

The Effect of Eight Weeks High Intensity Aerobic Continuous and Interval Training on Gene Expression of Vascular Endothelial Growth Factor In Soleus Muscle of Healthy Male Rats

Mohammad Reza Kordi¹, Amin Nekouei¹, Ahad Shafiee^{1*}, Vahid Hadidi¹

1- Department of Exercise Physiology, Tehran University, Tehran, Iran.

Received: 15 Apr 2015, Accepted: 1 Jul 2015

Abstract

Background: One of the important adaptations that occurs after exercise is increased capillary density or angiogenesis. Vascular endothelial growth factor, has a mitogenic role for endothelial cells and acts as an important intermedator in the process of angiogenesis. The aim of this study was to compare the effects of two kind of endurance training on vascular endothelial growth factor gene expression in healthy male rats.

Materials and Methods: In this laboratory experimental study, 18 male Wistar rats at the age of eight weeks, with an average weight of $210/5 \pm 9/77$ g were selected and randomly divided into three groups (control (n=6), ET (n=6) and HIIT (n=6)). Aerobic continuous training was performed 5 days a week, totally in eight weeks for 30 minutes with 70-75% VO₂max and high intensity interval training consisted of three periods (four minutes with 90 to 100% VO₂max and two minutes with 50 to 60% VO₂max). Vascular endothelial growth factor gene expression was measured by real time-PCR technique. To determine the significance of variables between these groups, one-way ANOVA and Tukey's post hoc tests were used.

Results: The results showed that the gene expression levels of vascular endothelial growth factor were increased significantly ($p=0/006$, $F=7/243$) in intense aerobic continuous and interval training groups compared to control group. Changes in exercise groups compared with each other were not significant.

Conclusion: According to the results of this study, increased levels of vascular endothelial growth factor gene expression in both training groups caused pro-angiogenic function in endothelial cells and an increase in rats VO₂max following eight weeks training may be due to increased angiogenesis process. High intensity interval training may cause faster adaptations in the body of organism than aerobic continuous training.

Keywords: Angiogenesis, Acrobic continuous exercise, Intense interval training, Vascular endothelial growth factor

*Corresponding Author:

Address: Department of Exercise Physiology, Tehran University, Tehran, Iran.

Email: A.shafiee@ut.ac.ir

تأثیر هشت هفته تمرین هوازی تداومی و تناوبی شدید بر بیان ژن عامل رشد اندوتلیال عروقی در عضله نعلی رت‌های نر سالم

محمد رضا کردی^۱، امین تکویی^۲، احد شفیعی^{۲*}، وحید حدیدی^۲

۱- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزش، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: از جمله سازگاری‌های مهمی که همراه با ورزش رخ می‌دهد، افزایش چگالی مویرگی یا رگ‌زایی است. عامل رشد اندوتلیال عروقی، یک نقش میتوژنیک برای سلول‌های اندوتلیال دارد و واسطه مهمی در فرآیند رگ‌زایی به شمار می‌رود. هدف از تحقیق حاضر، مقایسه تأثیر دو نوع تمرین استقامتی بر میزان بیان ژن عامل رشد اندوتلیال عروقی در رت‌های نر سالم بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی - آزمایشگاهی، ۱۸ سر رت نر نژاد ویستار در سن هشت هفتگی با میانگین وزن 210.5 ± 9.77 گرم انتخاب شدند و به صورت تصادفی به سه گروه کنترل ($n=6$)، گروه ET ($n=6$) و گروه HIIT ($n=6$) تقسیم شدند. تمرین تداومی هوازی پنج روز در هفته و در مجموع به مدت هشت هفته شامل ۳۰ دقیقه با شدت ۷۰ تا ۷۵ درصد VO_{2max} و تمرین تناوبی شدید شامل سه تناوب به مدت چهار دقیقه با شدت ۹۰ تا ۱۰۰ درصد VO_{2max} و دو دقیقه با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد VO_{2max} بود. سنجش بیان ژن عامل رشد اندوتلیال عروقی با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی مرز زمان - واقعی انجام گرفت. برای تعیین معنی‌دار بودن متغیرها بین گروه‌های تحقیق، از آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که سطح بیان ژن عامل رشد اندوتلیال عروقی در گروه تمرین هوازی تداومی و تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است که این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($F=7/243$ ، $p=0/006$). تغییرات در دو گروه تمرینات هوازی تداومی و تناوبی شدید نسبت به یکدیگر معنی‌دار نبوده است.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های این تحقیق، افزایش سطح بیان ژن عامل رشد اندوتلیال عروقی در هر دو گروه تمرین احتمالاً باعث عملکرد پروآنژیوژنزی سلول‌های اندوتلیال می‌شود و افزایش VO_{2max} رت‌ها در پی هشت هفته می‌تواند ناشی از افزایش فرآیند رگ‌زایی باشد. تمرین تناوبی شدید ممکن است باعث سازگاری‌های سریع‌تری نسبت به تمرینات تداومی هوازی در بدن موجود زنده شود.

