

## بررسی تغییرات آنژیوژنز، هایپوکسی بافتی و جریان یونی کلسیم بافت قلبی رت‌های نابالغ، بالغ و پیر متعاقب تمرین ترکیبی

بهمن میرزایی<sup>۱</sup>، حسین قوامی امین<sup>۲</sup>، محمدرضا فدائی جافی<sup>۳\*</sup>

۱-استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲-دانشجوی دکتری، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳-استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت، ایران

\* نشانی نویسنده مسئول: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی

Email: mfadaei2000@yahoo.com

پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۲۸

دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۶

### چکیده

**مقدمه و هدف:** در سطح سلولی تاثیرات حفاظت قلبی ناشی از ورزش بر بافت قلب در سنین مختلف متفاوت است. هدف از مطالعه حاضر بررسی تغییرات آنژیوژنز (VEGF)، هایپوکسی بافتی (HIF-1) و جریان یونی کلسیم (Calcineurin) بافت قلبی رت‌های نابالغ، بالغ و پیر متعاقب تمرین ترکیبی می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** تعداد ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار در سه رده سنی ۲ هفتگی، ۸ هفتگی و ۲۴ ماهگی تهیه (هر رده سنی ۱۰ سر) و هر رده سنی به دو گروه کنترل و تمرین تقسیم شدند (هر گروه ۵ سر). در گروه تمرین ترکیبی حیوانات به صورت یک روز در میان برنامه تمرینی مقاومتی یا هوازی را به مدت ۶ هفته انجام می‌دادند. میزان اضافه بار در برنامه تمرین مقاومتی بر اساس وزن بدن حیوانات از ۳۰٪ در هفته اول به ۱۲۰٪ وزن بدن در هفته آخر تعیین شد. برای تمرین هوازی نیز شدت تمرین از ۵۰ درصد حداکثر سرعت در هفته اول به ۸۰ درصد در هفته آخر رسید. پس از ۶ هفته تمرین، حیوانات قربانی و بافت قلب برای اندازه‌گیری فاکتورهای VEGF، HIF-1 و Calcineurin با روش RTPCr جدا گردید. برای آنالیز داده‌ها از روش آماری تحلیل واریانس یک‌راهه با معناداری  $P \leq 0/05$  استفاده شد.

**یافته‌ها:** گروه تمرین ۸ هفتگی مقادیر بالاتری در بیان ژن VEGF بافت قلب، نسبت به گروه کنترل خود (کنترل ۸ هفتگی) نشان داد ( $P=0/02$ ). با این وجود، بین گروه‌های تمرین در سه رده در بیان ژن VEGF تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $P>0/05$ ). همچنین، بین گروه‌های کنترل و تمرین در هر رده سنی و بین گروه‌های تمرین در سه رده در بیان ژن HIF-1 و Calcineurin قلبی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ( $P>0/05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** انجام تمرین ورزشی در سنین جوانی تاثیرات مطلوب‌تر سلولی (به ویژه تنظیم مثبت فاکتور رگ‌زایی) بر جای می‌گذارد. لذا برای داشتن یک دوره سالمندی با کیفیت پیشنهاد می‌شود از سنین جوانی تمرینات مقاومتی-هوازی منظم انجام شود.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین ترکیبی، آنژیوژنز، هایپوکسی، کلسیم، قلب

### مقدمه

همراه دارد (۲). بیماری قلبی همچنین یکی از دلایل اصلی ناتوانی بوده و سطح فعالیت را محدود می‌کند و در نهایت آسیب‌های مختلف قلبی عروقی کیفیت زندگی را به شدت کاهش می‌دهد (۳، ۴). افزایش سن می‌تواند باعث تغییراتی در قلب و عروق خونی شود. به عنوان مثال، با افزایش سن مقدار ضربان قلب بیشینه کاهش می‌یابد و توان فعالیت‌های بدنی نیز کاهش می‌یابد (۵). تغییراتی که با افزایش سن رخ می‌دهد

اگرچه مرگ و میر ناشی از بیماری عروق کرونر قلب در دهه‌های گذشته به طور قابل توجهی کاهش یافته است اما این بیماری همچنان تنها علت اصلی مرگ و میر برای بزرگسالان و سالمندان در سراسر جهان محسوب می‌شود (۱). هرچند آسیب‌ها و بیماری‌های قلبی در سنین کودکی نادر است اما پس از تشخیص، خطر قابل توجهی از عوارض و مرگ و میر را به

مؤثر در آنژیوژنز رت‌های نر نژاد ویستار شد که توانست آسیب‌های ناشی از آنفارکتوس را تقلیل دهد (۱۲). یو و همکاران (۲۰۲۲) بیان کردند که هر چند تمرین هوازی بر فاکتورهای رونویسی (HIF-1) و رگ‌زایی بافت قلبی تأثیرات بهتر دارند اما انجام تمرین به صورت منظم به ویژه تمرین ترکیبی، ممکن است عملکرد قلبی عروقی را با القای پاسخ‌های رگ‌زایی در میوکارد رت‌های مسن بهبود بخشد (۱۳).

رگ‌زایی فرآیند تشکیل رگ‌های خونی جدید است که توسط عامل رگ‌زایی رشد اندوتلیال یعنی VEGF<sup>۲</sup> انجام می‌شود. مطالعات گسترده نشان داده‌اند که رگ‌زایی در عضله اسکلتی به عنوان یک سازگاری به ورزش رخ می‌دهد که ممکن است نیازهای بافتی افزایش یافته برای تحویل اکسیژن و فرآیندهای متابولیک را برآورده کند (۱۴). VEGF برای رگ‌زایی میوکارد و نجات میوکارد پس از انفارکتوس میوکارد (MI) حیاتی است و در سنین مختلف از جمله سالمندی، افزایش این فاکتور می‌تواند در خون رسانی بهتر به بافت قلب نقش موثری داشته باشد (۱۵). شادمهری و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه خود نشان دادند که ترکیب تمرین استقامتی و مقاومتی تأثیر مثبتی بر VEGF دارد و احتمالاً می‌تواند به بهبود وضعیت رگ‌زایی به ویژه در بافت قلب کمک کند (۱۶). تحقیقات نشان داده‌اند که تمرین ورزشی، در یک مدل حیوانی میانسال، سلول‌های پیش ساز اندوتلیال (EPCs) را افزایش داده و رگ‌زایی را بالا می‌برد (۱۷). تمرین می‌تواند به شدت تعداد EPCها و سلول‌های رگ‌زایی کشت شده/در گردش را در نمونه انسانی افزایش دهد (۱۸). لذا تنظیم مثبت این فاکتور در بافت قلب در سنین مختلف می‌تواند تأثیر مفید داشته باشد. علاوه بر فاکتورهای مذکور انقباض بافت قلب می‌تواند در سنین مختلف دچار اختلال شود. تنظیم انقباض قلب تحت تأثیر یون کلسیم قرار می‌گیرد.

