

ارتفاع شبیه‌سازی شده بیشتر از تمرین هوازی، مسیر سازشی مرتبط با PGC-1 α را به طرف آنژیوژنز در بافت قلبی موش‌های نر نژاد ویستار پیش می‌برد

سهیلا رحیمی فردین^۱، معرفت سیاه کوهیان^{۲*}، پوران کریمی^۳، لطفعلی بلبلی^۴، حسن فرهادی^۵

تاریخ دریافت ۱۳۹۷/۰۵/۱۲ تاریخ پذیرش ۱۳۹۷/۰۸/۰۴

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: افزایش چگالی مویرگی عضله و قلب در اثر هیپوکسی و تمرین ورزشی یکی از عوامل موفقیت در فعالیت‌های ورزشی هوازی و همچنین پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر مقایسه اثرات ارتفاع شبیه‌سازی شده و تمرین هوازی بر آنژیوژنز و مسیرهای سازشی مرتبط با آن در بافت قلب بود.

مواد و روش کار: ۳۰ سر موش نر نژاد ویستار، به‌طور تصادفی در ۳ گروه ۱۰ تایی: کنترل (C)، هیپوکسی (H) و تمرین ورزشی (T) تقسیم‌بندی شدند. شرایط هیپوکسی، متناوب و نورموباریک و پروتکل تمرین هوازی بر روی نوارگردان با سرعت ۲۶-۲۲ متر در دقیقه و شیب ۶ درجه، به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته طراحی شد. غلظت پروتئین‌های مرتبط با آنژیوژنز شامل گیرنده‌های فعال‌کننده تکتیر پراکسیزومها (PGC-1 α)، عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و گیرنده مرتبط با استروژن (ERR α) با روش وسترن به لات اندازه‌گیری شد. داده‌ها با روش آماری ANOVA یک‌راهه با آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ تحلیل شدند.

یافته‌ها: غلظت پروتئین PGC-1 α و VEGFA در هر دو گروه تمرین و هیپوکسی نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت (P=۰/۰۰۱). همچنین شاخص PGC-1 α بین گروه تمرین با هیپوکسی معنادار بود (P=۰/۰۱۷). ولی شاخص VEGFA، بین گروه تمرین با هیپوکسی معنادار نبود (P=۰/۴۶۱). و غلظت پروتئین ERR α ، بین گروه کنترل با هیپوکسی معنادار بود (P=۰/۰۴۰) ولی بین گروه کنترل با تمرین (P=۰/۵۵۲) و تمرین با هیپوکسی (P=۰/۴۶۵) تفاوت معناداری مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: تمرین هوازی و هیپوکسی محرک مناسب برای فعال کردن مسیرهای پیام‌رسانی آنژیوژنز می‌باشد و نقش هیپوکسی در فعال کردن مسیر آنژیوژنز وابسته به ERR α از طریق PGC-1 α برجسته بود.

کلیدواژه‌ها: هیپوکسی متناوب، تمرین هوازی، عوامل آنژیوژنز

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و نهم، شماره نهم، ص ۶۷۸-۶۶۹، آذر ۱۳۹۷

آدرس مکاتبه: اردبیل، خیابان دانشگاه، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، گروه فیزیولوژی ورزش، ۰۹۱۴۱۰۲۶۳۸۶

Email: m_siahkohian@uma.ac.ir

مقدمه

شرایط هیپوکسی و تمرین‌های ورزشی هوازی در بدن رخ می‌دهد (۲). از مهم‌ترین این سازگاری‌ها، افزایش چگالی مویرگی تار عضلانی است که وابسته به فرایند آنژیوژنز می‌باشد. آنژیوژنز فرایند بیولوژیک جوانه زدن رگ‌های جدید از رگ‌های موجود در بافت است که در

پژوهش‌ها در مورد فواید ناشی از هیپوکسی و همچنین تمرین‌های استقامتی بر سازگاری‌های قلبی و عروقی در حال پیشرفت است و این موضوع موردعلاقه متخصصان بالینی، مربیان و فیزیولوژیست‌ها است (۱). سازگاری‌های متعددی متعاقب حضور در

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۲ استاد، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴ دانشیار، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

^۵ استادیار، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران

جریان خونی و ابقای عصبی را افزایش می‌دهد (۱۱) و در مهاجرت، تکثیر، تجزیه ماتریکس سلول‌های اندوتلیال، تشکیل شبکه عروقی (۱۱) و همچنین در فعال‌کننده پرواکسی زوم توسعه یافته (PPARs) و تنظیم گیرنده هورمون تیروئید نقش دارد (۱۲).

همچنین نتایج مطالعات نشان می‌دهد PGC-1 α در رگ‌زایی جنینی ضروری نمی‌باشد ولی در رگ‌زایی بزرگ‌سالی در هر دو شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی نقش دارد و نقش آن در آنژیوژنز، بیشتر در اندام‌های ایسکیمیک رخ می‌دهد و در شرایط ایسکمی PGC-1 α از طریق گیرنده مرتبط با استروژن (ERR α), VEGF و سایر فاکتورهای آنژیوژنیک را تحریک می‌کند و از طریق این مسیر موجب رگ‌زایی می‌شود (۱۳). به‌علاوه، در خلال فعالیت ورزشی مسیرهای تنظیم‌کننده بالادستی PGC-1 α , کلسیم، CAMP و AMPK هستند که سه کار اصلی آنژیوژنز، بیوژنز میتوکندریایی و تبدیل فنوتیپ تارهای عضلانی به یکدیگر را انجام می‌دهند. مسیر تنظیم آنژیوژنز در ورزش از طریق ERR α صورت می‌گیرد (۹).

