:26-37. doi:10.1161/01.res.58.1.26
3. Laham RJ LJ, Tofukuji M, Post M, Simons M, Sellke FW. Spatial heterogeneity in VEGF-induced vasodilation: VEGF dilates microvessels but not epicardial and systemic arteries and veins. Ann Vasc Surg 2003;17:245-52. doi:10.1007/s10016-001-0299-x
4. Li J BL, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. Am J Physiol Heart Circ Physiol 1996;270:1803-11.
5. Lopez JJ LR, Stamler A, Pearlman JD, Bunting S, Kaplan A, Carrozza JP, et al. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. Cardiovasc Res 1998;40:272-81.
6. Sato K WT, Laham RJ, Johnson RB, Douglas P, Li J, Sellke FW, Bunting S, Simons M, Post MJ. Efficacy of intracoronary or intravenous VEGF165 in a pig model of chronic myocardial ischemia. J Am Coll Cardiol 2001;37:616-23.
7. Timothy P, Howard W, Kevin A, Lenna M, Nicholas A, Rebecca A, et al. Lower capillary density but no difference in VEGF expression in obese vs lean young skeletal muscle in humans. J Appl Physiol 2005;5:315-21. doi:10.1152/japplphysiol.00353.2004
8. Dudzinski DM MT. Life history of eNOS: Partners and pathways. Cardiovasc Res 2007;75:247-60. doi:10.1016/j.cardiores.2007.03.023
9. Huang PL HZ, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. Nature 1995;377:239-42. doi:10.1038/377239a0
10. Shesely EG MN, Kim HS, Desai KM, Krege JH, Laubach VE, Sherman PA, Sessa WC,Smithies O. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci U S A 1996;9313176-81. doi:10.1073/pnas.93.23.13176
11. Kuhlencordt PJ GR, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. Circulation 2001;104:448-5. doi:10.1161/hc2901.091399
12. Hudlicka O BM, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. Physiol Rev 1992;72:369-417.

13. MD. B. Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. Exp Physiol 2003;88:645-58. doi:10.1113/eph8802618

14. Thompson PD BD, Pina IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, Berra K, et al. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of athrosclotic cardiovascular disease: a statement from the council on clinical cardiology (subcommittee on exercise, rehabilitation, and prevention) and the council on nutrition, physical activity, and metabolism (subcommittee on physical activity). Circulation 2003;107:3109-16. doi: 10.1161/01.CIR.0000075572.40158.77

15. Taylor RS BA, Ebrahim S, Jollife J, Noorani H, Rees K, Skdmore B, Stone JA, Thompson DR, Oldridge N. Exercise-based rehblitation for patients with coronary heart disease: systematic rview and meta-analysis of randomized controlled trails. Am J Med 2004;116:682-92. doi:10.1016/j.amjmed.2004.01.009

16. Clausen JP T-JJ. Heart rate and arterial blood pressure during exercise in patients with angina pectoris. Effects of training and of nitroglycerin. Circulation 1976;436:42-53.

17. Vona M RA, Capodaglio P, Rizzo S, Servi P, De Marchi M, Cobelli F. Impact of physical training and detraining on endothelium-dependent vasodilation in patients with recent acute myocardial infarction. Am Heart J 2004;147:1039-46. doi:10.1016/j.ahj.2003.12.023

18. Laufs U WN, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. Circulation 2004;109:220-6. doi:10.1161/01.CIR.0000109141.48980.37

19. Wu G RJ, Wykrzykowska J, Du Z, Ke Q, Kang P, Li J, Laham RJ exercise-induced expression of VEGF and salvation of myocardium in the early stage of myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009;296:H389-H95. doi:10.1152/ajpheart.01393.2007

20. Cornelissen VA FR. Effect of resistance training on resting blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of Hypertension 2005;23:251-9. doi:10.1097/00004872-200502000-00003

21. Kelley GA KK, Vu Tran Z. Aerobic exercise,lipids and lipoproteins in overweight and obese adults: a meta analysis of randomized controlled trials International Journal of Obesity 2005;29:881-93.

22. Hoydal MA WU, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2007;14:753-60.

23. Kraljevic J MJ, Pravdic D, et al. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart. Cardiovasc Res 2013;99:55-64.

24. Holloway TM BD, da Silva ML, Simpson JA, Quadrilatero J, Spriet LL. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. PLoS One 2015;10:e0121138. doi:10.1371/journal.pone.0121138

25. Karbalaeifar S GA, Kordi MR, Nuri R, Ghorbani P. The effect of 6-week high intensity interval training on the VEGF/COL-18 ratio and some echocardiographic indices in rats with myocardial infarction. J Kermanshah Univ Med Sci 2016;20:94-8.

