

تأثیر تمرین هوازی و هایپوکسی بر میزان بیان عوامل آنژیوژنز بافت قلبی موش‌های نر نژاد ویستار

حسن فرهادی^{*}، معرفت سیاه کوهیان^۱، لطفعلی بلبلی^۲، پوران کریمی^۳

۱. مربی، 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

۳. دانشیار، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴. استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نشانی نویسنده مسئول: تبریز، شهرستان ورزقان، خیابان امام، جنب پل بزرگ، منزل حسن فرهادی، ۰۹۱۴۱۰۲۶۳۸۶

Email: hassan_farhady@yahoo.com

پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۷

اصلاح: ۹۴/۰۹/۱۴

وصول: ۹۴/۰۸/۰۱

چکیده

مقدمه و هدف: علی‌رغم مشاهدات بالینی فراوان مبنی بر اثرات مفید هیپوکسی متناوب، تا به حال مکانیسم اثر آن بر روی آنژیوژنز بافت قلب بررسی نشده است. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی و هیپوکسی متناوب بر بیان پروتئین‌های مرتبط با آنژیوژنز در بافت قلبی موش‌های نر نژاد ویستار بود.

روش‌شناسی: تعداد ۴۰ رأس موش صحرایی در محدوده وزنی 20 ± 220 گرم، به طور تصادفی در ۴ گروه ۱۰ تایی: کنترل سالم، هیپوکسی، تمرین هوازی، تمرین هوازی توام با هیپوکسی تقسیم‌بندی شدند. شرایط هیپوکسی، متناوب و ایزوباریک و شرایط تمرین هوازی سرعت ۲۶-۲۲ متر در دقیقه با شیب ۶ درجه نوارگردان به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته طراحی شد. غلظت پروتئین‌های آنژیوژنز شامل عامل القاشده هیپوکسی (HIF1-a)، عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و فسفاتیدیل اینوزیتول تری کیناز PI3K/Akt با روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد و از روش آماری آنووا یک‌راهه با آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

یافته‌ها: بیان پروتئین‌های HIF1-a، VEGF و PI3K/Akt در هر سه گروه تمرین ($p < 0/01$)، هیپوکسی ($p < 0/01$) و تمرین توام با هیپوکسی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0/01$). ولی بیان HIF بین گروه‌های تمرین با هیپوکسی ($p < 0/95$) تمرین با ترکیب تمرین با هیپوکسی ($p < 0/09$)، هیپوکسی با ترکیب تمرین با هیپوکسی تفاوت معنی‌داری نداشت ($P < 0/09$). هم‌چنین غلظت پروتئین VEGF بین گروه‌های تمرین با هیپوکسی ($P < 0/56$)، تمرین با ترکیب تمرین با هیپوکسی ($p < 0/31$)، تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی بین هیپوکسی با ترکیب تمرین با هیپوکسی افزایش بیشتری نشان داد ($p < 0/03$). بالعکس سطح بیان PI3K/Akt در گروه تمرین ($p < 0/01$) و تمرین توام با هیپوکسی نسبت به گروه هیپوکسی بیشتر بود ($P < 0/001$). ولی مقایسه بیان PI3K/Akt بین گروه هیپوکسی و تمرین توام با هیپوکسی تفاوت معنی‌داری دیده نشد ($p < 0/08$).

بحث و نتیجه‌گیری: احتمال دارد هیپوکسی برای القا آنژیوژنز و تمرین هوازی برای فعالیت مسیر پیام‌رسانی PI3K/Akt محرک بهتری می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: هیپوکسی متناوب، تمرین هوازی، عوامل آنژیوژنیز.

محرک‌هایی مانند هیپوکسی (۲)، نیروهای همودینامیک (تنش برشی، کشش مکانیکی بافت) و عوامل متابولیکی (شامل فاکتورهای رشدی) فعالیت خود را از سر می‌گیرد (۳، ۴). هرگونه کاهش در سطوح اکسیژن، مجموعه‌ای از پاسخ‌های حاد و مزمن در بدن را موجب می‌شود که مکانیسم‌های تنظیم

مقدمه

آنژیوژنیز یا رگ‌زایی به معنی افزایش چگالی مویرگ‌های عضله قلبی و اسکلتی است (۱). که به صورت جوانه زدن و یا تقسیم طولی از رگ قلبی بوجود می‌آید و در پاسخ به

هموستاتیک در سیستم قلبی عروقی و تنفسی را به سرعت برای حفظ اکسیژن در متابولیسم طبیعی وارد عمل می‌کند (۵). یکی از مهم‌ترین سازگاری‌های حاصله در کمبود اکسیژن آنژیوژنز است (۶) و موثرترین عامل در آنژیوژنز، عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) می‌باشد که قوی‌ترین میتوژن اندوتلیالی بوده و تکثیر سلول‌های اندوتلیالی را در شرایط هایپوکسی تحریک می‌کند و اغلب تحت تاثیر عامل القایی هایپوکسی (Hypoxia Inducible Factor -1a) بیان می‌شود (۲). قرار گرفتن در یک محیط هایپوکسی، عامل (HIF-1a) را فعال می‌کند. HIF-1a تنظیم‌کننده اصلی در بیان ژن‌های مرتبط با هایپوکسی بویژه VEGF، در اغلب سلول‌های پستانداران می‌باشد که از دو زیر واحد HIF-1a و HIF-1 β تشکیل شده است و در تمام سلول‌های هسته‌دار وجود دارد و نسبت به کمبود اکسیژن بسیار حساس است (۷). HIF-1 بعد از تولید می‌تواند عناصر واکنش دهنده به هایپوکسی که روی ژن‌های هدف در هسته قرار دارند را شناسایی کنند (۸) و نسخه‌برداری ژن‌های مختلف سازگار با هایپوکسی نظیر آنژیوژنز، گلیکولیز، اریتروپویتین و بیوستنز کاتکولامین‌ها را شروع می‌کند (۹). علاوه بر این، عواملی مانند ورزش حاد، اسیدوز، فشار اکسایشی و گرما بیان HIF-1a را مستقل از هایپوکسی تحریک می‌کند (۷). با این‌که، بیش از دو درصد از تمام ژن‌های انسان به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم توسط HIF-1 در سلول‌های اندوتلیال سرخرگی تنظیم می‌شود (۱۰). تا به امروز القا رونویسی از حدود ۱۰۰ ژن هدف، توسط HIF-1a مشخص شده است (۱۱). که در بین آنها عامل رشدی اندوتلیالی فعال‌ترین میتوژن اندوتلیالی است (۱۲). VEGF باعث فراخوانی موثر سلول‌های بنیادی به داخل جریان خون شده و به عنوان آغازگر رگ‌زایی عمل می‌کند (۱۳) و در مهاجرت، تکثیر، تجزیه ماتریکس سلول‌های اندوتلیال و در تشکیل شبکه عروقی نقش دارد (۱۴). هم‌چنین از طریق فعال‌سازی مسیر درون سلولی فسفاتیدیل اینوزیتول تری کیناز (Phosphatidylinositol 3 Kinase) با گیرنده نوع دو، تحت پیام‌دهی پراکسید هیدروژن (H₂O₂) منجر به فعال شدن مسیر پروتئین کیناز (Akt/PKB) می‌شود. این مسیر با کاهش فعالیت پروتئین‌های آپوپتوتیک و افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوز در نهایت افزایش بقای سلول‌های اندوتلیال را باعث می‌شود (۱۶).

