



## **Comparison of the effects of 10 weeks mid and long-term swimming induced oxidative stress on left ventricular angiogenesis in male rats**

Maliheh Ardakani Zadeh<sup>1\*</sup>, Leila Vesali Akbarpour<sup>2</sup>

1 Department of Sports Sciences, Faculty of Humanities, Damghan University, Damghan, Iran

2 Faculty of Sports Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran

### **Original Article**

#### **Abstract**

**Purpose:** In previous studies, there was a relationship between angiogenesis and oxidative stress thus the aim of this study was to compare the effect of two protocols of mid and long-term on left ventricular angiogenesis in male rats.

**Methods:** The 18 male Wistar rats of  $210 \pm 20$ g, were randomly assigned in to three equal groups: control, mid and long-term group. Training groups swam in 32° water five days per week for 10 weeks. The mid-term group swam for one hour and the long-term group for three hours per session. One day after the end of the protocol, left ventricle of the heart was removed. Real-time PCR method was used to measure the genes expression of Vascular-endothelial-growth-factor-B, Fibroblast-Growth-Factor-B, Angiopoietin1&2. Differences were determined using by ANOVA One-Way method and the groups were compared by Tukey follow-up test at the significant level of  $P < 0.05$ .

**Results:** The genes expression levels of Vascular-endothelial-growth factor-B, Angiopoietin1&2 and Matrix-metalloproteinases-2 were significantly increased in the long-term group in compared to the both the control and mid-term groups, and in the mid-term group in compared to the control group, but the gene expression of Fibroblast-Growth-Factor-B had a significant increase only in the mid-term group in compared to the control group ( $P = 0.001$ ).

**Conclusion:** Due to the significantly increase of nitric-oxide, the angiogenesis process in the long-term group can be related to shear stress, and in the mid-term group, due to a significant increase in Malondialdehyde, it was attributed to oxidative stress.

**Keywords:** Oxidative stress, Angiogenesis, Mid-term swimming, Long-term swimming

How to cite this article: Ardakani Zadeh M, Vesali Akbarpour L. Comparison of the effects of 10 weeks mid and long-term swimming induced oxidative stress on left ventricular angiogenesis in male rats. *Sport and Exercise Physiology* 2021;14(1): 119-130

---

\*Corresponding Author; E-mail: m.ardakani@du.ac.ir  
DOI: 10.52547/joeppa.14.1.119



## مقایسه اثر فشار اکسایشی ناشی از ده هفته شنای متوسط و طولانی مدت بر رگ‌زایی بطن چپ موش‌های صحرایی نر

ملیحه اردکانی‌زاده<sup>۱\*</sup>، لیلا وصالی اکبریپور<sup>۲</sup>

۱ گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

۲ دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**هدف:** در مطالعات پیشین، بین رگ‌زایی و فشار اکسایشی رابطه‌ای عنوان شده است؛ بنابراین، پژوهش حاضر با هدف مقایسه اثر دو پروتکل متوسط و طولانی مدت بزرگ‌زایی بطن چپ موش‌های صحرایی نر انجام گرفت.

**روش‌ها:** تعداد ۱۸ سر موش نر صحرایی (۲۰±۲۱ گرم) به صورت تصادفی به سه گروه همتای کنترل، شنای متوسط و طولانی مدت تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی به مدت ۱۰ هفته و ۵ روز در هفته در آب ۳۲ درجه سانتی‌گراد شنا کردند. در هر جلسه گروه متوسط یک ساعت و گروه طولانی سه ساعت شنا کردند. یک روز پس از پایان تمرین، بافت بطن چپ قلب جدا شد و برای سنجش بیان ژن‌های عامل رشد اندوتلیال عروقی B، عامل رشد فیبروبلاست B، آنژیوپوپتین ۱ و ۲ و ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ از روش real-time PCR استفاده شد. تفاوت‌ها با روش آنوا یکطرفه، و مقایسه گروه‌ها از طریق آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری  $p < 0.05$  انجام گرفت.

**نتایج:** مقادیر بیان ژن‌های عامل رشد اندوتلیال عروقی B، آنژیوپوپتین ۱ و ۲، و ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ در گروه طولانی مدت در مقایسه با هر دو گروه کنترل و متوسط، و در گروه متوسط نیز در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری یافت، اما بیان ژن عامل رشد فیبروبلاست B فقط در گروه متوسط در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری داشت ( $P=0.001$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به افزایش معنادار نیتریک اکسید، می‌توان رخداد فرایند رگ‌زایی در گروه طولانی مدت را به فشار برشی، و در گروه متوسط به افزایش معنادار مالون دی‌آلدئید، به فشار اکسایشی نسبت داد.

**واژه‌های کلیدی:** رگ‌زایی، شنای متوسط مدت، شنای طولانی مدت، فشار اکسایشی

\* نویسنده مسئول: رایانامه: m.ardakani@du.ac.ir

## مقدمه

سلول‌های قلب به دلیل فعالیت اکسایشی مداوم، و قابلیت تکثیر محدود، بیشتر از بافت‌های دیگر در معرض آسیب بنیان‌های آزاد قرار دارند (۱). عنوان شده است که برخلاف فعالیت هوازی سبک، فعالیت‌های وامانده‌ساز و طولانی‌مدت، تأثیرات نامطلوبی بر عملکرد قلب دارند (۲)، که یکی از عوامل اصلی وقوع این تأثیرات نامطلوب، مربوط به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) فراتر از ظرفیت دستگاه دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن است که به بروز فشار اکسایشی، پراکسیداسیون لیپید و در پی آن نکروز و آپوپتوز سلولی منجر می‌شود (۳). در واقع هنگام بروز ایسکمی بافت قلب، کاهش آنتی‌اکسیدان قلب (سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از یک سو، و از سوی دیگر، خون‌رسانی مجدد و هجوم ناگهانی خون و اکسیژن، به تولید بیش از پیش مقادیر گونه‌های فعال اکسیژن می‌انجامد (۴). بر همین اساس، اورسو<sup>۳</sup> (۲۰۰۳) اظهار داشت که هرچه مدت زمان شنای موش‌ها بیشتر باشد، مقادیر مالون دی‌آلدئید (MDA)<sup>۴</sup> (محصول فشار اکسایشی)، بیشتر مشاهده می‌شود (۵). همچنین جولازاده (۱۳۸۹) بیان داشته است که فعالیت وامانده‌ساز، به افزایش معنادار مقادیر MDA بافت قلب در موش‌های نرسالم منجر می‌شود (۶). نتایج چندین مطالعه نشان دادند که مقادیر ناشی از هیپوکسی، فواید دیگری برای بافت‌های مختلف بدن از جمله قلب به دنبال دارد، به طوری که رنجبر و همکاران (۱۳۹۰) بیان داشتند که هیپوکسی ناشی از ورزش طولانی، از یک سو موجب تولید گونه‌های واکنشی در بافت قلب می‌شود و از سوی دیگر فرایند رگ‌زایی را تحریک می‌کند (۷). در واقع، ROS از طریق اتصال به NADPH-اکسیداز (جایگاه اصلی تولید بنیان‌های آزاد در سلول‌های اندوتلیال)، سبب بیان مهم‌ترین عامل آنژیوژنز، یعنی عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEFG)<sup>۵</sup> می‌شود (۸). در همین زمینه طاهری (۱۳۸۹) عنوان کرد که اجرای یک جلسه فعالیت وامانده‌ساز زیربیشینه حاد (۶۵ درصد  $VO_2\max$ ) توسط چرخ کارسنج، از طریق افزایش سرعت جریان خون، موجب افزایش مقادیر سرمی VEGF در مردان جوان فعال می‌شود (۹). نورشاهی (۱۳۹۴) نیز اظهار داشته است که مقدار VEGF در بافت عضله نعلی موش‌های مسن، بلافاصله پس از اجرای دویدن وامانده‌ساز حاد (۷۵ تا ۸۰ درصد  $VO_2\max$ ) کاهش، و ۴ ساعت پس از

