اثر هشت هفته تمرین استقامتی بر کلاژن ۱۸ پلاسمایی و عضله قلبی موش‌های صحرایی نر ویستار

حجت الله نیک بخت[۱]✉، احمد عبدی[۲]، خسرو ابراهیم[۳]

۱-دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه تربیت بدنی ۲-دانش آموخته دکتری فیزیولوژی ورزش دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه تربیت بدنی ۳-استاد دانشگاه شهید بهشتی، تهران

تاریخ دریافت مقاله ۹۲/۰۶/۰۴ **تاریخ پذیرش مقاله ۹۲/۰۷/۰۲**

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش بررسی اثر یک دوره تمرین استقامتی بر کلاژن ۱۸ پلاسمایی و عضله قلبی موش‌های نر ویستار بود. **روش شناسی:** ۱۶ سر موش صحرایی نر ویستار (۴-۶ هفته‌ای و ۱۲۵-۱۳۵ گرم) به طور تصادفی به دو گروه کنترل (C) و تمرین (T) تقسیم شدند. برنامه تمرینی شامل ۸ هفته، ۵ روز در هفته، به مدت ۲۰ تا ۶۰ دقیقه و سرعت ۲۸ تا ۳۴ متر در دقیقه بود. ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی نمونه‌گیری خون و بافت برداری انجام شد. مقدار کلاژن ۱۸ به روش الایزا اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از t مستقل در سطح معنی‌داری $\alpha<۰/۰۵$ تجزیه و تحلیل شد. **نتایج:** مقدار کلاژن ۱۸ پلاسمایی (C=۰/۷۲۱±۰/۱۴۲، T=۰/۸۳۹±۰/۰۷۹) و عضله قلبی (C=۲۰/۰۸۰±۳/۱۶۹، T=۴۰/۴۷۶±۱۱/۹۳۳) پس از هشت هفته فعالیت ورزشی افزایش داشت، ولی این افزایش فقط در سطح عضله قلبی معنی‌دار بود (P=۰/۰۴۶). **بحث و نتیجه‌گیری**: افزایش کلاژن ۱۸ احتمالاً نشان دهنده تأثیر فعالیت‌های ورزشی بر مهار رگ‌زایی بوده و گواه دیگری بر اثرات ضد سرطانی فعالیت‌های ورزشی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تمرین استقامتی، کلاژن ۱۸ پلاسمایی و بافت قلب، موش‌های نر ویستار

Effect of 8 week endurance training on plasma and heart tissue collagen XVIII in male Wistar rats

Abstract

Purpose: the aim of this study was to examine the effect of endurance training on plasma and heart tissue collagen XVII in male Wistar rats. **Methods:** 16 male Wistar rats (4-6 week old, 125-135 g weight) were randomly divided two groups: experimental (n=8) and control (n=8) groups. Training protocol consisted of treadmill exercise at 20 to 60 min, speed 28 to 34 m/min, (0%) grade, for 5days/week for 8 weeks. Rats were sacrificed 72 h after the last session of exercise for measurement collagen XVIII levels in plasma and heart tissue. Plasma and tissue collagen XVIII levels measured using ELISA. Data were analyzed using independent t-test at P= 0.05. **Results** collagen XVIII levels increased in plasma and heart tissue after 8 weeks endurance training, but significant difference observed only in heart tissue (P=0.046). **Conclusion**: It likely appears that increased of collagen XVIII was indicator of exercise training effect on anti-angiogenesis and confirmed the anti-cancer impact of exercise training.

Key words: endurance training, collagen XVIII plasma and heart tissue, male Wistar rats.