به نظر می‌رسد، PGC-1 α با تحریک VEGF و گیرنده‌های آن در شرایط هیپوکسی به فرایند آنژیوژنز در عضله قلب و اسکلتی بیانجامد و فعالیت ورزشی می‌تواند با اعمال فشار متابولیکی زیاد این روند را تسریع نماید. با وجود این، مطالعه‌ای آثار هم‌زمان تمرین ورزشی و هیپوکسی متناوب را بر میزان بیان PGC-1 α و فاکتورهای درگیر در آنژیوژنز قلبی، در بافت قلب بررسی نکرده است. مطالعات صورت گرفته بیشتر از سرم، پلاسما و یا عمدتاً در عضلات اسکلتی بوده‌اند. بنابراین، این مطالعه باهدف بررسی اثر ارتفاع شبیه‌سازی شده متناوب و تمرین هوازی بر میزان بیان PGC-1 α , VEGFA, و ERR α در بافت قلبی موش‌های سالم انجام شد تا به برخی از ابهامات موجود پاسخ دهد.

مواد و روش کار

روش تحقیق حاضر از نوع تجربی و طرح پس‌آزمون با گروه کنترل بود. ۳۰ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار (n=۳۰) از انستیتو پاستور، تهران با سن حدود ۳ ماهگی در محدوده وزنی ۲۰±۲۲ گرم خریداری شده و به محل آزمایشگاه‌های مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز انتقال گردید. ابتدا، موش‌های صحرایی در ۳ گروه ۱۰ تایی، کنترل سالم، هیپوکسی، و تمرین هوازی به‌طور تصادفی تقسیم شدند. تمام موش‌ها در آزمایشگاه حیوانات در یک محیط کم استرس (دمای ۲۲-۲۰°C، رطوبت ۵۰ درصد و کم سر و صدا) و چرخه روشنایی

پاسخ به محرک‌هایی مانند ایسکمی، هیپوکسی^۱ (۳)، نیروهای همودینامیک (تنش برشی^۲، کشش مکانیکی بافت) و عوامل متابولیکی، کاهش غلظت گلوکز خون و شامل فاکتورهای رشدی) فعال می‌شود. از بین محرک‌های ذکر شده هیپوکسی نقش مؤثری را در آنژیوژنز دارد زیرا کاهش در سطوح اکسیژن، مجموعه‌ای از پاسخ‌های حاد و مزمن در بدن را موجب می‌شود (۴) که مکانیسم‌های تنظیم هموستاتیک در سیستم قلبی عروقی و تنفسی به سرعت برای حفظ اکسیژن در متابولیسم طبیعی وارد عمل می‌شود (۴).

یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی در متابولیسم طبیعی، بیوژنز میتوکندریایی و آنژیوژنز، PGC-1 α می‌باشد. افزایش بیان PGC-1 α هم‌زمان با افزایش PPAR α می‌باشد. PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptors) گروهی از رسپتورهای هسته‌ای وابسته به لیگاند می‌باشند که به‌عنوان فاکتورهای نسخه‌برداری و تنظیم‌کننده بیان ژن عمل می‌کنند (۵). PGC-1 α ها در سال ۱۹۹۰ توسط ایسمان^۴ و همکاران معرفی شدند و اثرات بیولوژیکی و فیزیولوژیکی متعدد دارند (۶) به‌طور مثال در هموستاز گلوکز و لیپیدها، التهاب، تمایز سلولی، آنژیوژنز، ترمیم زخم و در بیماری‌هایی مثل دیابت، سرطان، آترواسکلروز و چاقی نقش دارند (۷، ۸) کوآکتیویتورها نمی‌توانند مستقیماً به DNA متصل شوند اما در عوض روی عوامل رونویسی نشسته و از طریق بازسازی کروماتین و تعامل با دستگاه رونویسی، نسخه‌برداری را تغییر می‌دهند (۸).

PGC-1 α تنظیم‌کننده اصلی متابولیسم انرژی قلب است (۹). بیان PGC-1 α در قلب بعد از تولد و در پاسخ به بی‌غذایی و کمبود اکسیژن بیشتر رخ می‌دهد و در سلول‌های قلبی صدها ژن را القاء می‌کند و کدگذاری آنزیم‌های کلیدی در تمام برنامه‌های متابولیکی اصلی را که در تولید مؤثرتر ATP نیازمند است القاء می‌کند (۹) و به‌عنوان یک میانجی پیام‌رسانی در پاسخ به کمبود اکسیژن و مواد غذایی، عامل رشد اندوتلیال عروقی^۵ (VEGF) و سایر فاکتورهای آنژیوژنیک را به‌طور مؤثری فرا می‌خواند. اگرچه تنظیم VEGF در پاسخ به هیپوکسی^۶ HIF (عامل القا شونده با هیپوکسی) است. ولی مسیر PGC-1 α مستقل از مسیر HIF به‌طور قابل‌توجهی VEGF را تحریک می‌کند (۱۰).

VEGF نقش مهمی در تنظیم واسکولوژنز، آنژیوژنز، ریمادلینگ و نفوذپذیری عروقی در هر دو شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیک دارد. فعال شدن VEGF و گیرنده‌هایش چگالی عروق خونی، ذخایر

⁴ Issemann

⁵ Vascular endothelial growth factor

⁶ Hypoxia-inducible factor

¹ Hypoxia

² Shear stress

³ Peroxisome proliferator_activated receptor

تا اینکه در هفته‌های پایانی مدت و شدت تمرین به ترتیب به ۵۵ دقیقه در روز و ۲۶ متر در دقیقه رسید.