واژگان کلیدی: رگ‌زایی، تمرینات تداومی هوازی، تمرینات تناوبی شدید، عامل رشد اندوتلیال عروقی

* نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تهران، گروه فیزیولوژی ورزشی

Email: A.shafiee@ut.ac.ir

مقدمه

سازگاری‌های متعددی پس از تمرین‌های ورزشی در بدن ایجاد می‌شود که به کاهش آمار مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی-عروقی و به بهبود اجرای ورزش کمک می‌کند. از اصلی‌ترین این سازگاری‌ها، افزایش جریان خون عضله می‌باشد که این افزایش با تغییر چگالی مویرگی و حداکثر اکسیژن مصرفی همراه است (۱). یکی از تغییراتی که هنگام تمرینات ورزشی در ساختار عروقی عضله اسکلتی برای رفع شرایط استرسی رخ می‌دهد، رگ‌زایی است. رگ‌زایی به معنای افزایش چگالی مویرگی عضله اسکلتی و قلبی و رشد مویرگ‌های جدید در عضله اسکلتی است که با تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال همراه است و به دو شکل جوانه‌زدن و دو نیم شدن مویرگ‌ها موجود می‌باشد (۲). فرآیند رگ‌زایی یکی از سازگاری‌های بسیار مهم در بافت‌های متعدد بدن (عضله اسکلتی، قلب، مغز، کلیه و غیره) همراه با ورزش محسوب می‌شود. از این رو هنگام فعالیت ورزشی حدود ۸۰ درصد خون در حال گردش به سوی عضله اسکلتی (۴۵ درصد وزن بدن را تشکیل می‌دهد) فرستاده می‌شود تا میزان اکسیژن بیشتری به عضله اسکلتی برسد و انرژی فعالیت ورزشی (تنفس میتوکندریایی) در حد مطلوبی تامین شود. به همین علت فرآیند رگ‌زایی در این بافت حائز اهمیت می‌باشد. در واقع، رگ‌زایی فرآیند پیچیده‌ای است که مستلزم درگیری انواع سلول‌ها (سلول‌های اندوتلیال و عضله صاف) و همچنین شامل مسیرهای پیام‌دهی شناخته شده‌ای از قبیل MAPK، PI3K و Erk1/2 عوامل رشدی گوناگون و مهم‌ترین آنها TGF-FGF-VEGF و وجود گیرنده‌هایی هم‌چون FLT-4، FLT-1، KDR و آنزیم‌هایی از خانواده MMPs می‌باشد (۲، ۳). تکثیر، تمایز و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال مویرگی (در هر دو روش) لازمه تشکیل عروق جدید هستند. رگ‌زایی یک فرآیند چند مرحله‌ای است که شامل مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیال و سازمان‌یابی توده‌های سلولی به شکل ساختارهای لوله مانند، اتصال ساختارهای لوله مانند به همدیگر و در نهایت بلوغ و تشکیل

عروق پایدار است (۴). عوامل آنژیوژنیک عمده‌ای شناسایی شده‌اند که از میان آن‌ها عامل رشد اندوتلیال عروقی به عنوان قوی‌ترین میتوژن مخصوص سلول‌های اندوتلیال شناخته شده است (۵). عامل رشد اندوتلیال عروقی یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های اختصاصی رگ‌زایی است. مجموعه عوامل رشد اندوتلیال عروقی شامل گلیکوپروتئین‌های ترشحی به نام‌های (VEGF-A، VEGF-B، VEGF-C، VEGF-D، VEGF-E، VEGF-F) و عامل رشد جفتی است (۶).

VEGF-A گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۴۲ تا ۳۴ کیلو دالتون بوده که دارای هفت ایزوفرم است و به ترتیب متشکل از ۱۲۱، ۱۴۵، ۱۴۸، ۱۶۵، ۱۸۳، ۱۸۹ و ۲۰۶ اسید آمینه است (۷). شواهد حاکی است که VEGF-165 از نظر بیولوژیکی، فعال‌ترین ایزوفرم می‌باشد و قابلیت اتصال به هر دو گیرنده VEGFR-1 و VEGFR-2 را دارد (۸). پلاسمین که در تخریب ماتریکس برون سلولی نقش دارد، هم به طور مستقیم از طریق هضم اجزای غشای پایه و هم به طور غیر مستقیم به وسیله فعال کردن کلاژنازاها، باعث رها شدن VEGF-165 می‌گردد. این عوامل رشد اندوتلیال عروقی، عمل زیستی خود را از طریق میان‌کنش با گیرنده‌های تیروزین کینازی موجود در غشای پلاسمایی سلول بر روی سلول‌های هدف به انجام می‌رسانند. این گیرنده‌ها پس از اتصال به لیگاند خود به صورت دایمر درآمده و اتو فسفریله می‌شوند که در نهایت این وضعیت خود منجر به ایجاد وقایع آنباشاری درون سلولی می‌شود. گیرنده‌های تیروزین کینازی که تاکنون در ارتباط با عامل‌های رشدی مذکور شناخته شده‌اند، عبارت‌اند از: VEGFR-1، VEGFR-2، VEGFR-3 و نوروپیلین‌ها (NRP-1 و NRP-2) (۹). VEGF عامل اصلی درگیر در فرآیند رگ‌زایی است و اثر خود را از طریق فعال کردن گیرنده‌های VEGFR-1 و VEGFR-2 اعمال می‌کند. VEGF در پاسخ به محرک‌هایی مانند هایپوکسی و استرس برشی (نیروی همودینامیکی ناشی از اصطکاک جریان خون با دیواره عروق) از سلول‌های اندوتلیالی ترشح می‌شود (۱۰).

