



دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی

گروه آموزش تربیت بدنی و علوم ورزشی

رساله برای دریافت درجه‌ی دکتری تخصص
رشته فیزیولوژی ورزشی گرایش قلب و عروق و تنفس

بررسی تاثیر هشت هفته تمرین هوازی و شرایط کم اکسیژنی بر مسیر رگ‌زایی ناشی از $PGC1-\alpha$ در موش‌های ویستار

پژوهشگر:

سهیلا رحیمی فردین

استادان راهنما:

پروفسور معرفت سیاه‌کوهیان

دکتر پوران کریمی

استاد مشاور:

دکتر لطفعلی بلبلی

(بهمن ۱۳۹۷)

عنوان و نام پدیدآور:	بررسی تاثیر هشت هفته تمرین هوازی و شرایط کم اکسیژنی بر مسیر رگ‌زایی ناشی از PGC1- α در موش‌های ویستار/ سهیلا رحیمی فردین
استادان راهنما:	دکتر معرفت سیاه‌کوهیان - دکتر پوران کریمی
استاد مشاور:	دکتر لطفعلی بلبلی
تاریخ دفاع:	۹۷/۱۱/۰۲
تعداد صفحات:	۱۶۸ ص.
شماره پایان‌نامه:	نام گروه / شماره پایان‌نامه

چکیده:

هدف: بررسی تاثیر تمرین هوازی و کم اکسیژنی متناوب بر محتوی پروتئین‌های مرتبط با آنژیوژنز در بافت قلبی موش‌های نر نژاد ویستار بود.

روش‌شناسی پژوهش: تعداد ۴۰ راس موش صحرایی نر نژاد ویستار (۳ ماهه) در محدوده وزنی 20 ± 220 گرم استفاده گردید. موش‌های صحرایی به طور تصادفی در ۴ گروه (۱۰ تایی: ۱) کنترل سالم (NC) (۲) کم اکسیژنی (H) (۳) تمرین هوازی (T) (۴) تمرین هوازی توام با کم اکسیژنی (TH) تقسیم‌بندی شدند. شرایط کم اکسیژنی، متناوب و ایزوباریک (فشار سهمی اکسیژن ۱۴ درصد و فشار کلی ۷۶۰ میلی‌متر جیوه) و شرایط تمرین هوازی سرعت ۲۲-۲۶ متر در دقیقه بر روی شیب ۶ درجه نوار گردان به تعداد دفعات ۵ جلسه در هفته طراحی شد. سپس میزان بیان پروتئین‌های مرتبط با آنژیوژنز شامل فاکتور القاء شده کم اکسیژنی (PGC-1 α)، عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGFA) و آدنوزین مونو فسفاکیناز (P-AMPK) با روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بیان پروتئین‌های PGC-1 α , ERR α , VEGFA و P-AMPK در هر سه گروه تمرین، کم اکسیژنی و تمرین توام با کم اکسیژنی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($P \leq 0/01$). بیان PGC-1 α از بین گروه‌های مداخله بین گروه H با T یا H معنی‌دار بود ($P = 0/017$). ولی بین گروه T با ترکیب T+H ($P = 0/116$) و H با ترکیب T+H ($P = 0/055$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین محتوی (P-AMPK) بین T با H ($P = 0/028$) و T با ترکیب T+H ($P = 0/010$) معنی‌دار بود. ولی H با ترکیب T+H ($P = 0/055$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نیز بیان (ERR α) بین T با H ($P = 0/265$) و T با ترکیب T+H ($P = 0/057$) و H با ترکیب T+H ($P = 0/069$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نیز بیان (VEGFA) بین T با H ($P = 0/461$) و T با ترکیب T+H ($P = 0/27$) معنی‌دار نبود ولی بین H با ترکیب T+H ($P = 0/001$) معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد با وجود اینکه نقش کم اکسیژنی در فعال کردن مسیر آنژیوژنز وابسته به ERR α از طریق PGC-1 α برجسته بود و تمرین هوازی در P-AMPK محرک موثری نشان داد ولی ترکیب T+H اثر هم‌افزایی نشان نداد. برای تعیین دقیق مکانیسم‌های پایین دستی و بالا دستی این مسیرها نیاز به مطالعات بیشتری وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: کم اکسیژنی متناوب، تمرین هوازی، عوامل آنژیوژنز.

۱-۱- مقدمه

تمرین در محیط کم اکسیژنی اغلب برای افزایش ظرفیت هوازی ورزشکاران مورد استفاده قرار می‌گیرد. از سوی دیگر، قرارگیری در شرایط کم اکسیژنی شدید موجب اختلال در همودینامیک عروق و تضعیف بافت عضله اسکلتی می‌شود به عنوان یک روش مناسب برای استفاده از تمرین در شرایط کم اکسیژنی بدون در نظر گرفتن اثر منفی، نظریه "زندگی در سطح دریا، تمرین در ارتفاع" پیشنهاد شده است (۱). در شرایط کم اکسیژنی یکی از مهم‌ترین سازگاری‌های حاصله افزایش چگالی مویرگی یا آنژیوژنز است آنژیوژنز فرایند بیولوژیکی جوانه زدن مویرگ‌های جدید از مویرگ‌های موجود در بافت می‌باشد و نیازمند مهاجرت، تکثیر و رشد سلول‌های اندوتلیال است (۲). و محرک‌هایی مانند کم اکسیژنی^۱، ایسکیمی، تنش برشی و عوامل متابولیکی فرایند آنژیوژنز را فعال می‌کند. از بین محرک‌های ذکر شده کم اکسیژنی نقش موثری را در آنژیوژنز دارد در شرایط کم اکسیژنی کمبود اکسیژن و مواد مغذی، عدم تعادل pH، تغییرات چشمگیری را در متابولیسم و وضعیت ردوکس سلولی ایجاد می‌کند و این رویدادهای متابولیکی منجر به فعال شدن کواکتیوتورهای PGC-1 می‌شوند (۳). PGC-1 α یک حس‌گر قوی متابولیکی و تنظیم کننده ناشی از کمبود مواد مغذی و اکسیژن است. اگر چه مکانیسم اثرشان بیشتر در بیوژنز میتوکندریایی، تغییر شکل میتوکندری، کاهش اختلال میتوکندریایی و تغییر فنوتیپ تارهای عضلانی از طریق عامل تقویت کننده میوسیت^۳ (MEF2s) می‌باشد اما نتایج برخی از تحقیقات بیانگر این است PGC-1 α بیان VEGF^۴ و فاکتورهای آنژیوژنز را با کاهش سایتوکاین‌های پیش التهابی و ترشح سایتوکاین‌های پیش آنژیوژنیک در سلول‌های عضلانی و عضله قلبی در محیط آزمایشگاهی مستقل از مسیر HIF1- α تنظیم می‌کند همچنین، نقش کواکتیوتور PGC-1 α در آنژیوژنز، بیشتر در اندام‌های ایسکیمیک رخ می‌دهد و در شرایط ایسکمی PGC-1 α از طریق گیرنده مرتبط

