دانشگاه شهید بهشتی
فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی

بهار و تابستان ۹۹، دوره ۱۳، شماره ۱، صفحه های: ۱۱۰-۱۰۰

تأثیر شش هفته تمرین تناوبی شدید بر مقادیر بیان ژن MMP-9، eNOS و نسبت VEGF به COL-18 در موش‌های صحرایی مبتلا به انفارکتوس میوکارد

سارا کربلایی‌فر[۱]، عباسعلی گایینی[۲]، محمدرضا کردی[۲]، رضا نوری*[۱]، پدرام قربانی[۱]

[۱]دانشکدۀ علوم اجتماعی- رفتاری، گروه علوم ورزشی، پردیس بین‌المللی کیش، دانشگاه تهران، کیش، ایران.
[۲]دانشکدۀ تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
*نویسنده مسئول: رضا نوری، تلفن: ۰۷۶۴۴۴۳۰۰۵۶، رایانامه: nuri_r7@ut.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۱۶ ویرایش مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۰۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۱۳

چکیده

هدف: انفارکتوس میوکارد مرگ سلولی بخشی از عضلۀ قلب به‌علت ازبین‌رفتن جریان خون است. فرایند مولکولی افزایش تراکم مویرگی در پاسخ به فعالیت هنوز معلوم نیست. لذا، این پژوهش با هدف ارزیابی اثر ۶ هفته تمرین تناوبی شدید بر مقادیر MMP-9 و eNOS و نسبت VEGF به COL-18 در موش‌های صحرایی مبتلا به انفارکتوس میوکارد انجام گرفت.

روش‌ها: ۱۲ سرموش صحرایی نر نژاد ویستار ۱۰ هفته‌ای با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم در دو گروه تمرین تناوبی شدید (۶۰ دقیقه دویدن تناوبی روی نوارگردان و هر تناوب شامل ۴ دقیقه با شدت ۸۵-۹۰ درصد VO_{2max} و ۲ دقیقه بازیافت فعال با شدت ۵۰-۶۰ درصد VO_{2max}، ۴ روز در هفته و به‌مدت ۶ هفته) و گروه کنترل (بدون مداخلۀ تمرین) قرار گرفتند. بعد از آن، موش‌های صحرایی به انفارکتوس میوکارد مبتلا شدند و بیان ژن‌های MMP-9 و eNOS و VEGF و COL-18 با استفاده از Real PCR time بررسی شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 به روش آماری t مستقل تجزیه‌وتحلیل شد ($P\leq$۰/۰۵).

نتایج: نتایج آزمون تی مستقل نشان داد مقادیر MMP-9 گروه تمرین تناوبی شدید (۳/۵۴۱ mg/ml) به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل (۱/۰۰۲ mg/ml) (P=۰/۰۱۲) و مقادیر eNOS گروه تمرین تناوبی شدید (۴/۲۳ mg/ml) نیز به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل (۳/۶۸ mg/ml) است (P=۰/۰۱۴)، اما افزایش نسب VEGF به COL-18 گروه تمرین تناوبی شدید (۱/۸۵۶ mg/ml) نسبت به کنترل (۱/۲۴۵ mg/ml) معنادار نیست (P=۰/۲۶۳).

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، ۶ هفته تمرین تناوبی شدید باعث افزایش MMP-9 و eNOS و نسبت VEGF به COL-18 و بهبود عملکرد قلبی در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار پس از وقوع انفارکتوس میوکارد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تمرین ورزشی، رگ‌سازی، سکتۀ قلبی.

مقدمه

بیماری‌های قلبی و عروقی یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ در جهان محسوب می‌شود و آمار مبتلایان به این بیماری روزبه‌روز در حال افزایش است. انفارکتوس میوکارد (MI)[۱] زمانی رخ می‌دهد که خون‌رسانی به سلول‌های قلبی در کوتاه‌مدت مختل و به‌طور متوسط ۴۰ تا ۵۰ درصد رگ‌ها بسته شود. وسعت و شدت بیماری در افراد مختلف فرق می‌کند و بسته به درگیری رگ‌ها، وسعت آن متغیر است [۱]. ایسکمی ایجادشده در اثر سکتهٔ قلبی باعث غیرعادی‌شدن عملکرد قلب و آریتمی می‌شود. بطن چپ بزرگ‌تر و در نتیجه تراکم مویرگی آن کمتر می‌شود. کاهش تراکم مویرگی، سلول‌های عضلهٔ قلبی را با خطر مرگ آپوپتوزی مواجه می‌کند [۲].

عوامل گوناگونی از جمله هایپوکسی، نیروهای همودینامیکی، متابولیت‌ها، اتساع‌کننده‌های عروق، انقباض عضلانی، برخی سایتوکاین‌ها و انواع کشش، بر امکان ایجاد عروق جدید در فرایندی به نام آنژیوژنز در بافت قلب مؤثر است، لذا رگ‌سازی مجدد در بافت قلب، همچنین افزایش درصد خون تزریقی از قلب یا کسر تخلیه (EF)[۲] و افزایش درصد کوتاه‌شدن الیاف عضلات بطن چپ یا کسر کوتاه‌شدگی بطن چپ (FS)[۳] برای ارتقای عملکرد قلبی و عروقی بیماران، مزیتی سازشی به‌شمار می‌رود. بنابراین، سنجش تعامل بین عوامل محرک آنژیوژنز و عوامل بازدارندهٔ آن در شرایط گوناگون به یافتن روشی مؤثر در افزایش فرایند آنژیوژنز و در نهایت ارتقای کیفیت بیماران مبتلا به سکتهٔ قلبی کمک می‌کند [۳].