✉ **نویسنده مسئول:** حجت الله نیک بخت تلفن:۰۹۱۱۱۰۶۷۷۴۹

آدرس: تهران- دانشگاه ازاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات- گروه فیزیولوژی ورزشی E-Mail: hojnik1937@yahoo.com

مقدمه

سازگاری‌هایی که پس از انجام تمرینات ورزشی در بدن اتفاق می‌افتد، عاملی برای جلوگیری از بروز برخی بیماری‌ها در افراد سالم است. یکی از اصلی‌ترین سازگاری‌ها، تغییر در سیستم گردش خون به ویژه عروق می‌باشد. افزایش چگالی مویرگی به تعادل بین فاکتورهای آنژیوژنیک[1] و آنژیواستاتیک[2] بستگی دارد (۱-۲). آنژیوژنز[3] نامناسب ممکن است با برخی اختلالات، و یا به طور مستقیم با یک بیماری همراه و مرتبط باشد (۳). اختلال در تنظیم کننده‌های آنژیوژنز غالباً با توسعه آنژیوژنز وابسته به بیماری‌هایی از قبیل آترواسکلروز همراه است (۴). بیشتر پژوهش‌ها نشان می‌دهند که تغییرات ناشی از تمرین بر عوامل رشدی آنژیوژنیک نشانه میزان پایین تحریک کننده ها نسبت به مهار کننده ها می باشد. اعتقاد بر این است که سطح پلاسمایی VEGF-A عامل مهم آنژیوژنیک، بعد از تمرین کاهش می‌یابد (۵-۷).

کلاژن ۱۸ جزءی از پروتئین خارج سلولی و هپارین سولفات پروتئوگلیکان[4] در غشای پایه اپیتلیوم و اندوتلیوم عروق می‌باشد (۸). این پروتئین ها یک قسمت ۲۰ کیلو دالتونی را به اشتراک گذاشته و باعث رهایش اندوستاتین از انتهای کربوکسیلی غیر کلاژنی کلاژن ۱۸ می‌شوند (۹). اندوستاتین باعث مهار رشد سلول‌های اندوتلیال، مهار آنژیوژنز، تضعیف شدن سرطان‌های مختلف و رشد تومور می‌شود (۱۰).
یافته‌ها نشان می‌دهد که کلاژن ۱۸/ اندوستاتین ممکن است تعامل بین سلول‌های اندوتلیال و غشای پایه را تنظیم کند (۱۱). اگر چه مکانیزم‌های رهایش کلاژن ۱۸/ اندوستاتین هنوز ناشناخته باقی مانده است، بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که رهایش پروتئولیتیک[5] اندوستاتین از کلاژن ۱۸ توسط میانجیگری بسیاری از پروتئازها مثل سیستئین پروتئاز ماتریکس متالوپروتئاز[6] و آسپارتیک پروتئاز صورت می‌گیرد (۸, ۱۲). بسیاری از این پروتئازها با نوسازی[7] فیزیولوژیکی کلاژن ۱۸ که با فعالیت ورزشی زیاد می‌شود، همراه است (۱۳-۱۴). بیان فاکتورهای پرو و آنتی آنژیوژنیک به وسیله سلول‌های سرطانی، ژن‌های سرکوبگر تومور و فاکتورهای نسخه بردار متعدد تنظیم می‌شود. افزایش برخی شاخص‌های آنژیوژنیک مانند VEGF-A نه تنها تشکیل عروق خونی جدید بلکه عروق لنفاوی درون تومور را نیز افزایش می‌دهند (۱۵). روندی که گسترش و متاستاز سلولهای تومور را تسهیل می‌کند. بنابراین به تازگی درمان آنتی آنژیوژنیک در جلوگیری از رشد و متاستاز تومورها مورد توجه فراوان قرار گرفته‌اند (۱۶). مشاهده شده که میزان کلاژن ۱۸ در برخی شرایط پاتولوژیک مثل آسیب مغزی (۱۷-۱۸)، بیماری اتوپی[8] (۱۹)، و اسکلودرمی[9] پوستی (۲۰) افزایش یافته و نشان داده شده که با پیشرفت سرطان هپاتوسلولار[10] همبستگی دارد (۲۱-۲۳). بیشتر گزارش های ورزشی توجه خود را بر برخی فاکتورهای آنژیوژنز در عضلات معطوف داشته‌اند. مطالعاتی که در زمینه تأثیر ورزش بر عوامل آنتی آنژیوژنز در عضله قلبی صورت گرفته بسیار اندک است. به همین دلیل محقق به دنبال بررسی اثر هشت هفته تمرین استقامتی بر یکی از فاکتورهای آنتی آنژیوژنیک (کلاژن ۱۸) می باشد.