1 . Hypoxia

2 . Peroxisome proliferator_ activated receptor

3 . Myocyte enhancer factor 2

4. Vascular endothelial growth factor

با استروژن^۱ (ERR α)، VEGF و سایر فاکتورهای آنژیوژنیک را تحریک می‌کند و با فعال-سازی این مسیر موجب رگ‌زایی می‌شود (۴). از سوی دیگر، نتایج تحقیقات ورزشی نشان می‌دهد کواکتیوتورهای PGC-1 نقش مهمی در تنظیم سازگاری عضلات اسکلتی با ورزش دارد. برخی مطالعات نشان داده است که ورزش باعث افزایش بیان PGC-1 α در عضله اسکلتی انسان و موش از مسیرهای چندگانه می‌شود. این عامل بر اثر فسفوریلاسیون و فعال شدن PGC-1 α توسط پروتئین کیناز فعال شده (AMPK)^۲ در پاسخ به ورزش رخ می‌دهد (۵). با این حال، مکانیزم‌هایی که کم اکسیژنی بیان PGC-1 α را القاء می‌کند هنوز به طور دقیق مشخص نیست گزارش شده که محیط کم اکسیژنی می‌تواند بیان PGC1-a را مستقل از مسیر HIF-1a فعال کند. در بررسی‌ها نشان داده شده است که کم اکسیژنی می‌تواند مسیر AMPK را در میوکاردیوم افزایش دهد و القاء بیان PGC-1 α با فعال سازی AMPK همراه است که با فعال شدن این مسیر روند پایین دستی آنژیوژنز فعال می‌شود. PGC-1 α در کبد و دیگر بافت‌های اکسیداتیو مانند قلب و عضله اسکلتی بیان می‌شود فعال شدن PGC-1 α منجر به فراخوانی فاکتورهای رونویسی بیوژنز میتوکندری و آنژیوژنیک از جمله افزایش نسخه برداری VEGF می‌گردد (۶).

۱-۲- بیان مساله

آنژیوژنز فرایند زیستی جوانه زدن مویرگ‌های جدید از مویرگ‌های موجود در بافت است (۱). که در پاسخ به عواملی مانند کم اکسیژنی^۳ (۲)، نیروهای همودینامیک (تنش برشی^۴، کشش مکانیکی بافت) و عوامل متابولیکی (۳) شامل فاکتورهای رشدی) فعال می‌شود. از بین فاکتورهای رایج در آنژیوژنز، کم اکسیژنی نقش موثری را در آنژیوژنز دارد زیرا هر گونه کاهش در سطوح اکسیژن، مجموعه‌ای از واکنش‌های حاد و مزمن در بدن را موجب می‌شود که مکانیسم‌های تنظیم هموستاتیک برای حفظ اکسیژن در متابولیسم طبیعی در دستگاه تنفسی و قلبی عروقی به سرعت وارد عمل می‌شود (۴).

یکی از تنظیم کننده اصلی در متابولیسم طبیعی، بیوژنز میتوکندریایی و آنژیوژنز، PGC-1 α می‌باشد. افزایش بیان پروتئین PGC-1 α توام با افزایش PPAR α می‌باشد.

1. Estrogen related - α receptor

2. Adenosine Monophosphate Activated Protein (AMPK) Kinase

3. Hypoxia

4. Shear Stress

PPAR یاگیرنده‌های فعال‌کننده‌ی تکثیر پراکسیزومها (Peroxisome proliferator- activated receptors) گروهی از گیرنده‌های هسته‌ای وابسته به لیگاند می‌باشند که به عنوان عوامل رونویسی و تنظیم‌کننده‌ی بیان ژن عمل می‌کنند (۵). PGC-1 α در سال ۱۹۹۰ توسط Issemann و همکاران شناسایی شد (۶) و اثرات فیزیولوژیکی و بیولوژیکی مختلف دارند به عنوان مثال در هموستاز لیپیدها و گلوکز، تمایز سلولی، آنژیوژنز، التهاب و ترمیم زخم و در بیماری‌هایی مثل دیابت، سرطان، تصلب شراین و چاقی نقش دارند (۷،۸،۱). کوآکتیویتورها نمی‌توانند به طور مستقیم به DNA وصل شوند ولی روی عوامل رونویسی نشسته و از طریق بازسازی کروماتین و تعامل با دستگاه رونویسی، نسخه‌برداری را تغییر می‌دهند (۷).