یافته‌های پژوهشی موید این است که مسیر پیام‌رسانی PI3K/Akt نقش اساسی را در آنژیوژنز ایفا می‌کند. زی‌کاو و همکاران (۲۰۱۳) مسیر PI3K/AKT/mTOR را در هیپرتروفی بطن چپ موش‌های صحرایی بررسی کردند. در این تحقیق موش‌ها به دو گروه تمرین و کنترل تقسیم شدند و گروه تمرین به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته و یک ساعت در روز شنا می‌کردند و بیان سطوح پروتئین قلبی PI3K/AKT/mTOR بر اثر تمرین ۳۶ درصد افزایش داشت که نشان دهنده فعال شدن مسیر پیام‌رسانی PI3K/AKT/mTOR بود (۱۷).

از سوی دیگر تحقیقات نشان داده است فعال شدن مسیرهای آنژیوژنز نسبت به نوع تمرین، مدت زمان حضور در ارتفاع، میزان و نوع هیپوکسی مزمن و متناوب، متفاوت می‌باشد (۱۸). گان و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ی گزارش کردند قرارگیری طولانی مدت در معرض هیپوکسی متناوب با شدت متوسط مثل ۱۴ درصد اثر محافظتی بر قلب داشته و مردمان ساکن تا ارتفاع ۲۵۰۰ متری بسیار کمتر از افراد ساکن در ارتفاع پایین‌تر دچار بیماری‌های قلبی عروقی می‌شوند و مرگ میر ناشی از بیماری‌های قلبی در بین آنها بطور معنی‌داری پایین‌تر است. بنابراین به نظر می‌رسد در شدت‌های پایین‌تر مدت قرارگیری در معرض هیپوکسی، باید کوتاه باشد. در مطالعه دیگری اسلیوکا و همکاران (۲۰۱۴) در حیوانات آزمایشگاهی رابطه VEGF-mRNA و HIF-1a را در شرایط ورزش هوازی و بی‌هوازی سنجیدند و به این نتیجه دست یافتند که هر دو فعالیت منجر به افزایش سطوح VEGF-mRNA و HIF-1a می‌شود و الگوی تجمع دو پروتئین در هر دو فعالیت متفاوت می‌باشد و رابطه بین غلظت VEGF و HIF-1a در بی‌هوازی قوی‌تر از ورزش‌های هوازی است (۱۹).

بنابراین، امروزه تحقیقات به مسیرهای پیام‌رسان سلولی و بررسی بیان برخی از ژن‌های مرتبط با آنژیوژنز (ترشح VEGF و بیان mRNA VEGF، HIF-1 و...) معطوف شده‌اند که عموماً تاثیر هیپوکسی و تمرین ورزشی را در بیان فاکتورهای آنژیوژنز تایید کرده‌اند اگر چه در این راستا هم، اختلاف نظرهایی وجود دارد (۲۱، ۲۰). برای مثال وانگ و همکاران (۲۰۱۴) نقش تمرین هوازی و هایپوکسی را بر بیان سلول‌های بنیادی در گردش اندوتلیال (CPCs) در افراد غیر فعال مورد مطالعه قرار دادند. این مطالعه نشان داد تمرین در شرایط هایپوکسی احتمالاً

1. Circulating Progenitor Cells

روش‌شناسی

روش تحقیق حاضر از نوع تجربی و طرح پس آزمون با گروه کنترل بود. در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر سفید نژاد ویستار (n=40) (انستیتو پاستور، تهران) با سن حدود ۳ ماهگی در محدوده وزنی 20 ± 220 گرم استفاده گردید. ابتدا، موش‌های صحرایی به طور تصادفی در ۴ گروه: کنترل سالم، هیپوکسی، تمرین هوازی با هیپوکسی و تمرین هوازی تقسیم‌بندی شدند و در هر گروه ۱۰ موش صحرایی قرار گرفت. تمام موش‌ها در آزمایشگاه حیوانات در یک محیط کم استرس (دمای 22°C - ۲۰، رطوبت ۵۰ درصد و کم سر و صدا) و سیکل روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته به صورت چهارتایی در هر قفس قرار داده شدند. ضمناً حیوانات آزادانه به آب شرب و غذای فشرده مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس) به مدت دو ماه و ۲ هفته دسترسی داشتند. به منظور 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، ایران) با شماره تصویب (۹۵/د/۲۰/۱۳) به تایید رسید. کلیه مراحل تیمار موش‌های صحرایی و آزمایش‌های تجربی در محل آزمایشگاه‌های مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد.