روش تحقیق

نمونه

جامعه آماری شامل تمام موش‌های صحرایی نر موجود در انستیتو پاستور آمل بوده که از بین آنها تعداد ۱۶ سر موش صحرایی نر چهار تا شش هفته‌ای از نژاد ویستار (۱۳۵-۱۲۵ گرم) به عنوان نمونه انتخاب و به مرکز پژوهش منتقل شدند.

نمونه‌ها طی دوره یک هفته ای آشنایی با محیط آزمایشگاهی و آشنایی با نوارگردان و همچنین مراحل اجرای پروتکل در قالب گروه های پنج سر موش در قفس‌های پلی کربنات شفاف، در محیطی با دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ ٪ و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲: ۱۲ ساعته نگهداری شدند. بعد از دوره آشنایی نمونه‌ها به صورت تصادفی به دو گروه تجربی (۸ سر) و کنترل (۸ سر) تقسیم شدند.

پروتکل

برنامه تمرین شامل دو مرحله به شرح ذیل می باشد:

[1] angiogenic
[2] angiostatic
[3] Angiogenesis
[4] heparan sulfate proteoglycans
[5] proteolytic release
[6] metalloproteinase
[7] Turnovers
[8] atopy
[9] scleroderma
[10] hepatocellular

مرحله اول (مرحله اضافه بار): در این مرحله که دو هفته بطول انجامید موش ها با رعایت اصل اضافه بار به صورت فزاینده بین ۲۰ تا ۶۰ دقیقه و با سرعت بین ۲۸ تا ۳۴ متر در دقیقه تمرین کردند. مرحله دوم (حفظ یا تثبیت بار): موش های گروه تمرین پس از رسیدن به سرعت ۳۴ متر در دقیقه (معادل VO_2max ٪۸۵) و مدت ۶۰ دقیقه، تا پایان هفته هشتم این حجم کار را حفظ نمودند (۲۴).

بافت برداری و جمع آوری پلاسما

۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی نمونه ها با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین[1](۳۰-۵۰mg/kg) و زایلازین[2](۳-۵ mg/kg) بی هوش شدند. نمونه های خون به به صورت مستقیم از ورید اجوف تحتانی گرفته و پس از انتقال به لوله های آزمایشگاهی حاوی EDTA در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵دقیقه سانتریفیوژ شده و پلاسما جمع آوری شد. پس از انجماد پلاسما به وسیله نیتروژن مایع تا زمان اندازه گیری کلاژن ۱۸در یخچال در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بافت قلب بلافاصله پس از جداسازی و شست و شو با سیلاین توسط فریز کلمپ[3] منجمد شده و با استفاده از هاون‌های چینی پودر شد. بافت‌های پودر شده بعد از وزن‌کشی وارد تیوب‌های شیشه‌ای گردیده و به ازای هر ۵۰ میلی‌گرم بافت پودر شده یک سی سی (1cc) بافر PBS به آن اضافه شد. مخلوط بافت و PBS بلافاصله توسط دستگاه هموژنایزر (در داخل ظرف یخ پودر شده) هموژن شده و مجددا به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا شده و وارد تیوب‌های مخصوص گردیده و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد.

اندازه‌گیری غلظت پلاسمایی و بافتی (قلب)کلاژن ۱۸

غلظت کلاژن بافتی و پلاسمایی به روش الایزا[4] (دستگاه الایزا ریدر فومو[5] ساخت کشور چین) و با استفاده از کیت شرکت گلوری[6] ساخت کشور آمریکا با حساسیت بر آورد ۵/۸۵ نانوگرم بر لیتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌ها، برای نرمال بودن داده‌ها از آزمون کلموگراف اسمیرنوف و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون t مستقل استفاده شد. لازم به ذکر است یافته‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. برای محاسبه‌ی داده‌ها از نرم افزار spss نسخه ۱۵ استفاده و اختلاف معنی‌داری در سطح $\alpha \leq 0.05$ تعیین شد.