Calcineurin<sup>۴</sup> یک هتروداایمر است که از یک زیر واحد کاتالیزوری ۶۰ کیلودالتون (CnA) و یک زیر واحد تنظیمی ۱۹ کیلودالتونی (CnB) تشکیل شده است (۱۸). به بیان دیگر Calcineurin یک پروتئین فسفاتاز وابسته به کلسیم، یکی دیگر از مولکول‌های سیگنال‌دهی درون سلولی است که توسط استرس مکانیکی القا می‌شود و منجر به هایپر تروفی عضلات

ممکن است خطر ابتلا به بیماری قلبی را در افراد افزایش دهد (۶). پیامد بالینی پیری در بیماری‌های قلبی عروقی در سطح سلولی نمایان می‌گردد. افزایش قرار گرفتن در معرض استرس و تغییر مسیرهای سیگنالینگ با افزایش سن، بیولوژی کاردیومیوسیت‌ها را تغییر می‌دهد. تجمع تدریجی ضایعات متابولیک و اندامک‌های آسیب‌دیده در کاردیومیوسیت‌ها، فرآیند بازیافت درون سلولی اتوفاژی را مسدود می‌کند و تمایل سلول را به سمت آپوپتوز افزایش می‌دهد. علاوه بر این، کاهش ظرفیت تجدید قلب در افراد مسن به دلیل کاهش تقسیم سلولی و اختلال در عملکرد سلول‌های بنیادی، منجر به اختلال عملکرد قلبی بیشتر و پاسخ‌های ناسازگار به بیماری یا استرس می‌شود (۷، ۸).

هموستاز قلب در پاسخ به انواع شرایط فیزیولوژیکی (تمرین ورزشی) و پاتوفیزیولوژیکی (افزایش سن و بیماری‌های قلبی) تحت تأثیر قرار می‌گیرد. فاکتور القایی هایپوکسی ۱ (HIF-1<sup>۱</sup>) به عنوان فاکتوری که بر VEGF اثر مستقیم دارد موجب آغاز و نیز تنظیم رونویسی بسیاری از ژن‌های دخیل در رگ‌زایی می‌شود. HIF-1 همچنین در سازگاری متابولیکی با هایپوکسی و ایسکمی، از جمله انتقال از متابولیسم اکسیداتیو به گلیکولیتیک واسطه می‌شود (۹). در طول رشد جنینی، HIF-1 جنین را از هایپوکسی داخل رحمی محافظت می‌کند. حذف آن و همچنین بیان اجباری آن از نظر جنینی کشنده است. کاهش فعالیت HIF-1 در طول بازسازی از هفته ۲۰ بارداری تا ۲۸ روز پیش از تولد<sup>۲</sup> زمانی که قلب از متابولیسم بی‌هوازی به هوازی تغییر می‌کند بسیار مهم است. در بزرگسالان، HIF-1 از قلب در برابر هایپوکسی محافظت می‌کند (۱۰) و حذف آن در کاردیومیوسیت‌ها بر عملکرد قلب حتی در شرایط عادی تأثیر می‌گذارد. افزایش سن یا بیماری‌هایی نظیر دیابت، فعالیت HIF-1 را مختل می‌کند و لذا پاسخ‌های واسطه‌ای HIF-1 را تحت شرایط محدود اکسیژن به خطر می‌اندازد (۱۱). این فاکتور نیز می‌تواند تحت تأثیر تمرینات ورزشی قرار گیرد. حیدرپور و همکاران (۲۰۲۱) تأثیر هشت هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط را بر بیان ژن‌های HIF-1 و فاکتور رگ‌زایی در عضله قلبی رت‌های نر مبتلا به آنفارکتوس میوکارد مورد بررسی قرار داده و بیان کردند این تمرین باعث افزایش عوامل

3. Vascular endothelial growth factor  
4. (CaN)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

1. Hypoxia-inducible factor-1  
2. Prenatal period

رت‌ها به محیط آزمایشگاه حیوانات در شرایط کنترل شده با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر)، دما (۲۲±۳ سانتی‌گراد)، و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. تعداد ۳-۵ رت در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ سانتی متر نگهداری شدند. حیوانات همچنین به آب و غذای استاندارد دسترسی آزادانه داشتند. کلیه آزمایشات مطابق با قوانین نگه‌داری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (NIH) شماره ۲۳-۸۵ سال ۱۹۶۶ و با رعایت کامل موازین اخلاقی انجام شد. حیوانات پس از یک هفته آشناسازی با محیط آزمایشگاه در سه رده سنی (هر رده دو گروه کنترل و تمرین) گروه کنترل ۲ هفته‌گی (در سن دو هفته‌گی وارد پژوهش شده و در طول دوره فعالیت بدنی انجام نمی‌دادند)، گروه تمرین ۲ هفته‌گی (در سن دو هفته‌گی فعالیت ورزشی خود را شروع کردند)، گروه کنترل ۸ هفته‌گی (در سن هشت هفته‌گی وارد پژوهش شده و در طول دوره فعالیت بدنی انجام نمی‌دادند)، گروه تمرین ۸ هفته‌گی (در سن هشت هفته‌گی فعالیت ورزشی خود را شروع کردند)، گروه کنترل ۲۴ ماهگی (در سن بیست و چهار ماه وارد پژوهش شده و در طول دوره فعالیت بدنی انجام نمی‌دادند) و گروه تمرین ۲۴ ماهگی (در سن بیست و چهار ماه فعالیت ورزشی خود را شروع کردند) تقسیم‌بندی شدند (هر گروه شامل ۵ سر رت بود). مشخصات و گروهبندی رت‌ها نیز در جدول ۱ قرار داده شده است.

تمرین ترکیبی (مقاومتی- هوازی): برنامه تمرینی به مدت ۶ هفته به صورت ترکیب تمرین مقاومتی روی نردبان و تمرین هوازی روی نوارگردان حیوانی (تجهیز گستر ایرانیان، مدل ۲۰۱۶) انجام شد. برنامه تمرین مقاومتی شامل ۳ جلسه تمرین در هفته (شنبه، دوشنبه، چهارشنبه) به مدت ۶ هفته بود. هر جلسه ۳ نوبت و هر نوبت شامل ۴ بار بالا رفتن از نردبان مخصوص، به ارتفاع ۱ متر و ۲۶ پله با فاصله ۴ سانتی‌متر پله‌ها از هم بود. بین هر نوبت ۳۰ ثانیه استراحت برای حیوانات در نظر گرفته شده بود. پس از بستن وزنه به دم، رت‌ها وادار به صعود از نردبان عمودی شدند. اصل اضافه‌بار با افزایش درصد وزن بدن به صورت هفته‌گی انجام می‌شد بدین صورت که در هفته اول میزان وزنه بسته شده به دم حیوان ۳۰٪ و به تدریج از هفته دوم ۷۰٪، هفته سوم ۱۰۰٪، هفته چهارم ۱۲۰٪، هفته پنجم ۱۴۰٪ و هفته ششم ۱۶۰٪ وزن بدن آنها بود (۲۵). تمرینات

قلب و اسکلتی می‌شود (۱۹، ۲۰). درحالی که مجموعه داده‌های قانع‌کننده‌ای ظاهر شده است که Calcineurin را به عنوان یک تنظیم‌کننده هایپرتروفی پاتوفیزیولوژیک نشان می‌دهد، کمتر از نقش Calcineurin در تنظیم بالقوه رشد فیزیولوژیک قلب به ویژه در سنین مختلف با تمرین ورزشی درک شده است. در مطالعات انجام شده مشخص شده که کلسینورین توسط بیان بیش از حد<sup>۱</sup> MCIP1 هایپرتروفی ناشی از ورزش را کنترل می‌کند (۲۱). علاوه بر این، هایپرتروفی ورزشی با افزایش تولید IGF-1 همراه است، که قبلاً نشان داده شده بود باعث هایپرتروفی عضلات اسکلتی از طریق مسیر NFAT- Calcineurin در میوبلاست‌های کشت شده می‌شود (۱۹). لذا تمرینات مختلف می‌تواند تمام این فاکتورهای سلولی را تحت تاثیر قرار داده و آسیب‌های ناشی از افزایش سن را بر مسیرهای<sup>۱</sup> calcineurin کنترل کند.