هفته به استراحت پرداختند و مجدداً بایوپسی از موش‌ها به عمل آمد. نتایج نشان داد که ۳ هفته بی‌تمرینی میزان VEGF و ANG-1 را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (۱۵). گاستافسون و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه‌ای بر روی بیان ژن VEGF در عضله اسکلتی انسان به این نتیجه رسیدند که در پاسخ به فعالیت ورزشی کوتاه مدت، افزایش همزمان در سطوح VEGF mRNA و پروتئین VEGF در فیبرهای عضلانی صورت می‌گیرد (۱). گوین و همکاران (۲۰۰۱) در مطالعه‌ای بر روی بیان ژن VEGF در عضله دوقلوی موش‌های صحرایی مشاهده کردند که پنج جلسه تمرین باعث کاهش پاسخ افزایشی بیان ژن‌های عوامل رشدی VEGF، FGF و TGF- β به یک جلسه تمرین حاد می‌شود (۱۶). از آنجا که فرایندهای رگ‌زایی و عامل اصلی در فرایند آن یعنی VEGF از اهمیت زیادی برخوردار است، از این رو دستیابی به شیوه‌های تمرین مناسب و شدت‌های متفاوت تمرینات هوازی در این فرایند در سال‌های اخیر مورد توجه محققان حوزه فیزیولوژی ورزش قرار گرفته است. با توجه به مطالب فوق به دنبال پاسخ این سوالات هستیم مبنی بر این که آیا تمرین هوازی تداومی و هم‌چنین تمرین HIIT بر بیان ژن VEGF تأثیر دارند؟ آیا تمرین تناوبی شدید اثر متفاوتی دارد؟ و کدام یک از این دو نوع تمرین بیان بیشتر این ژن را در پی خواهند داشت؟

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی-آزمایشگاهی بود. تعداد ۱۸ رت نر نژاد ویستار در سن هشت هفتگی با میانگین وزنی 20 ± 180 گرم از انستیتوی پاستور ایران خریداری و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تهران منتقل شدند و در شرایط دمایی 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد تحت چرخه خواب و بیداری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد قرار گرفتند و بدون هیچ‌گونه محدودیتی در غذا و آب، در قفس‌های پلی‌اتیلن نگهداری شدند. در مراحل مختلف ضمن رعایت مسایل اخلاقی سعی شد از هرگونه آزار جسمی و روش غیر ضروری اجتناب گردد (مجوز کد

VEGF از طریق تنظیم افزایشی عوامل آنتی‌آپوپتوتیک، سنتز DNA، تخریب غشای پایه و هم‌چنین فسفریله کردن اجزای چسبنده آندوتلیالی بین سلولی و اتصالات محکم، به ترتیب زمینه بقا، تکثیر، مهاجرت و نفوذپذیری سلول‌های آندوتلیال عروقی را فراهم می‌سازد و در نهایت موجب تشکیل عروق جدید می‌شود (۱۱). اگرچه فعالیت‌های ورزشی توانایی تنظیم سطوح سرمی عوامل آنژیوژنیک را دارند تا بدین ترتیب از به وجود آمدن شرایط پاتولوژیک مانند آترواسکلروز جلوگیری کنند، اما هنوز مکانیسم مولکولی شروع فرایند توسعه شبکه مویرگی در پاسخ به تمرینات ورزشی به خوبی شناخته نشده است (۱۲). از طرفی، تأثیر ورزش بر روی بیان ژن VEGF دارای نتایج متناقضی است. لاید و همکاران (۲۰۰۳) پژوهشی را در زمینه‌ی رگ‌زایی عضلات اسکلتی در پاسخ به تمرینات ورزشی، برای کسب آگاهی از فرایند رگ‌زایی بر روی موش‌ها انجام دادند. نتایج نشان داد که در گروه تمرینی، VEGF پس از ۱۲ روز سه تا شش برابر افزایش یافت، اما در گروه کنترل تغییری ایجاد نشد (۱۳). زاگروفسکا پاک و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی اثرات فعالیت ورزشی بر تولید TGF- β و VEGF-A موجود در بافت چربی ۵۹ موش صحرایی را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که سطح VEGF-A بلافاصله ۳ ساعت بعد از تمرین نسبت به قبل از تمرین تغییری نمی‌یابد. در گروه تمرینی، سطوح ژنی VEGF-A و TGF-b1 در سه ساعت بعد از تمرین نسبت به قبل از تمرین کاهش یافت و سطوح ژنی VEGF-A و TGF-b1 در نتیجه فعالیت استقامتی طولانی مدت در گروه تمرینی نسبت به غیر تمرینی افزایش معنی‌داری داشت. فعالیت بدنی مداوم، بیان عوامل رشدی در بافت چربی را افزایش داده بود (۱۴). دانگ و همکاران (۲۰۰۴) در تحقیقی تأثیر تمرین ورزشی بر روی VEGF و ANG-1 در موش‌های صحرایی را مورد مطالعه قرار دادند. تمرین شامل ۳۰ دقیقه دویدن در روز بر روی نوارگردان به مدت ۶ هفته بود. به علاوه میزان VEGF نیز افزایش پیدا کرد و بیشترین افزایش در هفته سوم مشاهده شد. بعد از تمرین، موش‌های تمرینی به مدت ۳