هیپوکسی:

هیپوکسی اعمال شده در این تحقیق، به‌طور متناوب و افزایشی در طول شب (سیکل روشنایی) در داخل اتاقک هیپوکسی ویژه حیوانات ساخت کشور استرالیا مدل بایومدتیج^۱ به مدت هشت هفته بود. این مقدار هیپوکسی از نظر میزان فشار سهمی اکسیژن شبیه ارتفاع ۳۴۰۰ متری می‌باشد. موش‌های صحرایی بعد از اتمام زمان هیپوکسی (۸ تا ۱۲ ساعت در شبانه روز) به محل آزمایشگاه و کنار سایر گروه‌ها انتقال داده می‌شدند. به‌منظور عادی سازی اتاقک، موش‌های صحرایی در دو هفته اول، به ترتیب ۴ و ۸ ساعت هیپوکسی را متحمل می‌شدند که در هفته‌های آخر تا ۱۲ ساعت شب‌مانی افزایش پیدا کرد. مدت‌زمان کلی مداخله هیپوکسی ۸ هفته بود. گروه‌های تمرین و کنترل غیر هیپوکسی در شرایط نورموکسیک ایزوباریک (فشار سهمی اکسیژن ۲۱ درصد با فشار کلی ۷۶۰ میلی متر جیوه) نگهداری می‌شدند. جدول (۱).

-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت به‌صورت چهارتایی در قفس‌های ویژه از جنس پلی کربنات شفاف نگهداری شدند. ضمناً حیوانات آزادانه به آب شرب و غذای فشرده مخصوص موش به مدت دو ماه و ۲ هفته دسترسی داشتند. به‌منظور ایجاد حالت سازش با محیط، تمامی مداخلات پس از گذشت حداقل دو هفته استقرار حیوانات در آزمایشگاه شروع شد. فرایند کلی کار در کمیته اخلاق کار با حیوانات دانشگاه محقق اردبیلی (اردبیل^۲ ایران) با شماره تصویب (۱۳/۲۰/۹۵/د) به تأیید رسید. کلیه مراحل تیمار موش‌های صحرایی و آزمایش‌های تجربی در محل آزمایشگاه‌های مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد.

تمرین هوازی:

تمرین هوازی انجام شده در این تحقیق، ۵ جلسه در هفته و به مدت ۸ هفته دوییدن بر روی نوار گردان بود. در هفته اول موش‌های صحرایی به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در روز و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه و با شیب ۶ درجه تمرین خود را آغاز کردند (۱۴). سرعت و مدت تمرین به تدریج در طول ۳ هفته‌ی بعد افزایش یافت

جدول (۱): زمانبندی قرارگرفتن موش‌های صحرایی در اتاقک هیپوکسی

هفته	مدت (ساعت)	ارتفاع شبیه‌سازی شده (متر)	هفته	مدت (ساعت)	ارتفاع شبیه‌سازی شده (متر)
هفته اول	۴	۳۰۰۰	هفته پنجم	۱۲	۳۴۰۰
هفته دوم	۸	۳۴۰۰	هفته ششم	۱۲	۳۴۰۰
هفته سوم	۱۲	۳۴۰۰	هفته هفتم	۱۲	۳۴۰۰
هفته چهارم	۱۲	۳۴۰۰	هفته هشتم	۱۲	۳۴۰۰

بافت قلب از بافر ریپا (سیگما^۳) حاوی مهار کننده پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده شد. غلظت تام پروتئین با روش برادفورد^۴ (سیگما) اندازه‌گیری گردید. سپس پروتئین‌ها در ژل ۱۰٪ دناتوره کننده آکرلامید حاوی سدیم دودسیل سولفات^۵ (SDS) و دستگاه الکتروفورز (بایورد) تفکیک شدند. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی غشا پلی وینیلیدین دی فلوراید^۶ (PVDF) (سیگما) ترانسفر شدند. بعد از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشا از آنتی بادی اولیه ضد PGC-1 α ساخت شرکت سانتاکروز^۷ آمریکا با کد ۵۸۱۵، ضد VEGFA با کد ۷۲۶۹، ضد ERR α با کد ۶۵۷۱۸ و ضد بتا اکتین با کد ۴۷۷۷۸ به نسبت ۱ به

ایمونوبلاکینگ^۲: ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش‌های صحرایی به‌وسیله تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. و قلب آن‌ها بلافاصله خارج شد. بعد از شستشو با نرمال سالین در نیتروژن مایع (-196°C) منجمد و در دمای (-70°C) نگهداری شدند. برای ارزیابی میزان بیان پروتئین‌های PGC-1 α ، VEGFA و ERR α از روش وسترن به لات استفاده شد. تکنیک وسترن به لات برای تعیین میزان بیان پروتئین‌های PGC-1 α ، VEGFA و ERR α به کار گرفته شد. روش کار مشابه کارهای قبلی به‌طور خلاصه به‌ترتیب زیر بود. برای تهیه هموژنه ده درصد وزنی حجمی

5 Sodium Dodecylsulfate
6 Polyvinylidene fluoride
7 Santa Cruz

¹ Biomedtech
² Immunoblotting
³ Sigma
⁴ Bradford

از آزمون لوین مشخص شد. برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین گروهی از آزمون آنوای یک طرفه استفاده شد. برای تعیین محل اختلاف بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری در تمام مراحل آماری ($P \leq 0.05$) مدنظر بود.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تحقیق در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد میانگین وزن نهایی موش‌ها در گروه کنترل (C)، هیپوکسی (H) افزایش، ولی در گروه تمرین (T) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشتند ($P=0.05$) همچنین (نسبت وزن قلب به وزن بدن ضربدر ۱۰۰۰) در گروه T و H نسبت به گروه C افزایش معنی‌داری داشت. ($P=0.01$). ولی بین گروه‌های H و T تفاوت معنی‌داری یافت نشد.