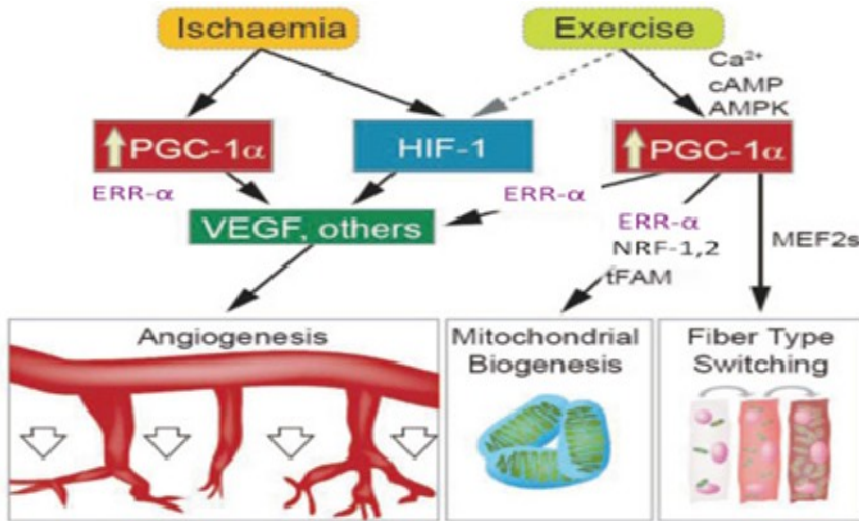
PGC-1 α تنظیم‌کننده‌ی اصلی متابولیسم انرژی قلب است (۸). بیان PGC-1 α در قلب بعد از تولد و در پاسخ به بی‌غذایی و کمبود اکسیژن بیشتر رخ می‌دهد و در سلول‌های قلبی صدها ژن را القاء می‌کند و کدگذاری آنزیم‌های کلیدی در تمام برنامه‌های متابولیکی اصلی را که در تولید موثرتر ATP نیازمند است القاء می‌کند (۹). و به عنوان یک میانجی پیام‌رسانی در پاسخ به کمبود اکسیژن و مواد غذایی عامل رشد اندوتلیال عروقی^۱ (VEGF) و سایر فاکتورهای آنژیوژنیک را به طور موثری فرا می‌خواند. اگر چه تنظیم VEGF در پاسخ به کم‌اکسیژنی^۲ HIF (عامل القا شونده با کم‌اکسیژنی) است. ولی مسیر PGC-1 α مستقل از مسیر HIF به طور قابل توجهی VEGF را تحریک می‌کند (۱۰).

VEGF نقش مهمی در تنظیم واسکولوژنز، مویرگ‌زایی، ریمادلینگ و نفوذپذیری عروقی در هر دو موقعیت پاتولوژیک و فیزیولوژیکی دارد. فعال شدن VEGF و گیرنده‌هایش چگالی عروق خونی، ذخایر جریان خونی و ابقای عصبی را افزایش می‌دهد (۱۱) و در مهاجرت، تکثیر، تجزیه ماتریکس سلول‌های اندوتلیال، تشکیل شبکه عروقی و همچنین در فعال‌کننده پرواکسی زوم توسعه یافته (PPAR α s) و تنظیم‌گیرنده هورمون تیروئید نقش دارد (۱۲).

-
1. Vascular endothelial growth factor
 2. Hypoxia-inducible factor
 3. Peroxisome proliferator_ activated receptor

همچنین نتایج مطالعات نشان می‌دهد PGC-1 α در عروق زایی جنینی ضروری نمی‌باشد ولی در عروق زایی بزرگسالی در هر دو شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی نقش دارد و نقش آن در آنژیوژنز، بیشتر در اندام‌های ایسکیمیک رخ می‌دهد و در شرایط ایسکمی PGC-1 α از طریق گیرنده مرتبط با استروژن (ERR α), VEGF و سایر فاکتورهای آنژیوژنیک را تحریک می‌کند و از طریق این مسیر موجب رگ‌زایی می‌شود. ولی در خلال فعالیت ورزشی مسیرهای تنظیم کننده بالادستی PGC-1 α ، کلسیم، AMPK و CAMK هستند که سه کار اصلی آنژیوژنز، بیوژنز میتوکندریایی و تبدیل فنوتیپ تارهای عضلانی به یکدیگر را انجام می‌دهند (۱۰). (شکل ۱)

مسیر تنظیم آنژیوژنز در ورزش از طریق ERR α صورت می‌گیرد ولی در بیوژنز میتوکندریایی علاوه بر ERR α عوامل هسته‌ای NRF-1, NRF-2 و عوامل نسخه برداری میتوکندریایی (TFAM) نیز درگیر هستند و تغییر فنوتیپ تارهای عضلانی هم از طریق عامل تقویت کننده میوسیت ۲ (MEF2s) صورت می‌گیرد (۱۰).



1. Transcription factor A, mitochondrial
2. Myocyte enhancer factor 2

شکل ۱-۱-۱- مکاتیسیم عمل PGC-1 α در ورزش و ایسکمی

علاوه بر این در پاسخ به ورزش، PGC-1 α توسط تحریک β آدرنرژیک فعال می‌شود و آنژیوژنز را در عضلات اسکلتی از طرق مسیر ERR α / VEGF هماهنگ می‌کند و این مورد در عضله قلبی به دلیل تحقیقات کمتر به طور کامل مشخص نیست (۵).

از سوی دیگر، برخی مطالعات نشان داده‌اند مداخله تمرین هوازی توام با کم اکسیژنی موجب القای بیشتری در فاکتورهای آنژیوژنز می‌شود. هر دو شرایط کم اکسیژنی و فعالیت هوازی فشارهای متابولیکی زیادی اعمال می‌کنند. کم اکسیژنی سطح اشباع اکسیژن را کاهش می‌دهد ولی فعالیت هوازی مصرف اکسیژن را در عضلات فعال افزایش می‌دهد. بنابراین فعالیت هوازی و کم اکسیژنی به طور قابل ملاحظه‌ای در اندام‌های فعال غلظت اکسیژن را کاهش می‌دهند و با کاهش تحویل اکسیژن، نیاز به اکسیژن در بافت‌های فعال افزایش می‌یابد برای جبران این مشکل فراخوان عوامل آنژیوژنز بیشتر می‌شود به این خاطر ترکیب فعالیت هوازی با کم اکسیژنی در مقایسه با فعالیت هوازی به‌طور مستقل در القاء عوامل آنژیوژنز موثر می‌باشد (۱۳).

با این حال، مکانیزم‌هایی که کم اکسیژنی بیان PGC-1 α را القاء می‌کند هنوز مشخص نیست گزارش شده که محیط کم اکسیژنی می‌تواند بیان PGC-1 α را مستقل از مسیر HIF-1 α فعال می‌کند. در بررسی‌ها نشان داده شده است که کم اکسیژنی می‌تواند مسیر AMPK را در میوکاردیوم افزایش می‌دهد و القاء بیان PGC-1 α با فعال سازی AMPK همراه است که با فعال شدن این مسیر روند پایین دستی آنژیوژنز فعال می‌شود (۱۰).

به نظر می‌رسد، PGC-1 α با تحریک VEGF و گیرنده‌های آن در شرایط کم اکسیژنی به فرایند آنژیوژنز در عضله قلب و اسکلتی بیانجامد و فعالیت هوازی می‌تواند با اعمال فشار متابولیکی زیاد این روند را تسریع نماید. با وجود این، مطالعه ای آثار همزمان مداخله تمرین ورزشی و کم اکسیژنی را بر میزان بیان PGC-1 α و فاکتورهای درگیر در آنژیوژنز قلبی، در بافت قلب بررسی نکرده است. مطالعات صورت گرفته بیشتر از سرم، پلاسما و یا عمدتاً در عضلات اسکلتی بوده‌اند. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی اثر تمرین هوازی بر میزان بیان PGC-1 α ، VEGFA، AMPK و ERR α در بافت قلبی موش‌های سالم انجام می‌شود تا به برخی از ابهامات موجود پاسخ دهد.

۱-۳- ضرورت و اهمیت پژوهش

یکی از مهم‌ترین علل موفقیت در فعالیت‌های ورزشی هوازی افزایش حداکثر اکسیژن مصرفی (VO_{2max}) است و یکی از دلایل افزایش حداکثر اکسیژن مصرفی فرایند آنژیوژنز می‌باشد و عامل تشدید کننده آنژیوژنز، فاکتورهای رشدی، شیراسترس، فشارهای مکانیکی، ایسکیمی و کم‌اکسیژنی است به این خاطر مربیان تمرین در کم اکسیژنی نورموباریک و هیپو باریک و یا ارتفاع را برای بهبود عملکرد ورزشی بهتر در نظر می‌گیرند (۱۴). سازگارهای عمده‌ای بر اثر تمرین در شرایط کم اکسیژنی سازگارهای عمده‌ای صورت می‌گیرد که این سازگاری‌ها نسبت به نوع و شدت تمرین، مدت زمان ماندن در ارتفاع و میزان ارتفاع و ایجاد شرایط کم اکسیژنی متفاوت می‌باشد (۱۵). کاهش فشار سهمی اکسیژن باعث دسترسی کمتر بافت‌ها به اکسیژن می‌شود و به تبع آن تحویل اکسیژن به بافت‌های فعال و مصرف آن در میتوکندری بویژه در هنگام فعالیت ورزشی هوازی مختل می‌شود (۱۶). از سوی دیگر، فشارهای متابولیکی و اکسایشی ناشی از فعالیت هوازی یک سری سازگاری‌های سلولی و مولکولی را در بین سلولی و درون سلولی موجب می‌گردد. در اثر فشارهای اکسایشی و متابولیکی ناشی از فعالیت انقباضی، فعالیت و بیان $PGC-1\alpha$ تحریک می‌شود که آن هم به نوبه خود از طریق تعامل با عوامل نسخه برداری بیوژنز میتوکندریایی و آنژیوژنز را القا می‌کند و به نظر می‌رسد این تحریک در شرایط کم اکسیژنی بیشتر از شرایط نورموکسی باشد.

ترکیب تمرین با شرایط کم اکسیژنی تحویل مواد غذایی و اکسیژن را در بافت‌های فعال کاهش می‌دهد و موجب تولید فشارهای متابولیکی و اکسایشی زیاد بویژه در زنجیره انتقال الکترون می‌گردد و ایجادگونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) می‌گردد. ROS ایجاد شده مسیر پیام‌رسانی AMPK را فعال می‌کند و فعال شدن این مسیر به بیان بیشتر پروتئین $PGC-1\alpha$ منجر می‌شود $PGC-1\alpha$ به عنوان انسجام دهنده اطلاعات متابولیکی و عصبی - هورمونی عمل می‌کند. سپس $PGC-1\alpha$ بیان VEGF و رسپتورهای آن را در شرایط کم اکسیژنی از طریق تعامل با $ERR\alpha$ و مستقل از $HIF-1\alpha$ افزایش می‌دهد و متعاقب آن VEGF ظرفیت نفوذپذیری و قابلیت اتساع مویرگ‌ها را با تکثیر بیشتر سلول‌های اندوتلیالی بالا می‌برد (۸). با فعال شدن این روند، فعالیت فاکتورهای ضد رگ‌زایی کاهش می‌یابد در نتیجه مقدار آنژیوژنز افزایش یافته و باعث بهبود عملکرد