26. Zokaei A MJN. The Effect of eight weeks of high intensity interval training on genes expression of eNOS, HIF-1 and VEGF in myocardial infarction rats. Report of Health Care 2017;3:31-7.

27. Hamzeh zadeh brojeni A NAP, Naghibi S. The Effect of High Intensity Interval Training(HIIT) on aerobic and anaerobic some indicators of iranian women's national teams of basketball players(Persian). Exercise Physiology 2012;5:35-48.

28. Hudlicka O BM. Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor. J Vasc Res 2009;46:504-12. doi: 10.1159/000226127

29. Cheng C vHR, de Waard M, van Damme LCA, Tempel D, Hanemaaijer L, van Cappellen GWA, Bos J, Slager CJ, Duncker DJ, et al. Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique. Blood 2005;106:3691-8. doi:10.1182/blood-2005-06-2326

30. Rizzo V MD, Oh P, Schnitzer JE. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. J Biol Chem 1998;273:34724-9.

31. Cunningham KS GA. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. Laboratory Investigation 2005;85:9-23. doi:10.1038/labinvest.3700215

32. Lee HJ KG. Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 2003;304:399-404. doi:10.1016/s0006-291x(03)00592-8

33. Park SY SC, Sheibani N. PECAM-1 Isoforms, eNOS, and Endoglin Axis in Regulation of Angiogenesis. Clin Sci (Lond) 2015;129:217-34. doi:10.1042/CS20140714

34. Wilson BS GM, Zhang JQ. Post-Myocardial Infarction Exercise Training Induces Angiogenesis in the heart. Journal of Clinical Trials in Cardiology 2018;5:1-5.

35. Fleming I FB, Dixit M, Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. J Cell Sci 2005;118:4103-11. doi: 10.1242/jcs.02541

36. McCormick ME GR, Fulton D, Oess S, Newman D, Tzima E. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 regulates endothelial NO synthase activity and localization through signal transducers and activators of transcription 3-dependent NOSTRIN expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011;31:643-9.

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2018; Vol 14, No 3

DOI: 10.22100/jkh.v14i3.2287

Original Article

The Effect of Eight Weeks of High Intensity Interval Training on Genes Expression of eNOS, VEGF and Protein Expression of CD31 in Myocardial Infarction

Hakimeh Akbari (Ph.D. Student)[1*], Siroos Choobineh (Ph.D.)[2], Ali Akbarnejad (Ph.D.)[3], Nasim Naderi (Ph.D.)[4]

1- Dept. of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
2- Dept. of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
3- Dept. of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
4- Heart Research Center, Rajaie Cardiovascular, Medical and Research Center, Tehran- Iran.

Received: 26 August 2019**, Accepted:** 17 Novemner 2019

Abstract:

Introduction: *Myocardial Infarction is one of greatest cause of death worldwide which cause enlargement of left ventricle and loss of capillaries. Angiogenesis and adequate growth of capillaries after MI is essential. The mechanism of exercise-induced benefit and angiogenesis in ischemic heart disease remains poorly defined. This study was designed to investigate the effects of eight weeks of high intensity interval training on endothelial constitutive nitric oxide synthase (eNOS), vascular endothelial growth factor (VEGF) and Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) in rats with myocardial infarction.*

Methods: *13 male Wistar rats weighing 250 to 300 grams were assigned into two groups: the experimental group or HIIT (42 minutes running on a treadmill on an interval basis, each interval four minutes with intensity of 85-90 and three minutes of active recovery with 40- 50 % VO^2max, Five days a week for eight weeks) and the control group (without training intervention). Genes expression of eNOS, VEGF were investigated by the PCR technique and protein expression of CD31 was investigated by western blotting test. Data were analyzed using SPSS (version 16) with Independent sample t-test (P≤0.05).*

Results: *Endothelial constitutive nitric oxide synthase in high intensity interval training group (8.43) was significantly higher than the control group (2.85) (P=0.001) vascular endothelial growth factor in high intensity interval training group (0.097) was significantly higher than control group (0.019) (P=0.05) and Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in high intensity interval training group (1.345) was significantly higher than control group (0.626) (P=0.01).*

Conclusion: *Eight weeks of high intensity interval training with intensity 85-90 % VO^2max increased endothelial constitutive nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor and Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1.*

Keywords: Angiogenesis, Myocardial infarction, High intensity interval training, VEGF, eNOS, CD31.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author**: H. Akbari, **Email**: akbari.ha12@gmail.com*

Citation: Akbari H, Choobineh S, Akbarnejad A, Naderi N. The effect of eight weeks of high intensity interval training on genes expression of enos, vegf and protein expression of cd31 in myocardial infarction. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2019;14(3):16-22.