# اثر ده هفته فعالیت استقامتی بر میزان بیان ژن فاکتورهای درگیر در فرایند آنژیوژنز عضله اسکلتی پس از انفارکتوس قلبی در موش سفید بزرگ آزمایشگاهی

ملیحه اردکانی‌زاده [۱](Ph.D)، کمال رنجبر [۲](Ph.D)، فرزاد ناظم [۳*](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 بر فرایند آنژیوژنز عضله اسکلتی در موش‌های مبتلا به انفارکتوس قلبی مشخص نیست. بنابراین هدف از این مطالعه، ارزیابی تاثیر تمرینات استقامتی بر فرایند آنژیوژنز عضله سولئوس موش‌های با انفارکتوس قلبی می‌باشد.**

**مواد و روش‌ها: ۳۰ سر موش صحرایی ویستار، چهار هفته پس از انفارکتوس قلبی در ۳ گروه شم (n=۱۰) گروه کنترل انفارکته شده (n=۱۰) و گروه تمرینی انفارکته شده (n=۱۰) توزیع شدند. برنامه تمرینی شامل فعالیت هوازی با شدت متوسط به مدت ۱۰ هفته بود. پس از اتمام تمرینات، چگالی مویرگی و میزان بیان ژن فاکتورهای درگیر در فرایند آنژیوژنز عضله سولئوس به ترتیب به روش ایمونوهیستوشیمی و RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.**

**یافته‌ها: چگالی مویرگی و نسبت مویرگ به تار چهارده هفته پس از انفارکتوس قلبی به طور قابل توجهی کاهش یافت. میزان چگالی مویرگی و نسبت مویرگ به تار در پاسخ به تمرینات ورزشی در عضله سولئوس به طور معناداری افزایش پیدا کرد. هم‌چنین میزان بیان ژن HIF-1 و TGF-β به طور معناداری در عضله سولئوس به ترتیب افزایش و کاهش یافت، اما تغییری در میزان بیان ژن فاکتورهای VEGF-A، FGF-2 و آنژیوستاتین مشاهده نشد.**

**نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که انفارکتوس قلبی منجر به کاهش چگالی مویرگی در عضله کند انقباض سلئوس می‌شود و ده هفته تمرینات استقامتی همراه با افزایش بیان ژن HIF-1، کاهش بیان ژن TGF-β و عدم تغییر VEGF، FGF-2 و اندوستاتین، منجر به احیای چگالی مویرگی و نسبت مویرگ به تار و بازگشت به سطح نرمال می‌شود.**

**واژه‌های کلیدی: انفارکتوس قلبی، آنژیوژنز، ورزش، ورزش درمانی**

## مقدمه

انفارکتوس قلبی (Myocardial Infarction) (MI) به عنوان شایع‌ترین علت نارسایی قلب (Heart Failure)، یکی از رایج‌ترین بیماری‌های قلبی-عروقی در کشورهای در حال پیشرفت و صنعتی می‌باشد [۱]. بر اساس گزارش سازمان 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

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۱۱۱۷۹۱۱

Email: Farzadnazem1@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۸

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، آپوپتوسیس 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 پپتیدهایی 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 آنژیوژنیک و آنژیوستاتیک گفته می‌شود. تعادل بین فاکتورهای آنژیوزنیک 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-β) (Transforming growth factor) مهم‌ترین فاکتورهای آنژیوژنیکی می‌باشند که از طریق تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و عضله صاف و فراخوانی پری سایت‌ها در فرایند آنژیوژنز و آرتریولارژنسیس (Arteriolar genesis) نقش اصلی را بازی می‌کنند. عاملی که در زمان هایپوپرفیوژن میزان بیان ژن فاکتورهای VEGF-A، FGF-2 و TGF-β 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 آنژیوژنز و آرتریولارژنسیس می‌شود [۱۱،۱۰].