آن افزایش می‌یابد (۱۰). همچنین ون<sup>۶</sup> (۲۰۰۸) افزایش VEGF را در مردان سالم پس از اجرای ورزش حاد (چرخ کارسنج) اعلام داشت (۱۱). در این مطالعات عنوان شده است که در طول و نیز متعاقب فعالیت ورزشی، بیان گیرنده‌های VEGF، به ویژه VEGFR-2 افزایش می‌یابد که به اتصال VEGF به گیرنده، و کاهش مقادیر سرمی و ژن این منجر می‌شود (۹).

نیتریک اکسید (NO)<sup>۷</sup> به طور موضعی از طریق اندوتلیوم عروق عضلانی و تارهای عضلانی در حین انقباض، و در پاسخ به جریان خون بالا (فشار برشی) تولید می‌شود (۳۹) که آپوپتوز را مهار می‌کند و از طریق افزایش بیان VEGF و عامل رشد فیبروبلاست (FGF)، تکثیر سلول‌های اندوتلیوم را افزایش می‌دهد (۱۲). در واقع، فشار برشی ناشی از ورزش شدید، به واسطه فعال‌سازی کانال‌های پتاسیمی، تولید نیتریک اکسید را می‌افزاید (۱۳). محققان بیان کرده‌اند که تمرینات ورزشی از طریق فعال‌سازی مسیر پروتئین کیناز B (PKB)<sup>۸</sup> و افزایش مقادیر نیتریک اکسید سنتتاز اندوتلیالی (eNOS)<sup>۹</sup> بیان ژن VEGF را در عضله قلبی افزایش می‌دهد (۱۴). در شرایط هیپوکسی و در محیط کشت، درون یک ماتریکس فیبری، صرفاً با بیان ژن FGF-B تحریک رگ‌زایی رخ می‌دهد. هیپوکسی حداقل دو مسیر انتقال پیام‌رسانی در سلول‌های تحریک شده با FGF-2 را فعال می‌کند: مسیر عامل هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا از لنفوسیت‌های B فعال شده (NF-kB)<sup>۱۱</sup> و مسیر پروتئین کیناز فعال شده با پیام‌رسانی برون‌سلولی ۲۱ (ERK1/2)<sup>۱۲</sup>، که هر دو مسیر ممکن است در اثر تحریک‌کنندگی از شرایط هیپوکسی در تشکیل توبول درگیر شوند. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تمام عوامل رشد رگ‌زایی مانند VEGF و FGF-B می‌تواند به بهبود جریان خون در اندام‌های ایسکمیک و عضله قلبی منجر شود (۱۵). در همین زمینه پژوهشگران مشاهده کرده‌اند که FGF-2 موجب رشد توبول مویرگی در شرایط هیپوکسی می‌شود، اما در شرایط نوروموکسی این اتفاق به وقوع نمی‌پیوندد (۱۶). علاوه بر این، VEGF می‌تواند موجب فعال‌سازی ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ (MMP-2)<sup>۱۳</sup> شود که نقش مهمی در رگ‌زایی دارد و می‌تواند کلاژن IV غشای پایه و کلاژن غیرطبیعی نوع I و II (اجزای اصلی از ماتریکس خارج سلولی قلبی) را کاهش دهد (۱۷). ریویلیس<sup>۱۴</sup>

اندوتلیال، و تشکیل جوانه می شود (۲۴).  
 فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در قلب حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد فعالیت آن در کبد، و غلظت گلوکاتیون پراکسیداز (GPx)<sup>۱۹</sup> در قلب موش حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد مقدار آن در کبد است. این یافته ها نشان می دهند که ظرفیت ضد اکسایشی قلب ضعیف است و در شرایط فشاری همچون فعالیت های طولانی، آسیب قلبی را به دنبال دارد (۲۸). ظرفیت ضد اکسایش تام (TAC)<sup>۲۰</sup> نشان دهنده مجموع ضد اکساینده های بدن است و حین فعالیت های استقامتی و شدید کاهش می یابد، که نشان دهنده نقش تضعیف کننده چنین فعالیت هایی بر دستگاه دفاعی ضد اکسایشی بدن است (۲۹).  
 هنگام غوطه وری در آب و افزایش فشار هیدرواستاتیک، بازگشت وریدی و حجم پایان دیاستول افزایش می یابد، همچنین فعالیت گروه های عضلانی بزرگ تر جهت غلبه بر مقاومت آب، برون ده قلبی و تفاوت اکسیژن سرخرگ-سیاهرگی را افزایش می دهد که به افزایش تهویه و VO<sub>2</sub>max بیشتر منجر می شود (۲۷). با توجه به اینکه ۲ تا ۵ درصد از اکسیژن مصرف شده، صرف تولید گونه های اکسیژن واکنش پذیر (ROS) می شود، قلب به عنوان بافت اکسایشی با افزایش فعالیت متابولیکی حین ورزش، از جمله بافت های مستعد آسیب اکسایشی است (۳۰).  
 محققان زیادی همچون رنجبر (۱۳۹۰)، طاهری (۱۳۸۹)، نورشاهی (۱۳۹۴) و ژائو (۲۰۰۹)، اعلام داشته اند که اجرای فعالیت طولانی مدت یا بیشینه از طریق افزایش مقادیر گونه های واکنشی، فرایند رگ زایی را بهبود می بخشد (۷، ۹، ۱۰، ۳۱)، اما فرانک (۲۰۰۷) و جانسن (۲۰۰۴) عدم تغییر، و جیان (۲۰۰۴) کاهش عوامل رگ زایی را پس از فعالیت طولانی مدت، گزارش کردند (۷، ۳۰، ۳۱). با توجه به این نتایج، آیا اجرای تمرین شنای طولانی مدت، در مقایسه با میان مدت، اثرات مشابهی خواهد داشت؟ و متغیر زمان، می تواند بر این مقادیر مؤثر واقع شود؟ از طرف دیگر، به نظر می رسد اندازه گیری تغییرات بیان ژن در بافت قلب و به خصوص بطن چپ، می تواند نتایج قابل اعتمادتری را بر مقادیر پژوهش حاضر ارائه دهد. حال این سؤال مطرح می شود که اجرای ۱۰ هفته فعالیت شنای طولانی و میان مدت، قادر خواهد بود فشار اکسایشی را در بافت بطن چپ موش های نر ایجاد کند؟، و آیا در پی افزایش مقادیر گونه های فعال اکسیژن، بیان ژن های درگیر در فرایند رگ زایی در قلب

