دانشگاه شهید بهشتی
فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی
پاییز و زمستان ۱۳۹۷، دوره ۱۱، شماره ۲، صفحه‌های: ۴۹-۶۲

تأثیر ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا بر تجمع پلاکت و میزان فسفریلاسیون $VASPser^{239}$ در مردان مبتلابه بیماری انسداد رگ‌های قلبی

اکبر نوری حبشی[۱]*، سجاد احمدی زاد[۲]، مرتضی سلیمیان[۳]، هیوا رحمانی[۲]

[۱] گروه فیزیولوژی ورزشی و حرکات اصلاحی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ایران.

[۲] گروه علوم زیستی در ورزش و تندرستی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

[۳] گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.

دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۸/۲۰ اصلاح مقاله: ۱۳۹۵/۹/۱۴ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۱۳

هدف: فعالیت به‌ویژه با شدت بالا، باعث افزایش فعالیت و تجمع پلاکت در بیماران قلبی می‌شود. هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر ۸ هفته فعالیت تناوبی با شدت بالا بر فعالیت و تجمع و میزان فسفریلاسیون $VASPser^{239}$ پلاکتی در مردان مبتلابه بیماری قلبی- عروقی بود.

روش‌ها: بیست بیمار قلبی CABG و PCI که از زمان جراحی آنان کمتر از سه ماه گذشته بود، به‌صورت داوطلبانه انتخاب و به دو گروه ۱۰ نفرهٔ کنترل و تمرین تناوبی تقسیم شدند. یک هفته پس از اندازه‌گیری مشخصات تن‌سنجی و تعیین اوج اکسیژن مصرفی، آزمودنی‌ها به مدت ۸ هفته و هفته‌ای ۳ جلسه در تمرین‌های تناوبی شرکت کردند. هر جلسه شامل ۴۰ دقیقه فعالیت بود. هفته اول با شدت ۷۵ به ۱۵ شروع و هر دو هفته ۵٪ افزایش یافت. در دو هفته پایانی، شدت ۹۰ به ۳۰ درصد اوج اکسیژن مصرفی رسید. گروه کنترل در طول دوره، فعالیت ورزشی نداشتند. نمونه‌های خونی قبل و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی اخذ شد. نمونه‌ها برای اندازه‌گیری تجمع پلاکتی، پی- سلکتین و فسفریلاسیون $VASPser^{239}$ آنالیز شدند. آزمون تی وابسته و مستقل برای تحلیل آماری داده‌ها استفاده شد.

نتایج: تجمع و پی- سلکتین پلاکتی گروه تمرین در پاسخ به ADP در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. فسفریلاسیون $VASPser^{239}$ در پاسخ به NO در گروه تمرین، افزایش معنی‌داری یافت ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: هشت هفته تمرین تناوبی باعث بهبود عوامل فعالیت و مهار پلاکتی در بیماران قلبی گردید. احتمالاً تمرین‌های منظم ورزشی با شدت بالا از طریق کاهش بیان CD62P و افزایش حساسیت به NO تولیدی در بافت پوششی رگ خونی، باعث بهبود عملکرد پلاکت شود.

واژه‌های کلیدی: پی سلکتین، تجمع پلاکتی، تمرین تناوبی با شدت بالا، فسفریلاسیون VASP.

* نویسنده مسئول: اکبر نوری حبشی، شماره تماس: ۰۹۱۴۳۴۱۶۰۱۱، ایمیل: a.norihabashi@urmia.ac.ir

مقدمه

پلاکت‌ها، در تشخیص و بروز بیماری‌های قلبی- عروقی نقش مهمی ایفا می‌کنند (۱) به‌طوری‌که تغییر شکل، تجمع[۱]، ترشح[۲]، بیان و فعال شدن گیرنده‌های سطحی پلاکت و تغییر مسیرهای سلولی آنها می‌تواند همگام با بیماری‌های مختلف رخ دهد (۲، ۳). متأسفانه بیماران قلبی نسبت به افراد سالم بیشتر در معرض خطر ابتلا به عوارض ناشی از لخته شدن خون قرار دارند به‌طوری‌که این بیماران دارای میانگین حجم پلاکتی، تجمع پلاکتی، بتاترومبوگلوبولین (β-TG)، عامل پلاکتی (PF4) و پی-سلکتین[۳](CD62P) بالاتری در مقایسه با افراد سالم هستند (۴-۶). همچنین، ایجاد لخته خونی، نقش مهمی در گرفتگی رگ‌های قلب در بیماران قلبی دارد. تخریب رگ‌های قلب مسدود شده و پارگی پلاک فیبروزی آن، موجب فعال شدن و تجمع پلاکت در محل آسیب و پس‌ازآن رخداد عوارض ایسکمیک قلبی ناشی از لخته خونی می‌شود (۷). لذا وضعیت پلاکت به‌عنوان شاخص مهمی در تشخیص و درمان بیماری‌ها بکار برده می‌شود (۸).

عوامل مختلفی از قبیل ADP، TXA_2، ترومبین، آسیب به دیواره پوششی رگ‌های خونی و وجود عوامل التهابی مانند IL_6 و کاتکولامین‌ها در فعال شدن پلاکت‌ها مؤثرند (۹). پلاکت‌ها، گیرنده‌های زیادی در سطح سلول دارند که از طریق آنها به ماده زمینه خارج سلولی در زیر دیواره رگ‌ها، در محل آسیب بافتی، چسبیده و میخ پلاکتی تشکیل می‌دهند. چسبیدن و رهایش مواد مترشحه از پلاکت‌ها، اتصالات سلولی آنها را محکم و گیرنده‌های سطح پلاکت را فعال می‌سازند. نیتریک اکساید (NO) و پروستاسایکلین (PGI_2)، به‌عنوان دو مهارکننده قوی فعالیت پلاکتی (۱۰) از بافت پوششی دیواره رگ‌های خونی ترشح می‌شوند (۱۱). ظاهراً پلاکت‌ها هم هر دو ایزوفرم نیتریک اکساید را از طریق تبدیل ال- آرژنین به ال- سیترولین تولید می‌کنند. نیتریک اکساید از غشاء پلاسمایی پلاکت نفوذ و بر گوانیلیل سیکلاز (sGC) اثر می‌کند (۱۲). نوکلئوتیدهای حلقوی موجب تحریک تولید آدنوزین منو فسفات حلقوی (cAMP) به‌واسطه پروتئین کیناز A (PKA) و گوانیلیل مونوفسفات حلقوی[۴](cGMP)، به‌واسطه پروتئین کیناز G (PKG) شده و پروتئین‌های زمینه‌ای (سوبسترا) را فسفردار می‌کنند (۱۰). نتیجه این فسفریلاسیون، غیرفعال شدن G پروتئین‌های کوچک خانواده Ras و Rho و مهار رهایش کلسیم از ذخایر درون‌سلولی است که به‌نوبه خود، مهار ترشح گرانول‌ها و کاهش تجمع پلاکتی را به دنبال دارد (۱۳).