۵۰۰ (در طول شب) استفاده شد. غشاها پس از چهار بار شستشو هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی (PBS^۱) حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰ در معرض آنتی بادی ثانویه کونژوگه با HRP^۲ به مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد با روش قبلی این بار به صورت سه تکرار از کیت (BioRad, ECL) برای آشکار سازی کمپلکس‌های ایمنی تشکیل شده استفاده شد. غشاها در معرض فیلم رادیو گرافی قرار گرفته و دانسیته باندها توسط نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد و دانسیته‌ی باندهای پروتئین هدف در مقابل لودینگ کنترل بتا اکتین نرمالیزه شدند. نتایج به صورت دانسیته نسبی (نسبت به گروه کنترل) ارائه گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۵ انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف و همگن بودن واریانس‌ها

جدول (۲): میانگین (\pm انحراف معیار) وزن، نسبت وزن قلب به وزن بدن در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	کنترل سالم (n=۱۰)	هیپوکسی (n=۱۰)	تمرین هوازی (n=۱۰)
وزن اولیه (گرم)	۲۴۵/۷۵ \pm ۶/۰	۲۳۷/۱۶ \pm ۵/۷	۲۴۴/۵۵ \pm ۵/۴
وزن نهایی (گرم)	۲۹۸/۱۲ \pm ۹/۹	۲۶۹/۸۳ \pm ۹/۵ \dagger	۲۱۸/۱۱ \pm ۱۱/۱ $\times\#$
Hrt wt/body wt \times 1000 (نسبت وزن قلب به وزن بدن ضربدر ۱۰۰۰)	۳/۸۰ \pm ۰/۱	۴/۶ \pm ۱۳ \times	۴/۵۸ \pm ۰/۸ \times

\times تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل # تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه هیپوکسی \dagger تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه تمرین

گروه‌ها نشان داد بین گروه کنترل با هیپوکسی و تمرین تفاوت معنی‌داری داشت ($P=0.001$) و لی بین گروه تمرین با هیپوکسی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P=0.461$).

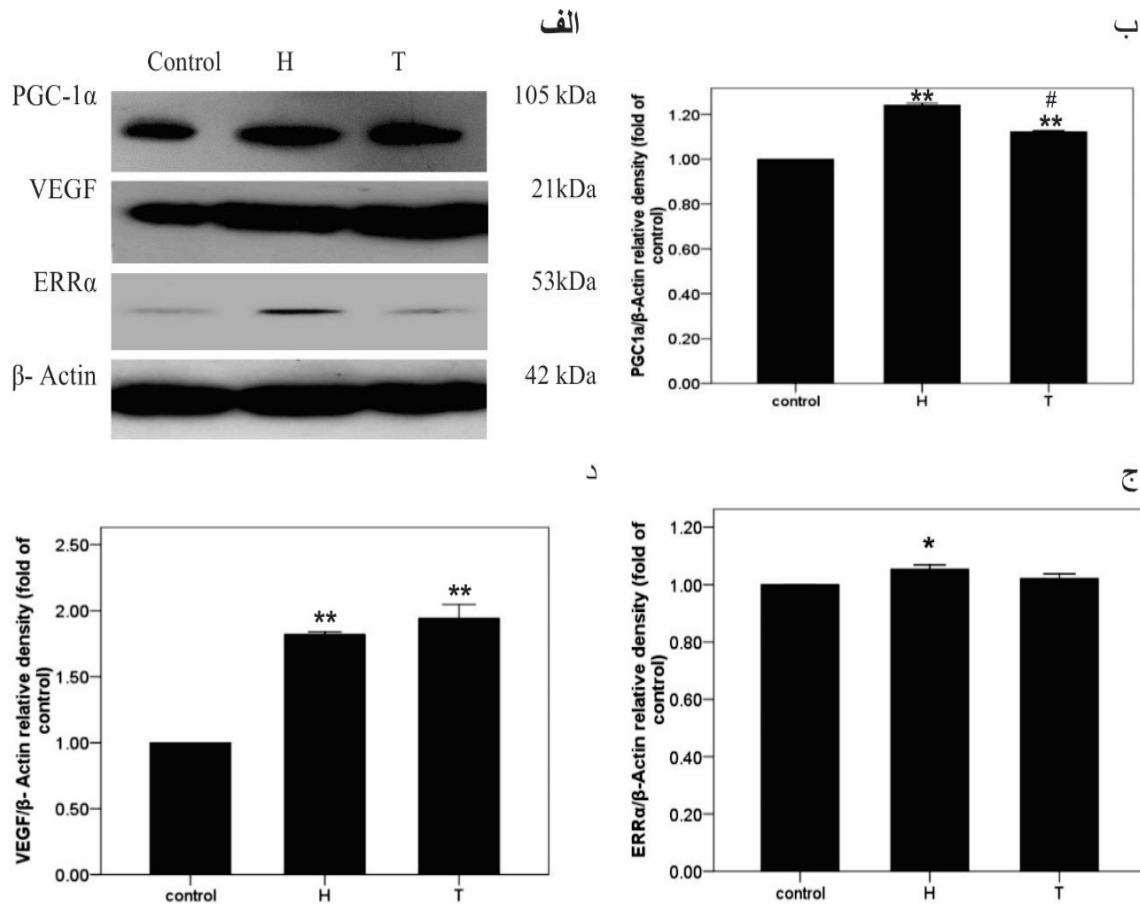
همچنین نتایج تحلیل واریانس یک راهه نشان داد تفاوت معنی‌دار در غلظت پروتئین ERR α ، در مقایسه بین گروهی وجود داشت ($F=8/02$, $P=0.009$). نتایج آزمون تعقیبی توکی در مقایسه دوبه‌دوی گروه‌ها نشان داد بین گروه کنترل با هیپوکسی تفاوت معنی‌داری یافت شد ($P=0.040$) ولی بین گروه کنترل با تمرین ($P=0.552$) و تمرین با هیپوکسی ($P=0.465$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