(۲۰۰۲) عنوان کرد که میزان ترشح عامل آنژیوژنیک به نوع محرک اعمال شده وابسته است، و تولید MMP تنها زمانی که عضله تحت کشش قرار می گیرد، از طریق جوانه زدن، سبب تشکیل عروق جدید می شود (۱۸).  
 MMP-2 دارای توانایی تجزیه پروتئین های ماتریکس خارج سلولی در تمام بدن از جمله دستگاه قلبی عروقی است (۱۹) و به وسیله کاردیومیوسیت ها، فیبروبلاست های قلبی و سلول های اندوکاردیال تولید می شود (۲۰). در همین زمینه نشان داده شده که افزایش فشار دیاستولی در موش های دیابتی، با افزایش فیبروز و کاهش MMP-2 قلبی همراه است (۲۱). محمد و همکاران (۲۰۱۱) نیز کاهش MMP-2 قلبی را در موش های آلبینو دیابتی مشاهده کردند (۲۰). از طرف دیگر، کواک<sup>۱۵</sup> و همکاران (۲۰۱۱) افزایش فعالیت MMP-2 را در بطن چپ موش های پیر پس از ۱۲ هفته فعالیت هوازی به مدت ۴۵ دقیقه در هر جلسه و ۵ روز در هفته گزارش داده اند (۲۲). در واقع مقادیر متوسط ROS، از طریق راه اندازی VEGF و در ادامه آن فعال سازی MMP-2، به عنوان میانجی در فرایندهای رگ زایی درگیر می شود (۱۹).  
 آنژیوپوپیتین-۱ (Ang-1)<sup>۱۶</sup> جزء خانواده آنژیوپوپیتین ها و عامل رشد پروتئین است که از طریق تشکیل عروق جدید سبب افزایش رگ زایی می شود. آنژیوپوپیتین-۲ (Ang-2) نیز، با تخریب اولیه پیوند بین سلول های اندوتلیال و عضله صاف عروق، فرایند رگ زایی را تسهیل می کند (۲۳). از عوامل مهم در فرایند رگ زایی، افزایش نسبت Ang-2 به Ang-1 است (۲۴). لایود<sup>۱۷</sup> و همکاران (۲۰۰۳)، مشاهده کردند که دویدن روی نوار گردان با سرعت ۲۰ تا ۲۵ متر در دقیقه پس از ۲۴ روز، نسبت Ang-2 به Ang-1 را در عضله کند و تند انقباض موش افزایش می دهد، تغییری که به نظر می رسد اغلب از افزایش Ang-2 ناشی می شود. هر چند در عضلات کند انقباض، کاهش Ang-1 نیز در افزایش این نسبت مؤثر است (۲۵). دینگ و همکاران (۲۰۰۴) نیز افزایش میزان بیان ژن Ang-2 و VEGF را موش های صحرائی پس از ۶ هفته تمرین هوازی گزارش کردند (۲۶). در همین زمینه، ناکامورا<sup>۱۸</sup> (۲۰۰۸) نشان داده است که اجرای تمرینات درون گرا در مقایسه با برون گرا، مقدار Ang-2/Ang-1 بیشتر است (۲۷). یانگا (۲۰۰۹) معتقد است که کشش چرخه ای سلول های اندوتلیال ورید نافی انسان، موجب تنظیم افزایشی ترشح Ang-2 و در نتیجه مهاجرت سلول

چپ موش‌های نر صحرایی، افزایش خواهد یافت؟

### روش پژوهش

**نمونه‌های پژوهش:** آزمودنی‌های پژوهش ۱۸ موش نر از نژاد صحرایی در محدوده وزنی  $20 \pm 21$  گرم و سن ۴ تا ۵ هفته بودند. موش‌ها از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی همدان تهیه شدند. حیوانات در محیطی با درجه حرارت  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت محیط  $5 \pm 5$  درصد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ نگهداری شدند. آب و غذا به صورت آزادانه در اختیار آن‌ها قرار داده شد. موش‌ها براساس میانگین وزن هر قفس، به طور تصادفی به سه گروه شش‌تابی گروه کنترل، گروه تمرین شنای میان‌مدت، و گروه تمرین شنای طولانی‌مدت تقسیم شدند. هر سه سر موش به صورت جداگانه در قفس‌های پلی‌اتیلن ( $23 \times 23 \times 12$  cm<sup>3</sup>) نگهداری شدند. استخر شنای موش‌ها شامل یک وان برای هر گروه تمرینی، به ابعاد  $60 \times 60 \times 100$  سانتی‌متر بود. درجه حرارت آب استخر در محدوده  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد تعیین شد.