عامل رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF)[۴]، به‌منزلهٔ قوی‌ترین و مهم‌ترین عامل مؤثر بر آنژیوژنز، باعث افزایش مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیال و تشکیل شبکهٔ عروقی می‌شود و برای تمایز سلول‌های آندوتلیال و برای جوانه‌زدن مویرگ‌های جدید از عروق قبلی (آنژیوژنز) هنگام رشد و توسعهٔ شبکهٔ مویرگی ضروری است [۴].

کلاژن ۱۸ (COL-18) مهم‌ترین پروتئین ماتریکس خارج سلولی و پیش‌ساز قوی اندوستاتین[۵] است. اندواستاتین قوی‌ترین بازدارندهٔ آنژیوژنز است و باعث کاهش تکثیر و افزایش آپوپتوز سلول‌های اندوتلیالی می‌شود. اندوستاتین به گیرنده‌های عامل آنژیوژنیVEGF پیوند می‌خورد و مانع از تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی و در نهایت مانع رشد شبکهٔ مویرگی می‌شود [۵، ۶].

ماتریکس متالوپروتئازها یا MMPها[۶] پروتئین‌هایی است که باعث تجزیهٔ غشای پایهٔ عروق قبلی و تهاجم و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال می‌شود [۵]. متالوپروتئین‌های ماتریکس تهاجم سلول‌های آندوتلیالی را از غشای پایه و ورودشان به بافت فاقد عروق را در پاسخ به محرک عروق‌زایی تسهیل می‌کند. MMP را سلول‌های فیبروبلاست و سلول‌های التهابی و سلول‌های اپی‌تلیال و اندوتلیال ترشح می‌کند. نقش آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئاز در فرایند آنژیوژنز بسیار برجسته است. برای تکثیر مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی، ضروری است که ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه هضم شود. علاوه‌بر این، باید پیوندهای بین سلولی نیز از هم گسیخته شود. این کار با خانوادهٔ بزرگ ماتریکس متالوپروتئازها (TIMP) انجام می‌شود. TIMP مهارکنندهٔ متالوپروتئاز است و سبب مهار هر دو شکل فعال و غیرفعال MMP می‌شود [۵].

eNOS منبع اصلی تولید نیتریک اکساید در سلول‌های اندوتلیالی عروق است و هنگام فعالیت ورزشی و در پاسخ به جریان خون زیاد یا تنش برشی[۷] فعال می‌شود. هایپوکسی باعث فعال‌شدن eNOS و در نهایت تولید نیتریک اکساید (NO) از ال- آرژنین توسط سلول‌های گوناگون می‌شود. در مراحل اولیهٔ آنژیوژنز، تنظیم افزایشی VEGF و VEGFR-2 به تنش برشی و آزادسازی NO وابسته است [۵، ۶].

آنژیوژنز سازوکاری سازشی است که تحت تأثیر عوامل گوناگونی تشدید یا سرکوب می‌شود. نقش فعالیت بدنی منظم در سلامتی به‌خوبی اثبات شده است و به‌تازگی، تمرین

تناوبی شدید (HIIT)[۸] با حداقل صرف زمان، برای غلبه بـر مشکل فرصت شرکت در تمرین و در نتیجه افزایش فعالیت بدنی و میزان سلامت این افراد توصیه شده است. این تمرین محرکی قوی برای سازگاری‌های قلبی- عروقی و عضلانی است و باعث افزایش اکسیژن مصرفی بیشینه (VO_{2max})، سوخت‌وساز، افزایش عملکرد ورزشی، کاهش استفاده از کربوهیدرات و اتکا به چربی، بهترشدن عملکرد انسولین، کاهش فشارخون و در بیماران قلبی و پرفشاری‌خون باعث بهترشدن آمادگی قلبی- عروقی می‌شود. به‌تازگی نیز شیوه‌ای تمرینی در ایجاد آنژیوژنز قلبی اهمیت یافته است. در ارتباط با تأثیر فعالیت‌های استقامتی بر فرایند آنژیوژنز، قبلاً مطالعات گسترده‌ای انجام شده است که اغلب به تأثیر مثبت فعالیت‌های استقامتی بر آنژیوژنز اشاره دارد [۷، ۸].

در این بین، به تمرین تناوبی شدید و تأثیر آن بر فرایند آنژیوژنز کمتر توجه شده و به‌نظر می‌رسد تنها در یک پژوهش تأثیر این شیوهٔ تمرینی بر عوامل آنژیوژنی و آنژیواستاتیکی مطالعه شده است که در آن نیز عوامل محرک و عوامل بازدارنده و گیرنده‌های مؤثر در این فرایند هم‌زمان و نیز سازوکار احتمالی تأثیرگذاری تمرین تناوبی شدید بر آنژیوژنز یک‌جا بررسی نشده است [۹].