در کل، پروتکل ورزشی شامل هشت هفته تمرین هوازی تداومی و تناوبی شدید بود. تمرین هوازی تداومی، هفته‌ای پنج جلسه و هر جلسه ۳۰ دقیقه دویدن با شدت ۷۰ تا ۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی با شیب صفر بر روی دستگاه نوارگردان بود. پروتکل حاضر بر مبنای پژوهش برنستون و همکاران (۲۰۰۹) طراحی شده که در جدول ۲ ارائه شده است (۱۷). در انتهای دو هفته آشنایی، حداکثر اکسیژن مصرفی رت‌ها اندازه‌گیری شد و رت‌ها با توجه به پروتکل ورزشی و درصدی از حداکثر اکسیژن مصرفی (که به متر بر دقیقه تبدیل شد)، پنج جلسه تمرین در هفته را آغاز کردند. در پایان هر دو هفته، آزمون حداکثر اکسیژن مصرفی اجرا شد و سرعت تمرینی جدیدی برای هفته بعد از تمرین در نظر گرفته شد. به علت نداشتن دسترسی به ابزار مستقیم (دستگاه تجزیه و تحلیل گازهای تنفسی)، توان هوازی رت‌ها به طور غیرمستقیم با استفاده از پژوهش‌های اخیر (هویدال و همکاران، ۲۰۰۷) بررسی شد (۱۸). ابتدا ۱۰ دقیقه گرم کردن با شدت ۴۰ تا ۵۰ درصد VO_{2max} صورت گرفت. بعد از گرم شدن، آزمون با دویدن رت‌ها با سرعت ۱۵ متر در دقیقه به مدت دو دقیقه شروع شد. سپس سرعت نوارگردان هر دو دقیقه یک بار به میزان ۰/۰۳ متر بر ثانیه (۱/۸ تا ۲ متر بر دقیقه) افزایش یافت تا حیوانات دیگر قادر به دویدن نباشند. ملاک رسیدن به VO_2 ، عدم افزایش VO_{2max} با وجود افزایش سرعت بود. سرعت VO_{2max} سرعتی است که در آن VO_2 به فلات برسد. رسیدن به فلات با غلظت لاکتات بالاتر از ۶ میلی‌مول در لیتر و نسبت تنفسی VCO_2/VO_2 برابر با ۱/۰۵ در نظر گرفته شد. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که یک ارتباط قوی بین سرعت نوارگردان و VO_{2max} رت‌ها وجود دارد (۰/۹۸- $r=0/94$ ، $p<0/005$) (۱۸). از این رو، میزان VO_{2max} رت‌ها براساس سرعت دویدن به دست آمد. تمامی جلسات تمرین، هنگام عصر که بهترین زمان تمرین در ریتم فعالیت طبیعی رت‌ها می‌باشد، در زیر نور قرمز (به علت کمترین استرس‌زایی) انجام شد. شرایط زیستی حیوانات در گروه کنترل به جز انجام تمرینات روزانه در سایر اوقات مشابه

اخلاقی از کمیته اخلاق در پژوهش به شماره K/171/91). در ابتدا، حیوانات به صورت تصادفی به سه گروه کنترل ($n=6$)، گروه HIIT ($n=6$) و گروه ET ($n=6$) تقسیم شدند. رت‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه حیوانات به مدت سه روز برای سازگاری با محیط و رسیدن به حد وزنی مطلوب (۲۰۰ گرم) مراقبت شدند. گروه تمرینی در دو هفته اول ۷ تا ۱۰ روز برای آشناسازی با اجرای HIIT و ET به تمرین پرداختند. البته برای عملیاتی کردن پروتکل، هم‌زمان برنامه به شکل مقدماتی اجرا شد. پروتکل ورزشی با توجه به اصول طراحی برنامه‌های تناوبی شدید برای به حداکثر رساندن عملکرد دستگاه هوازی (جذب اکسیژن و ظرفیت اکسایشی عضلات اسکلتی، هر دو) در شدتی نزدیک به VO_{2max} ، به مدت دو تا چهار دقیقه و زمان بازیافت فعال بین دو تا سه دقیقه پیشنهاد شده است که همین شرایط طراحی و اجرا شد. هر جلسه اجرای HIIT شامل ۳۰ دقیقه فعالیت ورزشی بود. پروتکل حاضر بر مبنای پژوهش شفیع و همکاران (۲۰۱۴) طراحی شد که در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. طرح پروتکل تمرین تناوبی شدید

مراحل تمرین مؤلفه تمرین	گرم کردن	بدنه اصلی تمرین (۳ تناوب)		سرد کردن
		تناوب شدید	تناوب کم شدت	
زمان تمرین (دقیقه)	۶ دقیقه	۴ دقیقه	۲ دقیقه	۶ دقیقه
شدت تمرین (VO_{2max})	۵۰ تا ۶۰ درصد	۹۰ تا ۱۰۰ درصد	۵۰ تا ۶۰ درصد	۵۰ تا ۶۰ درصد

❖ شیب نوارگردان در همه مراحل تمرین صفر بود.