**پروتکل پژوهش:** به منظور سازگاری موش‌ها و خو گرفتن آن‌ها با محیط شنا، یک هفته تمرین شنا کردن در نظر گرفته شد؛ بدین صورت که جلسه اول با ۲۰ دقیقه شنا شروع شد، سپس موش‌ها جلسه دوم ۴۰ دقیقه و جلسه سوم ۶۰ دقیقه شنا کردند. برنامه تمرینی در هر دو گروه، شامل ۱۰ هفته، ۵ روز در هفته و یک ساعت شنا در هر جلسه بود. در گروه شنای طولانی‌مدت هر هفته به طور فزاینده، ۳۰ دقیقه به مدت زمان شنای آن‌ها افزوده می‌شد (هر جلسه، پنج دقیقه)، به طوری که از هفته پنجم تا دهم، موش‌ها سه ساعت در هر جلسه شنا می‌کردند (۳۲). در تمام طول اجرای پژوهش، گروه کنترل در قفس نگهداری شده و هیچ نوع فعالیتی نداشتند. یک روز پس از پایان پروتکل تمرین، موش‌ها با گاز اتر بی‌هوش شدند. سپس در شرایط استریل و توسط متخصص آناتومی، قلب آن‌ها از ریشه آئورت جدا و سپس بطن چپ برش زده شد. بافت مورد نظر پس از شست‌وشو با سرم، بلافاصله در میکروتیوب‌هایی با حجم ۲/۵ میلی‌لیتر با برچسب متناسب با موش، وارد نیتروژن مایع شد. بعد از اتمام تشریح و تا شروع هموزن بافت‌ها، همه آن‌ها در دمای  $-80$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**روش‌های آزمایشگاهی:** ارزیابی نهایی بیان ژن، طبق دستورالعمل تکنیک Real Time-PCR انجام گرفت. از سایبرگرین مسترمیکس Ampliqon ساخت دانمارک استفاده شد. برای تعیین غلظت DNA از رنگ‌های فلورسانس استفاده می‌شود، که در این تکنیک متداول‌ترین رنگ، سایبرگرین است که به شیارهای کوچک DNA دورشته‌ای متصل می‌شود و با جذب طول موج ۴۹۸ نانومتر، نور  $522$  نانومتری را به رنگ سبز ساطع می‌کند، سپس به وسیله دستگاه ثبت می‌شود. بنابراین افزایش شدت فلورسنت با غلظت DNA متناسب است. طبق دستورالعمل کیت و بررسی میزان کارایی ژن رفرنس و هدف، برای یک نمونه  $10$  میکرولیتری، ترکیبی از مسترمیکس ( $5$  میکرولیتر)، پرایمر ( $1$  میکرولیتر)، cDNA ( $1$  میکرولیتر) و آب مقطر ( $3$  میکرولیتر) در نظر گرفته شد و میزان بیان ژن با استفاده از روش نسبی، نسبت به ژن رفرنس هیپوگزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز-۱ (HPRT-1) ارزیابی شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در شکل ۱ آمده است. پس از انتقال اطلاعات به نرم‌افزار اکسل، طبق فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  میزان بیان ژن محاسبه شد ( $33$ ). اندازه‌گیری سطح بافتی TAC: اصول کلی این روش براساس ظرفیت ضد اکسایشی محیط است که بتواند کمپلکس TPTZ<sup>2+</sup>، یون فریک را احیا و یون فرس (Fe II) ایجاد کند. در واقع تولید یون فرس سبب افزایش شدت رنگ آبی می‌شود که در طول موج  $593$  جذب می‌دهد. اندازه‌گیری سطح بافتی MDA: اساس این روش واکنش تیوباربیوتوریک اسید (TBA) با چربی‌های پراکسیده است. این اسید، مولکول‌های لیپیدی پراکسیده را در MDA می‌شکند، سپس MDA با TBA واکنش می‌دهد که ماده‌ای تولید می‌کند که با روش اسپکتروفتومتری فلورسنت قابل اندازه‌گیری است. به منظور رسوب دادن به پروتئین‌ها به  $100$  میکرولیتر از سوپرناتانت بافت قلب  $200$  میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید  $20$  درصد اضافه شده، و به مدت  $10$  دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از آن، به مدت  $10$  دقیقه با دور  $3000$  در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شده و به رسوب آن اسید سولفوریک  $0/05$  مول به منظور شست‌وشو اضافه و خارج شد. در ادامه  $200$  میکرولیتر اسید سولفوریک  $0/05$  مول و  $240$  میکرولیتر محلول تیوباربیوتوریک اسید  $0/2$  درصد تهیه و روی رسوب ریخته شد و نمونه‌ها

در طول موج ۴۱۲ نانومتر است، که بدین صورت است که آنزیم گلووتاتیون پراکسیداز دارای ریشه‌های سلنوسیستئین در جایگاه فعال است که هنگام واکنش سبب احیای پراکسیداز می‌شود. گلووتاتیون (GSH)<sup>۲۵</sup> سبب احیای مجدد سلنوسیستئین اکسید شده، جایگاه فعال می‌شود، و به گلووتاتیون اکسید شده (GSSG)<sup>۲۶</sup> تبدیل می‌شود. GSH باقی‌مانده موجب احیای معرف DTNB<sup>۲۷</sup> می‌شود، که رنگ زرد تولید می‌شود که طول موج ۴۱۲ نانومتر قابلیت جذب نور دارد، و میزان رنگ تولید شده متناسب با فعالیت آنزیم GPx است (۳۶).

**تحلیل آماری:** برای دسته‌بندی و تعیین شاخص‌های پراکندگی از آمار توصیفی، به منظور بررسی توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک و برای بررسی تغییرات بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یکسویه و به منظور تعیین گروه‌های متفاوت، از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معناداری برابر و کمتر از ۵ درصد در نظر گرفته شد. همه محاسبات آماری به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام گرفت و برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل ۲۰۱۵ استفاده شد.

به همراه استاندارد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد کردن تیوب‌ها به هر کدام ۳۲۰ میکرولیتر محلول n-بوتانول اضافه شده و بعد از هم زدن (ورتکس) به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۵۰ دور/دقیقه سانتریفیوژ شد. به مقدار ۲۴۰ میکرولیتر از مایع رویی برداشته شده و در پلیت تیره ۹۶ خانه ریخته شد، و در طول موج تحریکی ۵۳۲ نانومتر و طول موج بازتابی ۵۵۵ نانومتر در مقابل بلانک n-بوتانول از طریق دستگاه فلورومتر خوانده شد. محلول‌های استاندارد غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۲ و ۲۰ میکرومولار تترائوکسی پروپان در اسید سولفوریک ۰/۵ بود (۳۴).