اندوتلیال می‌شود که این عامل ممکن است از خطرات بیماری‌های سیستم قلبی عروقی بکاهد و باعث افزایش جریان خون و تحویل اکسیژن به بافت موردنظر در هنگام فعالیت ورزشی می‌شود. علیرغم این مکانیسم‌های مولکولی درگیر در این فرایند بخصوص در بافت قلب به طور دقیق شناسایی نشده‌اند و بررسی مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد تحقیقی تا کنون تاثیر تمرین هوازی، ترکیب تمرین با کم اکسیژنی متناوب را به طور توأمان در بافت قلبی بر محتوی $PGC-1\alpha$ ، $ERR\alpha$ ، $VEGFA$ و $AMPK$ بررسی نکرده است. بنابراین تحقیق حاضر سعی دارد تاثیر هر یک از روش‌های تمرین هوازی، کم اکسیژنی متناوب، و ترکیب آن‌ها باهم بر محتوی $PGC-1\alpha$ ، $ERR\alpha$ ، $VEGFA$ و $AMPK$ میوکارد موش‌های صحرایی را بررسی کند. تا در صورت مشاهده نتایج مثبت، فواید ناشی از تمرین در شرایط کم اکسیژنی متناوب را جایگزین تمرین در ارتفاعات برای مربیان و ورزشکاران پیشنهاد کند و همچنین راهکاری نوین درمان با کم اکسیژنی متناوب را به دلیل القا فعالیت $PGC-1\alpha$ ، برای مصدومین رشته‌های ورزشی استقامتی و بیماران ایسکمیک عروق قلبی ارائه کند.

۱-۴- فرضیه‌های پژوهش

- ۱- تمرین هوازی بر افزایش میزان بیان $PGC-1\alpha$ عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار تاثیر معنی‌داری دارد.
- ۲- شرایط کم اکسیژنی بر افزایش میزان بیان $PGC-1\alpha$ عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار تاثیر معنی‌داری دارد.
- ۳- مداخله تمرین هوازی و شرایط کم اکسیژنی بر افزایش میزان بیان $PGC-1\alpha$ عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار تاثیر معنی‌داری دارد.
- ۴- تمرین هوازی بر افزایش میزان بیان $VEGFA$ عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار تاثیر معنی‌داری دارد.
- ۵- شرایط کم اکسیژنی بر افزایش میزان بیان $VEGFA$ عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار م تاثیر معنی‌داری دارد.

- ۶- مداخله تمرین هوازی و شرایط کم اکسیژنی بر افزایش میزان بیان VEGFA عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار تاثیر معنی‌داری دارد.
- ۷- تمرین هوازی بر افزایش میزان بیان $ERR\alpha$ عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار تاثیر معنی‌داری دارد.
- ۸- شرایط کم اکسیژنی بر افزایش میزان بیان $ERR\alpha$ عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار تاثیر معنی‌داری دارد.
- ۹- مداخله تمرین هوازی و شرایط کم اکسیژنی بر افزایش میزان بیان $ERR\alpha$ عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار تاثیر معنی‌داری دارد.
- ۱۰- تمرین هوازی بر افزایش میزان بیان P- AMPK عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار تاثیر معنی‌داری دارد.
- ۱۱- شرایط کم اکسیژنی بر افزایش میزان بیان P- AMPK عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار تاثیر معنی‌داری دارد.
- ۱۲- مداخله تمرین هوازی و شرایط کم اکسیژنی بر افزایش میزان بیان P- AMPK عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار تاثیر معنی‌داری دارد.

۱-۵-۵- اهداف پژوهش

۱-۵-۱- هدف کلی

تعیین تاثیر تمرین هوازی ویژه و شرایط کم اکسیژنی بر میزان بیان $ERR\alpha$ ، $PGC-1\alpha$ ، $VEGFA$ و P- AMPK عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار

۱-۵-۲- اهداف اختصاصی

- ۱- تعیین تاثیر تمرین هوازی ویژه بر میزان بیان $PGC-1\alpha$ عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار
- ۲- تعیین تاثیر شرایط کم اکسیژنی بر میزان بیان $PGC-1\alpha$ عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار

- ۳- تعیین تاثیر مداخله تمرین هوازی ویژه و شرایط کم اکسیژنی بر میزان بیان PGC-1 α عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار
- ۴- تعیین تاثیر تمرین هوازی ویژه بر میزان بیان VEGFA عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار
- ۵- تعیین تاثیر شرایط کم اکسیژنی بر میزان بیان VEGFA عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار
- ۶- تعیین تاثیر مداخله تمرین هوازی و شرایط کم اکسیژنی بر میزان بیان VEGFA عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار
- ۷- تعیین تاثیر تمرین هوازی ویژه بر میزان بیان ERR α عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار
- ۸- تعیین تاثیر شرایط کم اکسیژنی بر میزان بیان ERR α عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار
- ۹- تعیین تاثیر مداخله تمرین هوازی و شرایط کم اکسیژنی بر میزان بیان ERR α عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار
- ۱۰- تعیین تاثیر تمرین هوازی ویژه بر میزان بیان P- AMPK عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار
- ۱۱- تعیین تاثیر شرایط کم اکسیژنی بر میزان بیان P- AMPK عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار
- ۱۲- تعیین تاثیر مداخله تمرین هوازی ویژه و شرایط کم اکسیژنی بر میزان بیان P- AMPK عضله قلبی موش‌های نر نژاد ویستار

۱-۶-۶- متغیرهای تحقیق

۱-۶-۶-۱- متغیرهای مستقل

کم اکسیژنی، تمرین هوازی، ترکیب کم اکسیژنی با تمرین هوازی

۱-۶-۶-۲- متغیرهای وابسته

محتوی پروتئین‌های PGC-1 α ، VEGFA و ERR α و P- AMPK میوکارد

۱-۶-۳- متغیرهای کنترل

وزن و تغذیه

۱-۷-۲- محدودیت های قابل کنترل و غیر قابل کنترل پژوه

۱-۷-۱- محدودیت های قابل کنترل

- نژاد
- جنس
- نوع تمرین
- محدوده وزنی برای شروع تمرین (۲۲۰-۲۴۰ گرم)
- محدوده سنی (۳ ماهگی)

۱-۷-۲- محدودیت های غیر قابل کنترل

محیط حیوان خانه: در مدت اجرای پروتکل تمرینی، دمای محیط ۲۲ درجه بود، ولی این متغیر در دامنه ۲۰-۲۶ نوسان داشت.

۱-۸- تعریف واژه‌ها

- **تمرین هوازی:** فعالیتی که با اجرای آن، عملکرد سیستم‌های تولید انرژی به روش هوازی افزایش یابد و سازگاری‌های ایجاد شده در اثر تمرین هوازی باعث افزایش استقامت قلبی-عروقی و تنفسی شود (۱). در مطالعه حاضر منظور از تمرین هوازی، فعالیت دویدن بر روی نوار گردان موتوردار به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته می‌باشد. در ابتدا، به مدت ۱۰ دقیقه در روز و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه و با شیب پایین موش-های صحرائی تمرین خود را آغاز می‌کنند. به تدریج بر سرعت و مدت تمرین در طول ۲ هفته بعد افزوده می‌شود تا در هفته‌های آخر مدت و شدت تمرین به ترتیب به ۱ ساعت در روز و ۲۶ متر در دقیقه و شیب ۶ درصد برسد.

- **کم اکسیژنی:** کم اکسیژنی یک حالت موقتی است که دسترسی بدن به اکسیژن در یک حالت یا یک شرایط کاهش می‌یابد، که این شرایط بیشتر در محیط مرتفع ایجاد می‌شود (۱۱). در مطالعه حاضر کم اکسیژنی نوروموباریک بصورت متناوب و با شدت

۱۴ درصد و در اتاقک کم اکسیژنی به نمونه‌ها اعمال گردید که با ارتفاع حدود ۳۳۰۰ تا ۳۴۰۰ متری شبیه سازی شد.

- **موش‌های صحرایی:** جوندگانی معمولی با و دمی بزرگ هستند که پس از موش-های سوری متداول‌ترین حیوان آزمایشگاهی است که مورد استفاده قرار می‌گیرد. موش‌ها عمدتاً در مطالعات پزشکی و دامپزشکی مانند سرطان شناسی، دیابت و ارزیابی داروها (۷). که در این مطالعه منظور از موش‌های صحرایی، موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با دامنه وزنی ۲۲۰ تا ۲۴۰ می باشند.

- **آنژیوژنز:** آنژیوژنز به معنی افزایش تراکم مویرگ‌های عضله اسکلتی و قلبی می‌باشد (۵) و در این مطالعه منظور از عوامل آنژیوژنز محتوی پروتئین-ERR α AMPK, PGC-VEGFA، 1 α می‌باشد.

۲- مبانی و پیشینه تحقیق

۲-۱- مقدمه

در فصل اول این پژوهش، به بیان مسئله، ضرورت انجام پژوهش، اهداف و فرضیه‌های پژوهش پرداخته شد. با بررسی‌های صورت گرفته نشان داده شد که مطالعه‌ای تاکنون موضوع تاثیر تمرین هوازی و کم اکسیژنی را بر محتوی پروتئین PGC-1 α , AMPK, ERR α در بافت قلبی موش‌های سالم بررسی نکرده است. لذا، با توجه به موارد اشاره شده و نوپا بودن بحث نقش پروتئین PGC-1 α در آنژیوژنز در حیطه علوم ورزشی، این مطالعه با هدف بررسی اثر تمرین هوازی و کم اکسیژنی بر میزان پروتئین PGC-1 α , AMPK, ERR α در بافت قلبی موش‌های سالم انجام شد.

روشن شدن این فرایندهای تنظیمی به وسیله PGC-1 α , AMPK, ERR α که به وسیله تمرین ورزشی تحت تاثیر قرار می‌گیرند، راهبرد بسیار با ارزشی است که می‌تواند به گسترش روش‌های تمرینی برای سازگاری‌های فیزیولوژیکی و درمانی برای بیماران ایسکمیک منجر شود.

در فصل دوم این مطالعه، ابتدا مبانی نظری عروق، آنژیوژنز و PGC-1 α , AMPK, ERR α ارائه شده و سپس به بررسی مطالعاتی که در مورد تاثیر تمرین ورزشی بر عوامل درگیر در آنژیوژنز در داخل و خارج از کشور انجام شده است، خواهد پرداخت.

۲-۲- مبانی نظری تحقیق

۲-۲-۱- انواع تشکیل عروق

کارکرد بافت‌های متفاوت به شبکه عروقی آن بافت به طور مستقیم وابسته است. بنابراین وقتی بافت جدیدی شکل می‌گیرد، عروق خونی نیز بایستی همراه با آن به وجود

بیايد. به این دلیل یکی از وقایع اولیه در امبریوژنز، واسکولوژنز یا ایجاد عروق خونی می‌باشد که با تفکیک سلول‌های مزودرمی به همانژیوبلاست‌ها (که پیش‌ساز سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های هماتوپوئیتیک است) شروع می‌شود. با تفکیک بیشتر، همانژیوبلاست‌ها به آنژیوبلاست تبدیل و با تجمع آنژیوبلاست‌ها حوضچه خونی اولیه ایجاد می‌گردد. سپس این حوضچه خونی با هم ترکیب شده و اولین شبکه عروقی تشکیل می‌شود.

فرایند واسکولوژنز با ایجاد شبکه عروقی و تغییر شکل آن در حین مویرگ‌زایی ادامه می‌یابد. اگرچه واسکولوژنز اغلب در دوران جنینی تشکیل می‌شود، اما در افراد بزرگسال نیز واسکولوژنز رخ می‌افتد. مکانیسم واسکولوژنز در بزرگسالان به این شکل است که سلول‌های پیش‌ساز عرق اندوتلیالی از مغز استخوان وارد سیستم گردش خون محیطی شده و به مناطقی که عوامل محرک مویرگ‌زایی آزاد می‌کنند، جذب و در ایجاد عروق جدید شرکت می‌کنند (۳۳).

۲-۱-۱-۲-۲- آرتریوژنز^۱

نوع دیگری از تشکیل عروق است که به تغییر شکل شریان‌های هدایتی بزرگ و شریان‌های جانبی که از قبل وجود داشته اشاره دارد. این پدیده مستقل از فرایند ایسکیمی است، اما با التهاب و شیر استرس افزایش یافته که خود نتیجه‌ای از انسداد عروق بزرگ به دلیل بالا رفتن جریان خون است، مرتبط می‌باشد. البته در شرایط ایسکیمی شدید مانند بیماری‌های شریانی آرتریوژنز و مویرگ‌زایی می‌توانند همراه با هم اتفاق بیافتند. در این حالت عروق ضعیفی که در موقع مویرگ‌زایی ایجاد شده‌اند طی پدیده آرتریوژنز تبدیل به عروق بالغ می‌شوند (۳۴).

۲-۱-۲-۲- آنژیوژنز

آنژیوژنز فرایند بیولوژیک جوانه زدن مویرگ‌های جدید از مویرگ‌های موجود در بافت می‌باشد. این پدیده به طور آشکار در دوره جنینی، دوره پس از تولد و حتی در بزرگسالان مشاهده می‌شود که به دو شکل پاتوفیزیولوژیکی و فیزیولوژیکی اتفاق می‌افتد. در شرایط آنژیوژنز فیزیولوژیکی تکثیر سلول‌های اندوتلیالی کنترل شده است و در مواردی مانند

ترمیم زخم، سیکل‌های دوران قاعدگی، تخمک گذاری، لانه‌گزینی جنین اتفاق می‌افتد. درحالی‌که در شرایط آنژیوزنز پاتوفیزیولوژیکی تکثیر سلول‌های اندوتلیالی غیرقابل کنترل می‌باشد، و در بیماری‌هایی مثل تصلب شراین، رشد تومورها و همانژیوم‌ها، رتینوپاتی دیابتی، اسکلرودرما، آرتريت روماتوئید و اندومتريوز دیده می‌شود. در شرایط فیزیولوژیکی، مویرگ‌زایی به وسیله تعادل بین عوامل آنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک تنظیم می‌گردد. وقتی مقادیر فاکتورهای رشد آنژیوژنیک بیشتر از مهارکننده‌های آن باشد تعادل به طرف رشد رگ‌های جدید جابه‌جا می‌شود، ولی برعکس هر چه قدر مقدار مهارکننده‌ها بیشتر شود، این پدیده متوقف می‌شود (۳۳).

۲-۲-۲- مکانیسم‌های مویرگ‌زایی

تشکیل و تکامل عروق، به فعال شدن تعداد زیادی رسپتور و لیگاند بستگی دارد که باید به دقت تنظیم شود. به ویژه در دوران بلوغ که عامل محرک و مهاری مویرگ‌زایی باید در شرایط تعادل قرار گیرد. با توجه به تحقیقاتی که تقریباً از سه دهه قبل شروع شده و در حال حاضر نیز در حال انجام است، تا حد زیادی مراحل آنژیوزنز شناسایی شده است (۳۵). روند مویرگ‌زایی با تخریب قسمتی از دیواره عروق موجود، تحریک سلول‌های اندوتلیال، تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی آغاز می‌شود. مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی به بیرون از جداره عروق موجب تشکیل ساختمان لوله ماندنی در اطراف عروق مادر می‌شود و بعد از کامل شدن، عروق تازه تشکیل شده می‌توانند به مویرگ‌ها، سرخرگ‌ها و وریدهای دیگر اتصال یابند و ارتباط برقرار کنند (۳۶، ۳۷).

به طور کلی برای عروق دو گروه سلول اصلی شامل سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های دیواره‌ای را می‌توان در نظر گرفت (۳۸). جداره مویرگ‌ها نازک بوده و از یک لایه سلولی تشکیل یافته درحالی‌که جداره شریان‌ها و وریدها از چندین لایه سلولی عضله صاف تشکیل یافته است. سلول‌های دیواره‌ای منشا مزانشیمال دارند (۳۷). در افراد بزرگسال شکل‌گیری عروق جدید به شدت کنترل شده است و فقط در شرایط بسیار ویژه مانند ترمیم زخم و یا ایسکیمی فعال می‌شود، زیرا هرگونه تغییر در تشکیل عروق می‌تواند باعث بیماری‌های وخیمی می‌شود. فرایند مویرگ‌زایی برای رشد انواع تومورها نیز بسیار ضروری است زیرا که تومورها نیز مانند سایر سلول‌های بدن برای رشد خود به تغذیه و اکسیژن نیاز دارند. در واقع تومور بدون خون‌رسانی و مویرگ‌زایی بیشتر از ۲ تا ۳ میلی

متر مکعب نمی‌تواند رشد کند، زیرا سلول‌های توموری در شرایط کم اکسیژنی از بین می‌روند. بنابراین تومورها برای رشد سلول‌های جدید به فعال شدن مویرگ‌زایی و خون‌رسانی نیاز دارند. روند فعال شدن مسیر مویرگ‌زایی، تغییر مویرگ‌زایی نامیده شده است. در این وضعیت تعادل بین عوامل مهارکننده و تحریک‌کننده‌ی مویرگ‌زایی در یک ناحیه به هم خورده و موازنه به سود عوامل تحریک‌کننده مویرگ‌زایی خواهد شد. در برخی از شرایط پاتولوژیکی، مویرگ‌زایی نه تنها با افزایش محرک‌های مویرگ‌زایی، بلکه با کاهش مهارکننده‌های مویرگ‌زایی نیز همراه است (۳۷، ۳۹).

۲-۲-۱- مویرگ‌زایی در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی

مویرگ‌زایی را می‌توان به دو دسته فیزیولوژیکی یا طبیعی و پاتولوژیکی یا غیر طبیعی طبقه بندی کرد. فرق بین این دو نوع مویرگ‌زایی در تفاوت عروق ایجاد شده توسط این دو پدیده می‌باشد. مویرگ‌زایی فیزیولوژیکی از دوران جنینی آغاز شده، و تا مرحله پس از تولد هم ادامه می‌یابد تا عروق طبیعی بافت‌های بالغ را تشکیل دهند. عروق خونی طبیعی، براساس یک قاعده‌ی فاصله منظم و به ترتیب به صورت سرخرگ‌ها، سرخرگچه‌ها، مویرگ‌ها، سیاهرگ‌های کوچک و بزرگ سازماندهی می‌شوند. برخلاف سازمان‌دهی عملی و ساختمانی مناسب در شکل‌گیری عروق طبیعی در شرایط فیزیولوژیکی، عروقی که در موقع مویرگ‌زایی پاتولوژیکی مانند زمان تشکیل تومورها، التهاب مزمن و یا انفارکتوس قلبی شکل می‌گیرند، حالت غیر طبیعی دارند. عروق تازه تشکیل یافته توزیع همسانی نداشته، همچنین شاخه‌های نامنظمی داشته، انحراف شریانی و وریدی در آن‌ها زیاد بوده و فاقد الگوی ترتیبی مناسب می‌باشند. این عروق دارای منفذ بوده و نفوذپذیری بالایی به پلاسما و پروتئین‌های آن دارند (۳۶).

Title and Author: **The effects of aerobic training, and hypoxia on signaling pathway angiogenesis induced by PGC1- α in Wistar rats/Soheila Rahimi Fardin**

Supervisors : **Marfat Siahkoughian (Prof) - Poran Karimi (Ph.D)**

Graduation date: **2019/01/22**

Number of pages: **168**

Abstract:

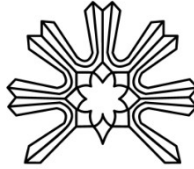
Research Aim: The aim of this study to investigate the effects of 8 weeks aerobic training and intermittent hypoxia on expression angiogenic factors in cardiac male wistar rats.

Research method: In the current experimental study, forty male Wistar rats weighing 220 ± 20 gr were randomly divided into four groups; normal control (NC), hypoxia (H), Hypoxia+ training (HT) and training groups. Hypoxia group exposed to chronic intermittent and isobaric hypoxia (total pressure $P_{iO_2} \approx 760$ mmHg, 14% oxygen for 8 weeks). And exercise group ran on a treadmill (22-26 meter per min) for 8 weeks, 5 session/ week with. (HT) Group, after exercise, during the day were similar to hypoxia in the hypoxic chamber. Then, relative protein density of PGC-1 α , VEGFA, P-AMPK and ERK α were measured with western blot method.

Findings: The result showed that intermittent hypoxia, exercise training+ hypoxia and exercise training significantly increased relative protein density of PGC-1 α , ERK α , VEGFA and P-AMPK compared to control group ($p \leq 0.001$). The expression of PGC-1 α was significant among the intervention groups between the T group and the H group ($P = 0.017$). However, there was no significant difference between the T group and combination of the T + H groups ($P = 0.16$) and the H group compared with the T + H groups ($P = 0.055$). Conversely, significant increases relative protein density of P-AMPK in the T group and the T+ H groups compared with the H group ($p \leq 0.001$) and between the T group with the H group ($P = 0.028$). But was not found significantly different between the H group and the T + H groups ($P = 0.055$). Also, the expression of the (ERK α) protein was not significantly different between the T and the H groups ($P = 0.269$) and the T group with the T + H groups ($P = 0.057$) and the H group with the combination of the T + H groups ($P = 0.069$). However, significant increased relative protein density of VEGFA in the H group compared to the T+ H groups ($p \leq 0.001$).

Conclusion: Although hypoxia was an effective stimulator to induce the expression of PGC-1 α and VEGFA and aerobic exercise was a potent phosphorylation inducer of AMPK, their combination did not have a synergistic effect. However, according to a few studies conducted in this area, more research is needed To determine the exact mechanisms of downstream and upstream pathways.

Keywords: Intermittent Hypoxia, Angiogenesis, Exercise Training, VEGF, P-AKT.



University of Mohaghegh Ardabili
Faculty of Educational Science and Psychology
Department of Physical Education and Sport Science

Dissertation submitted in partial fulfillment for the degree of **Doctor of Philosophy** in the course of **Exercise Physiology (Cardiovascular and Respiratory)**

The Effect of Aerobic Training, and Hypoxia on Signaling Pathway Angiogenesis Induce PGC1- α in Wistar Rats

By:

Soheila Rahimi Fardin

Supervisors:

Marefat Siahkoughian (Prof)

Poran Karimi (Ph.D)

Advisor:

Lolfali Bolboli (Ph.D)

(January 2019)