در رابطه با HIIT گزارش شده است هنگام HIIT، هایپوکسی ایجاد می‌شود و این هایپوکسی ممکن است موجب افزایش سطوح میوگلوبین نیز شود [۱۰، ۱۱]. همچنین، رابطهٔ مثبت و معناداری بین HIIT و نیروی کشش دیده شده است [۱۲]. بورگومستر و همکاران [۱۳] بیان می‌کنند HIIT ممکن است سازگاری‌های عضلانی، به‌ویژه کاهش تخریب کراتین فسفات و افزایش گلیکوژن را در پی داشته باشد. روداس و همکاران [۱۴] نیز بهبود عملکرد آنزیم‌های گلیکولیزی را در نتیجهٔ انجام HIIT گزارش داده‌اند. ظرفیت بافری عضلات و تنظیم یونی نیز ممکن است در نتیجهٔ HIIT بهبود یابد [۱۳، ۱۵]. همچنین، HIIT باعث افزایش نیتریک اکساید در عضلهٔ قلبی بیماران قلبی می‌شود. نیتریک اکساید اتساع‌کنندهٔ عروقی قوی است [۱۶]. این تمرینات ممکن است موجب افزایش هورمون‌های آنابولیکی از قبیل هورمون رشد (GH) و عامل رشد شبه‌انسولینی (IGF-1)[۹] در مدت زمان کوتاهی شود [۱۷]. همچنین، در پژوهشی در ارتباط با سازگاری‌های سوخت‌وسازی عضله با HIIT به افزایش میزان آدنوزین اشاره شده است [۱۸]. مقدار فیبرینوژن که از عوامل خطرزای بیماری‌های قلبی و عروقی است نیز تحت تأثیر این شیوهٔ تمرینی قرار می‌گیرد [۱۹]. سازوکار تأثیر کشش بر فرایند آنژیوژنز به نقش MMP مرتبط است. در این زمینه، نتایج متناقضی مطرح شده است. نظری و همکاران [۲۰] در پژوهش خود گزارش کردند، هنگام HIIT عضلات در طولی بلندتر از طول استراحتی قرار می‌گیرد و این کشش سطوح MMP را افزایش می‌دهد. در مقابل، دانزینگ و همکاران [۲۱] به عدم‌تغییر MMP در پاسخ به تمرین با شدت زیاد اشاره دارند.

با توجه به مطالب ارائه‌شده در ارتباط با عوامل مؤثر بر عروقی‌شدن عضلات اسکلتی و قلبی هنگام فعالیت ورزشی که عبارت بود از هایپوکسی، نیروهای همودینامیکی، متابولیت‌ها، اتساع‌کننده‌های عروقی، سایتوکاین‌ها و انواع کشش، و نتایج تحقیقات گذشته مبنی بر رابطهٔ مثبت و معنادار بین تمرین تناوبی خیلی شدید و این عوامل، معلوم می‌شود تمرین تناوبی شدید در بسیاری از موارد باعث دگرگونی‌های مثبتی در متغیرهای فیزیولوژیایی می‌شود که هر کدام به‌نوعی در سلامتی انسان مؤثر است. اما اینکه به‌کارگیری تمرین تناوبی شدید باعث تغییرات اصلی مؤثر بر آنژیوژنز مانند افزایش MMP-9 و eNOS و در پی آن VEGF و کاهش COL-18 می‌شود، پرسشی است که این پژوهش می‌کوشد بدان پاسخ دهد؛ همچنین، آیا تمرین تناوبی شدید باعث رگ‌زایی در بیماران مبتلا به سکتهٔ قلبی می‌شود و MMP-9و eNOS و VEGF را گسترش می‌دهد و COL-18 پیش‌ساز آندوستاتین را مهار می‌کند و عملکرد قلب را با رگ‌زایی مجدداً فزایش می‌دهد؟

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش

در این پژوهش توسعه‌ای، ۱۲ سرموش صحرایی نر نژاد ویستار ۱۰ هفته‌ای به‌صورت تصادفی به دو گروه ۶ تایی کنترل و تجربی تقسیم شدند. موش‌های صحرایی در قفس‌های مجزا با دسترسی آزاد به آب و بسته‌های غذایی (به‌صورت پلت) با توجه به اصول مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی و طبق چرخهٔ ۱۲ ساعت خواب و بیداری نگهداری شدند. در ادامه، موش‌های صحرایی تحت عمل جراحی قرار گرفتند و شریان کرونری نزولی سمت چپ (LAD) آن‌ها مسدود شد. به‌این ترتیب، رت‌ها به انفارکتوس میوکارد شدید مبتلا شدند [۲۲]. برای اطمینان از مبتلاشدن به MI، موش‌های صحرایی به‌صورت بی‌هوش اکوکاردیوگرافی داپلر شدند (با مارک جی ای هلس کر[۱۰]، ساخت آمریکا). طی این فرایند قطر بطن چپ در پایان دیاستول (LVDd)، قطر بطن چپ در پایان سیستول (LVDs)، حجم پایان دیاستولی (EDV) و حجم پایان سیستولی (ESV) بررسی شد. کسر کوتاه‌شدگی بطن چپ (FS) و کسر تخلیهٔ بطن چپ (FE) نیز به‌صورت نسبی طبق فرمول‌های زیر محاسبه شد [۲۲]:

$$EF = (LVDd2 - LVDs2)/LVDd2$$
$$FS = ((LVDd – LVDs)/LVDd)*100$$

موش‌های صحرایی با FS≤۳۵ درصد موش‌های صحرایی مبتلا به MI، برای این مطالعه انتخاب شدند [۲۲].

پروتکل پژوهش

موش‌های صحرایی مبتلا به MI به‌مدت ۲ هفته دورهٔ بازیافت بعد از جراحی باز قلب را طی کردند. در هفتهٔ سوم و چهارم، موش‌های صحرایی با نوارگردان (با مارک دانش سالار ایرانیان، ساخت ایران) با راه‌رفتن آرام روی آن با سرعت ۵ متر در دقیقه و به‌مدت ۵ دقیقه در روز و ۴ روز در هفته آشنا شدند. در این مرحله، تمامی رت‌ها قادر به انجام فعالیت بودند و هیچ‌گونه تلفاتی نداشتند. در پایان هفتهٔ چهارم، VO_{2max} رت‌ها با آزمون فعالیت ورزشی بیشینه، مطابق با فرمول و جدول مندرج در پژوهش مورتن و همکاران [۲۳]، و ویسلوف و همکاران [۲۴] و برای برآورد سرعت اولیهٔ دویدن موش‌های صحرایی اندازه‌گیری شد.