اساس اندازه‌گیری نیتریک اکسید (NO) با استفاده از کیت ZellBio GmbH بر پایه اندازه‌گیری توتال نیترات/نیتريت است. ابتدا نیترات (NO<sub>۳</sub><sup>-</sup>) طریق نیترات ردوکتاز به نیتريت (NO<sub>۲</sub><sup>-</sup>) تبدیل می‌شود، سپس معرف‌های گریس با نیتريت (NO<sub>۲</sub><sup>-</sup>) واکنش می‌دهند و ترکیب آزو (AZO) بنفش رنگ تولید می‌شود که در طول موج ۵۴۳ نانومتر قابل اندازه‌گیری است (۳۵). اساس اندازه‌گیری فعالیت گلووتاتیون پراکسیداز (GPx)<sup>۲۴</sup> با استفاده از کیت ZellBio GmbH بر پایه جذب نور از طریق DTNB

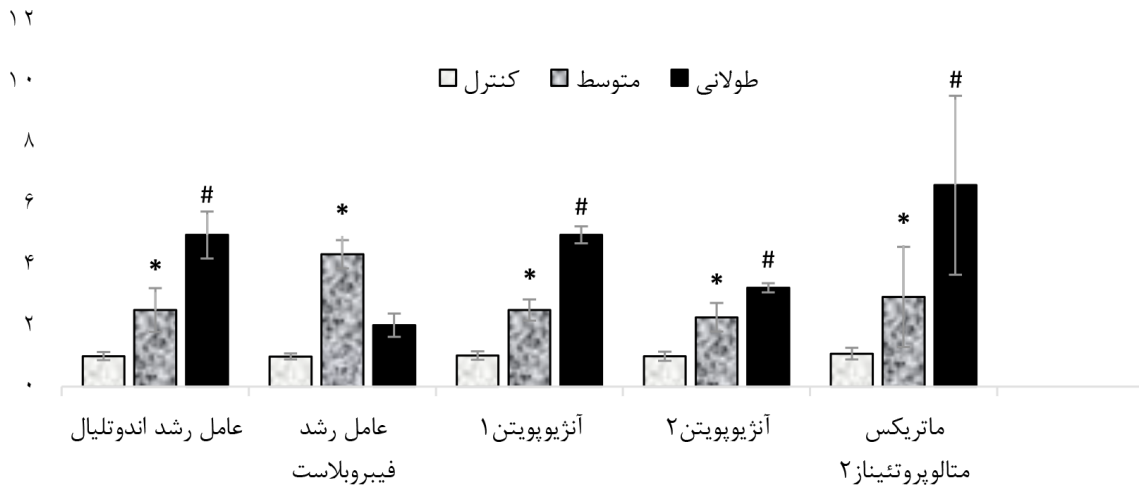
جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار گرفته شده برای بیان ژن‌های مورد نظر

Name	۳-۵ Sequence	Accession number
HPRT-1	F CCTCCTCAGACCGCTTTTCC	NM_012583.2
	R CACTAATCACGACGCTGGGA	
VEGF-B	F GCAACACCAAGTCCGAATG	NM_053549
	R CTTACAGCACTCTCCTTTCT	
FGF-1	F GCCATAGTGAGTCCGAGGACC	NM_012846.1
	R ACCGAGAGGTTCAACCTGCC	
ANGPT-1	F ACAAAGGACGCTGATAACGAC	NM_053546
	R AGTAGTGCCACTTTATCCCAT	
ANGPT-2	F TGGCTGGGCAACGAGTTT	NM_134454.1
	R TGGATCTTCAGCACGTAGCG	
MMP-2	F CCCCTATCTACACCTACACCA	NM_031054
	R GCGATGCCATCAAAGACAATG	

نتایج

به دنبال هفته پنجم تا دهم (هر هفته ۳۰ دقیقه) بیان ژن های VEGF، Ang1&2 و MMP2 در گروه زمان طولانی در مقایسه با هر دو گروه کنترل و شنای متوسط به طور معنادار بیشتر بود (P=۰/۰۰۱) (جدول ۲)، در حالی که بیان ژن FGF این طور نبود. همچنین در مقایسه با هر دو گروه کنترل و شنای متوسط، مقادیر TAC و GPx به طور معنادار کمتر و مقادیر MDA و NO به طور معنادار بیشتر بود (P<۰/۰۵) (جدول ۳).

پس از اجرای ۱۰ هفته شنای استقامتی در گروه با مدت زمان متوسط، مقادیر بیان ژن VEGF، FGF، Ang1&2 و MMP2 در مقایسه با گروه کنترل به طور معنادار بیشتر بود (P=۰/۰۰۱) (شکل ۱). همچنین مقادیر TAC (P=۰/۰۰۱) و GPx (P=۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنادار کمتر بود، در حالی که MDA در این گروه به صورت معناداری بیشتر از گروه کنترل بود (P=۰/۰۰۱) (شکل ۱).



شکل ۱. مقایسه (میانگین ± انحراف استاندارد) مقادیر بیان ژن در بطن چپ موش های صحرایی نر در گروه های کنترل و تمرین شنای متوسط و طولانی مدت ده هفته ای  
\* افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل (P=۰/۰۰۱)، # افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل و متوسط (P=۰/۰۰۱)

جدول ۲. مقادیر (میانگین ± انحراف استاندارد) بیان ژن در بطن چپ موش های صحرایی نر در گروه های کنترل و تمرین شنای متوسط و طولانی مدت ده هفته ای

ژن	گروه ها	اختلاف بین گروهی †		
		کنترل	متوسط	طولانی
عامل رشد اندوتلیال	کنترل	-	۰/۰۰۱* PC=+٪۱۵۱	۰/۰۰۱* PC=+٪۳۹۷
	متوسط	-	-	۰/۰۰۱* PC=+٪۹۸
	طولانی	-	-	-
عامل رشد فیبروبلاست	کنترل	-	۰/۰۰۱* PC=+٪۳۳۸	۰/۰۰۱* PC=+٪۱۰۳
	متوسط	-	-	۰/۰۰۱* PC=+٪۱۱۵
	طولانی	-	-	-

ادامه جدول ۲. مقادیر (میانگین±انحراف استاندارد) بیان زن در بطن چپ موش‌های صحرایی نر در گروه‌های کنترل و تمرین شنای متوسط و طولانی مدت ده هفته‌ای

ژن	گروه‌ها	میانگین±انحراف استاندارد		اختلاف بین گروهی †	
		استاندارد	طولانی	متوسط	کنترل
آنژیوپوپیتین ۱	کنترل	۱/۰۲ ± ۰/۰۵	۰/۶۸۲ PC=+٪۳۸۷	۰/۰۰۱* PC=+٪۱۴۶	-
	متوسط	۲/۵۱ ± ۰/۲۹	۰/۰۰۱* PC=+٪۹۸	-	-
	طولانی	۴/۹۷ ± ۰/۳۱	-	-	-
آنژیوپوپیتین ۲	کنترل	۱/۰۰ ± ۰/۰۶	۰/۰۰۱* PC=+٪۲۲۴	۰/۰۰۱* PC=+٪۱۲۷	-
	متوسط	۲/۲۷ ± ۰/۱۹	۰/۰۰۱* PC=+٪۹۷	-	-
	طولانی	۳/۲۴ ± ۰/۰۶	-	-	-
ماتریکس متالوپروتئیناز ۲	کنترل	۱/۰۸ ± ۰/۰۷	۰/۰۰۱* PC=+٪۵۱۱	۰/۳۶۳ PC=+٪۱۷۲	-
	متوسط	۲/۹۴ ± ۰/۶۷	۰/۰۰۳* PC=+٪۱۲۴	-	-
	طولانی	۶/۶ ± ۱/۱۹	-	-	-