نتایج

تغییرات کلاژن ۱۸ پلاسمایی و بافتی (قلب) در گروه تمرین و کنترل پس از هشت هفته فعالیت ورزشی در جدول ۱ ارائه گردیده است.

جدول ۱- تغییرات کلاژن ۱۸ پلاسمایی، بافتی در گروه تمرین و کنترل

ردیف	متغیر اندازه گیری شده	گروه کنترل	گروه تمرین	P
۱	کلاژن ۱۸ پلاسمایی (ng/ml)	۰/۷۲۱±۰/۱۴۲	۰/۸۳۹±۰/۰۷۹	۰/۱۹۴
۲	کلاژن ۱۸ بافتی (pg/mg)	۲۰/۰۸۰±۳/۱۶۹	۴۰/۴۷۶±۱۱/۹۳۳	*۰/۰۴۶

اعداد به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شده است.

تجزیه و تحلیل آماری به دست آمده از تغییرات نشان می‌دهد که مقادیر کلاژن ۱۸ پلاسمایی و بافتی (قلبی) درنتیجه فعالیت ورزشی، افزایش داشت ولی این افزایش فقط در سطح بافت (قلبی) معنی‌دار بود (p=0.046).

بحث

آنژیوژنز فرایندی است که می‌توان آن را به دو شکل فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی طبقه‌بندی کرد. آنژیوژنز فیزیولوژیکی که فرآیندی به شدت تنظیم شده است، در مواردی مثل ترمیم زخم، رشد جفت و تخمک‌گذاری اتفاق می‌افتد، در حالی که آنژیوژنز پاتوفیزیولوژیکی که اشاره به تکثیر غیرقابل کنترل اندوتلیوم مویرگی دارد در بیماری‌های مثل رتینوپاتی دیابتی، آترواسکلروز، رشد و متاستاز تومورها دیده می‌شود (۲۵). مهار آنژیوژنز در این موارد می‌تواند موجب بهبود بیماری یا علائم آن شود (۲۶).

[1] Ketamine
[2] Xylazine
[3] freeze clamp
[4] Enzyme-linked immunosorbent assay
[5] PHOMO
[6] Glory

یافته‌های این تحقیق نشان داد که تمرین استقامتی باعث افزایش مقادیر کلاژن ۱۸ پلاسمایی و بافتی می‌شود. این یافته با نتایج توماس و همکاران (۱۹۹۲) که بیان داشت فعالیت ورزشی باعث افزایش بیان کلاژن ۱۸ در عضلات بطن چپ و پاپیلاری می‌شود مطابقت دارد (۱۴). با توجه به دانش ما این اولین تحقیقی است که مقدار کلاژن ۱۸ را در بافت (قلب) و پلاسما اندازه‌گیری می‌کند. کلاژن ۱۸ پروتئین غشای پایه می‌باشد (۲۷-۲۸). این مولکول قطعاتی مثل TSP-1 و اندوستاتین بوده که می‌تواند بر فعالیت ضدرگ‌زایی، تکثیر سلولی و آپوپتوز کنترل داشته و می‌توان فرض کرد که توسعه سیستم عروقی را تنظیم کند (۲۹-۳۰). همچنین نشان داده شده که عدم وجود کلاژن ۱۸ باعث تشکیل غیر طبیعی غشای پایه می‌شود (۳۱). کلاژن ۱۸ در همه ساختار عروقی و اپیتلیال غشای پایه در سرتاسر بدن یافت می‌شود (۸, ۳۲). نشان داده شده که محل آن تقریباً در ساختار چشم انسان و همچنین سلول‌های عضلانی جسم مژگانی و عنبیه می‌باشد (۳۳-۳۴). در کبد در مناطق پری سینوزوئید[1] و غشای پایه یافت می‌شود. هپاتوسیت‌ها و سلول‌های ماهواره‌ای[2] مهمترین منابع کلاژن ۱۸ در کبد هستند (۳۵). به نظر فعالیت ورزشی می‌تواند باعث افزایش کلاژن ۱۸ شود (۱۴). فعالیت ورزشی باعث افزایش ترن اور[3] پروتئازها شده و پروتئازها یکی از عوامل افزایش کلاژن ۱۸ می‌باشد و از این طریق باعث رهایش اندوستاتین می‌شود. چنین قطعاتی به نوبه خود ممکن است مهار کننده منطقه-ای آنژیوژنز باشند. بنابراین سیستم کلاژن ۱۸/ اندوستاتین ممکن است به عنوان سنسور فعالیت‌های پروتئولیتیک همراه با آنتی آنژیوژنیک بوده و از طریق فیدبک منفی به صورت آنتی آنژیوژنز عمل نماید. اگر چه اطلاعات قطعی درباره قطعات مختلف شبه اندوستاتین موجود نمی‌باشد، این احتمال وجود دارد که قطعه بزرگ‌تر یا کوچک تر از اندوستاتین فعالیت آنتی آنژیوژنیک داشته باشد (۳۶).