امروزه به دلیل افزایش جمعیت و پیری، تعداد کل بیماران قلبی همچنان در حال افزایش است (۲۲). با این حال به دلیل افزایش میزان استرس‌های مختلف، این بیماری سایر جمعیت‌ها را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد، زیرا که آمارهای نگران‌کننده‌ای از مرگ و میر ناشی از بیماری قلبی در افراد میانسال و جوان نیز ثبت شده است (۲۳، ۲۴). کنترل مسیرهای سلولی یکی از اهداف درمانی در بیماری‌های قلبی می‌باشد. اصلاح سبک زندگی با انجام منظم تمرین ورزشی می‌تواند در تعدیل مسیرهای سلولی در آسیب‌های قلبی نقش داشته باشد. از آنجایی که تمرینات ورزشی ترکیبی (ترکیب ورزش مقاومتی و استقامتی) هم سیستم عضلانی و همچنین سیستم قلبی تنفسی را بهبود می‌بخشد در مطالعه حاضر تغییرات آنژیوژنز، هایپوکسی بافتی و جریان یونی کلسیم بافت قلبی رت‌های نابالغ، بالغ و پیر متعاقب تمرین ترکیبی مقاومتی-هوازی بررسی خواهد شد.

## روش‌شناسی

مطالعه حاضر از نوع تجربی بود که در تابستان ۱۴۰۱ در آزمایشگاه هیستورژنوتک، تهران، ایران انجام شد. برای بررسی متغیرهای مورد مطالعه، تعداد ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار از انستیتو پاستور ایران در سه رده سنی تهیه شدند. پس از انتقال

### 1. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein

حداکثر سرعت بود که به تدریج در هفته ششم به ۸۰ درصد رسید. مدت زمان تمرین در هر جلسه تمرینی ۳۰ دقیقه بود (۲۱). برنامه تمرینی نیز در جدول ۲ ارائه شده است.

هواری نیز برای ۳ جلسه در هفته (یکشنبه، سه شنبه و پنج شنبه) و در روزهای متناوب با تمرینات مقاومتی و به مدت ۶ هفته انجام شد. شدت تمرین در هفته اول معادل ۵۰ درصد

جدول ۱. مشخصات رت‌ها در گروه‌های مختلف پژوهش

گروه	تعداد	سن ابتدای پژوهش (هفته و ماه)
کنترل ۲ هفتگی	۵	۲ هفته
تمرین ۲ هفتگی	۵	۲ هفته
کنترل ۸ هفتگی	۵	۸ هفته
تمرین ۸ هفتگی	۵	۸ هفته
کنترل ۲۴ ماهگی	۵	۲۴ ماه
تمرین ۲۴ ماهگی	۵	۲۴ ماه

جدول ۲. برنامه تمرینی ترکیبی رت‌ها

مقاومتی	تعداد جلسه در هفته	سست (تکرار/استراحت)	افزایش بار در هفته (% وزن بدن)	مدت کل تمرین (هفته)
(شنبه، دوشنبه، چهارشنبه)	۳	۳ ست (۴ تکرار بالا رفتن / ۳۰ ثانیه استراحت بین هر تکرار)	هفته اول: ۳۰٪، هفته دوم: ۷۰٪، هفته سوم: ۱۰۰٪، هفته چهارم: ۱۲۰٪، هفته پنجم: ۱۴۰٪، هفته ششم: ۱۶۰٪	۶
هواری	تعداد جلسه در هفته	زمان تمرین هر جلسه	افزایش بار (% حداکثر سرعت)	مدت کل تمرین (هفته)
(یکشنبه، سه شنبه و پنج شنبه)	۳	۳۰ دقیقه	هفته اول تا ششم: ۵۰-۸۰٪	۶

بیان ژن‌های VEGF، HIF-1 و Calcineurin بافت قلب با روش RTPCr برای بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن (VEGF، HIF-1 و Calcineurin)، ابتدا استخراج RNA از بافت در همه گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیازن، آلمان) انجام گرفت. برای این کار، میزان ۲۰۰ لاندا کیازول به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پلاک موجود در کرایوتیوب در حالت نیمه انجماد خرد شد و به منظور لیز نمونه‌ها، میزان ۱۰۰ لاندا کلروفورم به مدت ۱ دقیقه به آنها اضافه شد. محلول حاصل، با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. ۱ میلی‌لیتر ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب آن ۱ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد

اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی: ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، کلیه رت‌ها با تزریق کتامین (۷۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس نمونه خونی از قلب حیوان گرفته شد. پس از اطمینان از قربانی شدن حیوان با رعایت اصول اخلاقی، بافت برداری انجام شد. بافت قلب از ناحیه مدیاستن با بالاترین حساسیت خارج شد. برای نمونه برداری بافتی ابتدا بافت قلب به سرعت برداشته شده و در نرمال سالین ۹ درصد شست و شو تا مقادیر خون داخل بافتی خارج شود، سپس قسمت آپکس قلب توسط متخصص آناتومی جدا شد و در انتها در میکروتیوب به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. در ادامه نیز مقادیر بیان ژنی متغیرهای مطالعه با روش RTPCr در آزمایشگاه بررسی شد.

بانک ژنی NCBI توسط شرکت ماکروژن انجام شد. از ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل استفاده گردید و میزان بیان ژن مورد نظر با فرمول  $\Delta\Delta Ct$  -2 به این صورت که ابتدا سیکل آستانه ژن موردنظر هر نمونه از سیکل آستانه ژن خانه‌گردان همان نمونه کم شد. ( $\Delta Ct = Ct \text{ Target} - Ct \text{ Housekeeping}$ ) در مرحله بعد،  $\Delta Ct$  هر نمونه را از نمونه‌ای که نسبت به آن نیاز بود مقایسه شود کم کرده، منفی عدد به دست آمده را به توان دو رسانده و بیان نسبی ژن‌های VEGF، HIF-1 و Calcineurin را به دست می‌آوریم. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۳ گزارش شده است.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Target} - \Delta Ct \text{ Reference} \quad E = 2$$

اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. مایع رویی تخلیه گردید و پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. میزان ۲۰ لاند آب مقطر ۶۰ درجه بر روی پلاک ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه ۶۰ درجه قرار داده شد. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (USA Fermentas) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. اندازه-گیری سطوح بیان قلبی VEGF، HIF-1 و Calcineurin با روش کمی Real time-PCR انجام شد. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های VEGF، HIF-1 و Calcineurin در