†: تفاوت‌های بین گروهی با استفاده از آزمون تعقیبی توکی، \*: تفاوت معنادار از لحاظ آماری در سطح معناداری (P/۰۵) ≥، PC: درصد تغییر

جدول ۳. نتایج مقادیر (میانگین±انحراف استاندارد) آنتی‌اکسیدان بطن چپ موش‌های صحرایی نر در گروه‌های کنترل و تمرین شنای متوسط و طولانی مدت ده هفته‌ای

متغیر	کنترل	شنای متوسط	شنای طولانی
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (واحد/لیتر)	۲۸۰/۸۶ ± ۶/۷۸۷	۱۷۲/۳۶ ± ۳/۱۰۲*	۱۰۵/۲۸ ± ۶/۷۲۶*#
گلوکاتایون پراکسیداز (واحد/لیتر)	۶۱۸/۷ ± ۱۱/۶۴	۳۱۳/۱ ± ۷/۶۸*	۱۱۲/۴۳ ± ۵/۶۱*#
مالون دی‌آلدئید (میلی‌گرم/لیتر)	۳۷/۱۴ ± ۲/۲۴	۵۶/۸۴ ± ۱/۴۱*	۴۰۷/۶۷ ± ۴/۴۳*#
نیتریک اکساید (میلی‌گرم/لیتر)	۱/۰۵ ± ۰/۱۳	۱/۴۵ ± ۰/۰۶	۲/۷۷ ± ۰/۳*#

مقادیر به صورت میانگین±انحراف معیار، \*: معناداری در مقایسه با گروه کنترل، #: معناداری در مقایسه با گروه شنای متوسط، سطح معناداری

P<۰/۰۵

### بحث و نتیجه‌گیری

زمینه، در گروه شنای متوسط، با افزایش معنادار مقادیر MDA، و کاهش معنادار مقادیر TAC، به نظر می‌رسد در نتیجه فرایند فشار اکسایشی، بیان ژن‌های رگ‌زایی در این گروه، افزایش یافته است. بر همین اساس، ژانویه<sup>۳۰</sup> (۲۰۰۹) اعلام داشت که رگ‌زایی میوکارد از لحاظ زمانی و مکانی با ROS متقارن است (۳۱). در ادامه این یافته‌ها، لِهوکس<sup>۳۱</sup> (۲۰۰۶) بیان کرد که آستانه‌های

قلب به‌عنوان بافت اکسایشی با افزایش فعالیت سوخت‌وسازی حین ورزش، از جمله بافت‌های مستعد آسیب اکسایشی است (۳۰). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که محرک‌های مختلفی چون ایسکمی، گونه‌های بنیان آزاد و فعالیت با شدت و مدت بالا به افزایش مویرگ‌سازی منجر می‌شوند (۳۷). در همین



معینی از کشش چرخه‌ای (۱۰ درصد) سلول‌های اندوتلیال موجب ترشح ROS می‌شوند. در واقع، افزایش اتساع‌پذیری عضله قلبی و برگشت به حالت اولیه، نوعی کشش چرخه‌ای را به وجود می‌آورد، که در طول زمان با پیشرفت فعالیت تکرار می‌شود. او همچنین عنوان کرد که ROS در غلظت‌های کم، به عنوان میانجی در فرایندهای رگ‌زایی درگیر می‌شوند، در چنین شرایطی بیان ژن VEGF، و میزان ترشح آن به عروق کرونری افزایش می‌یابد؛ بنابراین ممکن است ROS، رگ‌زایی ناشی از کشش چرخه‌ای را میانجی‌گری کند (۱۹). بر همین اساس، سیافکس<sup>۳۲</sup> (۲۰۰۱) افزایش mRNA VEGF و mRNA FGF عضله دیافراگم موش را متعاقب تهویه فعال گزارش داد، به طوری که در حیوانات با دیافراگم فلج شده این افزایش مشاهده نشد (۳۸).

اندوتلیوم نقش بسیار حیاتی در تنظیم اتساع و انقباض عروق ایفا می‌کند؛ به این صورت که هنگام اجرای فعالیت ورزشی، به دلیل انقباضات عضلانی و رگ‌تنگی‌های ناشی از آن و نیز افزایش سرعت جریان خون، تنش برشی<sup>۱</sup> وارد شده بر جدار داخلی عروق زیاد شده و با تولید نیتریک اکسید، سبب شروع آبشار رشد عروقی و پدیده رگ‌زایی می‌شود (۳۹). همسو با این یافته‌ها، گروه طولانی‌مدت در این پژوهش، افزایش معنادار بیان ژن VEGF را پس از ۱۰ هفته‌شنای فزاینده نشان دادند. پس از مشاهده افزایش معنادار NO در این گروه، به نظر می‌رسد هیپوکسی ناشی از سه ساعت شنای استقامتی، مقادیر بیان ژن VEGF را افزایش داده است، زیرا یافته‌های گوین<sup>۳۳</sup> و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که NO از طریق افزایش رونویسی VEGF با افزایش نیمه‌عمر mRNA VEGF در فرایند رگ‌زایی درگیر است (۴۰). در واقع، فشار برشی ناشی از ورزش شدید، از طریق فعال‌سازی کانال‌های پتاسیمی، مقادیر NO را افزایش می‌دهد که متعاقب با آن، بیان VEGF نیز ازدیاد می‌یابد (۳۹). علاوه بر این، VEGF می‌تواند سبب فعال‌سازی MMP2 شود که نقش مهمی در رگ‌زایی دارد و می‌تواند کلاژن IV غشای پایه و کلاژن غیرطبیعی نوع I و II (اجزای اصلی از ماتریکس خارج سلولی قلبی) را کاهش دهد (۱۷). همراستا با این مطالعه، کارملی<sup>۳۴</sup> (۲۰۰۵) اعلام داشته است که ۲ هفته تمرین استقامتی با ۷۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه<sup>۳۵</sup> در مقایسه با ۵۰ درصد VO<sub>2</sub>max میزان بیان ژن MMP2 بیشتری در