در این پژوهش افزایش میزان پلاسمایی کلاژن به سطح معنی‌داری نرسید. به نظر کلاژن ۱۸ به عنوان عوامل موثر بر رگ‌زایی در نتیجه فعالیت‌های ورزشی توسط بافت‌ها برداشت می‌شود. اگر چنین فرضی درست باشد احتمالا افزایش میزان کلاژن ۱۸ باعث عملکرد بیشتر مکانیزم‌های کلاژن ۱۸/ اندوستاتین شده و باعث مهار رشد سلول‌های اندوتلیال، مهار آنژیوژنز، تضعیف شدن سرطان‌های مختلف و رشد تومور (۱۰) و همچنین جلوگیری از پیشرفت بیماری آترواسکلروز اولیه می شود (۳۷).

در پژوهشی یوکی و همکاران (۲۰۱۰) در پژوهشی بیان داشتند که کلاژن ۱۸/ اندوستاتین به حفظ یکپارچگی ماتریکس خارج سلولس و مویرگی کلیه منجر شده و باعث محافظت کلیه در برابر گلومرولونفریت پیشرونده می‌شود (۳۸). تحقیقات نشان داده‌اند که بیان کلاژن ۱۸ در بسیاری از بافت‌ها در زمان پیشرفت رشد افزایش می‌یابد. افزایش بیان آن در اپیتلیوم ریه موش‌ها و کلیه در حال رشد، در هسته بافت همبند اندوکاردیال و اجزای دریچه قلبی در حال رشد موشها نیز مشاهده شد (۳۹). شاید افزایش اندازه عضلات نیز عاملی برای افزایش میزان کلاژن ۱۸ در بافت باشد. در این پژوهش اندازه عضلات نمونه‌ها اندازه‌گیری نشد اما وزن نمونه بعد از دوره تمرینی افزایش معنی‌داری داشت.

بطور کلی محققین در این پژوهش نتیجه گرفتند که افزایش میزان کلاژن ۱۸ در نتیجه فعالیت ورزشی احتمالاً می‌تواند مهار کننده منطقه‌ای رگ‌زایی بوده و گواه دیگری بر اثرات ضد سرطانی فعالیت‌های ورزشی می‌باشد. از آن جای که در این تحقیق محقق نتوانسته میزان اندوستاتین پلاسمایی و بافتی را اندازه‌گیری نماید پیشنهاد می‌شود که هر دو شاخص به همراه فاکتورهای مهم آنژیوژنیک از قبیل VEGF و ... اندازه‌گیری شود تا بتوان تفسیر دقیق‌تری از تغییرات فاکتورهای آنژیوژنیکی و آنژیواستاتیکی در نتیجه تمرینات ورزشی داشته باشیم.