جدول ۳. توالی پرایمر برای ژن‌های VEGF، HIF-1 و Calcineurin

Gene name	Oligo sequence 5'-3'
VEGF	F: 5' AGATGGTGAGAGAGATGGTGT 3' R: 5' AGATGGTTGATGGCTTAGATTAG 3'
HIF-1	F: 5' GTTGTGTGTTGTCTGTGGG 3' R: 5' AGTGAAAATGAAGGAGGAAGGG 3'
Calcineurin	F: 5' TTCAACTGCTCCCCCAT 3' R: 5' TCCATCTTCTTCTGACCCC 3'
GAPDH	F: 5' AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG 3' R: 5' CATACTCAGCACCAGCATCACC 3'

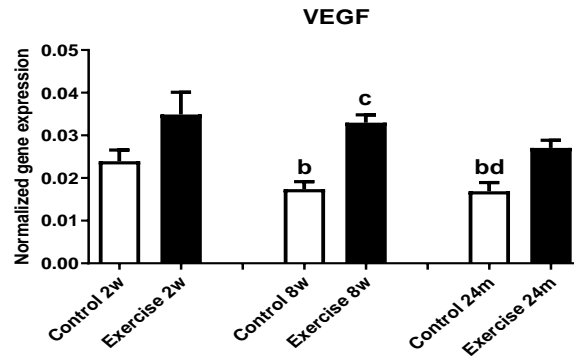
در بیان ژن فاکتور رگ‌زایی VEGF بافت قلب تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $P=0/0024$  و  $F=7/249$ ). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که گروه تمرین ۸ هفتگی مقادیر بالاتری در بیان ژن VEGF بافت قلب را نسبت به گروه کنترل خود (کنترل ۸ هفتگی) نشان داد ( $P=0/020$ ). با وجود این بین گروه‌های تمرین در سه رده تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $P>0/05$ ). در مقایسه سایر گروه‌ها با یکدیگر نیز مشخص شد که گروه‌های کنترل ۸ هفته ( $P=0/008$ ) و کنترل ۲۴ ماهه ( $P=0/007$ ) مقادیر پایین‌تری در بیان ژن VEGF را نسبت به گروه تمرین ۲ هفته نشان دادند. نسبت به گروه تمرین ۸ هفته نیز گروه کنترل ۲۴ ماهه کاهش معنی‌دار در بیان ژن VEGF بافت قلب را نشان داد ( $P=0/016$ ).

### روش‌های آماری

نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلک بررسی و تایید شد. به منظور تعیین معنی‌دار بودن تفاوت میانگین متغیرهای گروه‌های تحقیق، از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. از میانگین و انحراف استاندارد برای گزارش توصیفی داده‌ها استفاده شد. اطلاعات مورد نیاز پس از جمع‌آوری، به وسیله نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ در سطح معنی‌داری حداقل  $P \leq 0/05$  تجزیه و تحلیل شد.

### یافته‌ها

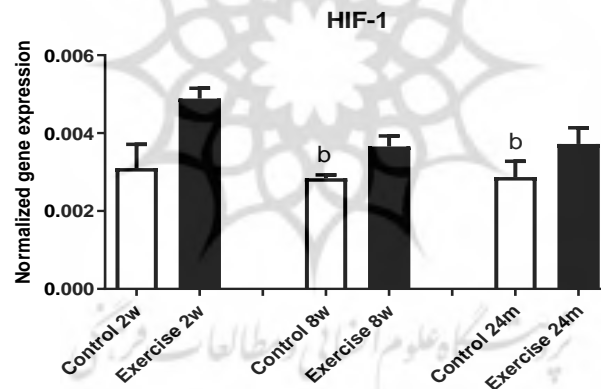
بیان ژن VEGF قلبی: تغییرات در بیان ژن فاکتور رگ‌زایی VEGF بافت قلب در نمودار ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج آزمون آماری آنوا یک‌راهه بین گروه‌های مختلف پژوهش



**نمودار ۱. بیان ژن VEGF بافت قلب برای گروه‌های پژوهش (داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد) سطح معنی‌داری:  $P < 0.05$ : b: اختلاف معنادار نسبت به گروه تمرین ۲ هفته‌ای، d: اختلاف معنادار نسبت به گروه تمرین ۸ هفته‌ای، Control: گروه کنترل، Exercise: گروه تمرین مقاومتی - هوازی، w: هفته، m: ماه**

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بین گروه‌های کنترل و تمرین در هر رده سنی و بین گروه‌های تمرین در سه رده تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). در این میان تنها گروه‌های کنترل ۸ هفته ( $P = 0.02$ ) و کنترل ۲۴ ماهه ( $P = 0.02$ ) مقادیر پایین‌تری را نسبت به گروه تمرین ۲ هفته نشان دادند.

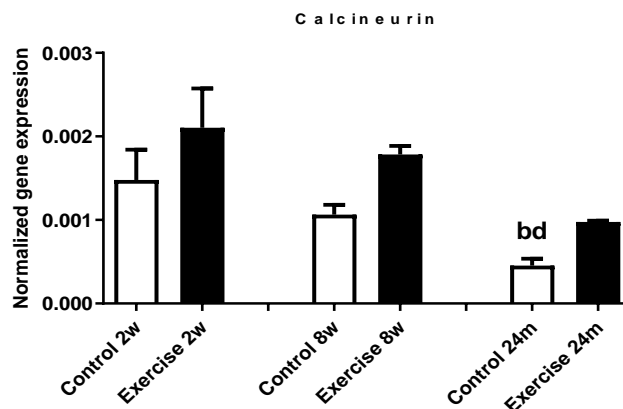
بیان ژن HIF-1 قلبی: تغییرات در بیان ژن فاکتور هایپوکسی بافتی HIF-1 قلب در نمودار ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج آزمون آماری آنوا یک‌راهه بین گروه‌های مختلف پژوهش در بیان ژن فاکتور هایپوکسی بافتی HIF-1 قلب تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $F = 4.174$  و  $P = 0.0197$ ). با این وجود



**نمودار ۲. بیان ژن HIF-1 بافت قلب برای گروه‌های پژوهش (داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد) سطح معنی‌داری:  $P < 0.05$ : b: اختلاف معنادار نسبت به گروه تمرین ۲ هفته‌ای، d: اختلاف معنادار نسبت به گروه تمرین ۸ هفته‌ای، Control: گروه کنترل، Exercise: گروه تمرین مقاومتی - هوازی، w: هفته، m: ماه**

آزمون تعقیبی توکی نشان داد که بین گروه‌های کنترل و تمرین در هر رده سنی و همچنین بین گروه‌های تمرین در سه رده تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). در این میان تنها گروه کنترل ۲۴ ماهه مقادیر پایین‌تری Calcineurin بافت قلب را نسبت به گروه‌های تمرین ۲ و ۸ هفته نشان داد ( $P = 0.006$ ) و ( $P = 0.027$  به ترتیب).