از طرفی نشان داده شده است که تمرینات ورزشی از طریق فرایند آنژیوژنز 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 کاش می‌یابد و تمرینات استقامتی به مدت ۸ هفته موجب افزایش فاکتورهای آنژیوژنیک در عضله سولئوس می‌شود [۱۲]. هم‌چنین Lee و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که ۸ هفته فعالیت استقامتی موجب افزایش فاکتورهای آنژیوژنیک 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 آنژیوژنیک و آنژیوستاتیک در عضله اسکلتی با انفارکتوس قلبی صورت گرفته باشد، یافت نشد. بنابراین در این تحقیق به ارزیابی تغییرات بیان ژن فاکتورهای آنژیوژنیک و آنژیوستاتیک در عضله سولئوس در موش‌های نر مبتلا به انفارکتوس قلبی در پاسخ به تمرینات ورزشی می‌پردازد.

## 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، دمای۲ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵٪) و دسترسی آزاد به آب و غذا قرار داشتند.

**نحوه ایجاد انفارکتوس قلبی.** ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم (۵۰mg/kg ip) بی‌هوش شدند. ناحیه قفسه سینه آن کاملاً تراشیده شده و بر روی تخت جراحی قرار داده شد و ۲۰۰ 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 می‌گردید تا به ریه چپ و یا قلب آسیبی نرسد. سپس پریکارد را به آرامی پاره کرده و نخ سیلک ۶/۰ 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 انفارکته 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 بوپرونورفین با دوز ۰/۰۵mg/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 ۱±۳۷ درجه سانتی‌گراد حفظ می‌شد. همه مراحل جراحی در گروه شم انجام شد، اما مرحله انسداد شریان کرونر 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].

**برنامه تمرین استقامتی.** چهار هفته بعد از عمل جراحی، موش‌هایی که زنده مانده بودند در سه گروه شم (Sham، n=۱۰)، گروه کنترل انفارکتوس شده (Con-MI، n=۱۰)، و گروه تمرینی انفارکتوس شده (Ex-MI، n=۱۰)، 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 [۱۷،۱۶].

برای ارزیابی چگالی مویرگی، نسبت مویرگ به تار و میزان بیان ژن فاکتورهای VEGF-A، FGF-2، TGF-β، HIF-1 و آنژیوستاتین، ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و ۱۴ هفته پس از MI، رت‌ها با کلروفرم 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 ۸۰°C- نگهداری شدند. هم‌چنین جهت ارزیابی چگالی مویرگی و نسبت مویرگ به تار نمونه‌های بافتی در قالب‌های پارافینی در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. لازم به ذکر است که در گروه شم و گروه تمرینی انفارکته شده مرگ و میر وجود نداشت، اما در گروه کنترل انفارکته شده ۲ سر رت تلف شدند.

**ایمونوهیستوشیمی .**چگالی مویرگی و نسبت مویرگ به تار عضله سولئوس به وسیله رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین 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 ۵۶ $^{o}$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 ۱۰۰ $^{o}$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)، هماتوکسیلین (۱۰ دقیقه) بعد وارد کردن در ظرف اسید الکل و کربنات لیتیم و سه مرحله شستشو با آب و آئوزین (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].

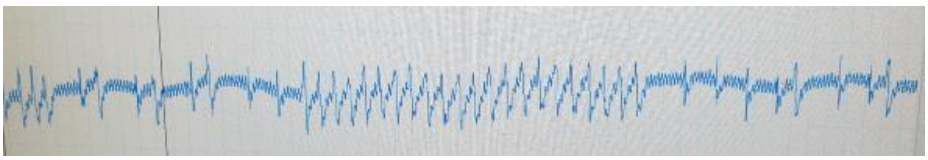
**استخراج mRNA و بررسی بیان ژن توسط Real Time PCR.** ابتدا به میزان ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده تریزول (TRIzol Reagent) را به ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های بافتی فریز شده اضافه کردیم و در دستگاه هموژنایزر هموژن شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده را به نمونه‌های هموژنایز شده اضافه کردیم. نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ کردیم. سپس ۵۰۰ میکرولیتر کلروفورم را به 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 اضاف کردیم و به مدت ۳۰ ثانیه با ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ و محلول ته تیوب دور ریخته شد. سپس با اضافه کردن ۷۰۰ میکرولیتر بافر شتشودهنده 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 شتشودهنده 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 شتشو 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 تام حاصل در دمای ۸۰ $^{o}$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 مراحلی که نیاز بود میکروتیوب‌های حاوی مواد، سانتریفیوژ و یا ورتکس شوند.

جهت سنتز cDNA، ابتدا ۰/۱ تا ۱ میکروگرم RNA تام 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.

هم‌چنین در این پژوهش از ژن beta actin بـه عنـوان ژن کنترل استفاده شد. برای جداسازی و استخراج RNA از کیـت (Total RNA Purification Kit, Jana Biosciense GmbH, Germany)، جهـــت ســـنتز cDNA از کیـــت (AccuPowerCycleScript RT PreMIX, BIONEER-USA) و PCR Real Time توسط (YTA SYBER Green qPCR Master Mix) طبق دستورالعمل شرکت‌هـای سـازنده استفاده شد. هم‌چنین طوالی طراحی پرایمـر ژن‌هـای VEGF-A، FGF-2، TGF-β، HIF-1 و آنژیوسـتاتین در جـدول ۱ نشان داده شده است.

روش آماری. بعد از اثبـات نرمـال بـودن داده‌هـا توسـط آزمون Shapiro-Wilk، برای نشان دادن اختلاف معناداری بین گروهی از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفـه بـا سـطح معناداری P<۰/۰۵ استفاده شد. داده‌ها بـه صـورت Mean ± SEM گزارش شد.



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

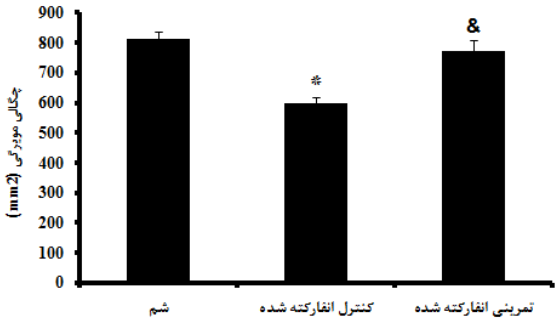
## نتایج

**تغییرات چگالی مویرگی عضله سولئوس.** همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است میـزان چگـالی مـویرگی عضـله سولئوس در میان گروه‌های مـورد مطالعـه تفـاوت معنـاداری داشـت (P=۰/۰۰۳، F=۹/۴۲). چگـالی مـویرگی در گـروه کنترل نسبت به گروه شم به طور معناداری کـاهش پیـدا کـرد (P=۰/۰۳). هم‌چنین ده هفته فعالیت میزان چگـالی مـویرگی عضله سولئوس را نسبت به گروه کنتـرل بـه طـور معنـاداری افزایش داد (P=۰/۰۲۵)، اما تفـاوتی بـا گـروه شـم نداشـت (P=۰/۶۹).

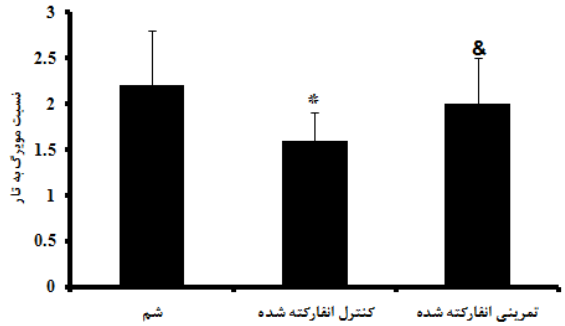
**تغییرات نسبت مویرگ بـه تـار عضـله سـولئوس.** نتـایج آنالیز آماری نشـان داد کـه نسـبت مـویرگ بـه تـار تفـاوت معنـی‌داری بـین گـروه‌هـای مـورد مطالعـه دارد (P=۰/۰۱، F=۶/۷۳). در همین راستا نتایج نشان داد که نسبت مویرگ به تار در عضله سولئوس در پاسخ به تمرینات ورزشی نسبت بـه گروه کنترل افزایش پیدا کرد (P=۰/۰۱) اما نسبت به گروه شم تفاوت معناداری نداشت (P=۰/۸) (شکل ۳).

**مقایســه تغــییرات بیــان ژن فاکتورهــای آنژیوژنیــک و آنژیوستاتیک عضله سولئوس گروه تمرین کرده در مقایسه بـا عضله سولئوس گروه کنترل انفارکتـه شـده.** در همـین راسـتا نتایج آنالیز RT-PCR نشان داد که ده هفته تمرینات ورزشـی اسـتقامتی میـزان بیـان ژن HIF-1 و TGF-β را در عضـله سولئوس به طور معناداری نسبت به گـروه کنتـرل بـه ترتیـب افزایش و کاهش داد (p<۰/۰۵). اگر چه نتایج نشـان داد کـه

میزان آنژیوستاتین افزایش پیدا کرد اما این میزان تغییر معنادار نبود (p=۰/۱). هم‌چنین میزان بیان ژن VEGF و FGF در پاسخ به فعالیت در عضله سولئوس نسبت به گروه کنترل تغییر نکرد (p=۰/۴) (شکل ۴).

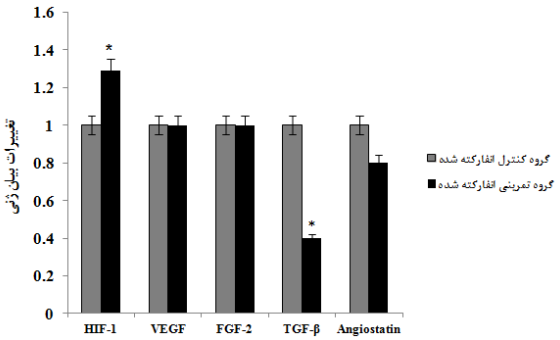



شکل ۲. میزان چگالی مویرگی در گروه های مورد مطالعه، *نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه شم، & نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل انفارکته شده. داده ها به صورت Mean ± SEM گزارش شده است.




شکل ۳. نسبت مویرگ به تار در گروه‌های مورد مطالعه، *نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه شم، & نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل انفارکته شده. داده ها به صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

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




عضله سولئوس موش‌های تمرین کرده انفارکته شده و موش‌های کنترل انفارکته شده در حضور ژن رفرنس(بتا اکتین). * نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل انفارکته شده. داده ها به صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که چگالی مویرگی عضله سولئوس، ۱۴ هفته پس از انفارکتوس قلبی به میزان ۲۶٪ کاهش پیدا کرد. این یافته موافق نتایج Ogoh 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 سولئوس 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 سولئوس 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 کم‌تحرکی را به طور معناداری در عضله سولئوس 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 سولئوس 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 حاظر مدت تمرین ۱۰ هفته بود) [۲۱].

مکانیسم مولکولی دقیق تغییرات فاکتورهای درگیر در فرایند آنژیوژنز در پاسخ به تمرین استقامتی در موش‌های با انفارکتوس قلبی مشخص نیست. به منظور دستیابی به یک بینش عمیق‌تر در مورد تغییرات فاکتورهای درگیر در فرایند رگ‌زایی در این مطالعه ما میزان بیان ژن فاکتورهای تنظیم‌کننده در فرایند آنژیوژنز 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 سولئوس 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

معناداری نکرد. هم‌چنین نتایج نشان داد میزان آنژیوستاتین عضله سولئوس در پاسخ به فعالیت تغییر معناداری نکرد. این تغییرات به ظاهر متناقض در میزان بیان ژن فاکتورهای آنژیوژنیک، 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 آنژیوژنز و کاهش این نسبت نشان‌دهنده عدم تشکیل عروق جدید می‌باشد.

مطالعات صورت گرفته در زمینه میزان بیان ژن فاکتورهای آنژیوژنیک در پاسخ به تمرینات استقامتی نشان داده‌اند که تغییرات بیان ژن فاکتورهای درگیر در فرایند آنژیوژنز 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 آنژیوژنز 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 آنژیوژنز 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 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 نسخه‌بردای میزان VEGF است، اما محققان نقش آن را در بیان ژن VEGF حین فعالیت را زیر سوال برده‌اند. در همین راستا برین و همکارن 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 کدام‌یک 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-β 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 آنژیوژنز 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

نشان از کنترل فیدبک منفی عضله برای ساخت عروق خونی جدید دارد [۲۵] (همان‌طور که میزان بیان ژن TGF-β، 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 آنژیوژنز 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 فزایش بیان ژن HIF-1، کاهش بیان ژن TGF-β 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.

## 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 β-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. Cardiovasc Res 2008; 78: 385-394.

[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 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.

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

Malihe Ardakanizade (PhD)[1], Kamal Ranjbar (PhD)[2], Farzad Nazem (PhD)[*3]
*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-β 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-β 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