نتایج تحلیل واریانس یک راهه نشان داد که ۸ هفته تمرین هوازی و شرایط هیپوکسی متناوب تفاوت معنی‌داری در شاخص PGC-1 α ، در مقایسه بین گروهی ($P=0.001$, $F=25/01$) داشت. نتایج آزمون تعقیبی توکی در مقایسه دوبه‌دوی گروه‌ها نشان داد بین گروه کنترل با هیپوکسی و تمرین تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P=0.001$) و همچنین بین گروه تمرین با هیپوکسی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P=0.017$).

نیز نتایج تحلیل واریانس یک راهه نشان داد که ۸ هفته تمرین هوازی و شرایط هیپوکسی متناوب موجب تفاوت معنی‌دار در شاخص VEGFA، در مقایسه بین گروهی ($P=0.001$)، شد. آزمون نتایج تعقیبی توکی در مقایسه دوبه‌دوی

2 horseradish peroxidase

1 Phosphate buffered saline



شکل ۱_ مقایسه‌ی محتوای پروتئینهای PGC-1α، VEGF و ERRα بافت قلب در تمام گروه‌های مورد مطالعه

الف تصاویر ایمنو بلائینگ پروتئین‌های PGC-1α، VEGF و ERRα با اکتین. ب. نمودار نشان‌دهنده مقادیر کمی شده‌ی باند پروتئینی PGC-1α در مقابل بتا اکتین به‌عنوان لودینگ کنترل. ج. نمودار نشان‌دهنده مقادیر کمی شده‌ی باند پروتئینی ERRα در مقابل بتا اکتین به‌عنوان لودینگ کنترل. د. نمودار نشان‌دهنده مقادیر کمی شده‌ی باند پروتئینی VEGF در مقابل بتا اکتین به‌عنوان لودینگ کنترل. $p < 0.01 \times \times$ در مقابل گروه کنترل. # $p < 0.5$ در مقابل گروه هیپوکسی. $n=10$ در هر گروه.

بحث و نتیجه‌گیری

و محتوی پروتئین عضله اسکلتی و همین‌طور در سرم و پلاسما انجام شده است مقایسه می‌گردد.

ورزش هوازی تکثیر میتوکندری و تشکیل عروق خونی جدید را در عضلات اسکلتی ایجاد می‌کند و یکی از نمونه‌های بارز آنژیوژنز فیزیولوژیک در بافتهای بالغ است. موریاس^۱ همکاران در سال (۲۰۱۱) ۱۲ هفته تمرینات استقامتی با دوچرخه کار سنج را در هفت مرد جوان و هفت مرد سالمند (تکرار سه جلسه در هفته، مدت ۴۵ دقیقه و شدت ۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی^۲ (VO₂max) بررسی کردند. قبل، در وسط و بعد از برنامه تمرینی مویرگ‌زایی و فعالیت آنزیم سترات سنتاز آزمودنی‌ها را اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد هم در سالمندان و هم در افراد جوان حداکثر برون ده

در تحقیق حاضر مقایسه تأثیر هیپوکسی متناوب و تمرین هوازی بر محتوی پروتئین PGC-1α، VEGFA و ERRα در بافت قلبی موش‌های سالم بررسی شد نتایج نشان داد محتوی پروتئین PGC-1α و VEGFA به دنبال ۸ هفته تمرین هوازی و هیپوکسی افزایش معنی‌دار داشت ولی غلظت پروتئین ERRα تنها در گروه هیپوکسی افزایش معنی‌داری داشت. از آنجاکه پژوهش حاضر نخستین پژوهش مقایسه تمرین هوازی و هیپوکسی متناوب بر محتوی پروتئین PGC-1α، VEGFA و ERRα در بافت قلبی می‌باشد و مطالعات مشابه در این زمینه خیلی اندک است. بنابراین، نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقاتی که بر بیان ژن فاکتورهای مذکور

² Volume of maximum O₂ consumption

¹ Murias

نشان می‌دهد. بنابراین PGC-1 α از طریق آنژیوژنز اکسیژن و مواد مغذی را به میوسیت‌ها تحویل داده و انتقال آن‌ها در سراسر سلول و مصرف آن‌ها در میتوکندری را هماهنگ می‌کند (۱۸). همچنین گزارش شده است با کاهش فعالیت PGC-1 α ممکن است چگالی عروقی کاهش یافته و نارسایی قلبی به تبع آن رخ دهد (۱۹).

همراستا با نتایج این تحقیق، آران^۱ و همکاران گزارش داده‌اند بیان ژن PGC-1 α به‌طور قابل ملاحظه‌ای چگالی عروقی را در عضلات اسکلتی افزایش داد و همین‌طور نقش محافظتی را در اندام‌های ایسکمی عضله اسکلتی داشت و ابراز داشتند PGC-1 α نه تنها در روند متابولیسم ضروری می‌باشد بلکه نقش اصلی را در فرایند آنژیوژنز ایفا می‌کند (۱۰).