افزایش عوامل مرتبط با فعالیت پلاکتی و واکنش‌پذیری پلاکت‌ها در نتایج بیشتر تحقیقات ورزشی تک جلسه‌ای و حاد گزارش‌شده است (۱۴، ۱۵). برای مثال، افزایش کلاژن (۱۶)، کاتکولامین‌ها (۱۷)، عامل فون ویلبراند (vWF) و چسبندگی گیرنده $\alpha_{IIb}\beta_3$، تجمع و بیان پی- سلکتین (۸، ۱۵) همچنین فقدان دسترسی و عدم مشاهده پاسخ مناسب پلاکت به نیتریک اکساید، پس از تمرین‌های شدید تناوبی، گزارش‌شده است (۶). هرچند فعالیت تک جلسه‌ای افزایش عوامل مرتبط با فعالیت پلاکتی را در پی دارد، اما انجام تمرین‌های منظم ورزشی در طولانی‌مدت، موجب کاهش حساسیت و بهبود عملکرد پلاکت می‌شود. برای مشاهده اثر طولانی‌مدت فعالیت ورزشی بر پلاکت، پژوهشگران دوره‌های تمرین تداومی ۸ هفته‌ای و بیشتر را انتخاب نموده‌اند. صرف‌نظر از نوع و شدت تمرین، در بیشتر موارد، تمرین طولانی‌مدت موجب کاهش عوامل مرتبط با فعالیت پلاکتی شده است (۱۸). کاهش پروتئین واکنش‌پذیر ROS و فشار اکسایشی به همراه افزایش ضد اکسایش‌ها پس از تمرین‌های ورزشی (۱۹، ۲۰) و همچنین کاهش حساسیت پلاکت به محرک ADP به دلیل افزایش ظرفیت ضد اکسایشی و کاهش نیم‌رخ لیپیدی (۱۸، ۱۹) نتایجی هستند که در پژوهش‌های قبلی گزارش‌شده است.

هرچند فعالیت حاد ورزشی ممکن است محرکی جدی برای بروز حوادث قلبی- عروقی باشد، ولی اثرات مفید ورزش در بیماران دارای مشکلات رگ‌های قلبی در تحقیقات پیشین گزارش‌شده است (۲۱). به‌طوری‌که استمرار بلندمدت فعالیت بدنی و ورزش، تغییرات مفیدی بر رفتار پلاکت بیماران قلبی- عروقی ایجاد می‌کند. وجود رابطه قوی بین افزایش میزان

فعالیت بدنی و کاهش عوارض و بیماری‌های قلبی- عروقی دلیل مهمی برای انجام تمرین‌های ورزشی است. در سال‌های اخیر، نوعی از تمرین‌های ورزشی که به تمرین‌های تناوبی شدید (HIIT) معروف شده، توسط ورزشکاران و مربیان به‌کاربرده می‌شود و بر این باورند که با انجام این تمرین‌های ضمن صرفه‌جوئی در وقت، در زمان کوتاه می‌توان به اثرات ورزش طولانی‌مدت دست‌یافت. دیمیرلز و همکاران (۲۰۰۷) افزایش فعالیت NOS، cGMP و کاهش ۱۴ درصدی تجمع پلاکت در پاسخ به کلاژن را در بیماران دارای فشارخون پس از ۱۲ هفته تمرین با شدت متوسط گزارش نموده‌اند (۲۲). روسلان و همکاران (۲۰۱۴) تأثیر ۱۲ هفته‌ای تمرین‌های تداومی و تناوبی بر بیان پی- سلکتین و فعالیت GPIIb/IIIa پلاکتی را در مردان جوان بررسی نموده و اعلام کردند که تمرین‌های تناوبی منجر به کاهش بیشتر سطح استراحتی بیان پی- سلکتین و فعالیت PAC-1 در مقایسه با تمرین‌های تداومی شده است. به نظر می‌رسد تمرین‌های طولانی‌مدت موجب فعال شدن مسیر مهاری cGMP و فسفریلاسیون پروتئین‌های مهاری پایین‌دستی در بیماران قلبی- عروقی می‌شود. به گزارش محققین، انجام تمرین‌های تناوبی با افزایش تنش برشی و سرعت جریان خون، غلظت پلاسمایی نیتریک اکساید را افزایش داده (۴) و موجب بهبود انتقال غشائی ال- آرژنین و فراهمی زیستی نیتریک اکساید و تولید cGMP پلاکتی و فسفریلاسیون VASP در بیماران قلبی- عروقی می‌شود (۲۲). آسینگر و همکاران (۲۰۱۲) کاهش فسفریلاسیون VASP را در افراد سیگاری گزارش کردند و با مشاهده رابطه آن با بیش فعالی پلاکت‌ها، کاهش سطح و فسفریلاسیون VASP را با عوامل پیش التهابی و عوارض قلبی- عروقی در افراد سیگاری مرتبط دانستند (۲۵). با توجه به اینکه تأثیرات مفید تمرین‌های تناوبی با شدت بالا، بر عملکرد پلاکتی در سطح سلولی- مولکولی بررسی نشده است و با در نظر گرفتن سازگاری‌های متفاوت در افراد بیمار نسبت به افراد سالم در اثر فعالیت بدنی منظم، تحقیق حاضر طراحی گردید تا تأثیر طولانی‌مدت (هشت هفته) فعالیت ورزشی تناوبی بر تجمع و بیان پی- سلکتین در سطح پلاکت، به‌عنوان عامل نشان‌دهنده میزان فعالیت پلاکتی و نیز میزان فسفریلاسیون $VASPser^{239}$ به‌عنوان نشانگر میزان مهار پلاکت در بیماران قلبی— عروقی، موردبررسی قرار گیرد.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش

از بین بیماران رگ‌های قلبی مرد با سن ۵۰ تا ۷۰ سال که در سه ماه گذشته جراحی قلب باز (CABG) و یا آنژیوپلاستی (PCI) انجام داده بودند و برای دوره باز توانی به بیمارستان قلب شهید رجایی تهران مراجعه کرده بودند، ۲۰ نفر به‌صورت داوطلبانه مشارکت کردند. معیارهای انتخاب شامل مشابه بودن مراقبت‌های دارویی این بیماران و نیز نداشتن فعالیت بدنی منظم بعد از جراحی بود. علاوه بر این، افراد سیگاری و افرادی که دارای مشکلات انعقادی و بیماری‌های خاص دیگر بوده و یا دارویی به‌غیراز داروهای تجویزی خود (لوزارتان، والزارتان، پنتاپرازول، آترواستاتین، آ اس آ، کاپتوپریل و متوهگزال) مصرف می‌کردند، از تحقیق کنار گذاشته شدند. مراحل تحقیق به بیماران توضیح داده شد. تمامی آزمودنی‌ها فرم رضایت‌نامه کتبی جهت اندازه‌گیری اوج اکسیژن مصرفی و دوره باز توانی مورد تائید شورای اخلاقی بیمارستان را امضا نمودند. سپس آزمودنی‌ها به‌طور تصادفی به دو گروه (۱۰ نفر در گروه تناوبی و ۱۰ نفر در گروه کنترل) تقسیم شدند. دستورالعمل اجرایی تحقیق حاضر با کد اخلاق به شماره RHC.AC.IR.REC1394.1 مورد تائید کمیته اخلاق بیمارستان شهید رجایی قرار گرفت.