بیان ژن کلسینورین: تغییرات در بیان ژن فاکتور تنظیم‌کننده جریان یونی کلسیم (Calcineurin) قلب در نمودار ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج آزمون آماری آنوا یک‌راهه بین گروه‌های مختلف پژوهش در بیان ژن فاکتور تنظیم‌کننده جریان یونی کلسیم (Calcineurin) قلب تفاوت معنی‌داری وجود دارد ( $F = 5.557$  و  $P = 0.0071$ ). با این وجود نتایج آزمون



نمودار ۳. بیان ژن فاکتور تنظیم کننده جریان یونی کلسیم (Calcineurin) قلب گروه‌های پژوهش (داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد)

سطح معنی‌داری:  $P < 0.05$ ; b: اختلاف معنادار نسبت به گروه تمرین ۲ هفته‌گی; d: اختلاف معنادار نسبت به گروه تمرین ۸ هفته‌گی،

Control: گروه کنترل، Exercise: گروه تمرین مقاومتی - هوازی، w: هفته، m: ماه

## بحث

می‌کند که ممکن است مسئول سازگاری قلبی، به‌ویژه رگ‌زایی باشد. لذا تنوع تمرین و شدت‌های متفاوت در تغییرات سلولی موثرتر می‌باشد. برای بررسی اثرات رشد نیز در سه رده سنی (گروه‌های کنترل) مشخص شد با افزایش سن از کودکی تا جوانی مقادیر بیان ژن VEGF کاهش غیر معنی‌دار می‌یابد. افزایش سن یک عامل خطر غالب برای اکثر بیماری‌های قلبی عروقی است. اختلال رگ‌زایی و اختلال عملکرد اندوتلیال احتمالاً به افزایش شیوع بیماری‌های قلبی عروقی و عواقب نامطلوب آنها در سالمندان منجر می‌شود (۲۷). آنژیوژنز پاسخ تطبیقی ضروری به استرس فیزیولوژیکی و هم یک مکانیسم ترمیم درون‌زا پس از آسیب ایسکمیک است. علاوه بر این، القای رگ‌زایی یک رویکرد درمانی امیدوارکننده برای بیماری‌های ایسکمیک است. به این دلایل، درک اساس اختلالات مربوط به سن در رگ‌زایی و عملکرد اندوتلیال پیامدهای مهمی برای درک و مدیریت بیماری قلبی عروقی دارد. یکی از دلایل کاهش فاکتور آنژیوژنز با سن را می‌توان به افزایش محرک‌های مضر ناشی از سن مانند لیپیدهای اکسید شده یا فشار همودینامیک نسبت داد. با وجود این با توجه به نتایج تحقیق حاضر، تمرین ورزشی به گونه‌ای قادر به کنترل این تخریب ناشی از سن بر رگ‌زایی قلبی می‌باشد. افزایش بیان ژن VEGF در پاسخ به تمرین ورزشی نشان می‌دهد که VEGF یکی از واسطه‌های احتمالی در رگ‌زایی ناشی از ورزش است و بنابراین گام مهم و اولیه در سازگاری با افزایش فعالیت عضلانی در بیمار مبتلا به نارسایی مزمن قلبی و یا افراد

سن بزرگترین عامل خطر برای بیماری‌های قلبی عروقی است و شیوع این بیماری‌ها با افزایش سن به طور چشمگیری افزایش می‌یابد. به منظور بهبود مراقبت و پیشگیری از بیماری‌های قلبی مرتبط با سن، می‌توان از فواید تمرین ورزشی در سنین مختلف بهره برد. از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای در سه رده سنی به بررسی تغییرات آنژیوژنز، هایپوکسی بافتی و جریان یونی کلسیم بافت قلبی به ویژه با تمرین ورزشی ترکیبی نپرداخته است، لذا هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی تغییرات آنژیوژنز، هایپوکسی بافتی و جریان یونی کلسیم بافت قلبی رت‌های نابالغ، بالغ و پیر متعاقب تمرین ترکیبی مقاومتی و هوازی می‌باشد. در مطالعه حاضر برای بررسی تغییرات رگ‌زایی قلبی در سنین مختلف و بررسی تاثیر تمرین بر این پدیده، فاکتور VEGF اندازه‌گیری شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن VEGF تنها در گروه تمرین ۸ هفته‌گی به طور معنی‌داری مقادیر بالاتری در بافت قلب نسبت به گروه کنترل خود داشت. همسو با نتایج مطالعه حاضر پورحیدر و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که ورزش از طریق تعدیل سطوح پروتئین VEGF-A و فاکتور هسته‌ای کاپا - بی (NF-kB) در میوکاردیوسیت، کاهش رگ‌زایی مرتبط با افزایش سن را بهبود می‌بخشد. در مطالعه حاضر هر چند مسیرهای التهابی بررسی نشد اما به نظر می‌رسد کنترل التهاب ناشی از ورزش می‌تواند در تعدیل رگ‌زایی سالمندی و مهار کاهش آن نقش داشته باشد (۲۶). سیلویانا و همکاران (۲۰۲۲) بیان کردند شدت‌های مختلف تمرین، الگوی مدولاسیون متفاوتی از پروتئین‌ها را القا

قابل توجه VEGF با تمرین ورزشی نداشت اما به نظر می‌رسد تمرینات شدیدتر که بتواند هایپوکسی ناشی از تمرین را در بافت قلب (در سنین مختلف) ایجاد کند می‌تواند در افزایش این فاکتور نقش مهمی داشته باشد.

نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که HIF-1 قلبی تنها در گروه‌های کنترل ۸ هفته و کنترل ۲۴ ماهه کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه تمرین ۲ هفته نشان دادند. با وجود این، رابطه‌های معقول در پژوهش نظیر مقایسه ۳ گروه کنترل (بررسی اثر سن)، بررسی سه گروه تمرینی در سه رده سنی و بررسی گروه‌های تمرین با کنترل در هر رده سنی معنی‌دار نشد. HIF-1 یک فعال‌کننده رونویسی اصلی ژن‌های تنظیم شده با اکسیژن است که در متابولیسم انرژی، رگ‌زایی و افزایش گلبول‌های قرمز نقش دارد (۳۹). اعضای مختلف خانواده این فاکتور (HIF) در سنین مختلف بیان متفاوتی در سلول‌ها می‌توانند داشته باشند (۴۰). در مطالعه حاضر نیز مشخص شد مقادیر این فاکتور با افزایش سن کاهش می‌یابد (کاهش غیر معنی‌دار). کاهش وابسته به سن در بیان HIF-1 $\alpha$  قبلاً در مغز، کبد و کلیه گزارش شده بود که ممکن است با کاهش سازگاری با هایپوکسی در حیوانات و انسان‌های مسن همراه باشد (۴۱). با وجود این، تمرین ورزشی می‌تواند سازگاری با هایپوکسی را القا کند و عدم معنی‌داری در رده‌های مختلف سنی شاید به تاثیر سازگارانه ناشی از تمرین ورزشی نسبت داده شود. همچنین، در رابطه با مکانیزم‌های این کاهش می‌توان بیان کرد که با افزایش سن، کاهش بیان HIF-1 $\alpha$  با افزایش بیان PHD3 در قلب موش و انسان مرتبط است. PHD3 برجسته‌ترین هیدروکسیلاز اصلاح‌کننده HIF است که در نمونه‌های قلب انسان یافت شده است (۴۱). برای پی بردن به این مکانیسم در مطالعه حاضر تغییرات PHD3 بررسی نشد. بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، عرب‌زاده و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی تأثیر تمرینات ورزشی روی تردمیل، عصاره چای سبز و ترکیب تمرین ورزشی با عصاره چای سبز بر نشانگرهای آپوپتوز میوسیت‌های قلبی موش صحرایی پیر با تأکید بر HIF-1 $\alpha$  پرداخته و نشان دادند که تمرین ورزشی و چای سبز به تنهایی قادر به بهبود این نشانگرها بوده اما ترکیب عصاره چای سبز و ورزش تأثیری بر HIF-1 $\alpha$  و نشانگرهای آپوپتوز در قلب رت‌های پیر نداشت (۴۲). از جمله تفاوت‌های نتایج مطالعه حاضر می‌توان به مدت زمان تمرین و مدالیته‌های مختلف