نشان داده شده است که با افزایش PGC-1 α ، محتوی میتوکندری و میزان سوخت و ساز عضله افزایش می‌یابد که نیاز عضله به جریان خون بیشتر می‌شود (۱۷، ۲۰) و در هنگام فعالیت ورزشی PGC-1 α این نیاز را از طریق مسیر پیام‌رسانی بتا (β2) آدرنژیکی توسط کاتکولامین‌ها تنظیم می‌کند و منجر به افزایش محتوی توده رگی می‌شود. همان‌طور که اشاره شد واسطه بین PGC-1 α و VEGF-A از طریق ERR α می‌باشد (۲۱).

از سوی دیگر، در شرایط هیپوکسی به‌دلیل محرومیت از اکسیژن، مواد مغذی، عدم تعادل pH، تغییرات چشمگیری در متابولیسم و وضعیت ردوکس سلولی رخ می‌دهد و این رویدادهای متابولیکی نقش مهمی را در فرایند آنژیوژنز دارند گرچه مکانیسم اثرشان به‌طور کامل شناخته نشده است. به‌طور مثال ساپها^۲ و همکاران اخیراً نشان داده‌اند در شرایط هایپوکسی به‌دلیل افزایش سیترات برون سلولی در شبکه چشم، به‌طور مستقیم سلول‌های گانگلیون در افزایش ترشح VEGF-A و سایر فاکتورهای آنژیوژنیک مستقل از مسیر HIF تحریک می‌شود.

وال^۳ و همکاران (۲۰۱۳) تحقیقی با عنوان پاسخ‌های عوامل رشدی آنژیوژنز در شرایط هایپوکسی حد ۲۰۰۰ تا ۴۰۰۰ متری را به مدت ۹۰ دقیقه در ۷ آزمودنی بررسی کردند و فاکتورهای سرمی VEGF, EPO, IL-6 و IGF-1 را قبل و بعد از قرارگیری در ارتفاع اندازه‌گیری کردند در پایان مشاهده کردند که VEGF, EPO, IL-6 افزایش معنی‌داری داشت ولی IGF-1 افزایش معنی‌داری نداشت (۶).

عروق اکسیژن و مواد مغذی را حمل می‌کند و بنابراین نقش مهمی در متابولیسم میتوکندری‌ها ایفا می‌کند و قلب هم به‌دلیل نیازهای اکسیداتیو و متابولیکی‌اش چگالی عروقی بالایی دارد.

قلبی و همچنین اختلاف خون سرخرگی سیاهرگی در اثر تمرینات افزایش معناداری داشت. شاخص مویرگ‌زایی در جوانان ۲۰-۳۰ درصد و در سالمندان ۳۰-۴۰ درصد افزایش داشت. فعالیت آنزیم سیترات سنتاز آزمودنی‌ها نیز به حد چشمگیری افزایش یافت. این تحقیق نشان داد که تمرین استقامتی در هر دو گروه موجب بهبود چگالی مویرگی و ظرفیت تنفس میتوکندریایی می‌گردد (۱۵).

همچنین نتایج تحقیقات نشان می‌دهد در هنگام فعالیت‌های هوازی منابع انرژی عضلات به‌دلیل تأمین انرژی با چالش‌های مواجه می‌شود که از جمله این چالش‌ها فعال کردن مسیرهای مختلف سیگنالینگ (CaMK, AMPK, MAPK و حتی mTOR) است که موجب القای ژن‌ها و بیان پروتئین فاکتورهای مختلف تنظیم کننده باپوژنز، آنژیوژنز، نوروژنز، می‌گردد. که این عامل سازگاری‌های را در بهبود عملکرد مکانیکی، متابولیکی، عصبی و انقباضی به دنبال دارد که همه این تغییرات تحت تأثیر تنظیمات رو نویسی و ترجمه ژن‌های هستند که فراوری پروتئین‌ها را کنترل می‌کنند و نهایتاً بهبود عملکرد ورزشی می‌شود. البته مدت و نوع تمرینات در این خصوص تأثیر بسزایی دارد (۱۶). از جمله مکانیسم‌های احتمالی درگیر در این فرایند این است که به‌دلیل افزایش مصرف ATP در خلال فعالیت ورزشی و تغییرات زیاد نسبت ATP:ADP/AMP، در روند انرژی‌رسانی اختلال ایجاد می‌شود و فشارهای متابولیکی ناشی از کاهش سطح ATP و همچنین افزایش کلسیم درون سلولی موجب فعال شدن مسیر پیام‌رسانی CaMK و AMPK می‌شود (۱۵).

AMPK نیز به‌طور مستقیم PGC-1 α را فسفریله می‌کند هر چند گفته می‌شود PGC-1 α با ورزش در عضله اسکلتی جوندگان و انسان‌ها، با فعالسازی آدرنژیک بیان می‌شود. ولی باید به خاطر داشت که این پروتئین یک سنسور قوی استرس اکسیداتیو هست که متعاقباً موجب افزایش سوپر اکسید دسموتاز میتوکندریایی نیز می‌گردد (۱۰).

PGC-1 α در پایین دست با افزایش بیان ERR α موجب افزایش VEGF-A می‌شود و در نهایت باعث افزایش رگ‌زایی در عضله قلبی و اسکلتی می‌گردد و افزایش چگالی مویرگی عضله و قلب از دلایل مهم گسترش توسعه فعالیت‌های ورزشی هوازی و همین‌طور پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد. (۱۷) موش‌هایی که فاقد PGC-1 α شده باشند به‌طور خاص در عضله اسکلتی گسترش شبکه عروقی خود را در پاسخ به ورزش از دست می‌دهند، این امر اهمیت آنژیوژنز ناشی از PGC-1 α در ورزش را

³ Wahl

¹ Arany
² Sapieha

همراستا با این تحقیق چینسومبون^۲ و همکاران در سال ۲۰۰۹ اعلام داشتند PGC-1 α از طریق تعامل با ERR α نسخه‌برداری VEGFA را در پاسخ به هیپوکسی و فشارهای متابولیکی افزایش می‌دهد و تنظیم مثبت VEGFA به‌طور معنی‌داری القای رشد مویرگی را در پاسخ به هیپوکسی در موش‌ها افزایش داد (۲۴).