موش‌های صحرایی در پی دارد (۴۱). با مشاهده افزایش نسبت Ang-1 به Ang-2 در هر دو گروه تمرینی، به نظر می‌رسد که پس از افزایش معنادار بیان ژن‌های VEGF و MMP-2، ابتدا رگ‌زایی رخ داد، سپس با افزایش نسبت Ang-1/Ang-2، سلول‌های اندوتلیال استحکام بیشتری یافتند، البته دلیل اصلی افزایش این نسبت، بیان بیشتر ژن Ang-1 است، زیرا Ang-1 در هر دو گروه نیز در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری نشان داد. اخیراً، رابطه دقیق بین VEGF و Ang در فرایند رگ‌زایی دیده شده است، به طوری که ژن Ang شروع‌کننده مویرگ‌سازی نیست، اما سبب تعامل بین سلول‌های اندوتلیال می‌شود. دینگ<sup>۳۶</sup> و همکاران (۲۰۰۴) نیز افزایش میزان بیان ژن آنژیوپوین-۲ و VEGF را موش‌های صحرایی پس از ۶ هفته تمرین هوازی عنوان کردند (۲۶). زمانی که مقادیر بیان ژن Ang-1 بیشتر از Ang-2 شود، سبب استحکام بیشتر سلول‌های اندوتلیال شده و در صورت افزایش نسبت Ang-2 به Ang-1، جوانه زدن و شروع رگ‌زایی تسهیل می‌شود. لایود و همکاران (۲۰۰۳)، مشاهده کردند که دویدن روی نوار گردان با سرعت ۲۰ تا ۲۵ متر در دقیقه پس از ۲۴ روز، نسبت Ang-2/Ang-1 را در عضله کند و تند انقباض موش افزایش می‌دهد که این افزایش اغلب ناشی از افزایش Ang-2 است (۲۵). گوین عدم تغییر در مقادیر mRNA FGF متعاقب مهار eNOS، را به دلیل عدم تغییر mRNA VEGF حین ورزش گزارش داد (۴۰). عنوان شده است که FGF سبب تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال می‌شود و نیز بیان ژنی NO و VEGF را افزایش می‌دهد. پاسخ به این پرسش که آیا هیپوکسی و فشار برشی سبب تغییر در میزان بیان ژن FGF می‌شود یا خیر، هنوز در ابهام است، اما به این دلیل که این عامل در سلول‌های اندوتلیال به صورت ذخیره وجود دارد، ممکن است هنگام هیپوکسی و فشار برشی به داخل سرم افزایش یابد. همچنین انتظار می‌رود سازوکارهای دیگری مانند سلول‌های ماهواره‌ای و آسیب بافتی سبب افزایش بیان ژن FGF شود (۴۰). در گروه تمرینی با شنای میان‌مدت همانند گروه طولانی‌مدت، مقادیر MDA افزایش و مقادیر TAC و GPX کاهش داشته است، که ممکن است از مسیری مستقل از هیپوکسی، بیان ژن VEGF را افزایش دهد.

**پی نوشت ها**

- 1 Reactive oxygen species
- 2 Superoxide dismutase
- 3 Urso
- 4 Malondialdehyde
- 5 Vascular endothelial growth factor
- 6 Van
- 7 Nitric oxide
- 8 Fibroblast growth factor
- 9 Protein kinase B
- 10 Endothelial nitric oxide synthases
- 11 Nuclear factor kappa B
- 12 extracellular-signal-regulated kinase
- 13 Matrix metalloproteinases
- 14 Rivilis
- 15 Kwak
- 16 Angiopoiteine
- 17 Lioyd
- 18 Nakamura
- 19 Glutathione peroxidase
- 20 Total antioxidant capacity
- 21 Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
- 22 Tripyridyltriazine.
- 23 Thiobarbituric acid
- 24 Glutathione peroxidase
- 25 Glutathione
- 26 glutathione-disulfide
- 27 Dithio-Bis (2-Nitrobenzoic Acid)
- 28 One-way ANOVA
- 29 Tukey
- 30 Zhao
- 31 Lehoux
- 32 Siafakas
- 33 Gavin
- 34 Carmeliet
- 35 VO2max
- 36 Ding
- 37 Catalase

**منابع**

1. Rinaldi B, Corbi G, Boccuti S, Filippelli W, Renzo G, Leosco D, et al. Exercise training affects age-induced changes in SOD and heat shock protein expression in rat heart. *Experimental gerontology*. 2006;41(8):764-70.
2. Tofler GH, Muller JE, Stone PH, Forman S, Solomon RE, Knatterud GL, et al. Modifiers of timing and possible triggers of acute myocardial infarction in the Thrombolysis in Myocardial Infarction Phase II (TIMI II) Study Group. *Journal of the American College of Cardiology*. 1992;20(5):1049-55.
3. Kasap S, Gönenç A, Şener DE, Hisar İ. Serum Cardiac Markers in Patients with Acute Myocar-

در تأیید این مطلب، ناظم و همکاران (۱۳۹۶) پس از مشاهده عدم افزایش آنزیم‌های ضد اکسایش (CAT، GSH و GPx) در موش‌های انفارکته شده، عنوان کردند که مداخله ورزش با شدت بالا، برای ایجاد سازگاری ضد اکسایشی مناسب نیست (۴۲). همسو با این یافته‌ها، اورسو (۲۰۰۳) اظهار کرده است که اجرای شنای طولانی مدت در مقایسه زمان کوتاه یا متوسط، مقادیر بیشتری از MDA در بافت قلب موش مشاهده می‌شود (۵). بر همین اساس، ذالفقاریدینی (۱۳۹۶) نیز در پژوهش خود عنوان کرد که مکمل دهی ضد اکسایشی در موش‌های صحرایی قادر است از طریق افزایش آنزیم GPx و TAC، سوپراکسیدهای نشت شده از میتوکندری (به دنبال اجرای تمرین وامانده ساز) را احیا کند و بدین صورت از میزان فشار اکسایشی در بافت قلب بکاهد (۴۳). بنابراین کاهش مقادیر ظرفیت آنتی اکسیدانی تام و آنزیم‌های ضد اکسایشی (مانند گلوکوتایون و سوپراکسید دیسموتاز)، قادر است از مسیری مستقل از هیپوکسی، ایسکمی و فشار برشی (آبشار فسفوریلاسیون-دفسفوریلاسیون)، بیان ژن‌های درگیر در فرایند رگ زایی را افزایش دهد. در پایان، با توجه به اینکه این پژوهش توسط آزمودنی‌های یکسان و در محیط کاملاً استاندارد آزمایشگاهی اجرا شد، هیچ محدودیتی برای آزمونگر وجود نداشت.

در نهایت، می‌توان گفت که ممکن است اجرای ۱۰ هفته شنای میان مدت، از طریق فشار اکسایشی، و اجرای ۱۰ هفته شنای طولانی مدت، از طریق فشار برشی، می‌توانند به رخداد فرایند رگ زایی منجر شوند. بر این اساس، پیشنهاد می‌شود بررسی مقادیر ژن‌ها و دیگر عوامل درگیر در فرایند رگ زایی، بر روی دستگاه نوار گردان (به منظور کنترل دقیق تر شدت تمرین)، و نیز روی موش‌های دارای بیماری‌های خاص همچون دیابت و سندروم متابولیک، اجرا شود.