سرعت دویدن هر موش صحرایی روی نوارگردان با توجه به VO_{2max} آن به‌صورت انفرادی محاسبه شد. پس از آن موش‌های صحرایی به‌مدت ۲ روز استراحت کردند. در نهایت، موش‌های صحرایی زنده‌مانده و مبتلا به انفارکتوس میوکارد، تصادفی به دو گروه تمرین تناوبی شدید و کنترل تفکیک شدند و پروتکل تمرینی اجرا شد [۲۳، ۲۴].

موش‌های صحرایی گروه تجربی در تمرین تناوبی شدید (به‌عنوان تمرین روز دنیا که تأثیر آن بر متغیرهای مورد نظر در این پژوهش کمتر بررسی شده است)، ۴ روز در هفته، به‌مدت ۶ هفته و هر جلسه به‌مدت ۶۰ دقیقه به‌صورت دویدن متناوب روی نوارگردان فعالیت کردند. هر تناوب کاری شامل ۴ دقیقه دویدن با شدت ۸۵-۹۰ درصد VO_{2max} و ۲ دقیقه بازیافت فعال با شدت ۶۰-۵۰ درصد VO_{2max} بود [۲۵]. در صورت امتناع از دویدن، پژوهشگر با ضربهٔ خودکار به نوارگردان موش‌های صحرایی را وادار به دویدن می‌کرد. رت‌ها قبل از شروع فاز اصلی تمرین، به‌مدت ۸ دقیقه با سرعت ۵ متر بر دقیقه روی نوارگردان به‌شکل راه‌رفتن، در برنامهٔ گرم‌کردن فعالیت می‌کردند. در مقابل، موش‌های صحرایی گروه کنترل (مبتلا به انفارکتوس میوکارد) هیچ تمرینی انجام ندادند [۲۵].

روش‌های آزمایشگاهی

پس از گذشت ۶ هفته، سرانجام، پس از ۲ روز استراحت، برای تشریح ابتدا موش‌های صحرایی با کتامین (۱۵۰ kg/mg) و زایلازین (۱۵ kg/mg) بی‌هوش شدند. سپس، به

پشت روی تخته تشریح خوابانده شدند و دست و پاها کشیده و به‌حالت صلیبی بسته شد. در نهایت، پس از شکافتن و کنارزدن قفسهٔ سینه، عضلهٔ قلب به‌طور کامل جدا شد. در نهایت، بطن چپ عضلهٔ قلب برای سنجش مقادیر RNA ژن‌های MMP-9 و eNOS و VEGF و COL-18 به‌عنوان پیش‌ساز قوی اندوستاتین در میکروتیوب‌های جداگانه قرار گرفت و برای تجزیه‌وتحلیل آزمایشگاهی به‌روش Real time PCR به فریزر ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد انتقال یافت.

در پژوهش حاضر، برای بررسی بیان mRNA ژن‌های MMP-9و eNOS و VEGF و COL-18 از روش PCR Time Real استفاده شد. در این روش، ابتدا RNA از بافت بطن چپ موش‌های صحرایی مورد مطالعه استخراج و پس از سنتز cDNA از سایبر میکس ریل تایم برای اجرای روش PCR-RTاستفاده شد. در پژوهش حاضر، برای طبیعی‌سازی نتایج PCR-RT از ژن مرجع بتا اکتین، همچنین برای آنالیز کمّی داده‌های PCR Time Real از روش دلتا دلتا سی‌تی (ct ΔΔ) استفاده شد.

بررسی میزان بیان ژن‌های MMP-9 و eNOS و VEGF و COL-18 در نمونه‌های گروه تجربی و گروه کنترل انجام گرفت (با کیت آزمایشگاهی مارک بیونر[۱۱]، ساخت کره و دستگاه Real time PCR مارک استپ وان آ بی آی[۱۲]، ساخت آمریکا و پرایمر با مارک ممرت، ساخت آلمان). توالی پرایمری مورد بررسی در جدول ۱ و برنامهٔ دمایی و زمانی Real time PCR در جدول ۲ آمده است.

جدول ۱. توالی پرایمری مورد بررسی

VEGF	forward: 5'-CCG TCC TGT GTG CCC CTA ATG-3'
	reverse: 5'-CGC ATG ATC TGC ATA GTG ACG TTG-3'
COL-18	forward: 5´-GGCCGGGACCTGACA-3´
	reverse: 5´-GCTGTGGTGGTGAAGCTGTAG-3´
eNOS	forward: 5′-AAGCGTTGCTCCTGCTCCTCC-3
	reverse: 5′-TTCCCTTGGTCTGGTCTTTGTG-3′
MMP-9	Forward: 5′- AGGTGCCTCGGATGGTTATCG-3´
	reverse:5´-TGCTTGCCCAGGAAGACGAA-3´

جدول ۲. برنامهٔ دمایی و زمانی PCR Time Real

مرحله	شرایط دما و زمان	تعداد تکرار
دناتوره‌شدن	۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد و ۳ دقیقه	۱
اتصال و بسط پرایمر	۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد و ۱۰ ثانیه	۴۰
	۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه	
تشکیل منحنی ذوب	۵۵ تا ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد و هر درجه ۵ ثانیه	۱

تحلیل آماری

داده‌های خام به‌صورت ct از دستگاه استخراج شد. سپس، با استفاده از نرم‌افزار Graph pad نمودار بیان ژن رسم شد. داده‌های آماری کمّی جمع‌آوری‌شده با روش Real time PCR به کمک نرم‌افزار آماری SPSS 18 تجزیه‌وتحلیل شد. برای تعیین طبیعی‌بودن داده‌ها از آزمون کلموگروف‌ـ اسمیرنوف استفاده شد. در صورت طبیعی‌بودن توزیع داده‌ها، از آزمون آماری تی مستقل در سطح معناداری ۰/۰۵ برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها استفاده گردید.