منابع

1- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. cell. 79(2):315-28.

2- Hanahan D.(1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. cell.86:353-64.

3- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G.(1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. The Journal of experimental medicine.133(2):275-88.

4- Richardson R, Wagner H, Mudaliar S, Saucedo E, Henry R, Wagner P.(2000). Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. American Journal of

[1] perisinusoidal
[2] stellate cells
[3] Turnovers

Physiology-Heart and Circulatory Physiology .279(2):H772-H8.

5- Asano M, Kaneoka K, Nomura T, Asano K, Sone H, Tsurumaru K, et al.(1998). Increase in serum vascular endothelial growth factor levels during altitude training. Acta physiologica scandinavica.162(4):455-60.

6- Gunga HC, Kirsch K, Röcker L, Behn C, Koralewski E, Davila EH, et al.(1999). Vascular endothelial growth factor in exercising humans under different environmental conditions. European journal of applied physiology and occupational physiology.79(6):484-90.

7- Gustafsson T, Knutsson A, Puntschart A, Kaijser L, Nordqvist SAC, Sundberg C ,et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. Pflügers Archiv European Journal of Physiology.444(6):752-9.

8- Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio–Harmainen H, Pihlajaniemi T.(2002). The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. The American journal of pathology. 1998;153(2):611-26.

9- Sasaki T, Fukai N, Mann K, Göhring W, Olsen BR, Timpl R.(1998). Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. The EMBO journal.17(15):4249-56.

10- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al.(1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. cell.88(2):277-85.

11- Marneros AG, Olsen BR.(2005). Physiological role of collagen XVIII and endostatin. The FASEB Journal.19(7):716-28.

12- Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaissé JM.(2000). Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. FEBS letters.486(3):247-51.

13- Kovanen V, Suominen H.(1989). Age-and training-related changes in the collagen metabolism of rat skeletal muscle. European journal of applied physiology and occupational physiology.58(7):765-71.

14- Thomas DP, McCormick RJ, Zimmerman SD, Vadlamudi RK, Gosselin L.(1992). Aging-and training-induced alterations in collagen characteristics of rat left ventricle and papillary muscle. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.263(3):H778-H83.

15- Marneros AG.(2009). Tumor angiogenesis in melanoma. Hematology/oncology clinics of North America.23(3):431.

16- Kivela R, Silvennoinen M, Lehti M, Jalava S, Vihko V, Kainulainen H.(2008). Exercise-induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle and in capillaries of healthy and diabetic mice. Cardiovasc Diabetol. 7(13):10.1186.

17- Deininger MH, Fimmen B, Kremsner PG , Meyermann R, Schluesener HJ.(2002). Accumulation of endostatin/collagenXVIII in brains of patients who died with cerebral malaria. Journal of neuroimmunology.131(1):216-21.

18- Mueller C, Schluesener H, Fauser U, Conrad S, Schwab J.(2007). Lesional expression of the endogenous angiogenesis inhibitor endostatin/collagen XVIII following traumatic brain injury (TBI). Experimental neurology. 208(2):228-37.

19- Castro-Giner F, Bustamante M, González JR, Kogevinas M, Jarvis D, Heinrich J, et al.(2009). A pooling-based genome-wide analysis identifies new potential candidate genes for atopy in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). BMC medical genetics.10(1):128.

20- Santos S, Oliveira G, Tavares A, Massensini A, Carvalhaes L, Reljasvaara R, et al.(2005). Collagen XVIII and fibronectin involvement in bullous scleroderma. Dermatology online journal.11(1):17.

21- Musso O, Theret N, Heljasvaara R, Rehn M, Turlin B, Campion JP, et al.(2003). Tumor hepatocytes and basement membrane–Producing cells specifically express two different forms of the endostatin precursor, collagen XVIII, in human liver cancers. Hepatology.33(4):868-76.