**تشکر و قدردانی**

بدین وسیله از همه کارکنان و مسئولان آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده علوم پزشکی همدان و تمامی افرادی که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند، سپاسگزاریم.

15. Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1993;69(5):508-17.
16. Kroon ME, Koolwijk P, van der Vecht B, van Hinsbergh VW. Hypoxia in combination with FGF-2 induces tube formation by human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix: involvement of at least two signal transduction pathways. *Journal of cell science*. 2001;114(Pt 4):825-33.
17. Friehs I, Barillas R, Vasilyev NV, Roy N, McGowan FX, del Nido PJ. Vascular endothelial growth factor prevents apoptosis and preserves contractile function in hypertrophied infant heart. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I290-5.
18. Rivilis I, Milkiewicz M, Boyd P, Goldstein J, Brown MD, Egginton S, et al. Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch- versus shear stress-induced angiogenesis. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;283(4):H1430-8.
19. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovascular research*. 2010;85(3):413-23.
20. Mohamad HE, Askar ME, Hafez MM. Management of cardiac fibrosis in diabetic rats; the role of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gamma) and calcium channel blockers (CCBs). *Diabetology & metabolic syndrome*. 2011;3(1):4.
21. Westermann D, Rutschow S, Jager S, Linderer A, Anker S, Riad A, et al. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes*. 2007;56(3):641-6.
22. Kwak HB, Kim JH, Joshi K, Yeh A, Martinez DA, Lawler JM. Exercise training reduces fibrosis and matrix metalloproteinase dysregulation in the aging rat heart. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(3):1106-17.
23. Yung YC, Chae J, Buehler MJ, Hunter CP, Mooney DJ. Cyclic tensile strain triggers a sequence of autocrine and paracrine signaling to regulate angiogenic sprouting in human vascular cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(36):15279-84.
24. Gustafsson T, Rundqvist H, Norrbom J, Rulman E, Jansson E, Sundberg CJ. The influence of physical training on the angiotensin and dial infarction: Oxidative Stress, C-Reactive Protein and N-Terminal Probrain Natriuretic Peptide. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2007;41(1):50-7.
4. Tompkins AJ, Burwell LS, Digerness SB, Zaragoza C, Holman WL, Brookes PS. Mitochondrial dysfunction in cardiac ischemia-reperfusion injury: ROS from complex I, without inhibition. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1762(2):223-31.
5. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003;189(1-2):41-54.
6. Jolazadeh T, Dabidi Roshan V, S. M. Apoptosis in cardiac cells in response to acute exercise protocol: An experimental protocol in the sedentary rats. . *Sport Sciences Research Institute of Iran*. 2010;11:27-36.
7. Ranjbar K, Noorshahi M, Hedayati M, H. Tc. Evaluation of serum levels of angiogenic factors in response to a session of activity Submaximal prolonged sedentary men. *Physio Pharm*. 2011;15:124-32.
8. Ushio-Fukai M, Nakamura Y. Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy. *Cancer letters*. 2008;266(1):37-52.
9. Taheri chadorneshin H, Noorshahi M RK. VEGF's response to practice and its relation to VO2max. *Life Sciences Sports*. 2011;7:59-75.
10. Noorshahi M, Frahmand F, M. B. The effect of a cinnamon extract supplement on VEGF and endostatin response of endometrial muscle after one session of exhaustive activity in elderly rats. *Phys Pharm*. 2015(1):170-8.
11. Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VF, et al. A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2008;104(4):1006-13.
12. Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(3):659-66.
13. Lee HJ, Koh GY. Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;304(2):399-404.
14. Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Miyauchi T. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;291(3):H1290-8.

34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1):248-54.
35. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1998;274(2):177-88.
36. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1967;70(1):158-69.
37. Tang K, Xia FC, Wagner PD, Breen EC. Exercise-Induced VEGF Transcriptional Activation in Brain, Lung and Skeletal Muscle. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2010;170(1):16-22.
38. Sifakas NM, Jordan M, Wagner H, Breen EC, Benoit H, Wagner PD. Diaphragmatic angiogenic growth factor mRNA responses to increased ventilation caused by hypoxia and hypercapnia. *The European respiratory journal*. 2001;17(4):681-7.
39. Loufrani L, Henrion D. Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)-induced dilation and remodeling in resistance arteries. *Medical & biological engineering & computing*. 2008;46(5):451-60.
40. Gavin TP, Westerkamp LM, Zwetsloot KA. Soleus, plantaris and gastrocnemius VEGF mRNA responses to hypoxia and exercise are preserved in aged compared with young female C57BL/6 mice. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2006;188(2):113-21.
41. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. 2003;9(6):653-60.
42. Nazem F, Hokkamian E, Ranjbar K, Nazari A. The Effects of Aerobic Training on Renal Oxidative Stress in Myocardial Infarction Rats. *Sport Physiology*. 2017;9(34):79-94.
43. Zolfeghar Didani H, Zolfeghar Didani MR, Asri Rezai S, Ghaderi Pakdel F. Effect of Short Term Nano Selenium Supplementation and Exhausted Training in Oxidation Indices on Heart Tissue of Male Rats. *Sport Physiology*. 2017;9(35):49-62.
44. VEGF-A systems in human skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2007;103(3):1012-20.
25. Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL. Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;284(5):H1668-78.
26. Ding YH, Luan XD, Li J, Rafols JA, Guthinkonda M, Diaz FG, et al. Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia/reperfusion injury in stroke. *Current neurovascular research*. 2004;1(5):411-20.
27. Nakamura K, Kitaoka K, Tomita K. Effect of eccentric exercise on the healing process of injured patellar tendon in rats. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 2008;13(4):371-8.
28. Kang YJ. The Antioxidant Function of Metallothionein in the Heart. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1999;222(3):263-73.
29. Giral P, Ratzu V, Couvert P, Carrie A, Kon-tush A, Girerd X, et al. Plasma bilirubin and gamma-glutamyltransferase activity are inversely related in dyslipidemic patients with metabolic syndrome: relevance to oxidative stress. *Atherosclerosis*. 2010;210(2):607-13.
30. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(10):1150-2.
31. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Reactive oxygen species promote angiogenesis in the infarcted rat heart. *International Journal of Experimental Pathology*. 2009;90(6):621-9.
32. Kilic M, Ulusoy O, Cirrik S, Hindistan IE, Ozkaya YG. Effect of exercise intensity on cerebrospinal fluid interleukin-6 concentration during recovery from exhaustive exercise in rats. *Acta physiologica Hungarica*. 2014;101(1):21-31.
33. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25(4):402-8.