جدول ۲. طرح پروتکل تمرین هوازی تداومی

مراحل تمرین مؤلفه تمرین	گرم کردن	بدنه اصلی تمرین	سرد کردن
شدت تمرین (VO_{2max})	۵۰ تا ۶۰ درصد	۷۰ تا ۷۵ درصد	۵۰ تا ۶۰ درصد

انکوبه شد: پنج دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد (مرحله ساخت cDNA به وسیله آنزیم ترانس کریپتاز معکوس RT) و پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (جهت غیر فعال کردن آنزیم RT). پس از اتمام مراحل ترموسایکلر ۲۸۰ واحد لیتر آب تزریقی اضافه شد و برای استفاده در QPCR در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. برای هر نمونه cDNA نیز یک نمونه کنترل مثبت با پرایمر b2m به عنوان کنترل داخلی، برای آزمون حضور cDNA تهیه شد. نمونه‌ها به آرامی و بدون ورتکس مخلوط شده و در دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلی مرز زمان واقعی (Corbett) با برنامه زیر PCR شدند: ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (واسرشته شدن اولیه)، ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (واسرشته شدن)، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد (اتصال پرایمرها) و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (گسترش). واکنش از مرحله دوم به بعد برای ۴۰ سیکل تکرار شد. Cts مربوط به واکنش‌ها از طریق نرم افزار دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلی مرز زمان واقعی استخراج گردید و در نهایت Ct mean سه مرتبه ثبت شد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۳ آورده شده‌اند. برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن هدف مورد نظر، از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. اطلاعات مورد نیاز پس از جمع‌آوری، از طریق نرم افزار آماری SPSS در سطح معنی‌داری $p \leq 0/05$ پردازش و تحلیل شدند و کلیه نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان گردیدند. بعد از اطمینان از نرمال بودن توزیع متغیرهای پژوهش، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی به منظور تعیین معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها استفاده شد.

گروه تمرین بود و حتی جهت شبیه‌سازی بیشتر، گروه کنترل در بازه‌ی زمانی تمرین سه بار در هفته و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه روی دستگاه نوارگردان با سرعت دو متر بر دقیقه قرار گرفتند (۱۹). ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، رت‌ها پس از ناشتایی شبانه نمونه‌برداری شدند و برای جمع‌آوری نمونه‌ها، ابتدا حیوان با ترکیبی از داروی زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و کتامین (۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) به شکل تزریق درون صفاقی بیهوش شد. سپس قفسه سینه حیوان شکافته و برای اطمینان از کمترین آزار حیوان، نمونه‌های خون مستقیماً از قلب حیوان گرفته شد. آن‌گاه عضله نعلی از اندام تحتانی حیوان برداشته شد، در سرم فیزیولوژیک شست و شو داده شد و در ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن کشتی گردید، سپس بلافاصله با استفاده از ازت مایع منجمد گشتو برای سنجش‌های بعدی به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. استخراج RNA با استفاده از ۵۰ میلی‌گرم عضله نعلی انجام گرفت. بافت با استفاده از یک میلی‌مول محلول تریزول لیز شده و با دستگاه همگن کننده بافت هموژن شد. در مرحله بعد، جداسازی از فاز آبی به کمک ۰/۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم شد. RNA استخراج شده با ۱ میلی‌لیتر اتانول سرد ۷۰ درصد شست و شو و خشک شد و سپس به آن آب استریل (۱/۵ واحد لیتر در میلی‌گرم بافت) اضافه گردید. برای سنجش کمی RNA استخراج شده از دستگاه بایوفتومتر با طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده شد. میانگین OD خوانده شده ۱/۷۷ بود که نشان‌گر کارایی مناسب RNA استخراج شده بود. استخراج cDNA برای هر نمونه طی سه مرحله ساخت cDNA انجام گرفت. بدین ترتیب که در ابتدا هشت میکروگرم از RNA استخراج شده با ۰/۸ واحد لیتر از آنزیم DNase I و ۲ واحد لیتر از بافر ۱۰x آن و آب DEPC خورده مخلوط شد و حجم نمونه به ۲۰ واحد لیتر رسانده شد. محصول ایجاد شده بدون ورتکس کردن به آرامی مخلوط گردید و سپس با برنامه زیر در دستگاه ترموسایکلر

جدول ۳. پرایمر مورد استفاده در پژوهش

سایکونس	میزبان	پرایمر
GATGGCTTGAAGATGTACTCGATCT	Rat	VEGF-A

یافته‌ها

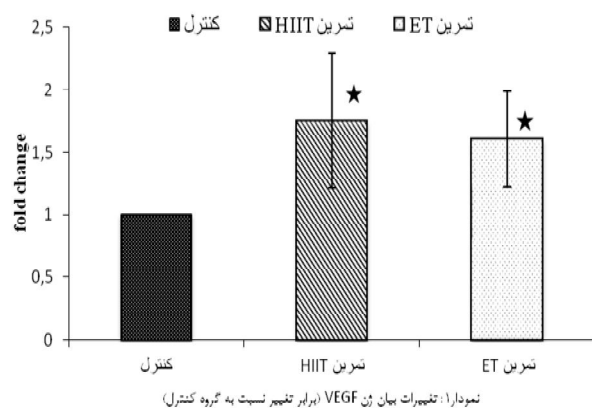
تغییرات وزن رت‌ها در جدول ۴ گزارش شده است که نشان دهنده رشد طبیعی و در عین حال افزایش کمتر وزن رت‌ها در گروه تمرین نسبت به کنترل است.

جدول ۴. میانگین و انحراف استاندارد وزن گروه‌ها

گروه	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)
کنترل (n=۶)	۲۱۰/۵±۹/۷۷	۳۳۷/۱۷±۷/۸۰
تمرین (n=۱۲)	۲۱۲±۹/۲۷	۳۰۵/۸۳±۱۶/۴۶

داده‌ها به صورت میانگین±انحراف استاندارد آورده شده اند.

یافته‌های به دست آمده از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که سطح بیان ژن VEGF-A در گروه تمرین هوازی تداومی و تمرین تناوبی شدید بعد از هفته هشت، ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین در عضله نعلی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که این افزایش معنی‌دار بود (F= ۷/۲۴۳، p=۰/۰۰۶). میزان بیان آن در نمودار ۱ ارائه شده است. اما این افزایش تغییرات در بین دو گروه تمرینات هوازی تداومی و تناوبی شدید نسبت به یکدیگر معنی‌دار نبوده است.



بحث

عوامل آنژیوژنیک عمده‌ای شناسایی شده‌اند که از میان آن‌ها عامل رشد آندوتلیال عروقی به عنوان قوی‌ترین میتوزن مخصوص سلول‌های آندوتلیال شناخته شده است. پژوهش حاضر از معدود مطالعاتی است که نقش دو نوع فعالیت ورزشی ET و HIIT را در تغییرات بیان ژن VEGF-A مورد مقایسه و بررسی قرار می‌دهد. پژوهش حاضر نشان داد که هشت هفته اجرای HIIT و ET باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن VEGF-A در عضله نعلی رت‌های نر و استار سالم می‌شود. مقادیر VEGF-A در گروه هوازی تداومی نسبت به گروه کنترل ۶۰ درصد افزایش داشته است و در گروه تمرینات تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل ۷۵ درصد افزایش داشت. اما این تغییرات در دو گروه تمرینات هوازی تداومی و تناوبی شدید نسبت به یکدیگر معنی‌دار نبوده است. این نتایج با پژوهش لاید و همکاران (۲۰۰۳)، دانگ و همکاران (۲۰۰۴) و گاستافسون و همکاران (۲۰۰۲) همسو می‌باشد و نتایج پژوهش حاضر با نتایج زاگروفسکا پازک و همکاران (۲۰۱۱) مغایر است. احتمالاً ناهمسو بودن نتایج زاگروفسکا پازک به علت سنجش ژن VEGF-A در بافت چربی و همچنین زمان سنجش این عامل رشد آندوتلیالی می‌باشد. در واقع، این پژوهش‌گران ژن VEGF-A را قبل، بلافاصله و سه ساعت بعد از انجام یک تست وامانده ساز پس از شش هفته تمرین مورد سنجش قرار دادند. به منظور تحلیل اختلاف میانگین مشاهده شده در سطوح ژن VEGF-A، می‌توان به موارد احتمالی زیر اشاره کرد. شواهد حاکی است که در شرایط ایسکمی و هایپوکسی، افزایش چشم‌گیری در عامل قابل القای هایپوکسی (HIF-1) رخ می‌دهد. فعال‌سازی HIF-1 سازگاری‌های عملکردی (بیان ژنی اریتروپوئیتین، بیان ژنی VEGF، بیان ژنی آنزیم‌های گلیکولیتیک و غیره) را آغاز می‌کند که این عوامل می‌توانند اثرات منفی قرارگیری در

ویژه در ماتریکس خارج سلولی عمل می‌کند. براساس این فرضیه، تنش برشی با ایجاد آشفتگی در ستون‌های اسکلتی سلول، در محل اتصال چسبنده موضعی، سلول آندوتلیال را دچار تغییر می‌کند و اینتگرین را فعال می‌سازد و بدین ترتیب سبب تولید پیام‌های درون سلولی می‌شود که در نهایت رونویسی ژن‌های درگیر در فرایند افزایش مویرگی را باعث می‌گردد (۲۳). احتمالاً این مسیر پیام رسانی قطعاً در عضله اسکلتی (نعلی) اتفاق افتاده و این مسیر سیگنالی در گروه تمرینی HIIT بیشتر بوده است، زیرا تمرینات تناوبی شدید با استرس و شدت بالاتری انجام می‌شوند و به نظر می‌رسد افزایش VO_2max رت‌ها در پی هشت هفته اجرای HIIT و ET نشان دهنده ترویج روند رگ‌زایی باشد. در مورد نقش رادیکال‌های آزاد در فرایند افزایش مویرگ‌ها، زاهو و همکاران (۲۰۰۹) با تحقیق در سطح کشت سلولی گزارش کردند که متعاقب انفاکتوس میوکارد، افزایش مویرگ به طور عمده در هفته اول صورت می‌گیرد که از لحاظ زمانی و مکانی با افزایش گونه‌های اکسیژن فعال هماهنگ است (۲۴). با توجه به مطالب ارائه شده، از جمله دلایل افزایش VEGF-A متعاقب تمرینات تناوبی شدید، احتمالاً تولید بیشتر رادیکال‌های آزاد ناشی از اجرای این فعالیت نسبت به فعالیت هوازی تداومی می‌باشد. هنگام انجام تمرینات شدید (هوازی)، تولید گونه‌های اکسیژن فعال شده افزایش می‌یابد و تصور بر این است که منبع اصلی این گونه مواد، میتوکندری سلول‌های عضلات فعال شده می‌باشد. به عبارتی، فعالیت‌های شدید منجر به فعال سازی چندین سیستم تولید کننده رادیکال آزاد (گونه‌های اکسیژن فعال شده) در سلول‌های بدن می‌شوند که به دو منبع اصلی (نشت الکترون از میتوکندری در طی تنفس هوازی، آنزیم‌های گزاتین اکسیداز و NADPH اکسیداز) و فرعی (سلول‌های فاگوسیتی، پارگی پروتئین‌های حاوی آهن و انباشتگی کلسیم) تقسیم می‌شوند (۲۵). احتمالاً افزایش ژنی VEGF-A به علت شدت بالای اجرای HIIT و اجرای فعالیت هوازی تداومی در شدتی معادل ۷۵ درصد VO_2max باعث فعال شدن پی در پی مسیرهای پیام رسانی می‌شود که متعاقباً

معرض هایپوکسی را کاهش دهند (۲۰). عامل رشدی قابل القای هایپوکسی، بعد از ترشح می‌تواند عناصر واکنش دهنده به هایپوکسی (HRE) که روی ژن‌های هدف در هسته قرار گرفته‌اند را شناسایی کند. واکنش بین HIF-1 و HRE، رونویسی ژن‌های هدف (ژن مربوط به VEGF) را آغاز می‌کند و از طرفی به تازگی مشخص شده است که microRNAs تنظیم کننده رگ‌زایی است و Mir-210 به عنوان یک تنظیم‌گر اصلی پروآنژیوژنیک عمل می‌کند. microRNA از طریق عامل القایی هایپوکسی (HIF-1 α) در فرآیند رگ‌زایی شرکت می‌کند. فاسنارو و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه‌ای نشان دادند که سرکوب Mir-210 منجر به کاهش مهاجرت القا شده سلول‌های آندوتلیال در اثر VEGF می‌شود و در حالت هایپوکسی القا شده، افزایش بیان Mir-210 به افزایش مهاجرت سلول‌های آندوتلیال منجر می‌گردد (۲۱) که این افزایش Mir-210 احتمالاً همانند یک عامل تسهیل کننده در عملکرد و افزایش بیان ژن VEGF عمل می‌کند. شفیی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که هشت هفته اجرای HIIT باعث افزایش ۳۴ درصدی بیان Mir-210 می‌شود، هرچند این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد (۲۲). به طور کلی، با توجه به نتایج پژوهش احتمالاً هایپوکسی که در اثر اجرای HIIT اتفاق افتاده است، بیشتر از اجرای ET بوده است، زیرا میزان بیان ژن VEGF-A در این گروه تمرینی بیشتر بوده است. در اثر سازگاری با تمرینات، تنظیم افزایشی VEGF اتفاق افتاده است که یکی از مهم‌ترین و قوی‌ترین محرک‌هایی است که رگ‌زایی عضله اسکلتی را موجب می‌شود. ثابت شده است که اجرای فعالیت ورزشی در حالت توام با لرزش نسبت به اجرای بدون لرزش، موجب جریان خون بیشتر در عضله اسکلتی و در پی آن اعمال تنش برشی بیشتر به جداره عروق می‌شود. اظهارات حاکی است که تنش برشی به طور عمده از طریق تنظیم افزایشی mRNA و پروتئین گیرنده‌های انتقال مکانیکی، یعنی اینتگرین‌های جمع شده در محل چسبنده موضعی بر روی سطح آبلومینال سلول آندوتلیال و فعال‌سازی آن‌ها و اتصال آن‌ها به لیگاندهای

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر، حاصل طرح تحقیقاتی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران به شماره ۴۵۰۴۰۰۷/۱/۵ می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران، آزمایشگاه سلولی مولکولی، دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس و تمامی کسانی که در انجام این پژوهش همراهی نموده‌اند تشکر و سپاس‌گزاری می‌نمایند.

منابع

1. Gustafsson T, Knutsson A, Puntchart A, Kaijser L, Nordqvist SA-C, Sundberg C, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. *Pflügers Archiv*. 2002; 444(6):752-9.
2. Siafakas N, Jordan M, Wagner H, Breen E, Benoit H, Wagner P. Diaphragmatic angiogenic growth factor mRNA responses to increased ventilation caused by hypoxia and hypercapnia. *European Respiratory Journal*. 2001; 17(4):681-7.
3. Lloyd PG, Prior BM, Li H, Yang HT, Terjung RL. VEGF receptor antagonism blocks arteriogenesis, but only partially inhibits angiogenesis, in skeletal muscle of exercise-trained rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005; 288(2):H759-H68.
4. Prior BM, Yang H, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *Journal of applied physiology*. 2004; 97(3):1119-28.
5. Zachary I, Gliki G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovascular research*. 2001; 49(3):568-81.
6. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2(10):795-803.
7. Islami D, Bischof P, Chardonens D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Molecular human reproduction*. 2003; 9(7):395-8.
8. Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. Crystal Structures of Novel Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) from

موجب افزایش فرآیند رگ‌زایی و ایجاد سازگاری می‌گردد. افزایش VO_2max رت‌ها در پی هشت هفته اجرای HIIT و ET نشان دهنده افزایش روند رگ‌زایی می‌باشد. از دیگر دلایل احتمالی افزایش بیشتر ژن VEGF-A نسبت به فعالیت هوازی تداومی که متعاقب فعالیت تناوبی شدید صورت می‌گیرد می‌توان به ترشح اینترلوکین‌های مهمی چون اینترلوکین-۱، اینترلوکین-۶، اینترلوکین-۱۰ و عامل نکروز دهنده آلفا اشاره کرد. در این راستا، اسکولز و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که پس از بروز آسیب‌های سلول عضلانی و تاندونی ناشی از فعالیت ورزشی، همبستگی مثبتی بین ترشح و افزایش اینترلوکین-۱، عامل نکروز دهنده آلفا، اینترلوکین-۶ و عامل رشد آندوتلیال عروقی وجود دارد (۲۶) که به نظر می‌رسد اجرای HIIT به میزان بیشتری نسبت به گروه ET منجر به افزایش اینترلوکین-۱، عامل نکروز دهنده آلفا و اینترلوکین-۶ شده است و بیان بیشتر ژن VEGF-A را به همراه داشته است که این فرآیند منجر به مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی و افزایش رگ‌زایی در عضله اسکلتی شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر، اثرات احتمالی تمرینات ورزشی ET و HIIT را بر سطوح برخی عوامل تأثیر گذار بر فرآیند آنژیوژنز نشان می‌دهند که این تمرین تناوبی شدید باعث سازگاری‌های سریع‌تر می‌گردد و احتمالاً این نوع تمرین رگ‌زایی را به میزان بیشتری نسبت به تمرین تداومی ترویج می‌دهد. البته مطالعات اخیر نشان داده‌اند که فعالیت HIIT در زمان کمتر سازگاری‌های مورد نیاز را ایجاد می‌کند و مسیرهای پیام‌رسانی متعددی را آغاز می‌کند. اگرچه تمرینات ورزشی باعث افزایش رگ‌زایی در سلول‌های اندوتلیال می‌شوند، اما جهت روشن‌تر شدن موضوع لازم است مطالعات وسیع‌تری در سطح مولکولی انجام شود.

- Snake Venoms insight into sselective vegf binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(3): 2126-31.
9. Tallquist MD, Soriano P, Klinghoffer RA. Growth factor signaling pathways in vascular development. *Oncogene*. 1999; 18(55):7917-32.
10. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical pharmacology*. 2001; 61(3):253-70.
11. Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgraduate Medical Journal*. 2005; 81(954):236-42.
12. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental cell research*. 2006; 312(5):549-60.
13. 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-H78.
14. Czarkowska-Paczek B, Zendzian-Piotrowska M, Bartłomiejczyk I, Przybylski J, Gorski J. The influence of physical exercise on the generation of TGF- β 1, PDGF-AA, and VEGF-A in adipose tissue. *European journal of applied physiology*. 2011; 111(5):875-81.
15. Ding Y-H, Luan X-D, 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.
16. Gavin TP, Wagner PD. Effect of short-term exercise training on angiogenic growth factor gene responses in rats. *Journal of applied physiology*. 2001; 90(4):1219-26.
17. Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. *Proteomics*. 2009; 9(1): 106-15.
18. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 2007; 14(6):753-60.
19. Wisløff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovascular research*. 2001; 50(3):495-508.
20. Mounier R, Pialoux V, Roels B, Thomas C, Millet G, Mercier J, et al. Effect of intermittent hypoxic training on HIF gene expression in human skeletal muscle and leukocytes. *European journal of applied physiology*. 2009; 105(4):515-24.
21. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(23):15878-83.
22. Shafiee A, Kordi MR, Gaeini AA, Soleimani M, Nekouei A, Hadidi V. The effect of eight week of high intensity interval training on expression of mir-210 and ephrinA3 mRNA in soleus muscle healthy male rats. *Arak Medical University Journal (AMUJ)*. 2014; 17(84): 26-34.[Persian]
23. Ribatti D, Conconi MT, Nussdorfer GG. Nonclassic endogenous novel regulators of angiogenesis. *Pharmacological reviews*. 2007; 59(2):185-205.
24. 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.
25. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*. 2008; 88(4):1243-76.
26. Schulze-Tanzil G, Al-Sadi O, Wiegand E, Ertel W, Busch C, Kohl B, et al. The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2011; 21(3):337-51.