در مطالعه‌ی حاضر هر دو مداخله‌ی تمرین هوازی و هیپوکسی محرک مناسبی برای فعال کردن مسیرهای پیام‌رسانی فرایند آنژیوژنز دیده شدند و لی نقش هیپوکسی در فعال کردن مسیر آنژیوژنز وابسته به ERR α از طریق PGC-1 α برجسته‌تر بود. به نظر می‌رسد، تنش‌های اکسیداتیو و متابولیکی در شرایط هیپوکسی نسبت به فعالیت هوازی بیشتر به فعال شدن محرک‌های بالا دستی PGC-1 α از جمله (CaMK, AMPK, MAPK) می‌شود که آن هم به نوبه خود از طریق تعامل با عوامل رونویسی موجب افزایش بیان (ERR α , VEGFA) در ژن‌های کدگذاری شده هسته‌ای می‌شود.

البته شایان ذکر است که مقایسه نتایج این پژوهش با نتایج پژوهش‌های قبلی کار آسانی نیست چرا که در این زمینه مطالعات اندکی صورت گرفته است و نیاز به مطالعات بیشتری دارد. با توجه به نتایج تحقیق حاضر و همچنین نتایج تحقیقات مشابه می‌توان از هیپوکسی متناوب با شدت متوسط به‌عنوان یک روش درمانی برای مصدومین رشته‌های ورزشی استقامتی در دوره زمان بی‌تمرینی استفاده نمود و از اثرات بی‌تمرینی در زمان مصدومیت تا حدودی جلوگیری کرد. این تحقیق همچنین بر تعیین تأثیر مکانیسم‌های بالادستی و پایین دستی مسیر آنژیوژنز از طریق PGC-1 α تأکید دارد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از مسئولین آزمایشگاه‌های مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز که در انجام این تحقیق کمال همکاری را داشتند.

یافته‌های اخیر در عضله اسکلتی PGC-1 α را در شرایط هیپوکسی در تنظیم رگ‌های خونی مؤثر دانسته‌اند. PGC-1 α بیان شده در کشت سلولی در شرایط شبه ایسکمی، به نوبه خود یک برنامه گسترده از عوامل آنژیوژنیک، از جمله فاکتور رشد اندوتلیال عروقی VEGF را فعال می‌کند. القاء VEGF به‌طور مستقل از مسیر فاکتور القایی هیپوکسی (HIF) و با فعال‌سازی ERR α تقویت‌کننده جدید در اینترن اول ژن VEGF اتفاق می‌افتد. بیان بیش از حد ژن PGC-1 α در عضله اسکلتی باعث ایجاد آنژیوژنز قوی و تسریع بهبود جریان خون پس از اعمال جراحی ایسکمی کمر درد شد این امر ظرفیت عملکرد عروق تازه تشکیل شده از طریق PGC-1 α را نشان می‌دهد. هویر^۱ و همکاران در سال (۲۰۱۴) نشان دادند در عضله، تولید VEGF-A با هیپوکسی و فشارهای متابولیکی افزایش می‌یابد الگوی تنظیم تولید VEGF-A ارتباط تنگاتنگ با نیازهای متابولیکی تارچه‌های عضلانی دارد (۲۲). همچنین اخیراً نشان داده شده است که اکسید نیتریک (یک پیام‌میانجی تولید شده توسط سلول‌های اندوتلیال در پاسخ به استرس برشی بالا) می‌تواند تولید VEGF-A را در میوسیت عضلات بالا ببرد. علاوه بر این، کمبود VEGF-A حاصل از میوسیت، منجر به از دست دادن آنژیوژنز ناشی از جریان خون می‌شود (۲۳). این یافته‌ها اهمیت دو جانبه بین سلول‌های اندوتلیال مویرگی و تارچه‌های عضلات اسکلتی، در هماهنگی پاسخ‌های سازگاری مناسب در درون شبکه ریز عروقی را نشان می‌دهد (۲۳).

زولاتان و همکاران همچنین نقش PGC-1 α در تنظیم VEGF و آنژیوژنز را بررسی کردند و اعلام داشتند ایسکمی قلب، مغز و اندام یکی از علل عمده مرگ‌ومیر در سراسر جهان است و هیپوکسی ترشح فاکتور رشد اندوتلیال عروقی و سایر عوامل آنژیوژنیک را تحریک می‌کند، که این امر منجر به ایجاد رگ‌زایی و محافظت اندام‌ها در برابر آسیب‌های ایسکمیک می‌شود و PGC-1 α در عضلات اسکلتی در محیط آزمایشگاهی مستقل از مسیر HIF1-a و از طریق مسیر وابسته به گیرنده استروژن رگ‌زایی را تنظیم می‌کند (۱۰).

References:

1. Stray-Gundersen J, Chapman RF, Levine BD. "Living high-training low" altitude training improves sea level performance in male and female elite runners. *J Appl Physiol* 2001;91(3):1113-20.

2. Moraga FA, López I, Morales A, Soza D, Noack J. The Effect of Oxygen Enrichment on Cardiorespiratory and Neuropsychological Responses in Workers With Chronic Intermittent Exposure to High Altitude (ALMA, 5,050 m). *Front Physiol* 2018;9:187.