سالم می‌باشد (۲۸). همسو با نتایج مطالعه حاضر نشان داده شده که تمرین ورزشی در موش‌های جوان بیان mRNA و پروتئین VEGF را در کل قلب افزایش می‌دهد (۲۹). مطالعات قبلی همچنین نشان داده‌اند که تمرین شنا در موش صحرایی باعث افزایش تراکم مویرگی قلب و نسبت مویرگ به میوسیت می‌شود (۳۰، ۳۱). VEGF آبشار سیگنالینگ رگ‌زایی را فعال می‌کند و رگ‌زایی را در ارتباط با فعال‌سازی مسیر مرتبط با Akt و اکسید نیتریک اندوتلیال (eNOS) افزایش می‌دهد (۳۲، ۳۳). بنابراین، ممکن است منطقی باشد که حدس بزنیم افزایش بیان VEGF ناشی از تمرینات ورزشی در قلب سالخورده ممکن است باعث افزایش اتصال VEGF به گیرنده‌های رگ‌زایی آن شود و باعث افزایش حالت فسفوریلاسیون eNOS قلبی از طریق فعال‌شدن پروتئین Akt شود که در نهایت منجر به افزایش رگ‌زایی قلبی در طی تمرینات ورزشی در سنین بالا شود. از سوی دیگر، نشان داده شده افزایش سطح NO و بیان NOS نیز بیان ژن VEGF را در اندوتلیوم وریدی کرونری افزایش می‌دهد (۳۴)، به گونه‌ای که مهار NOS در بافت عضله اسکلتی تأثیر تمرین بر mRNA VEGF را نیز در این بافت به حداقل می‌رساند (۳۵). بنابراین یک تنظیم متقابل بین سطح NO و بیان VEGF نیز وجود دارد (۲۸). با وجودی که در مطالعه حاضر تغییرات NO و NOS اندازه‌گیری نشد، اما نمی‌توان این احتمال را که افزایش eNOS در قلب تنظیم‌کننده رونویسی مهم افزایش بیان mRNA VEGF ناشی از تمرین ورزشی در سنین بالا باشد را رد کرد. برای روشن شدن این موضوع، باید از مهارکننده‌های اختصاصی VEGF و/یا NOS در مطالعات آینده استفاده شود. VEGF در سنین مختلف با توجه به فراهمی اکسیژن، سطوح بیان متفاوت دارد (۳۶). در شرایط ابتدایی زندگی افزایش هایپوکسی سبب افزایش این فاکتور و افزایش رگ‌زایی در بافت قلب می‌شود (۳۷). اما در سنین بالاتر معمولاً بافت قلبی با مدل‌های هایپوکسی ناشی از تمرین می‌تواند در تنظیم مثبت این فاکتور موثر باشد (۲۸). تحقیقات نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی، تنظیم کاهش آبشار سیگنال‌دهی رگ‌زایی VEGF ناشی از افزایش سن را در قلب بهبود می‌بخشد. علاوه بر این، تراکم مویرگی کل قلب و نسبت مویرگ به میوسیت با افزایش سن کاهش می‌یابد و این کاهش‌ها با تمرینات ورزشی در دوران سالمندی معکوس می‌شوند (۳۸). در مطالعه حاضر هر چند گروه سالمند افزایش



استاندارد فعالیت Calcineurin در عصاره‌های بافتی تحت شرایط مقادیر کلسیم و کالمودولین اضافی انجام می‌شود (۴۶). بنابراین، آنها فعالیت واقعی *in vivo* را منعکس نمی‌کنند، بلکه صرفاً اندازه‌گیری کل فعالیت Calcineurin بالقوه موجود را در صورت فعال شدن تمام Calcineurin در سلول ارائه می‌دهند. همچنین، بسیاری از مطالعات از روش کمی‌سازی سطوح رونویسی استفاده می‌کنند که این روش نیز مستقیماً تحت کنترل NFAT/ Calcineurin است (۴۷). با این حال، این رویکرد همچنین دارای محدودیت‌هایی است، زیرا فقط فعالیت Calcineurin را نسبت به رونویسی با واسطه NFAT ارزیابی می‌کند و بنابراین ممکن است عملکرد Calcineurin را بر روی سایر بسترها منعکس نکند. بنابراین انتخاب روش اندازه‌گیری Calcineurin نیز یکی از دلایل غیر معنی‌داری در نتایج می‌تواند باشد. در این رابطه پیشنهاد می‌شود از بیان پروتئین نیز در کنار بیان ژن در مطالعات استفاده شود. با توجه به موارد مذکور نیز می‌توان بیان نمود که این مطالعه همچنین شامل چندین محدودیت از جمله، عدم اندازه‌گیری بیان پروتئین در کنار بیان ژن، عدم بررسی مسیرهای سیگنالی مرتبط با التهاب و فیروز به ویژه در رت‌های سالمند و همچنین تعداد کم نمونه‌ها و مدت زمان کمتر تمرین برای بررسی دقیق‌تر تاثیرات ناشی از سن بود که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی این نکات مد نظر قرار گیرد.

### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر تمرین ترکیبی سبب بهبود فاکتور رگ‌زایی به ویژه در رت‌های جوان شد. اما تغییرات فاکتور رونویسی HIF-1 و همچنین Calcineurin در بافت قلب با این روش تمرینی در سه رده سنی معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد فاکتور رگ‌زایی بافت قلب در نوجوانی بیشتر تحت تاثیر روش تمرینی ترکیبی قرار گیرد با این وجود پیشنهاد می‌شود برای بررسی اثرات دقیق‌تر تمرین بر بافت قلب در سه رده سنی تاثیر تمرینات مجزای استقامتی و مقاومتی نیز بر این فاکتورها ارزیابی شود.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله محققان از زحمات آزمایشگاه هیستورنوتک تقدیر و تشکر می‌کنند.

درمانی اشاره کرد، زیرا که در آن مطالعه از تمرین تریدمیل ۱۲ هفته‌ای (با سرعت ۱۷ تا ۲۷ متر در دقیقه و ۶۰ تا ۷۵ درصد  $VO_{2peak}$ ) همراه مکمل چای سبز استفاده شد، اما در مطالعه حاضر از تمرین مقاومتی و هوازی برای مدت زمان کمتر استفاده شد. لذا به نظر می‌رسد برای بهره‌برداری از تاثیرات مفید تمرین ورزشی به ویژه هوازی بر HIF-1 $\alpha$  قلبی باید از دوره‌های طولانی‌تر تمرین استفاده کرد تا سازگاری واقعی در نشانگرهای سلولی قلبی از جمله HIF-1 $\alpha$  نیز رخ دهد. در مطالعه حاضر، برای بررسی تنظیم کلسیم قلبی فاکتور کلسینورین اندازه‌گیری شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تنها گروه کنترل ۲۴ ماهه کاهش معنی‌داری کلسینورین بافت قلب را نسبت به گروه‌های تمرین ۲ و ۸ هفته نشان داد. هر چند در سنین پایین‌تر و با تمرین ورزشی مقادیر کلسینورین بیشتر بود، اما این مقادیر بالاتر معنی‌دار نبود. در سلول‌های تحریک‌کننده، مانند نوروها و کاردیومیوسیت‌ها، که تغییرات سریع و مکرر در کلسیم سیتوپلاسمی را تجربه می‌کنند، سطح پروتئین کلسینورین فوق‌العاده بالاست که نشان می‌دهد این سلول‌ها به سطوح بالایی از فعالیت کلسینورین نیاز دارند (۴۳). با این حال، به طور گسترده شناخته شده است که فعال شدن بیش از حد کلسینورین در قلب به بازسازی هیپرتروفیک پاتولوژیک و پیشرفت به سمت سکته کمک می‌کند (۴۳). لذا به نظر می‌رسد کلسینورین تحت تاثیر سازگاری ناشی از تمرین و یا حتی افزایش سن قرار نمی‌گیرد، زیرا افزایش یا کاهش آن برای بافت قلبی (در آزمودنی سالم) می‌تواند مضر باشد و اختلال یونی می‌تواند قلب را در معرض شرایط پاتولوژیک قرار دهد. همچنین، تفاوت‌های اساسی در سیگنال‌دهی کلسینورین در کاردیومیوسیت‌های نوزاد و فرد بالغ وجود دارد (۴۳). لذا تغییرات این فاکتور ناشی از سن یا تمرین را باید در سیگنال‌های بعدی کلسینورین جست و جو کرد. بیان شده که کلسینورین هدف داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی نظیر سیکلوسپورین A و FK506 است (۴۴, ۴۵) و لذا تحت مصرف دارویی می‌تواند در بافت قلبی تنظیم مثبت یا منفی شود. این در حالی بود که در مطالعه حاضر از هیچ‌گونه دارو یا القای مدل پاتولوژیک استفاده نشد. لذا این عوامل می‌توانند توجیه‌کننده تغییرات غیرمعنی‌دار Calcineurin در مطالعه حاضر باشد. از دیگر دلایل این تغییرات را می‌توان به روش اندازه‌گیری نسبت داد. زیرا سنجش‌های بیوشیمیایی

## منابع

- Goldstein SA, D'Ottavio A, Spears T, Chiswell K, Hartman RJ, Krasuski RA, et al. Causes of death and cardiovascular comorbidities in adults with congenital heart disease. *Journal of the American Heart Association*. 2020;9(14):1-8. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.016400>.
- Lipshultz SE, Law YM, Asante-Korang A, Austin ED, Dipchand AI, Everitt MD, et al. Cardiomyopathy in children: classification and diagnosis: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2019;140(1):e9-e68. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000682>.
- Mensah GA, Roth GA, Fuster V. The global burden of cardiovascular diseases and risk factors: 2020 and beyond. *J American College of Cardiology Foundation Washington*; 2019; 74(20). 2529-32. <https://www.jacc.org/doi/full/10.1016/j.jacc.2019.10.009>
- Komalasari R, Nurjanah MMY. Quality of life of people with cardiovascular disease: a descriptive study. *Asian/Pacific Island Nursing Journal*. 2019;4(2):92-96. doi: 10.31372/20190402.1045.
- Wu G-Q, Arzeno NM, Shen L-L, Tang D-K, Zheng D-A, Zhao N-Q, et al. Chaotic signatures of heart rate variability and its power spectrum in health, aging and heart failure. *PLoS One*. 2009;4(2):1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004323>.
- North BJ, Sinclair DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circulation research*. 2012;110(8):1097-108. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246876>.
- Obas V, Vasani RS. The aging heart. *Clinical Science*. 2018;132(13):1367-82. doi: 10.1042/CS20171156.
- Shih H, Lee B, Lee RJ, Boyle AJ. The aging heart and post-infarction left ventricular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(1):9-17. doi/abs/10.1016/j.jacc.2010.08.623.
- Gao J, Feng W, Lv W, Liu W, Fu C. HIF-1/AKT signaling-activated PFKFB2 alleviates cardiac dysfunction and cardiomyocyte apoptosis in response to hypoxia. *International Heart Journal*. 2021;62(2):350-8. <https://doi.org/10.1536/ihj.20-315>.
- Liu M, Galli G, Wang Y, Fan Q, Wang Z, Wang X, et al. Novel therapeutic targets for hypoxia-related cardiovascular diseases: the role of HIF-1. *Frontiers in Physiology*. 2020;11:1-8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00774>.
- Cerychova R, Pavlinkova G. HIF-1, metabolism, and diabetes in the embryonic and adult heart. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9(1):1-14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00460>.
- Haidarpour S, Ghahremani M, Hosseinpour Delavar S. The Effect of Eight Weeks of Moderate-Intensity Endurance Training on the Expression of HIF-1 and VEGF Genes in the Heart Muscle of Male Rats with Myocardial Infarction. *Armaghane Danesh*. 2021;26(4):624-33. doi: 10.52547/armaghanj.26.4.1.624.[In Persian]
- Yeo H-S, Lim J-Y. Effects of different types of exercise training on angiogenic responses in the left ventricular muscle of aged rats. *Experimental gerontology*. 2022;158:111650. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111650>.
- Gustafsson T, Kraus WE. Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2001;6(3):75-89. file:///C:/Users/1673/Downloads/LandmarkA595.pdf
- Marneros AG. Effects of chronically increased VEGF - A on the aging heart. *The FASEB Journal*. 2018;32(3):1550-65. <https://doi.org/10.1096/fj.201700761RR>.
- Shadmehri S, Ahmadi M. The Effect of Concurrent Endurance and Resistance Exercise on Plasma Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Endostatin in Inactive Women. *Report of Health Care*. 2016;2(1):38-45. [https://jrhc.marvdasht.iau.ir/article\\_2794\\_5b3443401dbf5b0ce57d4e5b4f098aa2.pdf](https://jrhc.marvdasht.iau.ir/article_2794_5b3443401dbf5b0ce57d4e5b4f098aa2.pdf).
- Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004;109(2):220-6. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000109141.48980.37>.
- Rehman J, Li J, Parvathaneni L, Karlsson G, Panchal VR, Temm CJ, et al. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43(12):2314-8. doi/abs/10.1016/j.jacc.2004.02.049.
- Semsarian C, Wu M-J, Ju Y-K, Marciniak T, Yeoh T, Allen DG, et al. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature*. 1999;400(6744):576-81. <https://doi.org/10.1038/23054>.
- Musarò A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*. 1999;400(6744):581-5. <https://doi.org/10.1038/23060>.
- Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, Nicol RL, Mammen P, Yang J, et al. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(6):3328-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.041614798>.
- Khan MA, Hashim MJ, Mustafa H, Baniyas MY, Al Suwaidi SKBM, AlKatheeri R, et al. Global epidemiology of ischemic heart disease: results from the global burden of disease study. *Cureus*. 2020;12(7) 1-9.
- Le HM, Downey BC, Lanois CJ, Miller PE, Stein CJ, Kerkhof DL, et al. Comparison of the limb-lead Electrocardiogram to the 12-lead Electrocardiogram for identifying conditions associated with sudden cardiac death in youth athletes. *The American Journal of Cardiology*. 2021;152:146-9. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2021.04.030>.
- Twig G, Yaniv G, Levine H, Leiba A, Goldberger N, Derazne E, et al. Body-mass index in 2.3 million adolescents and cardiovascular death in adulthood. *New England journal of medicine*. 2016;374(25):2430-40. doi :10.1056/NEJMoa1503840.
- Kim H-J, So B, Son JS, Song HS, Oh SL, Seong JK, et al. Resistance training inhibits the elevation of skeletal muscle derived-BDNF level concomitant with improvement of muscle strength in Zucker diabetic rat. *Journal of exercise nutrition & biochemistry*. 2015;19(4):281-288. doi: 10.5717/jenb.2015.15112402.
- Pourheydar B, Biabanghard A, Azari R, Khalaji N, Chodari L. Exercise improves aging-related decreased angiogenesis through modulating VEGF-A, TSP-1 and p-NF-Kb protein levels in myocardiocytes. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*. 2020;12(2):129-135. doi :10.34172/jcvtr.2020.21.

27. Lähteenvuo J, Rosenzweig A. Effects of aging on angiogenesis. *Circulation research*. 2012;110(9):1252-64. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246116>.
28. Gustafsson T, Bodin K, Sylven C, Gordon A, Tyni - Lenne R, Jansson E. Increased expression of VEGF following exercise training in patients with heart failure. *European journal of clinical investigation*. 2001;31(4):362-6. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2001.00816.x>.
29. Husain K. Physical conditioning modulates rat cardiac vascular endothelial growth factor gene expression in nitric oxide-deficient hypertension. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;320(4):1169-74. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.058>.
30. Bloor C, Leon A. Interaction of age and exercise on the heart and its blood supply. *Laboratory Investigation*. 1970;22(2):160-5.
31. Tomanek RJ. Effects of age and exercise on the extent of the myocardial capillary bed. *The Anatomical Record*. 1970;167(1):55-62. <https://doi.org/10.1002/ar.1091670106>.
32. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399(6736):601-5. <https://doi.org/10.1038/21224>.
33. Fulton D, Gratton J-P, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399(6736):597-601. <https://doi.org/10.1038/21218>.
34. Morbidelli L, Chang C-H, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1996;270(1):H411-H5. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.270.1.H411>.
35. Gavin TP, Spector DA, Wagner H, Breen EC, Wagner PD. Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2000;88(4):1192-8. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.4.119>.
36. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359(6398):843-5. <https://doi.org/10.1038/359843a0>.
37. J Patterson A, Zhang L. Hypoxia and fetal heart development. *Current molecular medicine*. 2010;10(7):653-66.
38. Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Miyauchi T. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006;291(3):H1290-H8. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00820.2005>.
39. Zheng J, Zhang M, Weng H. Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1 $\alpha$  regulates heart regeneration by promoting the survival of cardiac stem cell. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;503(4):2226-33. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.142>.
40. He Y, Munday JS, Perrott M, Wang G, Liu X. Association of age with the expression of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$  and VEGF in lung and heart of tibetan sheep. *Animals*. 2019;9(9):673. <https://doi.org/10.3390/ani9090673>.
41. Rohrbach S, Simm A, Pregla R, Franke C, Katschinski DM. Age-dependent increase of prolyl-4-hydroxylase domain (PHD) 3 expression in human and mouse heart. *Biogerontology*. 2005;6(3):165-71. <https://doi.org/10.1007/s10522-005-7950-9>.
42. Arabzadeh E, Norouzi Kamareh M, Ramirez - Campillo R, Mirnejad R, Masti Y, Shirvani H. Twelve weeks of treadmill exercise training with green tea extract reduces myocardial oxidative stress and alleviates cardiomyocyte apoptosis in aging rat: The emerging role of BNIP3 and HIF - 1 $\alpha$ /IGFBP3 pathway. *Journal of Food Biochemistry*. 2022; e14397. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14397>.
43. Parra V, Rothermel BA. Calcineurin signaling in the heart: The importance of time and place. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2017;103:121-36. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.12.006>.
44. Cardenas ME, Muir RS, Breuder T, Heitman J. Targets of immunophilin - immunosuppressant complexes are distinct highly conserved regions of calcineurin A. *The EMBO journal*. 1995;14(12):2772-83. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07277.x>.
45. Liu J, Farmer Jr JD, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 1991;66(4):807-15. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90124-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90124-H).
46. Fruman DA, Pai S-Y, Klee CB, Burakoff SJ, Bierer BE. Measurement of calcineurin phosphatase activity in cell extracts. *Methods*. 1996;9(2):146-54. <https://doi.org/10.1006/meth.1996.0020>.
47. Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, et al. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circulation research*. 2000;87(12):e61-e8. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.12.e61>.

# Investigating changes in angiogenesis, tissue hypoxia and Calcineurin of cardiac tissue at immature, mature and old rats following combined training

Bahman Mirzaei<sup>1</sup>, Hossein Ghavami Amin<sup>2</sup>, Mohammad Reza Fadaei Chay<sup>3\*</sup>

1. Professor, Department of Exercise Physiology, University of Guilan, Rasht, Iran
2. PhD Candidate, Department of Exercise Physiology, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Received: 2023/05/06

Accepted: 2023/08/19

## Abstract

### \*Correspondence:

### Email:

mfadaei2000@yahoo.com

**Introduction and purpose:** At the cellular level, the cardioprotective effects of exercise on the heart tissue are different at various ages. The aim of this study was to investigate the changes in angiogenesis (VEGF), tissue hypoxia (HIF-1) and calcium ion flow (Calcineurin) in the heart tissue of immature, mature and old rats following combined training.

**Materials and Methods:** Thirty male Wistar rats divided in three age groups of 2 weeks, 8 weeks and 24 months (10 each group) and each age group was divided into two control and exercise training groups (5 each group). In the combined training group, animals performed one day of resistance training and one day of aerobic training for 6 weeks. The amount of overload in the resistance training program was determined based on the body weight of the animals from 30% in the first week to 120% body weight in the last week. For aerobic training, the intensity of training increased from 50% of maximum speed in the first week to 80% in the last week. After 6 weeks of training, sacrificed animals and heart tissue were removed to measure VEGF, HIF-1 and Calcineurin factors by RTPCr method. To analyze data, the statistical method of one-way analysis of variance was used with significance  $P \leq 0.05$ .

**Results:** The group of exercise training (8-week) showed higher levels of VEGF gene expression in heart tissue compare to the control group (8-week control) ( $P=0.020$ ). However, there was no significant difference in VEGF gene expression between training groups in three age groups ( $P>0.05$ ). Also, there was no significant difference between the control and training groups in each age group and between the training groups in the three age in the expression of cardiac HIF-1 and Calcineurin gene ( $P>0.05$ ).

**Discussion and Conclusion:** Exercising at young age has more favorable cellular effects (especially the positive regulation of angiogenesis factor). Therefore, in order to have a good aging period, it was suggested to do regular resistance-aerobic exercises from a young age.

**Key Words:** Combined training, Angiogenesis, Hypoxia, Calcium, Heart