22- Hu TH, Huang CC, Wu CL, Lin PR, Liu SY, Lin JW, et al.(2004). Increased endostatin/collagen XVIII expression correlates with elevated VEGF level and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Modern pathology. 18(5):663-72.

23- Passos-Bueno MR, Suzuki OT, Armelin-Correa LM, Sertié AL, Errera IV F, Bagatini K, et al.(2006). Mutations in Collagen 18A1 (COL18A1) and their relevance to the human phenotype. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 78(1):123-31.

24- Fathi R, Ghanbari-Niaki A, Rahbarizadeh F, Hedayati M, Ghahramanloo E, Farshidi Z.(

2009). The effect of exercise on plasma acylated ghrelin concentrations and gastrocnemius muscle MRNA expression in male rats. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 10(5):519-26.

25- van Royen N, Piek JJ, Schaper W, Bode C, Buschmann I.(2001). Arteriogenesis: mechanisms and modulation of collateral artery development. Journal of Nuclear Cardiology.8(6):687-93.

26- Risau W.(1997). Mechanisms of angiogenesis. Nature.386(6626):671-4.

27- Muragaki Y, Abe N, Ninomiya Y, Olsen BR, Ooshima A.(1994). The human alpha 1 (XV) collagen chain contains a large amino-terminal non-triple helical domain with a tandem repeat structure and homology to alpha 1 (XVIII) collagen. Journal of Biological Chemistry.269(6):4042-6.

28- Rehn M, Pihlajaniemi T.(1994). Alpha 1 (XVIII), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen. Proceedings of the National Academy of Sciences. 91(10):4234-8.

29- Väänänen A, Ylipalosaari M, Parikka M, Kainulainen T, Rehn M, Heljasvaara R, et al.(2007). Collagen XVIII modulation is altered during progression of oral dysplasia and carcinoma. Journal of oral pathology & medicine. 36(1):35-42.

30- Quelard D, Lavergne E, Hendaoui I, Elamaa H, Tiirola U, Heljasvaara R, et al.(2008). A Cryptic Frizzled Module in Cell Surface Collagen 18 Inhibits Wnt/β −Catenin Signaling. PLoS One.3(4):e1878.

31- Sakimoto T, Kim T-i, Ellenberg D, Fukai N, Jain S, Azar DT, et al.(2008). Collagen XVIII and corneal reinnervation following keratectomy. FEBS letters. 582(25):3674-80.

32- Muragaki Y, Timmons S, Griffith CM, Oh SP, Fadel B, Quertermous T, et al.(1995). Mouse Col18a1 is expressed in a tissue-specific manner as three alternative variants and is localized in basement membrane zones. Proceedings of the National Academy of Sciences.92(19):8763-7.

33- Ylikärppä R ,Eklund L, Sormunen R, Kontiola AI, Utriainen A, Määttä M, et al.(2003). Lack of type XVIII collagen results in anterior ocular defects. The FASEB Journal. 17(15):2257-9.

34- Määttä M, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, Uusitalo M.(2007). Collagen XVIII/endostatin shows a ubiquitous distribution in human ocular tissues and endostatin-containing fragments accumulate in ocular fluid samples. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. 245(1):74-81.

35- Musso O, Rehn M, Saarela J, Théret N, Liétard J, Hintikka E, et al.(1998). Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. Hepatology.28(1):98-107.

36- Beck L, D'Amore PA.(1997). Vascular development: cellular and molecular regulation. The FASEB journal.11(5):365-73.

37- Celletti FL, Hilfiker PR, Ghafouri P, Dake MD.(2001). Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque. Journal of the American College of Cardiology. 37(8):2126-30.

38- Hamano Y, Okude T, Shirai R, Sato I, Kimura R, Ogawa M, et al.(2010). Lack of collagen XVIII/endostatin exacerbates immune-mediated glomerulonephritis. Journal of the American Society of Nephrology. 21(9):1445-5.۵

39- Lin Y, Zhang S, Rehn M, Itaranta P, Tuukkanen J, Heljasvaara R, et al.(2000) Induced repatterning of type XVIII collagen expression in ureter