پروتکل پژوهش

یک هفته قبل از شروع پژوهش ویژگی‌های تن‌سنجی (آنتروپومتریک)، داروهای مصرفی و همچنین ضربان قلب استراحتی آزمودنی‌ها، ثبت و فشارخون آنها به حالت نشسته بر روی صندلی، پس از ۳۰ دقیقه استراحت، اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری‌ها در محیط بیمارستان قلب شهید رجایی، بخش نو

توانی قلبی انجام شد. شرایط دمایی ثابت و در دامنه ۱۸ الی ۲۵ درجه بود. تمامی اندازه‌گیری‌ها در بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح گرفته می‌شد. برای تعیین VO_{2peak} از آزمون تعدیل‌شده بروس[5] استفاده شد. بدین‌صورت که ابتدا توضیحات و نکات ایمنی و نحوه انجام آزمون به آزمودنی‌ها توضیح داده شد. آزمودنی‌ها برای رسیدن به هماهنگی لازم، با نحوه راه رفتن روی نوار گردان بدون کمک دست آشنا شدند و به مدت ۵ دقیقه به‌طور دلخواه گرم نمودند. پس‌ازآن ماسک گاز و لیدهای دستگاه به آزمودنی وصل شد. در مدت آزمون، گازهای تنفسی با دستگاه گاز آنالیزور (Metalyzer 3-B-Cortex) تجزیه‌وتحلیل شد و ضربان قلب و نمودار الکتروکاردیوگرافی با استفاده از ضربان سنج دیجیتالی بی‌سیم ثبت گردید. پایان هر ۳ دقیقه از مراحل آزمون، فشارخون آزمودنی‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد. آزمودنی‌ها نمره درک از تلاش خود را هر ۳ دقیقه بر اساس معیار بورگ اعلام کردند. حداکثر اکسیژن دریافتی آزمودنی‌ها بر اساس معیارهایی شامل نسبت تبادل تنفسی بالاتر از ۱/۱۵، رسیدن به فلات اکسیژن مصرفی با افزایش میزان بار، ضربان قلب در سطح حداکثر میزان پیش‌بینی‌شده و درک از تلاش ۲۰ تعیین شد. علاوه بر این، معیارهای پایان آزمون، درخواست آزمودنی، احساس درد متوسط تا شدید در ناحیه قفسه سینه، افت فشارخون بیش از ۱۰ میلی‌متر جیوه، علائم اختلال در خون‌رسانی مانند سیانوز یا رنگ‌پریدگی با علائم دستگاه عصبی مانند سرگیجه آتاکسی یا سنکوپ، تاکی کاردی بطنی، تغییر غیرمعمول ECG و تغییر ناگهانی ضربان قلب آزمودنی بود (۲۳). یک هفته پس از اندازه‌گیری‌های اولیه، آزمودنی‌های گروه تجربی تمرین‌های تناوبی خود را به مدت ۸ هفته و هفته‌ای ۳ جلسه انجام دادند. تمامی جلسات تمرینی در نوبت قبل از ظهر در بخش توان‌بخشی و تحت نظر پزشک و پرستار بخش انجام شد. به‌منظور مشخص کردن سرعت نوار گردان برای تعیین شدت جلسات تمرینی، جلسه اول تمرین با استفاده از دستگاه تجزیه‌وتحلیل گازهای تنفسی انجام شد. تمرین شامل ۵ دقیقه حرکات کششی و گرم کردن روی نوار گردان با شدت ۴۰٪ حداکثر اکسیژن دریافتی و ۸ تکرار ۴ دقیقه‌ای (۲ دقیقه فعالیت و ۲ دقیقه استراحت فعال)، دویدن روی نوار گردان و ۳ دقیقه سرد کردن بود. درمجموع هر جلسه تمرینی، ۴۰ دقیقه طول می‌کشید. آزمودنی‌ها جلسه اول تمرین خود را با شدت ۷۵٪ برای وهله فعالیت و ۱۵٪ حداکثر اکسیژن دریافتی برای وهله استراحت فعال شروع نمودند. هر دو هفته ۵٪ به‌شدت فعالیت و استراحت اضافه شد. دو هفته آخر، شدت فعالیت به ۹۰٪ برای وهله فعالیت و ۳۰٪ حداکثر اکسیژن دریافتی برای وهله استراحت رسید. گروه کنترل طی مدت ۸ هفته به‌غیراز فعالیت‌های عادی روزمره، هیچ فعالیت ورزشی منظمی نداشتند.

روش‌های آزمایشگاهی

از آزمودنی‌ها دو نمونه خون اخذ شد. نمونه اول قبل از شروع تمرین‌های و نمونه دوم ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین در دامنه ساعتی ۸ تا ۱۰ صبح با رعایت حداقل ۸ ساعت ناشتایی گرفته شد. نمونه‌های خون به مقدار ۸ میلی‌لیتر از سیاه‌رگ بازویی، پس از ۳۰ دقیقه استراحت به حالت نشسته روی صندلی و اندازه‌گیری ضربان قلب استراحتی و فشارخون آزمودنی‌ها، گرفته شد. جهت انجام آزمایش و تجزیه‌وتحلیل، نمونه‌های گرفته‌شده به دو قسمت تقسیم شد. برای اندازه‌گیری تجمع پلاکتی، مقدار ۳ میلی‌لیتر و برای تهیه پلاکت شسته شده و اندازه‌گیری پی- سلکتین سطح پلاکت، مقدار ۵ میلی‌لیتر خون در لوله‌های فالکون حاوی ماده ضد انعقاد سیترات سدیم ۳/۸ درصد ریخته و بلافاصله جهت انجام آزمایش و تجزیه‌وتحلیل به آزمایشگاه انتقال داده شد.

تجمع پلاکتی: تجمع پلاکتی در پلاسمای غنی از پلاکت[6] (PRP) در پاسخ به محرک ADP با روش درصد جذب نوری در پلاکت‌های تجمع یافته اندازه‌گیری شد. برای تهیه پلاسمای غنی از پلاکت، نمونه سیتراته به مدت ۸ دقیقه و با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Eppendorf 5702) و پلاسمای غنی، از پلاکت جدا و داخل میکروتیوب ریخته شد. برای تهیه پلاسمای فقیر از پلاکت[7] (PPP)، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه دیگر با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و

پلاسمای فقیر از پلاکت داخل میکروتیوب مجزا جدا شد. نمونه‌هایی که پلاکت آنها در گزارش نتیجه آزمایش شمارش سلولی (CBC) که با دستگاه شمارشگر سلول‌های خونی Cell Counter مدل (Sysmex K-1000) انجام شد، بیش از /ml ۲۷۵×۱۰۳ بود با پلاسمای فقیر، از پلاکت رقیق شد. تجمع پلاکتی در پاسخ به ۵ میکرومول محرک ADP توسط دستگاه اندازه‌گیری تجمع پلاکتی[8] مدل APACT4004 ساخت کشور آلمان اندازه‌گیری و درصد تجمع پلاکتی ثبت شد.

فلوسیتومتری جهت اندازه‌گیری پی- سلکتین: برای اندازه‌گیری تغییر پی- سلکتین سطح پلاکت از روش فلوسیتومتری استفاده شد. برای این منظور به ۵ میلی‌لیتر نمونه خون اخذشده، جهت جلوگیری از فعال شدن، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر اسید سیترات دکستروز[9](ACD) اضافه شد. برای تهیه پلاسمای غنی از پلاکت، نمونه به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه (۲۰۰ g) به‌صورت نرم و بدون ترمز سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، دوسوم بالای پلاسمای غنی از پلاکت به‌دست‌آمده، برای تهیه پلاکت شسته شده و انجام وسترن بلات جدا و در لوله جدا، نگه‌داشته شد (لازم به ذکر است که در تمامی مراحل جداسازی و برداشتن پلاسما و یا انتقال آن توسط سمپلر، جهت جلوگیری از تحریک پلاکت از سرسمپلرهایی استفاده شد که برای قطور شدن مجرای آنها، قبلاً سر آنها با قیچی بریده‌شده بود). از یک‌سوم باقی‌مانده پلاسما داخل سه میکروتیوب، هرکدام مقدار ۵۰ میکرولیتر پلاسمای غنی از پلاکت ریخته شد. مقدار ۲ میکرولیتر محرک ADP فقط به میکروتیوب اول اضافه و هر سه میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. جهت متوقف کردن فرآیند و تثبیت فعالیت پلاکتی به هرکدام از میکروتیوب‌ها مقدار ۱۵ میکرولیتر پارافرمالدئید ۱٪ (۱ حجم فیکساتور، ۳ حجم PRP) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه دیگر در دمای اتاق انکوبه شد تا عمل تثبیت کامل شود. سپس مقدار ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی پی- سلکتین $CD_{62}P$ کونژیکه شده (Anti- human $CD_{62}P$, monoclonal BD Biosciences) به میکروتیوب اول و دوم و ۵ میکرولیتر ایزوتایپ کنترل، به میکروتیوب سوم اضافه گردید. هر سه میکروتیوب به مدت یک ساعت در محل تاریک و در دمای اتاق بر روی شیکر انکوبه شد. نمونه‌های آماده‌شده جهت خوانش پی- سلکتین سطح پلاکتی در دستگاه فلوسیتومتری (BD FACSCalibur, USA) قرار داده شد. برای این منظور، حجم میکروتیوب‌ها با محلول[10] PBS به ۱/۵ میلی‌لیتر رسانده و در لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری ریخته شد. ابتدا جمعیت پلاکتی با تنظیم SSC-H و FFC-H در کانال (رنگ قرمز) FL2-PE مشخص و تعداد خوانش در ۵۰۰۰۰ پلاکت قرار داده شد. پس از مشخص نمودن جمعیت پلاکتی جهت مشخص نمودن اتصالات غیراختصاصی آنتی‌بادی از نمونه میکروتیوب حاوی ایزوتایپ کنترل استفاده شد. درنهایت میزان بیان آنتی‌ژن پی- سلکتین سطح پلاکت اندازه‌گیری و نتایج به‌صورت درصد به دست آمد.

جداسازی و تیمار پلاکت و وسترن بلات $VASP\ ser^{239}$: جهت تهیه پلاکت شسته شده مقدار ۵ میلی‌لیتر خون حاوی سیترات سدیم، به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰ g در دمای اتاق سانتریفیوژ نرم شد. مقدار ۳ میلی‌لیتر از قسمت بالایی پلاسمای غنی از پلاکت جدا و در لوله حاوی هپارین (۵۰ میکرولیتر به ازای هر میلی‌لیتر پلاسمای غنی از پلاکت) ریخته شد. پلاسمای غنی از پلاکت جداشده حاوی هپارین، در دمای اتاق به مدت ۷ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰g سانتریفیوژ نرم شد. پلاکت‌های جداشده دو بار به‌آرامی با تایرود بافر ۶/۵ =PHشسته شد. مقدار ۱۵۰ میکرولیتر تایرود بافر با PH=۷/۲ به پلاکت‌ها اضافه و با سمپلر به‌آرامی هم زده شد تا محلول یکنواخت پلاکت به دست آید. جهت استراحت پلاکت‌ها محلول به‌دست‌آمده به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. جهت بررسی میزان فسفریلاسیون VASP در پاسخ به نیتریک اکساید، داخل ۲ میکروتیوب هرکدام به مقدار ۴۵ میکرولیتر از محلول پلاکتی تهیه‌شده، ریخته شد. در دمای اتاق، یکی از میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه با آزادکننده نیتریک اکساید سدیم نیتروپروساید[11] (SNP) با غلظت ۱۰۰ میکرومول انکوبه شد. میکروتیوب دوم نیز به‌عنوان نمونه کنترل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بلافاصله

پس از ۵ دقیقه، مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول نمونه بافر (SDS) حاوی (DTT) تازه (۱ واحد DTT، ۹ واحد SDS) اضافه‌شده و به‌شدت هم زده شد. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه جوشانده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت g ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد. مایع زلال بالایی جهت انجام وسترن بلات جدا شد.

تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰، تجزیه‌وتحلیل شدند. از آزمون کولموگروف-اسمیرنف جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. جهت مقایسه تغییرات بین گروهی، ابتدا تفاضل داده‌های قبل و بعد تمرین محاسبه گردید و سپس از آزمون تی مستقل استفاده شد. سطح معنی‌داری برای تمام تحلیل‌های آماری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

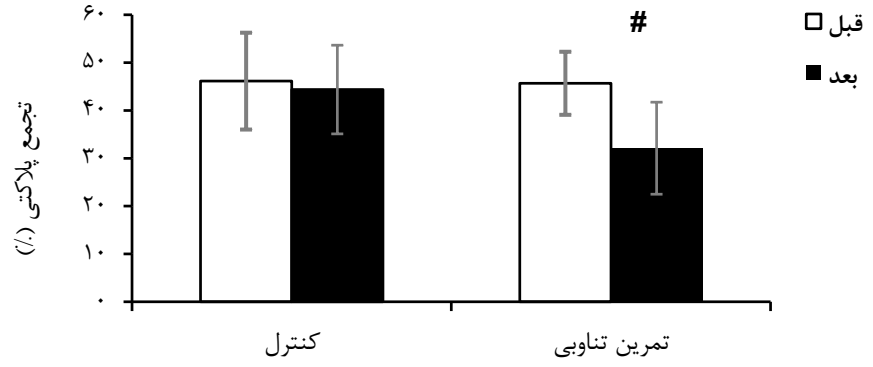
اوج اکسیژن مصرفی آزمودنی‌ها در گروه کنترل ۲۲/۲±۲/۵ و در گروه تناوبی ۲۳/۲±۲/۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم در دقیقه بود. مشخصات حاصل از اندازه‌گیری ویژگی‌های مختلف تن‌سنجی و قلبی- عروقی آزمودنی‌های دو گروه قبل، از شروع تحقیق و نیز بعد از گذشت ۸ هفته اندازه‌گیری شد که به‌صورت توصیفی در جدول ۱ ارائه‌شده است.

تجزیه تحلیل آماری داده‌ها کاهش معنی‌دار در تجمع پلاکتی گروه فعالیت تناوبی نسبت به گروه کنترل پس از ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا نشان داد (t۱۶= -۲/۱۷،P=۰/۰۴) (شکل ۱).

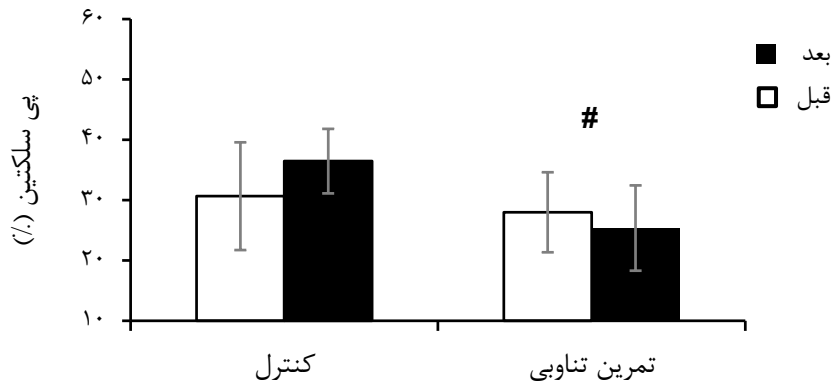
جدول ۱. میانگین (± انحراف معیار) اطلاعات تن‌سنجی و قلبی- عروقی

	کنترل		تناوبی	
	قبل	بعد (۸ هفته)	قبل	بعد (۸ هفته)
سن (سال)	۵۹±۴/۵	-	۶۰/۶±۳/۲	-
قد (سانتی‌متر)	۱۶۸±۴/۵	-	۱۷۱±۴/۲	-
اوج اکسیژن مصرفی (میلی‌لیتر بر کیلوگرم در دقیقه)	۲۲/۲±۲/۵	-	۲۳/۲±۲/۲	-
وزن (کیلوگرم)	۷۱/۵±۸/۹	۷۵/۲±۷/۲	۷۸/۷±۹/۴	۷۵±۱۱/۲ *
ضربان قلب (تعداد در دقیقه)	۷۰/۵±۵/۹	۷۱/۱±۹/۷	۶۸/۲±۳/۹	۶۲/۲±۵۴ *
فشارخون سیستولی (میلی‌متر جیوه)	۱۲۰/۲±۹/۲	۱۱۹/۱±۷/۸	۱۲۲/۵±۶/۴	۱۱۴/۵±۷ *
فشارخون دیاستولی (میلی‌متر جیوه)	۷۵/۵±۷/۴	۷۸/۸±۵/۳	۷۶/۸±۸/۲	۷۷/۴±۹/۹

* نشان‌دهنده تغییرات معنی‌دار درون‌گروهی کنترل و تمرین تناوبی با شدت بالا پس از ۸ هفته است.

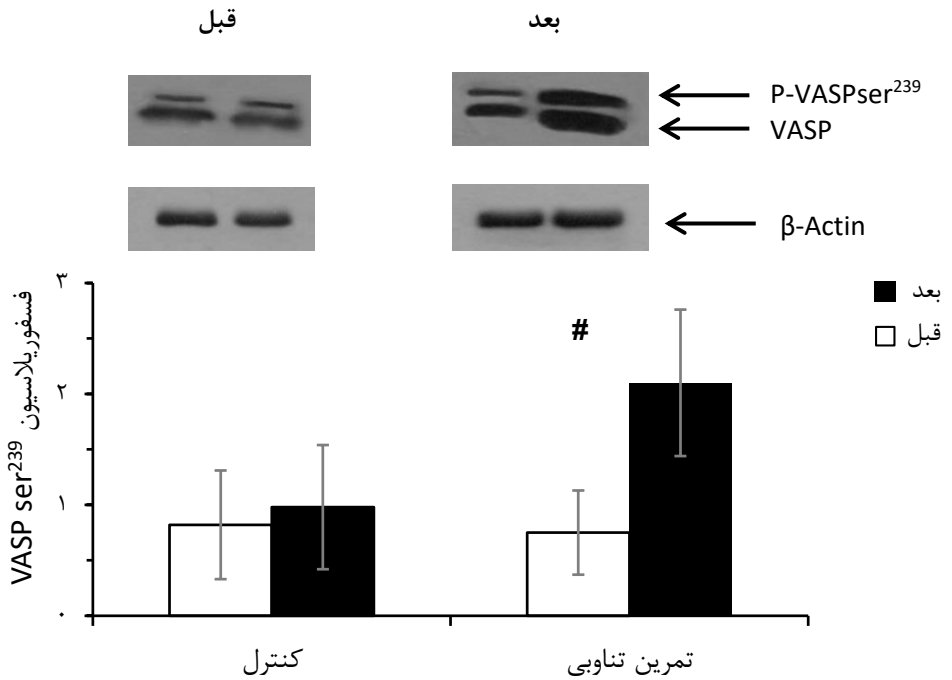


شکل ۱. میانگین (± انحراف استاندارد) درصد تجمع پلاکتی بیماران قبل و بعد از ۸ هفته. علامت # نشان‌گر تفاوت معنی‌دار بین دو گروه کنترل و تناوبی است.



شکل ۲. میانگین (± انحراف استاندارد) درصد پی- سلکتین آزمودنی‌ها قبل و بعد از ۸ هفته. علامت # نشان‌گر تفاوت معنی‌دار بین دو گروه کنترل و تناوبی قبل و بعد از ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا است.

در تجزیه تحلیل سطح پی- سلکتین در پاسخ به ADP نیز کاهش معنی‌داری در گروه تمرین تناوبی پس از ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا مشاهده شد ($t_{۱۶}$=-۲/۶۸،P=۰/۰۱) (شکل ۲) میزان فسفریلاسیون VASP ser^{239} در پاسخ به نیتریک اکساید قبل و بعد از ۸ هفته با روش آزمایشگاهی وسترن بلات اندازه‌گیری شد. برای بررسی پاسخ به نیتریک اکساید نسبت فسفریله شدن VASP ser^{239} به بتا- اکتین محاسبه گردید. نتایج تجزیه تحلیل آماری فسفریلاسیون VASP ser^{239} در پاسخ به نیتریک اکساید افزایش معنی‌داری در گروه تمرین تناوبی پس از ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا نشان داد ($t_{۱۰}$=۲/۳۹،P=۰/۰۳) (شکل ۳).



شکل ۳. میانگین (± انحراف استاندارد) فسفریلاسیون VASP ser^{239} آزمودنی‌ها قبل و بعد از ۸ هفته. پروتئین بتا- اکتین و فسفریلاسیون VASP سرین ۲۳۹.

علامت # نشان‌گر تفاوت معنی‌دار بین دو گروه کنترل و تناوبی است.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا بر تجمع و ترشح پی- سلکتین پلاکتی در پاسخ به ADP در بیماران قلبی- عروقی تأثیر داشته است. تجزیه‌وتحلیل آماری نشان داد که در گروه تمرین تناوبی، حساسیت پلاکت به محرک ADP کم شده و تجمع پلاکتی ٪۲۶ کاهش‌یافته که ازنظر آماری معنی‌دار است. همچنین میزان استراحتی بیان پی- سلکتین پس از هشت هفته تمرین تناوبی در پاسخ به ADP ٪۸ کاهش داشته است که این کاهش در گروه تمرین تناوبی، پس از ۸ هفته، در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود. بسیاری از تحقیقات پیشین افزایش تجمع پلاکتی را در پاسخ به محرک‌های مختلف پلاکتی، پس از انجام فعالیت تک جلسه‌ای گزارش کرده‌اند (۲۴-۲۶). افزایش تنش برشی و سطوح پلاسمایی کاتکولامین‌ها مخصوصاً اپی‌نفرین پس از فعالیت شدید ورزشی از عوامل مهم تجمع پلاکتی گزارش‌شده است (۲۷). اکتوریز و همکاران (۱۹۸۱) اعلام کرده‌اند که افزایش فعالیت گیرنده‌های آلفا آدرنرژیک در پاسخ به افزایش اپی نفرین ممکن است موجب مهار دستگاه آدنیلات سیکلاز توسط جی- پروتئین شده و گیرنده‌های IIb/IIIa سطح پلاکت را در حضور ADP فعال کند (۲۸). اگرچه فعالیت حاد ورزشی ممکن است موجب افزایش عوامل خطرزای قلبی و عروقی شده و عوارض ناشی از ایجاد لخته خونی حاد را در پی داشته باشد؛ اما نشان داده‌شده که فعالیت منظم ورزشی طولانی‌مدت موجب بهبود کیفیت زندگی و افزایش سلامتی در بیماران قلبی- عروقی می‌شود (۲۹). در جمع‌بندی تحقیقات مربوط به نظر می‌رسد کاهش فشارخون استراحتی آزمودنی‌ها پس از انجام تمرین‌های ورزشی منظم و طولانی‌مدت و کاهش نیروی تنش برشی موجب کاهش فشار فیزیکی بر روی پلاکت می‌شود. کاهش فشار فیزیکی پلاکت و بهبود عملکرد بافت پوششی رگ، آسودگی و آرمیدگی پلاکت را در پی داشته و می‌تواند توجیهی برای کاهش حساسیت و فعالیت پلاکت باشد که با یافته‌های این پژوهش هم‌خوانی دارد (۲۱, ۳۰). کاهش حساسیت پلاکت در اثر فعالیت منظم و نزدیک شدن آنها به سطوح پایه در افراد دارای فعالیت منظم ورزشی، به‌نوعی نشان‌دهنده اثر مثبت ورزش بر شاخص‌های قلبی عروقی ازجمله پلاکت‌ها است که می‌تواند نشانگر بهبود وضعیت سلامتی آزمودنی‌ها باشد. وانگ و همکاران (۲۰۰۴) اعلام کرده‌اند که تمرین‌های ورزشی سطوح پلاسمایی نیتریک اکساید و cGMP پلاکت را افزایش و فعالیت سطوح استراحتی پلاکت را کاهش می‌دهد، این امر نیز می‌تواند پاسخی بر یافته‌های این تحقیق باشد (۳۱)، چراکه اثر و سطوح استراحتی کاتکولامین‌ها نیز پس از انجام تمرین‌های منظم ورزشی، کاهش می‌یابد (۳۲).

همان‌طور که ذکر شد کاهش پاسخ‌پذیری پلاکت به محرک ADP پس از هشت هفته در گروه تمرین، منجر به کاهش تجمع و بیان گیرنده پی- سلکتین در سطح پلاکت گردیده که به‌نوعی نشان‌دهنده افزایش پتانسیل مقاومتی در مقابل عوامل تحریکی است. بیشتر تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که تمرین منظم ورزشی منجر به بهبود عملکرد پلاکتی شده و پژوهشگران کاهش تجمع و ترشح پلاکتی را پس از انجام تمرین‌های ورزشی گزارش کرده‌اند که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌سو است (۴، ۲۲، ۳۳). در همین رابطه، دمیریلز و همکاران (۲۰۰۹) اعلام کرده‌اند که تمرین‌های ورزشی موجب افزایش انتقال ال- آرژنین در پلاکت و ساخت بیشتر نیتریک اکساید در درون پلاکت می‌شود. افزایش دسترسی زیستی نیتریک اکساید عملکرد پلاکت را مهار کرده و حساسیت آن را در پاسخ به محرک‌ها کاهش می‌دهد (۲۲). به گزارش برونین و همکاران (۲۰۰۴) سنتز نیتریک اکساید در پلاکت با انتقال ال- آرژنین از غشاء و تبدیل آن به ال- سیترولین محدود می‌شود که تمرین‌های منظم ورزشی این عامل را افزایش می‌دهد (۳۴). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که عوامل التهابی مانند پروتئین واکنش‌پذیر[۱۲] (CRP)

می‌تواند عملکرد آنزیم سازنده نیتریک اکساید رگی (eNOS) را تخریب کرده و با کاهش تأثیر eNOS اثرات لخته سازی پلاکت را افزایش دهد (۳۵، ۳۶). دمریلز و همکاران (۲۰۰۹) پیشنهاد کرده‌اند که تمرین منظم ورزشی با کاهش عوامل التهابی و بهبود دسترسی زیستی نیتریک اکساید، فعالیت پلاکتی را مهار کرده و تجمع پلاکتی را کاهش دهد (۲۲). این امر نیز می‌تواند توجیهی بر یافته‌های این تحقیق باشد. در ارتباط با ترشح پی- سلکتین اسمیت و همکاران (۲۰۰۳) نشان داده‌اند که بیان سطح پلاکتی پی- سلکتین در افراد تمرین کرده نسبت به افراد غیرفعال، پایین‌تر می‌باشد (۳۷). به نظر می‌رسد برآیند تأثیر عوامل مختلف تحریکی و مهاری پلاکت تعیین‌کننده وضعیت پلاکت ازنظر فعالیت و استراحت است. تحقیقات پیشین نشان داده‌اند که افزایش بیان پی-سلکتین با افزایش فعالیت پلاکتی ناشی از تنش برشی در ارتباط است. طبق گزارش آنها تنش برشی، برخورد پلاکت با دیواره عروق را افزایش داده و منجر به افزایش کلسیم درون‌سلولی پلاکت شده و بارهایش پی- سلکتین از گرانول‌های آلفا بیان آن را در سطح پلاکت افزایش می‌دهد (۲۷، ۳۸). علاوه بر این، فعالیت منظم ورزشی باعث افزایش ظرفیت بافت پوششی رگ برای تولید مهارکننده‌های پلاکتی نظیر نیتریک اکساید می‌شود که با کاهش مقاومت دیواره عروق و مهار پلاکت همراه است. رسلان و همکاران (۲۰۱۴) کاهش بیان پی- سلکتین را پس از انجام تمرین‌های ورزشی گزارش کرده‌اند که یافته‌های این پژوهش را تأیید می‌کند. به گزارش آنها، کاهش پی- سلکتین ناشی از کاهش فعالیت نوع فعال گیرنده گیلکوپروتئینی IIa/IIIb پس از تمرین‌های ورزشی است (۳۳). از طرفی، کاهش غلظت پلاسمایی فیبرینوژن پس از تمرین‌های ورزشی منجر به خاموش ماندن محل فعال گیرنده گیلکوپروتئینی IIa/IIIb در غلظت‌های پایین فیبرینوژن می‌شود که این امر درنهایت، کاهش تحریک ترشح پی- سلکتین از گرانول‌های آلفا را در پی دارد (۳۹). همچنین در ارتباط پاسخ پلاکت به ADP دی ماسیو و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که تمرین‌های طولانی‌مدت ورزشی منجر به کاهش پاسخ‌پذیری پلاکت به محرک ADP شده است. یافته‌های آنها نشان داد سازوکار احتمالی درگیر در کاهش پاسخ‌پذیری پلاکت، افزایش کلی وضعیت ضداکسایندگی پلاسما پس از تمرین است (۱۹)؛ بنابراین، بخشی از سازوکار کاهش پاسخ‌پذیری پی- سلکتین را می‌توان به کاهش فعالیت PAC-1 و کاهش پاسخ پلاکت به محرک ADP و درنهایت تخلیه کمتر گرانول‌های آلفا نسبت داد. تحقیقات قبلی بهبود عملکرد بافت پوششی، افزایش NO، cGMP، PGI_2 و کاهش عوامل التهابی را در بیماران قلبی- عروقی، پس از انجام تمرین‌های منظم ورزشی گزارش کرده‌اند. بنا به نتایج آنها، همه عوامل ذکرشده درنهایت، منجر به افزایش مهار پلاکت و کاهش حساسیت سطوح استراحتی پلاکت می‌شود که یافته‌های تحقیق حاضر را تأیید می‌کند (۴، ۵، ۲۹).

فسفریلاسیون VASP در سرین ۲۳۹ پیغام مهاری داخل به بیرون را ایجاد کرده که منجر به مهار، تغییر شکل و بازآرایی پروتئین‌های اسکلتی پلاکت می‌شود. بررسی نتایج آماری فسفریلاسیون $VASPser^{239}$ نشان داد که حساسیت پلاکت در پاسخ به نیتریک اکساید پس از ۸ هفته، افزایش داشته است. به‌طوری‌که تغییرات بین گروهی میزان فسفریلاسیون $VASPser^{239}$ در گروه تمرین، پس از انجام ۸ هفته تمرین تناوبی، افزایش معنی‌دار داشت. با افزایش فسفریلاسیون و کاهش ترشح و تجمع پلاکتی در تحقیق حاضر، شاید بتوان چنین استنباط کرد که احتمالاً تمرین، موجب کاهش میل تحریکی پلاکت از مسیرهای موازی مختلف شده باشد. بر همین اساس به نظر می‌رسد دستگاه مهاری پلاکت نیز با سازگاری‌هایی همراه شده باشد، چراکه در پاسخ به میزان معینی از نیتریک اکساید، فسفریلاسیون بیشتری در پروتئین