تمرین هوازی

گروه‌های تمرین هوازی ۵ جلسه در هفته و ۸ هفته بر روی نوار گردان تمرین داده می‌شدند. در ابتدا، 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 (هفته اول). سرعت و مدت تمرین بتدریج در طول ۳ هفته‌ی بعد افزایش یافت تا اینکه در هفته‌های پایانی مدت و شدت تمرین به ترتیب به ۵۵ دقیقه در روز و ۲۶ متر در دقیقه رسید. (جدول ۱)

اعمال هیپوکسی

هیپوکسی اعمال شده از نوع هیپوکسی ایزوباریک (فشار سهمی اکسیژن ۱۴ درصد با فشار کلی ۱ اتمسفر) بوده و به مدت هشت هفته به طور متناوب و افزایشی در طول شب (سیکل روشنایی) در داخل اتاقک هیپوکسی ویژه حیوانات ساخت کشور استرالیا مدل بایومدتیج (*Biomedtech*) اعمال می‌شد. (جدول ۲) این مقدار هیپوکسی از نظر میزان فشار سهمی اکسیژن شبیه ارتفاع ۳۴۰۰ متری می‌باشد. موش‌های صحرایی

بیان بیش تنظیمی فاکتور مشتق از سلول‌های بنیادی (SDF-1)، VEGF و NO را با فعال شدن مسیر عامل القایی هیپوکسی افزایش می‌دهد و احتمالاً VEG، سلول‌های بنیادی در گردش را به سلول‌های اندوتلیال عروقی عملکردی در بافت‌های فعال متمایز کند (۲۲). در مطالعه‌ی دیگر، گان و همکاران (۲۰۱۶) و میلانو و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر پیام‌رسانی PI3K در هیپوکسی متناوب را بر موش‌ها بررسی کردند (۲۳). در این تحقیق موش‌ها به مدت ۱۴ روز، روزانه ۴ چرخه در معرض هیپوکسی متناوب (به صورت دو دقیقه با هیپوکسی ۶ تا ۸ درصد همراه با ۳ دقیقه اکسیژن‌گیری برای ۵ بار) قرار گرفتند و با موش‌های نورموکسی به عنوان گروه شاهد مقایسه کردند و گزارش دادند مسیر PI3K/Akt در هیپوکسی متناوب، آنژیوژنز، انقباض پذیری و عملکرد قلبی را بهبود بخشید و در کاهش آسیب ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون عضله قلبی موثر بود. به‌علاوه، رنجبر و همکاران تحقیقی را در یک شرایط هیپوکسی با ارتفاع ۴۲۰۰ متر با ۱۲ درصد هیپوکسی به مدت هشت هفته انجام دادند و نشان دادند ترکیب هیپوکسی و تمرین به افزایش ۴۴ درصدی سطوح سرمی VEGF منجر می‌شود و در گروه نورموباریک افزایش ۱۷ درصدی را مشاهده کردند (۱۲). در حالی که، لاندبای و همکاران عنوان داشتند که ۲ و ۸ هفته ماندن در شرایط هیپوکسی (ارتفاع ۱۰۰۰ متری) موجب تغییر معنی‌داری در بیان mRNA VEGF، mRNA HIF-1 و چگالی مویرگی نمی‌شود (۲۴).

برای روشن شدن علت این تناقضات، بهترین راه شناسایی مسیرهای مولکولی درگیر در این پدیده است. بررسی مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهد تا کنون توان دو مداخله تمرین هوازی و هیپوکسی متناوب بر القا آنژیوژنز در بافت قلبی با هم مقایسه و هم افزایی این دو عامل بر هم بررسی نشده است. اندازه‌گیری‌های صورت گرفته عمدتاً در سطح سرم، پلاسما و یا بیان ژن در عضله اسکلتی بوده‌اند که دقیقاً منعکس‌کننده وضعیت بیان ژنی بافت قلبی نمی‌باشند. لذا تحقیق حاضر سعی کرده تاثیر هر یک از مداخلات تمرین هوازی، هیپوکسی متناوب، و ترکیب آن‌ها را بر محتوای پروتئین‌های HIF1-a، VEGFA، و P-AKT در میوکارد موش‌های صحرایی بررسی کند.

جدول ۱. زمانبندی هفتگی تمرین موش‌ها

هفته	مدت تمرین (دقیقه)	شدت تمرین (با سرعت متر در دقیقه)	شیب نوارگردان
هفته اول	۵ دقیقه گرم کردن	۱۰ تا ۲۰	۵ دقیقه سرد کردن
هفته دوم	۵ دقیقه گرم کردن	۲۰ الی ۴۰	۵ دقیقه سرد کردن
هفته سوم	۵ دقیقه گرم کردن	۴۰	۵ دقیقه سرد کردن
هفته چهارم	۵ دقیقه گرم کردن	۴۵	۵ دقیقه سرد کردن
هفته پنجم	۵ دقیقه گرم کردن	۵۰	۵ دقیقه سرد کردن
هفته ششم	۵ دقیقه گرم کردن	۵۵	۵ دقیقه سرد کردن
هفته هفتم	۵ دقیقه گرم کردن	۵۵	۵ دقیقه سرد کردن
هفته هشتم	۵ دقیقه گرم کردن	۵۵	۵ دقیقه سرد کردن

جدول ۲. زمانبندی قرار گرفتن موش‌های صحرایی در اتاقک هایپوکسی

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

خلاصه به ترتیب زیر بود. برای تهیه هموزنه ده درصد وزنی حجمی بافت قلب از بافر ریپا (سیگما) حاوی مهار کننده پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده شد. غلظت تام پروتئین با روش برادفورد (سیگما) اندازه‌گیری گردید. سپس پروتئین‌ها در ژل ۱۰٪ دناتوره کننده آکرلامید حاوی سدیم دودسیل سولفات ۱ (SDS) و دستگاه الکتروفورز (شرکت نوژن پارس، مشهد، ایران) تفکیک شدند. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی غشا پلی وینیلیدین دی فلوراید^۱ (PVDF) (سیگما) ترانسفر شدند. بعد از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشا از آنتی بادی اولیه خرگوشی ضد HIF1-a ساخت شرکت سانتاکروز^۲ آمریکا با کد sc-۱۳۵۱۵، ضد VEGFA با کد ۵۰۷، ضد P-AKT با کد sc-۷۹۸۵ و ضد بتا اکتین با کد sc-۴۷۷۸۸ به نسبت ۱ به ۵۰۰ (در طول شب) استفاده شد. غشاها پس از چهار بار شستشو هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰ در معرض آنتی بادی ثانویه کونژوگه با HRP^۳ به مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد با روش قبلی این بار به صورت سه تکرار از کیت (ECL) (BioRad) برای آشکارسازی کمپلکس‌های ایمنی تشکیل شده استفاده شد. غشاها در معرض