نتایج

در جدول ۱، تغییرات مقادیر کسر تخلیه (EF) و کسر کوتاه‌شدگی (FS) (میانگین ± انحراف استاندارد) ۱۰ هفته پس از جراحی (شامل ۴ هفته بازیافت پس از جراحی و ۶ هفته مداخلهٔ فعالیت ورزشی)، همچنین در جدول ۳، نتایج

t مستقل مربوط به این عوامل در گروه کنترل و HIIT نشان داده شده است. همچنین، آمار توصیفی و نتایج t مستقل مربوط به آزمودنی‌ها در جدول ۴ آمده است.

جدول ۳. تغییرات کسر تخلیه و کسر کوتاه‌شدگی (میانگین ± انحراف استاندارد) و نتایج آزمون t مستقل در گروه‌های تجربی و کنترل

متغیر و گروه	کسر تخلیه (٪)	کسر کوتاه‌شدگی (٪)
گروه تجربی (HIIT)	۷۷/۷±۴۶۱/۰۲۲	۴۱/۶±۶۲۵/۸۴۷
گروه کنترل	۶۴/۳±۴۸۳/۶۹۵	۳۱/۳±۳۲۰/۴۶۰
سطح معناداری (P-value)	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

P≤۰/۰۵*

نتایج آزمون تی مستقل نشان می‌دهد کسر تخلیه در گروه HIIT (۷۷/۷±۴۶۱/۰۲۲) به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل (۶۴/۳±۴۸۳/۶۹۵) است (*P*=۰/۰۰۱) و افزایش کسر کوتاه‌شدگی نیز در گروه HIIT (۴۱/۶±۶۲۵/۸۴۷) نسبت به گروه کنترل (۳۱/۳±۳۲۰/۴۶۰) معنادار است (*P*=۰/۰۰۱) (جدول ۳).

نتایج آزمون تی مستقل نشان می‌دهد با وجود اینکه مقادیر شاخص COL-18 در گروه HIIT (۱/۷۲۴) ۱/۳۶ برابر بیشتر از گروه کنترل (۱/۲۶۵) است، این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود (*P*=۰/۳۴۰)، ولی بین گروه کنترل و تمرین HIIT در شاخص VEGF معنادار بود (*P*=۰/۰۰۱) و مقادیر شاخص VEGF در گروه تجربی HIIT (۶/۳۹۷) ۶/۳۷ برابر بیشتر از گروه کنترل (۱/۰۰۲) بود و در نهایت افزایش نسبت VEGF به COL-18 نیز معنادار نبود (جدول ۴).

همچنین، نتایج حاصل از آزمون تی مستقل نشان داد که بین دو گروه کنترل و HIIT در شاخص MMP-9 تفاوت معناداری وجود دارد (*P*=۰/۰۱۲) و مقادیر شاخص MMP-9 در گروه تجربی HIIT (۳/۵۴۱) ۳/۵ برابر بیشتر از گروه کنترل (۱/۰۰۲) است. بین دو گروه کنترل و HIIT در شاخص eNOS نیز تفاوت معناداری وجود دارد (*P*=۰/۰۱۴) و مقادیر شاخص eNOS در گروه تجربی HIIT (۴/۲۳) ۱/۱۷ برابر بیشتر از گروه کنترل است (۳/۶۸) (جدول ۴).

جدول ۴. آمار توصیفی و نتایج آزمون t مستقل مربوط به تعداد آزمودنی‌ها و میانگین و انحراف معیار گروه‌های تجربی و کنترل در شاخص‌های COL-18 و VEGF و MMP-9 و eNOS

(mg/ml)

	گروه	تعداد	میانگین± انحراف میعار	میزان معناداری (p-value)
COL-18	کنترل	۶	۰/۱±۹۷۷/۲۶۵	۰/۳۴۰
	تجربی (HIIT)	۶	۰/۱±۵۱۸/۷۲۴	
VEGF	کنترل	۶	۰/۱±۰۷۳/۰۰۲	۰/۰۰۱
	تجربی (HIIT)	۶	۱/۶±۲۸۰/۳۹۷	
MMP-9	کنترل	۶	۰/۱±۰۷۳/۰۰۲	۰/۰۱۲
	تجربی (HIIT)	۶	۱/۳±۶۱۰/۵۴۱	
Enos	کنترل	۶	۱/۳±۶۷/۶۸	۰/۰۱۴
	تجربی (HIIT)	۶	۲/۴±۰۸/۲۳	

بحث و نتیجه‌گیری

در کل، با توجه به نتایج، می‌توان بیان کرد نسبت VEGF به COL-18 در گروه HIIT نسبت به گروه کنترل به‌طور غیرمعناداری بیشتر بود. احتمالاً، ۶ هفته تمرین تناوبی شدید با افزایش مقادیر بیان ژن‌های MMP-9 و eNOS باعث بیشترشدن این نسبت، همچنین بیشتر ترشح‌شدن معنادار

VEGF نسبت به گروه کنترل شد و با افزایش معنادار FS و EF نیز به بهبود عملکرد قلبی در موش‌های صحرایی نر مبتلا به انفارکتوس میوکارد انجامید.