VASP پلاکت گروه تمرین اتفاق افتاده است. مطالعات در ارتباط با فعالیت بدنی و تأثیر آن بر فسفریلاسیون VASP بسیار محدود است، اما مطالعات نشان داده‌اند که اثر رها کننده‌های نیتریک اکساید منجر به فسفریلاسون این پروتئین در سرین ۲۳۹ شده است (۴۰ -۴۲). فعالیت بدنی به‌صورت تک‌وهله‌ای دستگاه سمپاتیک را تحریک کرده و با افزایش فشار دینامیک خون، فعالیت NOS را افزایش می‌دهد و به‌این‌ترتیب ساخت نیتریک اکساید از مسیر cGMP موجب فسفریلاسیون VASP در سرین ۲۳۹ می‌شود (۴۳). دی مریل و همکاران (۲۰۱۳) اعلام کردند که سازگاری‌های ایجادشده در بافت پوششی رگ‌های خونی و درون پلاکتی پس از انجام تمرین‌های منظم ورزشی در بیماران قلبی- عروقی، دسترسی زیستی نیتریک اکساید را افزایش داده و فعالیت پلاکتی را در این بیماران مهار می‌کند(۱۸). این یافته‌ها به‌نوعی با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد چراکه به نظر می‌رسد بخشی از افزایش فسفریلاسیونVASP مربوط به تسهیل دسترسی و افزایش ساخت نیتریک اکساید در آزمودنی‌ها پس از انجام تمرین‌های تناوبی باشد. کاهش نیم‌رخ لیپیدی، غلظت فیبرینوژن، ترومبوکسان و عوامل تحریکی پلاکت پس از انجام تمرین‌های ورزشی می‌تواند دلیلی بر ایجاد زمینه مساعد برای افزایش پاسخ‌پذیری پلاکت به مهارکننده‌ها و افزایش فسفریلاسیون پروتئین‌های مهاری و کنترل فعالیت پلاکت باشد. اندازه‌گیری نکردن و عدم کنترل این عوامل به دلیل گستردگی، جزو محدودیت‌های تحقیق حاضر بود که برای توضیح و تشریح بهتر رفتار پلاکت، بررسی عوامل تأثیرگذار در کنار هم ضروری به نظر می‌رسد و توصیه می‌شود در تحقیقات آتی موردتوجه قرار گیرد.

درنهایت تحقیق حاضر نشان داد انجام ۸ هفته تمرین‌های تناوبی با شدت بالا، ضمن تغییر در رفتار پلاکت، منجر به کاهش تجمع و ترشح و افزایش فسفریلاسیون پروتئین VASP در بیماران قلبی- عروقی گردید؛ بنابراین انجام تمرین‌های تناوبی به‌صورت منظم، تغییراتی در جهت آرمیدگی پلاکت در بیماران قلبی- عروقی فراهم می‌کند که بخشی از آن مربوط به عملکرد بهتر بافت پوششی رگ در ساخت نیتریک اکساید و افزایش دسترسی زیستی آن و همچنین بهبود عملکرد سازوکار دستگاه مهاری پلاکت، ناشی از کاهش ترشح پی- سلکتین و افزایش فسفریلاسیون VASP و کاهش پلیمریزاسیون اکتین در پاسخ به نیتریک اکساید باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی بیمارستان قلب شهید رجایی تهران انجام شد. ضمن سپاسگزاری از همکاری‌های انجام‌شده، از تمامی آزمودنی‌های و کارکنان محترم بخش توان‌بخشی بیمارستان قلب شهید رجایی کمال تشکر راداریم.

پی‌نوشت‌ها

[1] Aggregation
[2] Secretion
[3] P-selectin
[4] Cyclic Guanylyle monophosphate
[5] Modified Bruce protocol
[6] Platelet-rich plasma
[7] Platelet-poor plasma
[8] Aggregometer
[9] Acid Citrate Dextrose
[10] Phosphate-buffered saline
[11] Sodium nitroprusside
[12] C-reactive protein

منابع

1. Gurney D, Lip GY, Blann AD. A reliable plasma marker of platelet activation: does it exist? American journal of hematology. 2002;70(2): 139-144.

2. Scheinowitz M, Pakala R, Ben-Dor I, Lemesle G, Torguson R, Pichard AD, et al. Platelet reactivity in diabetic patients subjected to acute exercise stress test. Cardiovascular

Revascularization Medicine. 2011; 12(1): 20-24.

3. Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Diabetes and antiplatelet therapy in acute coronary syndrome. Circulation. 2011; 123(7): 798-813.

4. de Meirelles LR, Matsuura C, de Castro Resende A, Salgado ÂA, Pereira NR, Coscarelli PG, et al. Chronic exercise leads to antiaggregant, antioxidant and anti-inflammatory effects in heart failure patients. European journal of preventive cardiology. 2014; 21(10): 1225-1232.

5. Mongirdienė A, Kubilius R. Effect of physical training on indices of platelet aggregation and fibrinogen concentration in patients with chronic heart failure. Medicina. 2015; 51(6): 343-350.

6. Ahmadizad S, Nouri-Habashi A, Rahmani H, Maleki M, Naderi N, Lotfian S, et al. Platelet activation and function in response to high intensity interval exercise and moderate continuous exercise in CABG and PCI patients. Clinical hemorheology and microcirculation. 2016; 64(4): 911-919.

7. Kumar A, Kar S, Fay WP. Thrombosis, physical activity, and acute coronary syndromes. Journal of applied physiology. 2011; 111(2): 599-605.

8. Hong S, Adler KA, Von Känel R, Nordberg J, Ziegler MG, Mills PJ. Prolonged platelet activation in individuals with elevated blood pressure in response to a moderate exercise challenge. Psychophysiology. 2009; 46(2): 276-284.

9. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. haematologica. 2009;94(5):700-711.

10. Smolenski A. Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2012;10(2): 167-176.

11. Suhr F, Porten S, Hertrich T, Brixius K, Schmidt A, Platen P, et al. Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes. Nitric Oxide. 2009; 20(2): 95-103.

12. Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation. Circulation research. 2007; 101(7): 654-662.

13. Makhoul S, Walter E, Pagel O, Walter U, Sickmann A, Gambaryan S, et al. Effects of the NO/soluble guanylate cyclase/cGMP system on the functions of human platelets. Nitric oxide. 2018; 1(76): 71-80.

14. Aurigemma C, Fattorossi A, Sestito A, Sgueglia GA, Farnetti S, Buzzonetti A, et al. Relationship between changes in platelet reactivity and changes in platelet receptor expression induced by physical exercise. Thrombosis research. 2007; 120(6): 901-909.

15. Wang J-S. Intense exercise increases shear-induced platelet aggregation in men through enhancement of von Willbrand factor binding, glycoprotein IIb/IIIa activation, and P-selectin expression on platelets. European journal of applied physiology. 2004; 91(5-6): 741-747.

16. Kadoglou NP, Kostomitsopoulos N, Kapelouzou A, Moustardas P, Katsimpoulas M, Giagini A, et al. Effects of exercise training on the severity and composition of atherosclerotic plaque in apoE-deficient mice. Journal of vascular research. 2011; 48(4): 347-356.

Testing Guidelines: Volume I–Sport Testing: The British Association of Sport and Exercise Sciences Guide: Routledge; 2006.

24. Lamprecht M, Moussalli H, Ledinski G, Leschnik B, Schlagenhauf A, Koestenberger M, et al. Effects of a single bout of walking exercise on blood coagulation parameters in obese women. Journal of applied physiology. 2013; 115(1): 57-63.

25. Cadroy Y, Pillard F, Sakariassen KS, Thalamas C, Boneu B, Riviere D. Strenuous but not moderate exercise increases the thrombotic tendency in healthy sedentary male volunteers. Journal of applied physiology. 2002; 93(3): 829-833.

26. Ahmadizad S, El-Sayed MS. The effects of graded resistance exercise on platelet aggregation and activation. Medicine and science in sports and exercise. 2003; 35(6): 1026-1032.

27. Kobusiak-Prokopowicz M, Kuliczkowski W, Karolko B, Prajs I, Mazurek W. Platelet aggregation and P-selectin levels during exercise treadmill test in patients with ischaemic heart disease. Kardiologia polska. 2006; 64(10):1094-1100; discussion 101.

28. Aktories K, Jakobs KH. Epinephrine inhibits adenylate cyclase and stimulates a GTPase in human platelet membranes vis α-adrenoceptors. FEBS letters. 1981; 130(2): 235-238.

29. Guiraud T, Nigam A, Gremeaux V, Meyer P, Juneau M, Bosquet L. High-intensity interval training in cardiac rehabilitation. Sports medicine. 2012; 42(7): 587-605.

30. Ciolac EG. High-intensity interval training and hypertension: maximizing the benefits of exercise. Am J Cardiovasc Dis. 2012; 2(2): 102-110.

17. Ikarugi H, Taka T, Nakajima S, Noguchi T, Watanabe S, Sasaki Y, et al. Norepinephrine, but not epinephrine, enhances platelet reactivity and coagulation after exercise in humans. Journal of Applied Physiology. 1999; 86(1): 133-138.

18. de Meirelles LR, Matsuura C, de Castro Resende A, Salgado ÂA, Pereira NR, Coscarelli PG, et al. Chronic exercise leads to antiaggregant, antioxidant and anti-inflammatory effects in heart failure patients. European journal of preventive cardiology. 2013; 21(10): 1225-1232.

19. Di Massimo C, Scarpelli P, Penco M, Tozzi-Ciancarelli M. Possible involvement of plasma antioxidant defences in training-associated decrease of platelet responsiveness in humans. European journal of applied physiology. 2004; 91(4): 406-412.

20. Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, et al. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. Journal of Applied Physiology. 2001;91(5): 2205-2212.

21. Warburton DE, McKenzie DC, Haykowsky MJ, Taylor A, Shoemaker P, Ignaszewski AP, et al. Effectiveness of high-intensity interval training for the rehabilitation of patients with coronary artery disease. The American journal of cardiology. 2005; 95(9): 1080-1084.

22. De Meirelles L, Mendes-Ribeiro A, Mendes M, Da Silva M, John Clive Ellory J, Mann G, et al. Chronic exercise reduces platelet activation in hypertension: upregulation of the l-arginine-nitric oxide pathway. Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2009; 19(1): 67-74.

23. Winter EM, Jones AM, Davison RR, Bromley PD, Mercer TH. Sport and Exercise Physiology

uptake and the time for which this can be maintained. European journal of applied physiology. 2003; 89(3-4): 337-343.

38. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. Circulation. 2001; 103(4): 491-495.

39. Lee KW, Lip GY. Effects of lifestyle on hemostasis, fibrinolysis, and platelet reactivity: a systematic review. Archives of internal medicine. 2003; 163(19): 2368-2392.

40. Calzi SL, Purich DL, Chang KH, Afzal A, Nakagawa T, Busik JV, et al. Carbon Monoxide and Nitric Oxide Mediate Cytoskeletal Reorganization in Microvascular Cells via Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Phosphorylation Evidence for Blunted Responsiveness in Diabetes. Diabetes. 2008; 57(9): 2488-2494.

41. Major TC, Handa H, Brisbois EJ, Reynolds MM, Annich GM, Meyerhoff ME, et al. The mediation of platelet quiescence by NO-releasing polymers via cGMP-induced serine 239 phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein. Biomaterials. 2013; 34(33): 8086-8096.

42. Shah A, Passacquale G, Gkaliagkousi E, Ritter J, Ferro A. Platelet nitric oxide signalling in heart failure: role of oxidative stress. Cardiovascular research. 2011; 91(4): 625-631.

43. Cuzzolin L, Lussignoli S, Crivellente F, Adami A, Schena F, Bellavite P, et al. Influence of an acute exercise on neutrophil and platelet adhesion, nitric oxide plasma metabolites in inactive and active subjects. International journal of sports medicine. 2000; 21(04): 289-293.

31. Wang J-S, Li Y-S, Chen J-C, Chen Y-W. Effects of exercise training and deconditioning on platelet aggregation induced by alternating shear stress in men. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2005; 25(2): 454-460.

32. Desgorces FD, Chennaoui M, Gomez-Merino D, Drogou C, Bonneau D, Guezennec CY. Leptin, catecholamines and free fatty acids related to reduced recovery delays after training. European journal of applied physiology. 2004; 93(1-2): 153-158.

33. Ruslan NH, Ghosh AK, Razak AAA, Hassan R, WMZ WS. Effect of continuous and intermittent exercise training programs on platelet activation and fibrinolytic profile of sedentary males. International Journal of Basic and Applied Medical Sciences 2012; 2(2): 27-39.

34. Brunini T, Moss M, Siqueira M, Meirelles L, Rozentul A, Mann G, et al. Inhibition of l-arginine transport in platelets by asymmetric dimethylarginine and NG-monomethyl-l-arginine: Effects of arterial hypertension. Clinical and experimental pharmacology and physiology. 2004; 31(10): 738-740.

35. Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. Physiological reviews. 2003; 83(1): 183-252.

36. Brunini T, Resende A, Moss M, De Moura RS, Ribeiro A. L-arginine availability as a pathological mechanism in essential hypertension, chronic renal and heart failure. Vascular Disease Prevention. 2005; 2(1): 37-51.

37. Smith TP, Coombes JS, Geraghty DP. Optimising high-intensity treadmill training using the running speed at maximal O2

Shahid Beheshti University

Sport and Exercise Physiology

Autumn & Winter 2019/ No.2/ Vol. 11/ Pages: 49-62

The effects of high intensity interval training on platelet aggregation and phosphorylation of VASPser239 in men with coronary heart disease

Akbar Nouri-Habashi[1*], Sajad Ahmadizad[2], Morteza Salimian[3], Hiwa Rahmani[2]

[1] Department of Exercise Physiology and Corrective Exercises, Faculty of Sports Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.
[2] Department of Sport and Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[3] Department of Medical Laboratory, Faculty of Paramedical Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

Received: 11/10/2016 Revised: 04/12/2016 Accepted: 02/01/2017

Purpose: Exercises increase platelet activation and aggregation in patients with cardiovascular diseases especially at high intensities. The aim of the study was to investigate the effect of 8 weeks of high-intensity interval training on platelet activation and aggregation and phosphorylation of VASPser239 in the coronary heart patients.

Methods: For this purpose, twenty CABG and PCI patients (≤ 3 months) participated voluntarily and were randomly divided into two groups; i.e. control (N=10) and interval training (N=10) groups. Anthropometric characteristics and peak oxygen consumption were recorded a week before the start. High-intensity interval training group patients participated in an 8 weeks exercise training program, three times a week. The interval training program consisted of a warm-up, 8 reps/ four min (exercise: 2min, active recovery: 2min, intensity: 90/ 30) and finally, cool down. Each session lasted 40 min. The training intensity was started 75/ 15% of the peak oxygen consumption but gradually increased during the first two weeks to reach 90/ 30% of peak oxygen consumption in the last two weeks. The control group did not participate in regular exercises during this period. Blood samples were taken before and 48h after the last exercise session and analyzed for platelet aggregation, CD62p expression, and phosphorylation of VASPser239. The dependent and independent t-tests were used for statistical analysis.

Results: A significant difference was observed between the two groups in the amount of decrease in platelet aggregation and CD62p expression in response to ADP ($P < 0.05$). Also, the VASP phosphorylation at ser239 was increased significantly in response to NO in the interval training group ($P<0.05$).

Conclusion: Eight weeks of high-intensity interval training led to the improvement in platelet activation and aggregation factors in coronary heart patients of this study. It seems that regular high-intensity exercise may improve platelet function, due to a decrease in CD62P expression and an increase in sensitivity to NO production by endothelial cells.

Key words: High-intensity interval training, Platelet aggregation, P selectin, VASP phosphorylation.

* Corresponding Author: Akbar Nouri-Habashi. Tel: 09143416011. E-Mail: a.norihabashi@urmia.ac.ir