بعد از اتمام زمان هایپوکسی (۸ تا ۱۲ ساعت در شبانه روز) به محل آزمایشگاه و کنار سایر گروه‌ها انتقال داده می‌شدند. گروه تمرین با هایپوکسی بعد از تمرین در طول روز مشابه گروه هایپوکسی در داخل اتاقک هایپوکسی قرار داده می‌شدند و گروه‌های کنترل غیر هایپوکسی در شرایط نورموکسیک ایزوباریک (فشار سهمی اکسیژن ۲۱ درصد با فشار کلی ۷۶۰ میلی متر جیوه) نگه‌داری می‌شدند. به منظور عادی سازی اتاقک، موش‌های صحرایی در دو هفته اول، بترتیب ۴ و ۸ ساعت هایپوکسی را متحمل می‌شدند که در هفته‌های آخر تا ۱۲ ساعت شب مانی افزایش پیدا کرد. مدت زمان کلی مداخله هایپوکسی ۸ هفته بود.

نمونه‌گیری

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، موش‌های صحرایی بوسیله 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 (۱۹۶°C-) منجمد و در دمای (-۷۰°C) نگه‌داری شدند. برای ارزیابی میزان بیان پروتئین‌های HIF1-a، VEGFA و P-AKT از روش وسترن بلات استفاده شد.

ایمونوبلاکینگ (Immunoblotting) تکنیک وسترن بلات برای تعیین میزان بیان پروتئین‌های HIF1-a، VEGFA و P-AKT به کار گرفته شد. روش کار مشابه کارهای قبلی بطور

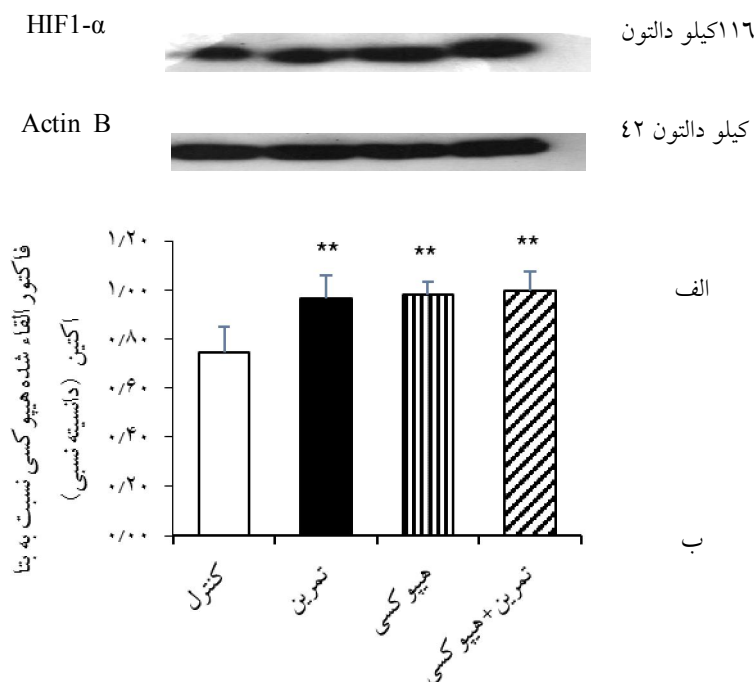
1. Sodium Dodecylsulfate
2. Polyvinylidene fluoride
3. Santa Cruz
4. horseradish peroxidase

تمرین با هیپوکسی ($P < 0/09$)، هیپوکسی با ترکیب تمرین با هیپوکسی تفاوت معنی داری نداشت ($P < 0/09$). (شکل ۱) هم‌چنین بررسی‌های آماری تحقیق حاضر نشان داد بیان پروتئین VEGF در هر سه گروه تمرین ($P < 0/001$)، هیپوکسی ($P < 0/001$) و مداخله تمرین با هیپوکسی در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری داشت ($P < 0/001$). مقایسه بین گروه‌ها مشخص کرد که بیان پروتئین VEGF بین گروه‌های تمرین با هیپوکسی ($P < 0/056$) تمرین با ترکیب تمرین با هیپوکسی ($P < 0/31$)، هیپوکسی با ترکیب تمرین با هیپوکسی

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

داده‌های پژوهش حاضر با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف مشخص شد. برای بررسی اختلاف معنی دار بین گروهی از آزمون آنوای یک طرفه استفاده شد.



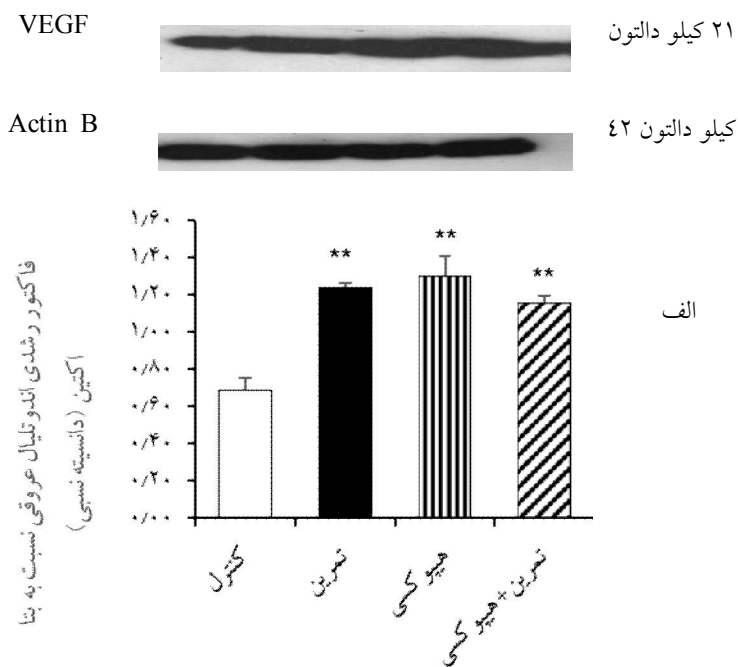
شکل ۱. نشان دهنده افزایش بیان پروتئین فاکتور القاء شده هیپوکسی (HIF1- α) در گروه‌های مداخله مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل (الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین HIF1- α . (ب) نمودار ستونی جهت نمایش کمی دانسیته نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌های مورد مطالعه و مقایسه آن‌ها با هم. $P < 0/001$ *** در مقایسه با گروه کنترل

تفاوت معنی داری نداشت ($P < 0/038$). (شکل ۲) هم‌چنین یافته‌ها نشان دادند که بیان پروتئین PI3K/Akt در هر سه گروه تمرین ($P < 0/001$)، هیپوکسی ($P < 0/001$) و تمرین توأم با هیپوکسی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت ($P < 0/001$). در مقایسه بین گروه‌ها غلظت پروتئین PI3K/Akt در گروه تمرین ($P < 0/001$) و مداخله تمرین با هیپوکسی نسبت به گروه هیپوکسی افزایش معنی داری داشت ($P < 0/001$) ولی بین گروه تمرین و تمرین توأم با هیپوکسی تفاوت معنی داری یافت نشد. (شکل ۳)

برای تعیین محل اختلاف بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی داری ($P \leq 0/05$) مد نظر بود.

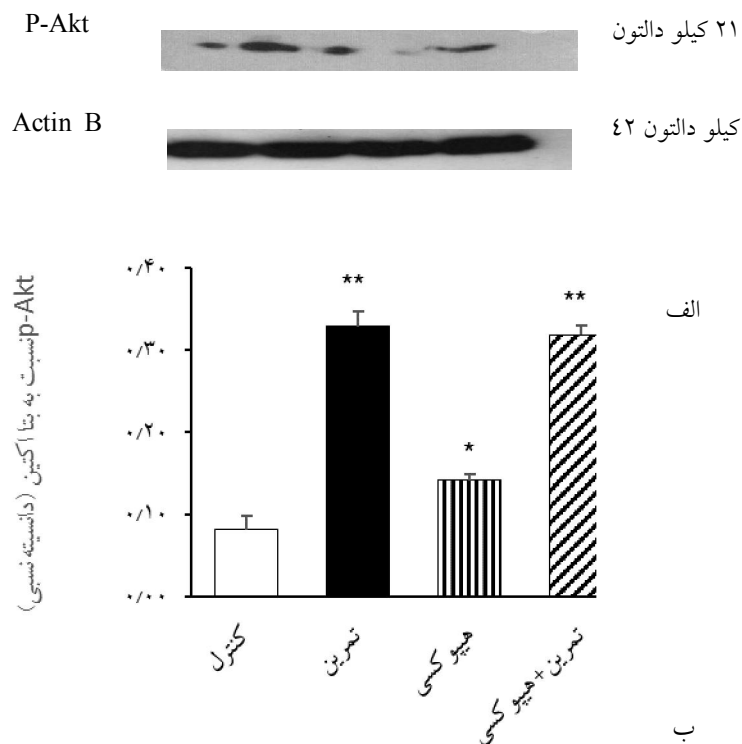
یافته‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تحقیق نشان داد چگالی نسبی پروتئین HIF1- α در هر سه گروه تمرین ($P < 0/001$)، هیپوکسی ($P < 0/001$) و تمرین توأم با هیپوکسی ($P < 0/001$) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت. ولی بیان HIF بین گروه‌های تمرین با هیپوکسی ($P < 0/95$) تمرین با ترکیب



ب

شکل ۲. نشان دهنده افزایش بیان پروتئین فاکتور رشد آندوتلیال عروقی (VEGF) در گروه‌های مداخله مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل (الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین VEGF. ب) نمودار ستونی جهت نمایش کمی دانشیه نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌های مورد مطالعه و مقایسه آن‌ها با هم. #P < ۰/۰۵ در مقایسه با گروه هیپوسکی. *P < ۰/۰۱ در مقایسه با کنترل



شکل ۳. نشان دهنده افزایش بیان پروتئین فاکتور رشد آندوتلیال عروقی (VEGF) در گروه‌های مداخله مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل (الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین VEGF. ب) نمودار ستونی جهت نمایش کمی دانشیه نسبی باندهای پروتئینی در گروه‌های مورد مطالعه و مقایسه آن‌ها با هم. *P < ۰/۰۵ در مقایسه با کنترل. **P < ۰/۰۱ در مقایسه با کنترل

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر جهت بررسی اثر تمرین هوازی و هیپوکسی متناوب به تنهایی و توأم بر روی آنژیوژنز بافت قلب طراحی گردید. نوع هیپوکسی در این مطالعه متناوب و ایزوباریک بود. مهم ترین یافته های این تحقیق عبارت بود از اینکه هیپوکسی به تنهایی محرک قویتری در القای آنژیوژنز محسوب می شود هر چند در تحریک مسیر Akt/PI3K که یک مسیر بقا و ترمیم مهم به شمار می رود تمرین هوازی اثر بهتری دارد. نیز بررسی ها نشان دادند که هیپوکسی متناوب و تمرین هوازی هر دو به یک میزان در القا فاکتور القاشونده با هیپوکسی نقش دارند. همانطور که قبلاً نیز اشاره شد بر اساس نتایج تحقیق حاضر مشخص شد که سطح بیان پروتئین VEGF، با هر سه محرک تمرین، هیپوکسی و تمرین توأم با هیپوکسی افزایش می یابد. نتایج این تحقیق با یافته های چن و همکاران (۲۰۱۰) همخوانی دارد که گزارش کردند ۸ ساعت قرارگیری در معرض هیپوکسی متناوب و متوسط (۱۴ تا ۱۵ درصد اکسیژن) به مدت ۸ هفته باعث افزایش بیان mRNA VEGF می شود (۲۵). هم چنین با نتایج وانگ جونگ شیان و همکاران (۲۰۱۴) که نقش تمرین هوازی و هیپوکسی را بر بیان سلول های بنیادی در گردش اندوتلیال^۱ (CPCs) در افراد غیر فعال مورد مطالعه قرار دادند همخوانی دارد. این مطالعه نشان داد تمرین در شرایط هیپوکسی احتمالاً بیان بیش تنظیمی فاکتور مشتق از سلول های بنیادی (SDF-1)، ماتریکس متالوپروتیناز^۲ (MMP-9)، و VEGF و NO را با فعال شدن مسیر عامل القائی هیپوکسی افزایش می دهد و احتمالاً VEGF، سلول های بنیادی در گردش را به سلول های اندوتلیال عروقی عملکردی در بافت های فعال متمایز می کند (۲۶، ۲۲). همسو با نتایج ما رنجبر و همکاران (۲۰۱۳)، گان و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که هیپوکسی و تمرین ورزشی سطوح mRNA VEGF سرمی را افزایش می دهند (۱۲، ۲۳).

در اغلب تحقیقات، دو مکانیسم اصلی توسط هیپوکسی در افزایش بیان VEGF ذکر شده است. یکی اینکه در شرایط هیپوکسی آدنوزین در عضله اسکلتی تجمع می یابد و از طریق اتصال به گیرنده خود یعنی (A2)، موجب بالا رفتن غلظت cAMP1 می شود که این عامل به نوبه خود باعث افزایش سطح

mRNA پروتئین VEGF می شود. دیگر اینکه هیپوکسی باعث تحریک HIF می شود. HIF در ادامه از طریق فعال سازی مسیر P-AKT/Akt موجب القا و بیان ژنی پروتئین VEGF می شود (۲۶). ولی نتایج تحقیق حاضر با نتایج برخی از تحقیقات مانند مونیر و همکاران (۲۰۰۹)، لاندبای و همکاران (۲۰۰۴) همسو نمی باشد مونیر و همکاران در تحقیقی تک جلسه ای که ورزشکاران استقامتی را برای سه ساعت در شرایط هیپوکسی (معادل ارتفاع ۳۰۰۰ متری) به صورت استراحت مطلق قرار دادند، متوجه کاهش معنی داری در سطوح VEGF سرمی آنان شدند. مشابه این تحقیق، التمانز و همکاران (۲۰۰۶) نیز کاهش معنی دار VEGF سرمی را بعد از ۱۵۰ دقیقه هیپوکسی (در شرایط استراحت مطلق) گزارش کردند (۲۵). به علاوه، لاندبای و همکاران (۲۰۰۴) عنوان داشتند که ۲ و ۸ هفته استراحت مطلق در شرایط هیپوکسی (ارتفاع ۱۰۰۰ متری) موجب تغییر معنی داری در بیان mRNA VEGF، mRNA HIF-1 و چگالی مویرگی نمی شود (۲۴). علت همخوان نبودن نتایج، احتمالاً نوع هیپوکسی (متناوب یا تداومی) مدت هیپوکسی و یا سطح هیپوکسی و بویژه نوع، زمان و نمونه مورد اندازه گیری (سرم در مقابل بافت قلب) می تواند باشد (۲۲).

مطالعات هم چنین نشان داده اند تمرینات ورزشی به علت افزایش مصرف اکسیژن شرایط شبه هیپوکسی ایجاد می کنند. مشاهده شده که عضلات تمرین کرده به دلیل مصرف اکسیژن سریع دچار تنش اکسیژن می شوند (۲۵). زمانی که اکسیژن رسانی متعاقب محدودیت جریان خون در عضلات مختل شود سطوح پروتئین HIF-1 α افزایش می یابد. هر چند مطالعاتی وجود دارند که نشان می دهند HIF-1 α فقط به میزان کمی در عضلات تمرین کرده فعال می شود (لیندهلم و راندکویست (۲۰۱۶)، سیلویکا و همکاران (۲۰۱۴) گزارش دادند که فعالیت ورزشی در فشار سهمی اکسیژن ۱۳ درصد نقش اصلی را در بیان ژن HIF-1 α در عضلات اسکلتی ایفا می کند (۲۸، ۲۷). تحقیقاتی نیز وجود دارند که اثر ترکیب هیپوکسی حاد با فعالیت ورزشی حاد را بررسی کرده و نشان داده اند که در این شرایط فراخوان فاکتورهای آنژیوژنز بیشتر می شود (۷). نیز برخی محققین در مطالعه بر روی بیان پروتئین HIF-1 متوجه شدند که هیپوکسی حاد همراه با فعالیت استقامتی سطوح mRNA HIF-1 را نسبت به فعالیت استقامتی صرف بیشتر افزایش داده است (مانیر و همکاران (۲۰۰۹). که با

1. Circulating Progenitor Cells
2. Matrix Metalloproteinase-9

نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد زیرا یافته‌های ما نشان دادند که هیپوکسی مزمن متناوب توام با ورزش متوسط اثر هم‌افزایی (سینرژیک) بر بیان HIF-1 α ندارند. هر چند باید به تفاوت‌های دو نوع هیپوکسی اعمال شده توجه داشت (هیپوکسی حاد در مقابل مزمن) چند علت احتمالی نیز برای این نتایج می‌توان برشمرد (۱) این احتمال وجود دارد که علیرغم اعمال دو محرک قوی، محدودیت ظرفیت کل سلول‌های قلبی در بیان VEGF اجازه پاسخ‌دهی بیشتر را ندهاند چون همانطور که در شکل ۲ آورده شده هم هیپوکسی و هم تمرین یک افزایش تقریباً دو برابری را در بیان VEGF القا کرده‌اند مطالعات نشان داده‌اند که حتی در حضور مواد پرو آنژیوژنز کلاسیک افزایش بیش از دو برابر دیده نشده است (۸). (۲) احتمال دارد که این دو محرک در برخی مسیرها اثر همدیگر را کم‌رنگ کنند (۳) احتمال سوم مربوط به رسیدن به یک راهکار مشترک در رفع مشکل محرومیت از اکسیژن است به این صورت که فعالیت ورزشی به طور مستقل فشارهای متابولیکی زیادی اعمال می‌کند و متعاقباً مصرف اکسیژن را توسط عضلات فعال افزایش می‌دهد در حالیکه هیپوکسی حاد با کاهش اکسیژن، کاهش فعالیت‌های متابولیکی را می‌طلبد. نیز مشاهدات مرتبط با سازگاری با ارتفاع متناوب نشان می‌دهند که پاره‌ای از اثرات مفید آن به تولید نیتریک اکسید (NO) که یک گشادکننده عروقی مهم و عامل محافظت‌کننده موثر در برابر هیپوکسی شدید و طولانی است، مربوط می‌باشد. اثرات این نوع هیپوکسی هم‌چنین شامل محافظت قلبی عروقی، عصبی و دفاع در مقابل استرس می‌باشد (عزتی و همکاران (۲۰۱۱) (۲۹). علاوه بر موارد بالا تحقیق حاضر نشان داد که فسفریلاسیون پروتئین AKT در هر سه گروه تمرین، هیپوکسی و مداخله تمرین با هیپوکسی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری دارد. هر چند این افزایش در گروه تمرین نزدیک به سه برابر بیشتر از گروه هیپوکسی بود (نمودار ۳). مسیر PI3K/Akt در پیام‌رسانی سلول‌های طبیعی و سرطانی نقش اساسی دارد این مسیر نقش کلیدی در چندین عملکرد سلولی از جمله تکثیر، مهاجرت، چسبندگی، تهاجم و بقای سلولی را دارد. نتایج این تحقیق با یافته‌های کارار و مایاتی همخوانی دارد کرار و ماتی (۲۰۱۱) که اعلام داشتند فعال شدن مسیر P-AKT/AKT به تثبیت سطح پروتئین HIF کمک می‌کند و ترشح VEGF را بالا می‌برد و آنژیوژن را در سلول‌های طبیعی و سرطانی موجب می‌شود (۳۱).

اتصال VEGF به گیرنده خودش روی سلول‌های اندوتلیال فسفریلاسیون AKT را پیش می‌برد. افزایش کوتاه مدت نسبت P-AKT/AKT با بیان بیش تنظیمی VEGF، هایپرتروفی فیزیولوژیکی قلب را موجب می‌شود اوکا (۲۰۱۴). هم‌چنین در تحقیق حاضر در مقایسه بین گروه‌ها، فسفریلاسیون پروتئین AKT در گروه‌های تمرین توام با هیپوکسی نسبت به گروه هیپوکسی افزایش معنی‌داری داشت. علت این امر احتمالاً فعال شدن مسیرهای پیام‌رسانی دیگری غیر از P-AKT/AKT از جمله میتوژن فعال شده پروتئین کیناز^۱ (P38MAPK) و یا تریک اکساید در شرایط هیپوکسی بوده است. مطالعات پیشین اثر تمرین بر افزایش مسیرهای رشد و ترمیم را که به شدت با فسفریلاسیون AKT در ارتباطند نشان داده‌اند. در مقابل مطالعاتی نیز وجود دارند که اثر مهار هیپوکسی مزمن را بر آنژیوژنز و مسیر VEGF آشکار کرده‌اند (۳۰). این مغایرت‌ها جهت واضح‌تر شدن به مطالعات وسیع‌تر نیازمند است که بعلاوه محدودیت‌های متعدد در این مطالعه به آن‌ها پرداخته نشده است.

نتیجه‌گیری

یافته‌ها نشان می‌دهد که هشت هفته تمرین هوازی و هیپوکسی متوسط به طور متناوب به تنهایی و به طور توام منجر به فعال شدن مسیرهای آنژیوژنز قلبی در رت‌ها و فعال شدن مسیر P-AKT/AKT می‌گردند. به نظر می‌رسد که هیپوکسی برای القا آنژیوژنز و تمرین هوازی برای فعالیت مسیر پیام‌رسانی P-AKT/AKT محرک بهتری می‌باشند نیز این دو عامل اثر هم‌افزایی نشان ندادند. برای تعیین دقیق مکانیسم‌های پایین‌دستی و بالادستی این مسیرها نیاز به مطالعات بیشتری وجود دارد.

قدردانی و تشکر

با تشکر از مسئولین آزمایشگاه‌های مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز که در انجام این تحقیق کمال همکاری را داشتند. هم‌چنین از زحمات سرکار خانم دکتر پوران کریمی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز و دکتر مصطفی خانی، دانشکده تربیت بدنی دانشگاه تبریز تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. 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. *Cardiovascular research*. 2007.
2. 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. *European journal of applied physiology*. 2009; 105(4):515-24.
3. Prior BM, Yang H, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *Journal of Applied Physiology*. 2004;97(3):1119-28.
4. Adair TH, Cotten R, Gu J-W, Pryor JS, Bennett KR, McMullan MR, et al. Adenosine infusion increases plasma levels of VEGF in humans. *BMC physiology*. 2005; 5(1):10.
5. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *New England Journal of Medicine*. 2011; 365(6):537-47.
6. Sica A, Melillo G, Varesio L. Hypoxia: a double-edged sword of immunity. *Journal of molecular medicine*. 2011;89(7):657-65.
7. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, et al. Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *Journal of cell science*. 2003;116(7):1319-26.
8. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodeling. *Cardiovascular research*. 2010;cvq045.
9. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual review of cell and developmental biology*. 1999;15(1):551-78.
10. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular pharmacology*. 2006; 70(5):1469-80.
11. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Shui QY, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 2005;105(2):659-69.
12. Ranjbar K, Nourshahi M, Gholamali M. The Effect of Acute Sub-Maximal Endurance Exercise on Serum Angiogenic Indices in Sedentary Men. *zjrms*. 2014;16:58-63.
13. Byrne AM, Bouchier-Hayes D, Harme J. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9(4):777.
14. Connolly D, Olander J, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, et al. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(33):20017-24.
15. Tomanek RJ, Schatteman GC. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *The anatomical record*. 2000; 261(3):126-35.
16. Cai J, Jiang WG, Ahmed A, Boulton M. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation is regulated by interaction between VEGFR-2, SH-PTP1 and eNOS. *Microvascular research*. 2006;71(1):20-31.
17. Ma, Z., Qi, J., Meng, S., Wen, B., & Zhang, J. (2013). Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *European Journal of Applied Physiology*, 113(10), 2473-2486.
18. Vanotti A, Magiday M. Untersuchungen zum studium des trainiertsein V über die capillarisation der trainierten muskulaturen. *Arbeitsphysiologie*. 1934; 7:615-22.
19. Slivka DR, Heesch MW, Dumke CL, Cuddy JS, Hailes WS, Ruby BC. Human skeletal muscle mRNA response to a single hypoxic exercise bout. *J Wilderness Med*. 2014; 25:462-5.
20. Dantz D, Bewersdorf J, Fruehwald-Schultes B, Kern W, Jelkmann W, Born J, et al. Vascular endothelial growth factor: a novel endocrine defensive response to hypoglycemia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(2):835-40.
21. Davis PG, Wideman L, Bloomer RJ, Consitt LA, Weaver RA, You T. Acute effect of prolonged cycle ergometer exercise on plasma vascular endothelial growth factor. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2002; 34(5):S30.
22. Wang J-S, Lee M-Y, Lien H-Y, Weng T-P. Hypoxic exercise training improves cardiac/muscular hemodynamics and is associated with modulated circulating progenitor cells in sedentary men. *International journal of cardiology*. 2014; 170(3):315-23.
23. Gan Z. Hypoxia in skeletal muscles: from physiology to gene expression. *Musculoskeletal Regeneration*. 2016;2.
24. Lundby C, Calbet JA, Robach P. The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia. *Cellular and molecular life sciences*. 2009; 66(22):3615-23.
25. Chen C-Y, Tsai Y-L, Kao C-L, Lee S-D, Wu M-C, Mallikarjuna K, et al. Effect of mild intermittent hypoxia on glucose tolerance, muscle morphology and AMPK-PGC-1 α signaling. *Chin J Physiol*. 2010;53(1):62-71.
26. Wang J-S, Wu M-H, Mao T-Y, Fu T-c, Hsu C-C. Effects of normoxic and hypoxic exercise regimens on cardiac, muscular, and cerebral hemodynamics suppressed by severe hypoxia in humans. *Journal of Applied Physiology*. 2010.
27. Lindholm ME, Rundqvist H. Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise. *Experimental physiology*. 2016;101(1):28-32.
28. Slivka DR, Heesch MW, Dumke CL, Cuddy JS, Hailes WS, Ruby BC. Human Skeletal Muscle mRNA Response to a Single Hypoxic Exercise Bout. *Wilderness & environmental medicine*. 2014;25(4):462-5.
29. Ezzati M, Horwitz ME, Thomas DS, Friedman AB, Roach R, Clark T, et al. Altitude, life expectancy and mortality from ischaemic heart disease, stroke, COPD and cancers: national population-based analysis of US counties. *Journal of epidemiology and community health*. 2011;jech. 2010.112938.
30. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2011; 4:51.
31. Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I. Angiogenesis and Cardiac Hypertrophy Maintenance of Cardiac Function and Causative Roles in Heart Failure. *Circulation research*. 2014;114(3):565-71.

Effects of aerobic training and hypoxia on expression angiogenic factors in cardiac male Wistar rats

Farhadi H^{*1}, Siahkohian M², Lotfali B³, Pouran.K⁴

1. Corresponding Author, Mohaghegh Ardabil University, Ardabil, Iran

2. Professor, Mohaghegh Ardabil University, Ardabil, Iran

3. Associate Professor, Mohaghegh Ardabil University, Ardabil, Iran

4. Assistant Professor, neuroscience Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

* Corresponding: Department of Physical Education and Sport Sciences, Mohaghegh Ardabil University, Ardabil, Iran. Tel: 09141026386

Received: 2015/10/23

Revised: 2015/12/05

Accepted: 2016/02/16

*Correspondence:

University Mohaghegh
Ardabil

Email: hassan_farhady
@yahoo.com

Abstract

Introduction: Despite the many clinical observations regarding the beneficial effects of hypoxia, the mechanism of its effect on the angiogenesis of the cardiac tissue has not yet been studied. However, the aim of this study to investigate. The effects of aerobic training and hypoxia on expression angiogenic factors in cardiac male wistar rats.

Materials and Methods: In the current experimental study, forty male Wistar rats weighing 220 ± 20 gr were randomly divided into four groups; normal control (NC), hypoxia (H), Hypoxia + training (HT) and training groups. Hypoxia group exposed to chronic intermittent hypoxia ($PiO_2 \approx 106$ mmHg, simulated altitude ≈ 3400 m, 14% oxygen for 8 weeks). And exercise group ran on a treadmill for 8weeks, 3 session/ week. (HT) Group, after exercise, during the day were similar to hypoxia in the hypoxic chamber. Then, relative protein density of HIF1a, VEGF and PI3K were measured with western blot method.

Results: The result showed that intermittent hypoxia, exercise training+ hypoxia and exercise training significantly increased relative protein density of HIF1a, VEGF and PI3K compared to control group ($p < 0.001$).also, significant increased relative protein density of VEGF in hypoxia group compared to exercise training+ hypoxia group ($p < 0.034$). However, significant increased relative protein density of PI3K in exercise groups compared with control group ($p < 0.001$).

Conclusion: It seems that hypoxia more induced angiogenesis signaling pathway and exercise training is potent stimulator for activity of P-I3K/Akt signaling pathway.

Key Words: Intermittent Hypoxia, Angiogenesis, exercise training.