نتایج این پژوهش با نتایج حاصل از تنها پژوهش یافت‌شده در رابطه با تأثیر HIIT بر آنژیوژنز که هولووای و همکاران [۹] انجام دادند متناقض بود. آن‌ها به مقایسهٔ HIIT و تمرین استقامتی بر نشانه‌های ناتوانی قلبی و تغییر ساختار عضلهٔ قلبی در رت‌ها پرداخته بودند. در پژوهش مذکور VEGF، همچنین eNOS بررسی شد و نتایج حاکی از عدم‌تأثیر معنادار HIIT بر فرایند آنژیوژنز بود. علت تناقض در نتایج ممکن است ناشی از تفاوت در پروتکل تمرین و عدم‌سنجش هم‌زمان عوامل محرک و مهاری در پژوهش مذکور بوده باشد. به‌نظر می‌رسد تمرین تناوبی شدید باعث القای عوامل مؤثر در بیان ژن‌های VEGF می‌شود و به این وسیله آنژیوژنز را تحریک می‌کند. تمرین تناوبی شدید با ایجاد هیپوکسی، رگ‌زایی را فعال کرده است. عامل القاشونده با هایپوکسی در شرایط هایپوکسی هیدروکسیله نشده و پایدار مانده و به هسته مهاجرت کرده و باعث القای عوامل مؤثر در رگ‌زایی شده است [۱۰]. همچنین، هیپوکسی ناشی از تمرین تناوبی شدید [۱۷] باعث آزادسازی سیتوکاین‌ها می‌شود و با ورود به سلول‌های آندوتلیال به زنجیرهٔ عروق‌زایی توسط عامل ریلکس‌کنندهٔ مشتق از آندوتلیال (EDRF) به نام نیتریک اکساید وارد شده است که بر اثر بیش‌تنظیمی عامل رشد فیبروبلاستی ۲ (FGF-2) تحریک می‌شود. از طرفی، افزایش فوری نیروی کشش ناشی از تمرینات تناوبی خیلی شدید بیشتر از طریق فعال‌سازی کانال‌های یونی، به‌ویژه کانال‌های پتاسیمی، موجب ترشح اتساع‌کننده‌های عروقی، به‌ویژه نیتریک اکساید، شده است [۲۶] که باعث تنظیم افزایشی VEGF و VEGFR-2 به نیروی کشش و آزادسازی NO شده است. در اثر تمرینات تناوبی خیلی شدید افزایش سازگاری‌های عضلانی، به‌ویژه کاهش تخریب کراتین فسفات و افزایش گلیکوژنوژنز، رخ می‌دهد. همچنین، هورمون‌های آنابولیکی و آدنوزین افزایش می‌یابد که باعث تحریک بیان ژن VEGF می‌شود [۲۷].

از طرفی، در اثر تمرینات تناوبی خیلی شدید و دفسفریله‌شدن AMP به‌وسیلهٔ اکتو-۵ نوکلئوتیداز، از بافت‌های هیپوکسی در فضای خارج سلولی مجاور سلول پارانشیمی آدنوزین تولید می‌شود که نقش مهمی در روند آنژیوژنز دارد [۲۸]. آدنوزین خارج سلولی ایجادشده در اثر تمرین تناوبی خیلی شدید، گیرنده‌های آدنوزین را فعال می‌کند و به‌دنبال آن از سلول پارانشیم، VEGF، آزاد می‌شود [۲۹]. همچنین، آدنوزین به‌واسطهٔ تنظیم عوامل رشد پرو و آنتی‌آنژیوژنی دیگر، باعث تحریک تکثیر سلول‌های اندوتلیوم عروقی می‌شود یا با ایجاد وازودیله‌شدن در توسعه و بازسازی رگ‌های جدید مؤثر است. شواهد نشان می‌دهد در بعضی شرایط، آدنوزین ممکن است واسطه‌ای برای ۵۰ تا ۷۰ درصد آنژیوژنز القاشده با هیپوکسی ضروری باشد [۲۹].

کشش حاصل از تمرینات تناوبی خیلی شدید نیز عضلات را در طولی بلندتر از طول استراحتی قرار می‌دهد و این کشش مقادیر MMP را افزایش داده است [۲۰]. متالوپروتئاز از این سلول‌های اندوتلیال ترشح می‌شود و غشای پایه را در منطقهٔ مذکور از طریق ورود کلسیم به داخل سلول و دپلاریزه‌کردن آن و فعال‌شدن کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ و ورود کلسیم به داخل سلول و هایپرپلاریزه‌شدن سلول تجزیه کرده و سلول‌های اندوتلیال اقدام به مهاجرت و تکثیر می‌کند [۳۰]. در نهایت، تمامی عوامل با افزایش VEGF و اتصال آن به گیرنده‌های ویژهٔ خود روی سلول اندوتلیال پیام‌هایی را فعال می‌کند که موجب تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و افزایش نفوذپذیری عروق می‌شود [۵]. VEGF از راه تنظیم افزایشی عناصر آنتی‌آپوپتوزی، DNA را سنتز می‌کند و با تخریب غشای پایه و فسفریله‌شدن اجزای چسبندهٔ آندوتلیالی بین سلولی و اتصالات محکم به‌ترتیب زمینهٔ بقا، تکثیر، مهاجرت و نفوذپذیری سلول آندوتلیالی را موجب می‌شود [۶].

سازگاری ساختاری و عملکردی بطن چپ در اثر تمرین نسبت به سایر بخش‌های قلب بیشتر است [۳۱]. در ارتباط با شاخص‌های اکوکاردیوگرافی نیز افزایش کسر تخلیهٔ بطن چپ و کسر کوتاه‌شدگی پاسخ سازمان‌یافته‌ای برای افزایش حجم ضربه‌ای است که در اثر سازگاری با تمرینات ورزشی و اعمال بار حجمی بر قلب و ضخیم‌شدن دیواره‌های بطنی ایجاد می‌شود. به‌عبارتی، افـزایش درصد کوتاه‌شدن الیاف عضلات بطن چپ و درصد کسر تخلیهٔ بطن چپ برتری عملکرد سیستولی بطن چپ پس از تمرین را نشان می‌دهد [۳۲].

به‌طور کلی، نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که پروتکل تمرینی استفاده‌شده در این پژوهش- ۶۰ دقیقه دویدن تناوبی خیلی شدید روی نوارگردان با شدت ۸۵-۹۰ درصد VO_{2max} و ۴ روز در هفته و به‌مدت ۶ هفته- توانسته است در افزایش عوامل محرک آنژیوژنز قلبی و بهبود عملکرد قلب مؤثر باشد.

عدم‌سنجش تراکم مویرگی از محدودیت‌های پژوهش حاضر است و باعث می‌شود نتوانیم به‌طور قاطع بیان کنیم تمرین تناوبی خیلی شدید باعث افزایش رگ‌زایی شده است. لذا، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، در کنار عوامل محرک و مهاری آنژیوژنز، تراکم مویرگی نیز سنجیده شود تا بتوان با اطمینان بیشتری از این شیوهٔ تمرینی برای ارتقای سطح زندگی و بهبود عملکرد دستگاه قلب و عروق بیماران مبتلا به انفارکتوس میوکارد بهره گرفت.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل رسالهٔ دکتری گرایش فیزیولوژی ورزشی گروه تربیت‌بدنی دانشگاه تهران پردیس بین‌المللی کیش است که با هزینهٔ شخصی انجام گرفته است. از تمام دوستانی که در انجام این پژوهش با ما همکاری کردند، صمیمانه سپاسگزاریم.

پی‌نوشت‌ها

[1]Myocardial infarction (MI)

[2]Ejection fraction (EF)

[3]Shortening fractional (SF)

[4]Vascular endothelial growth factor (VEGF)

[5]Endostatin

[6]Matrix metallo proteinase (MMP's)

[7]Shear stress

[8]High intensity interval training (HIIT)

[9]Insulin growth factor-1 (IGF-1)

[10]J. A. health care echocardiography device

[11]Biooneer brand

[12]Step one ABI

منابع

[1] Nordlie MA, Wold LE, Kloner RA. Genetic contributors toward increased risk for ischemic heart disease. J Mol Cell Cardiol. 2005; 39(4): 667-79.

[2] Fukuda Sh, Kaga Sh, Sasaki H, Zhan L, Zhu L, Otani H , et al. Angiogenic signal triggered by ischemic stress induces myocardial repair in rat during chronic infarction. J Mol Cell Cardio. 2004; 36(4): 547-559.

[3] Nourshahi M, Taheri Chadorneshin H, Ranjbar K. The stimulus of angiogenesis during exercise and physical Activity. Quarterly of the Horizon of Medical Sciences. 2003; 18(5): 286-296. [in Persian]

[4] Gavin TP, Stallings HW, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Ryan NA, Moore RA, et al. Lower capillary density but no difference in VEGF expression in obese vs lean young skeletal muscle in humans. J Appl Physiol. 2005; 98(1): 315-21.

[5] Mooren F, Völker K. Molecular and cellular exercise physiology. Human Kinetics. 2004; 451-7.

[6] Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. J Physiol Rev. 2004; 79(4): 1283-316.

[7] Van Hinsbergh VWM, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis matrix metalloproteinases in the lead. J Cardiovascular Research. 2008; 78: 203-12.

[8] Gu JW, Gadonski G, Wang J, Makey I, Adair TH. Exercise increases endostatin in circulation of healthy volunteers. J BMC Physiol. 2004; 16(4): 2.

[9] Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Simpson JA, Quadrilatero J, Spriet LL. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. PLoS One. 2015; 10(3): e0121138.

[10] Laursen PB, Jenkins DG. The scientific basis for high- intensity interval training opti mizing training programmes and maximizing performance in highly trained endurance athletes. J Sports Med. 2002; 32(1): 53-73.

[11] Truijens MJ, Toussaint HM, Dow J, Levine BD. Effect of high-intensity hypoxic training on sea-level swimming performances. J Appl Physiol. 2002; 94(2): 733-43.

[12] Padilla J, Harris RA, Rink LD, Wallace PJ. Characterization of the brachial artery shear stress following walking exercise. J Vasc Med. 2008; 13(2): 105-11.

[13] Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, Rakobowchuk M, MacDonald MJ, McGee SL, et al. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. J Physiol. 2008; 586(1): 151-160.

[14] Rodas G, Ventura JL, Cadefau JA, Cusso R, Parra J. A short training programme for the rapid improvement of both aerobic and anaerobic metabolism. Eur J Appl Physiol. 2000; 82(5-6): 480-6.

[15] Edge J, Bishop D, Hill-Haas S, Dawson B, Goodman C. Comparison of muscle buffer capacity and repeatedsprint ability of untrained, endurance-trained and team-sport athletes. Eur J Appl Physiol. 2006; 96(3): 225-34.

[16] Weston KS, Wisløff U, Coombes J. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. Br J Sports Med. 2014; 48(16): 1227-34.

[17] Hamzehzadeh Brojeni E, Nazar Ali P, Naghibi S. The Effect of High Intensity Interval Training (HIIT) on aerobic and anaerobic some indicators of Iranian women's national teams of basketball players. Exercise Physiology. 2012; 5(4): 35-48. [in Persian]

[18] Martin J, Gibala MG, McGee SL. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? Sport Sci. 2008; 36(2): 58-63.

[19] Donovan GO, Owen A, Bird SR, Kearney EM, Nevill AM, Jones DW, et al. Changes in cardiorespiratory fitness and coronary heart disease risk factors following 24 wk of moderate- or high-intensity exercise of equal energy cost. J Appl Physiol. 2005; 98(5): 1619-25.

[20] Nazari M, Kordi MR, Choobineh S. The effect of High Intensity Interval Training (HIIT) on gelatinase-A (MMP-2) serum levels and muscle damage indices in young sedentary. J Arak Medical University. 2015; 18(94): 78-86. [in Persian]

[21] Danzig V, Mikova B, Kuchynka P, Benakova H, Zima T, Kittnar O, et al. Levels of circulating biomarkers at rest and after exercise in coronary artery disease patients. Physiol Res. 2010; 59(3): 385-92.

[22] Kraljevic J, Marinovic J, Pravdic D, Zubin P, Dujic Z, Wisloff U, et al. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction

failing rat heart. Cardiovasc Res. 2013; 99(1): 55-64.

[23] Morten A, Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2007; 14(6): 753-60.

[24] Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO_2max and cardiac hypertrophy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000; 280(3): 1301-10.

[25] Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal TU, Wisloff U, Ellingsen O. Moderate vs high exercise intensity: Differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. Cardiovasc Res. 2005; 67(1): 161-72.

[26] Hudlicka O, Brown MD. Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow role of shear stress nitric oxide and vascular endothelial growth factor. J Vasc Res. 2009; 46(5): 504-12.

[27] Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? J Appl Physiol. 2004; 97(3): 1119-28.

[28] Koos BJ. Adenosine A_{2a} receptors and O_2 sensing in development. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011; 301(3): 601-22.

[29] Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. Biochim Biophys Acta. 2012; 1822(1): 2-8.

[30] Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. Curr Mol Med. 2003; 3(7): 643-51.

[31] Visartaite A, Vainoras A, Sedekerskis V, Poderys J. The influence of aerobics exercise to cardiovascular functional parameters of 30-40 year old women. Medicina (Kaunas). 2004; 40(5): 451-8.

[32] Rawlins J, Bhan A, Sharma S. Left ventricular hypertrophy in athletes. Eur J Echocardiogr. 2009; 10(3): 350-6.

Shahid Beheshti University

Sport and Exercise Physiology

Spring and Summer 2020; Vol.13; No.1

Effect of 6 weeks high intensity interval training on expressions of MMP-9, eNOS and the ratio of VEGF to COL-18 genes on rats with myocardial infarction

Sara Karbalaeifar[1], Abbas Ali Gaeini[2], Mohammad Reza Kordi[2], Reza Nuri[*1], Pedram Ghorbani[1]

[1]Faculty of Physical Education, Department of Sport Sciences, University of Tehran, Kish International Campus, Kish, Iran.
[2]Faculty of Physical Education, University of Tehran, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: Reza Nuri, Tel: +98-7644430056, E-mail: nuri_r7@ut.ac.ir
Received: 06/05/2016 Revised: 23/07/2018 Accepted: 04/08/2018

Abstract

Purpose: Myocardial infarction (MI) is the irreversible cell death by ischemia in parts of myocardium. The molecular process of increased capillary density in response to activity and its appropriate intensity is not clear yet. Therefore, this research aimed to evaluate the effect of 6-week high intensity interval training on expressions of MMP-9, eNOS and the ratio of VEGF to COL-18 genes on rats with myocardial infarction.

Methods: 12 Wistar male rats of 10 weeks old and mean weight 250-300gr were allocated to two groups of experimental (60 minutes of interval treadmill running for 4 minutes with the intensity of 85-90 percent of VO_{2max} and 2 minutes of active rest at 50-60 percent of VO_{2max} for 4 days a week for 6 weeks) and control group (without any training). Real-time PCR was used to assess the expression of MMP-9, eNOS VEGF and COL-18 genes after inducing MI, and shortening fractional and ejection fraction were investigated as echocardiographic indices. Data were analyzed in SPSS18 using independent t test ($P \leq 0.05$).

Results: The findings showed that the amount of MMP-9 in HIIT (3.541 mg/ml) is significantly much more than the control group (1.002 mg/ml) (P=0.012) and the amount of eNOS in HIIT group (4.23 mg/ml) was also significantly much more than control group (3.68 mg/ml) (P=0.014) but there was no significant increase in the VEGF/COL-18 ratio in the HIIT group (1.856 mg/ml) as compared with the control group (1.245 mg/ml) (P=0.263).

Conclusion: In general, 6 weeks of high intensity interval training can effectively increase MMP-9, eNOS and the ratio of VEGF to COL-18 genes and improve myocardial function in male Wistar rats after MI.

Keywords: Angiogenesis, Exercise training, Myocardial Infarction.