² Chinsomboon

¹ Hoier

3. Mounier R, Pialoux V, Roels B, Thomas C, Millet G, Mercier J, et al. Effect of intermittent hypoxic training on HIF gene expression in human skeletal muscle and leukocytes. *Eur J Appl Physiol* 2009;105(4):515.
4. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *New Eng J Med* 2011;365(6):537-47.
5. Dillon LM, Rebelo AP, Moraes CT. The role of PGC - 1 coactivators in aging skeletal muscle and heart. *IUBMB life* 2012;64(3):231-41.
6. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 2000;405(6785):421.
7. Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, Butterfield CE, Freedman DA, Chen EJ, et al. PPAR γ ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 2002;110(7):923-32.
8. Finck BN ,Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 2006;116(3):615-22.
9. Rowe GC, Jiang A, Arany Z. PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circ Res* 2010;107(7):825-38.
10. Arany Z, Foo S-Y, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girmun G, et al. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature* 2008;451(7181):1008.
11. Tang K, Xia FC, Wagner PD, Breen EC. Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. *Respir Physiol Neurobiol* 2010;170(1):16-22.
12. Jensen L, Pilegaard H, Neuffer PD, Hellsten Y. Effect of acute exercise and exercise training on VEGF splice variants in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287(2):R397-R402.
13. Hu J, Long H, Wu T-D, Zhou Y, Lu H-B. The effect of estrogen-related receptor α on the regulation of angiogenesis after spinal cord injury. *Neuroscience* 2015;290:570-80.
14. Shen M, Gao J, Li J, Su J. Effect of ischaemic exercise training of a normal limb on angiogenesis of a pathological ischaemic limb in rabbits. *Clin Sci* 2009;117(5):201-8.
15. Murias JM, Kowalchuk JM, Ritchie D, Hepple RT, Doherty TJ, Paterson DH. Adaptations in capillarization and citrate synthase activity in response to endurance training in older and young men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011;66(9):957-64.
16. Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, Oka T, Sargent MA, York A, et al. Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J Clin Invest* 2007 Nov 1;117(11):3198-210.
17. Izumiya Y, Shiojima I, Sato K, Sawyer DB, Colucci WS, Walsh K. Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload. *Hypertension* 2006;47(5):887-93.
18. Russell AP, Lamon S, Boon H, Wada S, Güller I, Brown EL, et al. Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short - term endurance training. *J Physiol* 2013;591(18):4637-53.
19. Yan Z. Exercise, PGC-1 α , and metabolic adaptation in skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009;34(3):424-7.
20. Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochemical Journal* 2009;418(2):261-75.
21. Leick L, Hellsten Y, Fentz J, Lyngby SS, Wojtaszewski JF, Hidalgo J, et al. PGC-1 α mediates exercise-induced skeletal muscle VEGF expression in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297(1):E92-E103.

22. Hoier B, Hellsten Y. Exercise - induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. *Microcirculation* 2014;21(4):301-14.
23. Uchida C, Nwadozi E, Hasanee A, Olenich S, Olfert IM, Haas TL. Muscle - derived vascular endothelial growth factor regulates microvascular remodelling in response to increased shear stress in mice. *Acta Physiologica* 2015;214(3):349-60.
24. Chinsomboon J, Ruas J, Gupta RK, Thom R, Shoag J, Rowe GC, et al. The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *PNAS* 2009;pnas.0909131106.

THE SIMULATED HEIGHT PROMOTES PGC1A RELATED-ADAPTIVE PATHWAY TOWARD ANGIOGENESIS FURTHER THAN AEROBIC TRAINING IN THE HEART TISSUE OF WISTAR MALE RATS

Soheila Rahimi Fardin¹, Marefat Siahkohian^{2*}, Poursan Karimi³, Lotfali Bolboli⁴, Hasan Farhadi⁵

Received: 13 Aug, 2018; Accepted: 26 Oct, 2018

Abstract

Background & Aims: Hypoxia and exercise training increase the capillary density of the muscle and the heart and is one of the important reasons for the development of aerobic exercise and the prevention and treatment of many diseases. The purpose of this study was to compare the effects of simulated heights and aerobic training on PGC-1 α angiogenesis in the heart tissue.

Materials & Methods: Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups; normal control, hypoxia, and training groups. Hypoxia group was exposed to chronic intermittent and Isobaric hypoxia. And exercise group ran on a treadmill (22-26 meter per min) for 8 weeks, 5 session/ weeks. Then, relative protein density of PGC-1 α , VEGFA and ERRA were measured with western blot method.

Results: The result showed that intermittent hypoxia and exercise training significantly increased relative protein density of PGC-1 α , VEGFA compared to the control group (P= 0.001). Also, PGC-1 α index was significantly different between the exercise and hypoxia groups (P= 0.017). However, VEGFA index was not significantly different between the exercise and hypoxia groups (P= 0.496). Also, the relative protein density of ERRA was significantly different between the control and hypoxia groups (P= 0.40), but there was no significant difference between the control group with exercise (P= 0.552) and exercise with hypoxia (P= 0.465).

Conclusion: Aerobic exercise training and hypoxia are an effective stimulants for activating the signaling pathways of angiogenesis. The role of hypoxia in activating the pathway of angiogenesis was prominent in comparison with exercise training by PGC-1 α .

Keywords: Intermittent hypoxia, aerobic training, angiogenesis factors

Address: Department of Physical Education and Sport Sciences, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

Tel: +989141026386

Email: m_siahkohian@uma.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2018; 29(9): 678 ISSN: 1027-3727

¹ PhD Student in Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

² Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran (Correspond Author)

³ Assistant Professor, Neuroscience Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Associate Professor, Neuroscience Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran