

## تاثیر ترکیبی تمرین استقامتی و داروی آتورواستاتین بر تظاهر پروتئین VEGF در رت ها پس از انفارکتوس تجربی میوکارد

اکبر اعظمیان جزی<sup>۱\*</sup>، محمدرضا حافظی<sup>۲</sup>، حمید اپرا<sup>۱</sup>، هادی عبدی<sup>۳</sup>

۱) گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

۳) گروه تربیت بدنی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۳

### چکیده

**مقدمه:** استاتین ها و تمرینات ورزشی ممکن است اثرات سودمند مضاعفی بر فرآیند آنژیوژنز متعاقب انفارکتوس میوکارد داشته باشند. بنا بر این، پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر تمرین استقامتی، داروی آتورواستاتین و ترکیب آن ها بر تظاهر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در عضله قلبی موش صحرایی نر پس از انفارکتوس تجربی میوکارد انجام شد.

**مواد و روش ها:** ۴۵ سر موش صحرایی نر (۱۰-۸ هفته ای با میانگین وزن  $230 \pm 10$  گرم) به ۵ گروه شم، کنترل، تمرین استقامتی، آتورواستاتین و تمرین+آتورواستاتین تقسیم شدند. انفارکتوس میوکارد به وسیله تزریق زیرجلدی ایزوپرنالین ( $150 \text{ mg/kg}$ ) در دو روز متوالی القاء شد. مداخله دارویی و تمرین استقامتی ۲ روز پس از انفارکتوس میوکارد شروع و به مدت ۴ هفته تداوم یافت. جهت بررسی تظاهر VEGF از تکنیک رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. داده ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه در سطح  $P < 0.05$  و آزمون تعقیبی شفه تحلیل شدند.

**یافته های پژوهش:** تظاهر VEGF در گروه آتورواستاتین در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کمتر بود ( $P=0.006$ ). تظاهر VEGF در گروه های ترکیبی (تمرین+آتورواستاتین) و تمرین استقامتی در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود (به ترتیب:  $P=0.534$  و  $P=0.055$ )، اما تظاهر آن در گروه ترکیبی (تمرین+آتورواستاتین) در مقایسه با گروه تمرین استقامتی ( $P=0.002$ ) و گروه آتورواستاتین ( $P=0.001$ ) به طور معنی داری بیشتر بود.

**بحث و نتیجه گیری:** به نظر می رسد که ترکیب تمرین استقامتی و داروی آتورواستاتین نسبت به تمرین استقامتی تنها و نیز آتورواستاتین تنها اثر نسبتاً مطلوب تری بر افزایش تظاهر VEGF و در نتیجه فرآیند آنژیوژنز پس از انفارکتوس میوکارد داشته باشد.

**واژه های کلیدی:** تمرین استقامتی، آتورواستاتین، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، انفارکتوس میوکارد، موش صحرایی

\* نویسنده مسئول: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

Email: azamianakbar@yahoo.com

## مقدمه

بیماری های قلبی-عروقی را عامل اصلی حدود یک سوم از کل مرگ و میرها در جهان می دانند(۱). بیماری ایسکمیک قلبی یکی از این بیماری ها است که به طور فزاینده ای در ایران در حال افزایش است و هزینه های گزافی دارد(۲). این بیماری می تواند به سکتة قلبی و آسیب سلولی بیانجامد(۳،۴). موثرترین درمان بالینی برای این بیماران، درمانی است که باعث شود جریان نرمال خون در عضله قلبی برقرار شود(۵). پس از هر رویداد ایسکمیک، آنژیوژنز پر سرعتی شروع می شود(۶) و عوامل متعددی از جمله، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor - VEGF) در آن نقش دارد(۷).

VEGF مهم ترین فاکتور درگیر در فرآیند آنژیوژنز است(۸) که نقش مهمی در آنژیوژنز متعاقب انفارکتوس میوکارد به عهده دارد(۹). تظاهر VEGF در ایسکمی قلبی در بیماران مبتلا به انفارکتوس میوکارد افزایش می یابد(۱۰). هایپوکسی بافتی یکی از عواملی است که بر تحریک تظاهر VEGF تاثیر دارد. با افزایش سوخت و ساز بدن، سطح اکسیژن کاهش یافته و وضعیت هایپوکسی بافتی ایجاد می شود. همه سلول های هسته دار بدن قادرند به هایپوکسی پاسخ دهند. هایپوکسی، در پاتوبیولوژی بیماری های قلبی نقش دارد و هم چنین می تواند سیگنال های مختلفی را جهت تحریک آنژیوژنز ایجاد نماید(۱۱-۱۳).

استرس برشی نیز اثری تحریکی بر VEGF دارد(۱۴). استرس برشی ناشی از تمرینات ورزشی با شدت متوسط یکی از مهم ترین مکانیسم هایی است که عملکرد عروقی را بهبود می بخشد(۱۵). با افزایش شدت تمرینات ورزشی، میزان جریان خون و سرعت آن افزایش می یابد. این دو عامل به افزایش استرس برشی منجر می شود که یکی از مهم ترین محرک های VEGF در حین ورزش می باشد(۱۶). استرس برشی به واسطه فعال سازی کانال های یونی و به ویژه کانال های پتاسیمی تولید نیتریک اکساید(NO) را افزایش می دهد(۱۷). از طرف دیگر، فعال شدن سنتز NO نیز به افزایش ترشح VEGF وابسته است(۱۸).

تایاما و همکاران(۲۰۱۲) نشان دادند که داروهای استاتینی تاثیر به سزایی در کاهش خطر رویدادهای قلبی-عروقی دارند(۱۹). اطلاعات اخیر نشان می دهد که استاتین ها مانع بروز آسیب ایسکمیک قلبی شده(۲۰) و به این ترتیب میزان مرگ و میر افراد دارای سابقه سکتة قلبی را نیز کاهش می دهند(۲۱). هم چنین، بررسی مستقیم قطعه ST در مطالعات الکتروکاردیوگرافی نیز نشان داده است که درمان با استاتین ها میزان پایین افتادگی ST را کمتر می کند و اثر ضد ایسکمی دارد(۲۲،۲۳). از این رو، بلافاصله پس از آسیب ایسکمیک قلبی تجویز می شود تا سطوح VEGF افزایش یابد(۲۴،۲۵). مکانیسم عمل استاتین ها به این صورت است که از طریق تنظیم تون عروق کرونری، فرآیند خون رسانی را بهبود می بخشند(۲۶). آتورواستاتین یکی از استاتین ها می باشد که مصرف آن باعث می شود تا ذخایر NO افزایش یافته و عملکرد اندوتلیال بهبود یابد(۲۷).

افزایش تراکم مویرگی یکی از مهم ترین سازگاری های بدن در پاسخ به تمرینات ورزشی می باشد(۲۸). سطح VEGF پلاسمای گردش خون مردان تمرین نکرده و حتی تمرین کرده استقامتی در نتیجه تمرین استقامتی افزایش می یابد(۲۹). فعالیت ورزشی می تواند تظاهر VEGF و گیرنده های آن را افزایش داده و وسعت ناحیه ایسکمیک را در موش های مبتلا شده به انفارکتوس میوکارد تا حد زیادی کاهش دهد(۹). هم چنین، فعالیت های ورزشی منظم می توانند تعداد سلول های پیش ساز اندوتلیالی(EPC) در گردش خون بیماران مبتلا به بیماری سرخرگ کرونری (coronary artery disease) را افزایش داده و عملکرد عروقی را بهبود بخشند(۳۰).

علی رغم پیشرفت های زیادی که در این حوزه تحقیقاتی صورت گرفته است هنوز هم(۲۰۱۱) در مورد چگونگی آثار حفاظتی تمرینات ورزشی بر قلب ابهاماتی وجود دارد(۳۱). هم چنین، مکانیسم تاثیر تمرینات ورزشی بر وقوع فرآیند آنژیوژنز در بیماری های ایسکمیک قلبی به درستی شناخته نشده است(۹). گزارش شده است که انجام تمرینات ورزشی پس از

که از سه دوز ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استفاده شد و پس از بررسی بافت قلب موش های صحرایی مشخص شد که انفارکتوس میوکارد در دوزهای ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن القاء گردید. بنا بر این، دوز تزریقی ۱۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن انتخاب شد. از مجموع ۴۵ سر موش صحرایی تعداد ۴ سر موش به دلیل عدم سازگاری مناسب با دویدن بر روی تردمیل از تحقیق خارج شدند، سپس از ۴۱ سر موش صحرایی باقی مانده، تعداد ۶ سر به گروه کنترل کاذب (شم) اختصاص یافت که به جای ایزوپرنالین فقط نرمال سالین به صورت زیرجلدی دریافت کردند. ۳۵ سر موش صحرایی باقی مانده مطابق دستورالعمل فوق ایزوپرنالین دریافت کردند. از مجموع ۳۵ سر موش صحرایی که ایزوپرنالین دریافت کرده بودند، تعداد ۷ سر موش پس از تزریق دوم تلف شدند. سپس به منظور بررسی آسیب بافتی برای اطمینان از بروز انفارکتوس میوکارد، ۲ روز پس از القاء انفارکتوس میوکارد به طور تصادفی تعداد ۴ سر موش کشته شدند و بافت قلب آن ها با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-آئوزین و بر اساس میزان ارتشاح سلول های تک هسته ای مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این که میزان آسیب نکروزی و ارتشاح سلول های تک هسته ای در بافت قلب همه ۴ سر موش قربانی شده بسیار شدید(+++) بود، بنا بر این، القاء انفارکتوس میوکارد مورد تایید قرار گرفت. ۲۴ سر موش صحرایی باقی مانده به طور تصادفی به ۴ گروه (۱ کنترل بدون تمرین)(n=۶)، ۲ تمرین ورزشی استقامتی(n=۶)، ۳ تمرین استقامتی+آتورواستاتین(n=۶) و ۴ آتورواستاتین(n=۶)، تقسیم شدند که همراه با گروه شم در مجموع ۵ گروه شدند.

*پروتکل تمرین استقامتی و مداخله دارویی: چهل و هشت ساعت پس از تزریق دوم مداخلات دارویی و تمرینی شروع شد. گروه های تمرینی، برنامه تمرینی اصلی را با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در روز و ۵ جلسه در هفته شروع کردند. سرعت و مدت تمرین به تدریج افزایش یافت به طوری که در پایان هفته دوم، موش ها قادر بودند با سرعت ۱۶ متر بر*

انفارکتوس میوکارد به طور بالقوه ممکن است اثرات مفید استاتین درمانی را مضاعف نماید(۳۲). هم چنین، ترکیب تمرین ورزشی و داروی آتورواستاتین می تواند تاثیر مثبت مضاعفی بر ترکیب و پایداری پلاک های آترواسکلروتیک در موش ها داشته باشد(۳۳).

بنا بر این، با توجه به این که تمرینات ورزشی و استاتین ها ممکن است اثرات مضاعف و هم راستایی بر بیماری های قلبی-عروقی و به ویژه فرآیند آتروژنز در مرحله پس از انفارکتوس داشته باشند، پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر تمرین استقامتی، داروی آتورواستاتین و ترکیب آن ها بر تظاهر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در عضله قلبی موش صحرایی نر پس از انفارکتوس تجربی میوکارد طراحی و اجرا گردید.

### مواد و روش ها

در این تحقیق تعداد ۴۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸-۱۰ هفته ای با وزن ۲۱۰-۲۴۵ گرم استفاده شد. موش های انتخاب شده پس از همگن سازی بر اساس وزن و یک هفته عادت به شرایط جدید، در یک برنامه آشناسازی جهت دویدن بر روی تردمیل مخصوص در ۵ روز متوالی با سرعت ۶ متر بر دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در روز با شیب صفر درجه شرکت کردند(۳۴). برای وادار کردن موش ها به دویدن، از شوک الکتریکی به میزان ۰/۵ میلی آمپر استفاده شد. آب و غذا به طور آزادانه در دسترس موش ها قرار داشت و همه آن ها در شرایط یکسان با چرخه ۱۲ ساعت روشنایی-تاریکی در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۴۵ تا ۵۵ درصد در داخل قفس های پلاستیکی در حیوان خانه دانشگاه ایلام نگهداری شدند.

*روش ایجاد انفارکتوس میوکارد: جهت ایجاد انفارکتوس تجربی میوکارد از تزریق زیر جلدی ایزوپرنالین (Subcutaneous Injection of Isoprenaline) به میزان (۱۵۰ mg/kg) محلول در نرمال سالین در دو روز متوالی با فاصله ۲۴ ساعت استفاده شد. استفاده از این ماده در مدل های حیوانی به ویژه موش صحرایی یکی از روش های رایج برای ایجاد سکتة قلبی است(۲۰،۳۵). انتخاب دوز تزریقی دارو بر اساس مطالعه پایلوت انجام شد. به این صورت*

دقیقه و ۵۰ دقیقه در روز (شامل ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه) بدونند. پروتکل تمرین استقامتی ۴ هفته به طول انجامید. مشخص شده است که این رژیم تمرینی معادل ۵۵ درصد  $VO_{2max}$  است و به خوبی توسط موش های صحرایی انفارکتوسی تحمل می شود (۳۶،۳۷). سایر گروه ها روزانه به مدت ۵ دقیقه بر روی دستگاه قرار داده شدند و برنامه راه رفتن با سرعت ۵ متر بر دقیقه را انجام دادند. گروه های مداخله دارویی نیز ۴۸ ساعت پس از القاء انفارکتوس میوکارد، روزانه میزان ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ( $10 \text{ mg/kg}$ ) آتورواستاتین محلول در نرمال سالین ( $10 \text{ ml/kg}$ ) به صورت خوراکی و با استفاده از گاوآژ (Gavage) دریافت کردند. نشان داده شده است که این دوز مصرفی در موش های صحرایی بسیار موثر است (۳۸). سایر گروه ها، همین میزان نرمال سالین دریافت کردند.

رنگ آمیزی / ایمونوهیستوشیمی: ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین (۲۸ روز بعد از انفارکتوس) موش ها با استفاده از کلروفورم بیهوش شدند و در شرایط بیهوشی عمیق قلب آن ها جدا و بعد از شست و شو و سپس توزین به وسیله ترازوی دیجیتالی Precisa 3100 c ساخت سوئیس در داخل فرمالین ۱۰ درصد به عنوان فیکساتیو قرار داده شد. ۲۴ ساعت بعد قلب ها به صورت طولی برش داده شد و در داخل پارافین مذاب غوطه ور شدند. پس از تهیه بلوک های پارافینه با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطعی به ضخامت ۴ میکرومتر برای رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی تهیه شد. به طور خلاصه مقاطع پارافینه به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه و روی لام های شارژی منتقل شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و پس از آن به مدت ۱ ساعت در فور با دمای ۶۰ درجه انکوبه شدند. در مرحله بعد به منظور پارافین زدایی، لام ها در داخل ۳ ظرف حاوی گزلیل هر کدام به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس به کمک الکل در غلظت نزولی (مطلق، ۹۰ درصد و ۷۰ درصد)، به صورت سری هر کدام به مدت ۵ دقیقه، آب دهی شدند. پس از این مرحله به منظور کاهش فعالیت آنزیم

درون زاء، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۱۰ درصد پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ /Methanol) قرار داده شدند. سپس لام ها در محلول بافر تریس (tris wash buffer) با  $PH 7.4$  شسته شده و جهت بازیابی آنتی ژن ها در اتوکلاو (دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد) بافر سیترات  $PH 6$  به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس برش ها با آنتی بادی اولیه (UK, Biorbyt) به مدت یک شب (overnight) در دمای ۴ درجه انکوبه شدند. آنتی بادی اولیه VEGF با رقت ۱ به ۵۰ روی برش ها اضافه شد. سپس لام ها در بافر PBS شست و شو داده شدند و به وسیله آنتی بادی ثانویه HRP (Horse Radish Peroxidase) با رقت ۱/۱۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس در بافر PBS شست و شو داده شدند و پس از آن با محلول DAB ( $3,3'$ diaminobenzidin سیگما، USA) ۱ درصد در تاریکی به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. مجدداً در بافر PBS شسته شده و سپس جهت رنگ آمیزی زمینه بافت ها (counter stain) در محلول هماتوکسیلین قرار داده شدند. در انتها، لام ها در سری الکل صعودی (۷۰، ۹۰، الکل مطلق) آب گیری شده، در زایلین شفاف شدند و به وسیله چسب انتالن (Entalen) لامل بر روی لام ها مونته شد. به منظور بررسی رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی نمونه ها، هر اسلاید توسط دو پاتولوژیست به طور جداگانه به وسیله میکروسکوپ نوری (Olympus, Japan) در بزرگ نمایی  $\times 40$  مورد بررسی قرار گرفت. هر اسلاید در ۴ فیلد از نظر شدت رنگ پذیری مورد ارزیابی قرار گرفت. بنا بر این، به هر فیلد در هر اسلاید اعداد ۰-۴ (۰ تا ۴) اختصاص یافت به طوری که اگر نتیجه منفی بود عدد صفر، مثبت و کمتر از ۵ درصد رنگ پذیری عدد ۱، بین ۵ تا ۵۰ درصد رنگ پذیری عدد ۲، بیشتر از ۵۰ درصد رنگ پذیری ضعیف عدد ۳ و بیشتر از ۵۰ درصد رنگ پذیری شدید عدد ۴ تعلق می گرفت. معیار رنگ پذیری، رنگ پذیری سیتوپلاسم سلول های اندوکارد بود. سپس جهت اطمینان از دقت و صحت تعیین شدت رنگ پذیری ۲۰ درصد لام ها به طور تصادفی مجدداً مورد بررسی پاتولوژیست قرار گرفتند و نتایج با نتایج قبلی

مقایسه گردید و نتایج نهایی ثبت گردید. نتایج به دست آمده بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شدند.

به منظور بررسی چگونگی توزیع داده ها از آزمون کلموگروف اسمیرنوف استفاده شد. برای مقایسه تفاوت های بین گروه ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. در صورت وجود تفاوت معنی دار از آزمون تعقیبی استفاده شد. در صورتی که همگنی واریانس داده ها برقرار بود از آزمون تعقیبی شفه و چنان چه همگنی برقرار نبود از آزمون تعقیبی دانت تی-۳ استفاده شد. سطح معنی داری اختلاف بین گروه ها،  $(P < 0.05)$  تعیین شد. داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS vol.20 تجزیه و تحلیل شدند.

### یافته های پژوهشی

در جدول شماره ۱ میانگین و انحراف معیار وزن بدن، وزن قلب، نسبت وزن قلب به وزن بدن و میزان تظاهر VEGF ارائه شده است. نتایج نسبت وزن قلب به وزن بدن نشان داد که تزریق زیر جلدی ایزوپرنالین ( $150 \text{ mg/kg}$ ) در دو روز متوالی با فاصله ۲۴ ساعت باعث هیپرتروفی میوسیت های قلب در گروه های انفارکتوسی در مقایسه با گروه شم گردید (جدول شماره ۱). نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که اختلاف آماری معنی داری از نظر نسبت وزن قلب به وزن بدن در بین گروه های مختلف این تحقیق وجود دارد ( $F=3.168, P=0.03$ ). آزمون تعقیبی شفه نشان داد که تنها بین گروه فعالیت استقامتی و گروه کنترل کاذب (شم) تفاوت معنی داری از نظر نسبت وزن قلب به وزن بدن وجود دارد ( $P < 0.05$ ).

جدول شماره ۱. میانگین و انحراف معیار شاخص های وزن بدن، وزن قلب، نسبت وزن قلب به وزن بدن و میزان تظاهر VEGF

متغیرها	گروه ها	تمرین استقامتی	تمرین+آتورواستاتین	آتورواستاتین	کنترل	کنترل کاذب(شم)
وزن بدن (g)	۲۷۸±۳/۷۶	۲۴۹±۱۱/۶	۲۴۰±۵/۴۵	۲۴۶±۴/۹۳	۲۷۵±۹/۶۳	۰/۹۵±۰/۰۹
وزن قلب (g)	۱/۲۸±۰/۱۸	۱/۰۷±۰/۰۹	۰/۹۷±۰/۱۵	۱/۰۶±۰/۰۸	۰/۹۵±۰/۰۹	۰/۹۵±۰/۰۹
نسبت وزن قلب به وزن بدن (g/kg)	۴/۶۳±۰/۶۳	۴/۲۹±۰/۳۰	۴/۰۱±۰/۵۵	۴/۲۸±۰/۳۳	۳/۶۳±۰/۳۹	۳/۶۳±۰/۳۹
VEGF	۱/۷۱±۰/۱۹	۲/۲۱±۰/۱۹	۱/۵۸±۰/۲۰	۲/۰۴±۰/۱۹	۲/۹۶±۰/۱۹	۲/۹۶±۰/۱۹

نتایج حاصل از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی VEGF نشان داد که تفاوت آماری معنی داری از نظر میزان تظاهر پروتئین VEGF در ناحیه انفارکتی بین گروه های مختلف تحقیق وجود دارد ( $P=0.001$ ) (شکل شماره ۱). نتایج مربوط به مقایسه جفتی گروه ها که با استفاده از آزمون شفه انجام شده است به شرح ذیل می باشد.

- بین گروه کنترل و گروه ترکیبی (تمرین+آتورواستاتین) تفاوت معنی داری مشاهده نشد ( $P=0.534$ ).

- بین گروه کنترل و گروه تمرین استقامتی تفاوت

معنی داری مشاهده نشد ( $P=0.055$ ).

- بین گروه کنترل و گروه آتورواستاتین تفاوت

معنی داری مشاهده شد ( $P=0.006$ ).

- بین گروه ترکیبی (تمرین+آتورواستاتین) و گروه

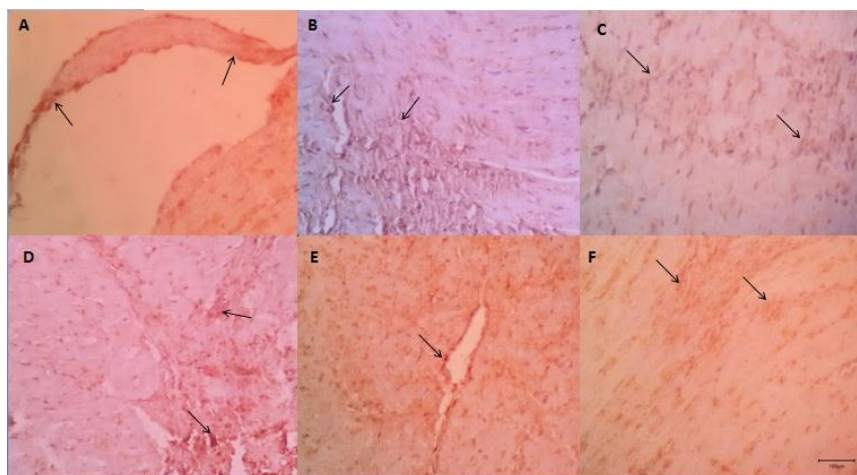
تمرین استقامتی تفاوت معنی داری مشاهده شد ( $P=0.002$ ).

- بین گروه ترکیبی (تمرین+آتورواستاتین) و گروه

آتورواستاتین تفاوت معنی داری مشاهده شد ( $P=0.001$ ).

- بین گروه تمرین استقامتی و گروه آتورواستاتین

تفاوت معنی داری وجود نداشت ( $P=0.739$ ).



شکل شماره ۱. فتومیکروگراف های رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی VEGF در بطن چپ گروه های مختلف تحقیق. (A) اندوکارد، (B) گروه آتورواستاتین، (C) گروه تمرین استقامتی، (D) گروه کنترل، (E) گروه کنترل کاذب (شم)، (F) گروه تمرین + آتورواستاتین، (فلش های سیاه تظاهر مثبت پروتئین VEGF را نشان می دهند، بزرگ نمایی  $\times 40$ ، Bar: 100 $\mu$ m).

### بحث و نتیجه گیری

خلاصه نتایج اصلی تحقیق حاضر این است که تظاهر VEGF در گروه آتورواستاتین در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کمتر بود ( $P=0.006$ ). تظاهر VEGF در گروه های ترکیبی (تمرین + آتورواستاتین) و تمرین استقامتی در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود (به ترتیب:  $P=0.534$  و  $P=0.055$ ), اما تظاهر آن در گروه ترکیبی (تمرین + آتورواستاتین) در مقایسه با گروه تمرین استقامتی ( $P=0.002$ ) و گروه آتورواستاتین ( $P=0.001$ ) به طور معنی داری بیشتر بود.

در تحقیق حاضر، تظاهر VEGF در گروهی که داروی آتورواستاتین مصرف کرده بودند نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کمتر بود. این موضوع با برخی از گزارش های پژوهشی مغایرت دارد. از جمله، چن و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که استفاده از آتورواستاتین پس از سکته مغزی، تظاهر VEGF در موش ها را افزایش می دهد (۳۹). هم چنین، گزارش شده است که استاتین ها دارای تاثیرات وسیعی بر فرآیند التهاب و آنژیوژنز می باشند (۴۰). هم چنین، والتر و همکاران (۲۰۰۴) بیان کردند که استاتین ها باعث رگ زایی و ایجاد پوشش اندوتلیالی می شوند (۴۱). حال این سوال پیش می آید که چرا

آتورواستاتین در تحقیق حاضر چنین تاثیری نداشته است؟ یکی از دلایل احتمالی این مغایرت این است که تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول های اندوتلیال در غلظت های پایین استاتین ها افزایش می یابد، اما به طور مشخصی در غلظت های بالا کاهش می یابد و این اثرات ضد رگ زایی استاتین ها در غلظت های بالا با کاهش ترشح VEGF ارتباط دارد (۴۲). در تحقیق حاضر، رت ها روزانه ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۱۰ mg/kg) آتورواستاتین محلول در نرمال سالین (۱۰ ml/kg) دریافت کردند و نشان داده شده است که این دوز مصرفی در موش های صحرائی بسیار موثر است (۳۸). بنا بر این، در پژوهش حاضر احتمال دارد که این مقدار دوز مصرف آتورواستاتین برای رت ها زیاد بوده باشد و اثرات ضد رگ زایی ایجاد کرده باشد. هم چنین، همان گونه که قبلاً ذکر شد این عدم هم خوانی ممکن است به روش ایجاد انفارکتوس میوکارد نیز بستگی داشته باشد. در تحقیق حاضر از تزریق زیر جلدی ایزوپرنالین برای القاء انفارکتوس میوکارد استفاده شده است که به صورت ایسکمی/ریپرفیوژن باعث ایجاد آسیب می شود. نشان داده شده است که برقراری مجدد جریان خون (Reperfusion) پس از ایسکمی موقت باعث افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species)،

افزایش نفوذپذیری میتوکندری ها و مرگ سلول های قلبی می شود (۴۳). بنا بر این، اگر بالا بودن احتمالی میزان دوز مصرفی داروی آتورواستاتین را در تحقیق حاضر بپذیریم، این احتمال وجود دارد که مصرف دوز بالای آتورواستاتین باعث افزایش تولید رادیکال های آزاد و در نهایت مرگ سلول های قلبی بیشتری شده باشد. که این امر ممکن است در کاهش تظاهر VEGF موثر بوده باشد. در مورد مکانیسم تاثیر دوگانه استاتین ها بر فرآیند آنژیوژنز گزارش کرده اند که دوزهای پایین استاتین از طریق افزایش NO منجر به تحریک آنژیوژنز شده، در حالی که این ترکیب ها در دوزهای بالا، پرنیلاسیون (Prenylation) پروتئین ها را کاهش می دهد و باعث مهار رشد سلولی می شود (۴۴). در تحقیق حاضر، تمرین استقامتی تاثیر معنی داری بر تظاهر VEGF نداشت که این نتیجه با تحقیق وو و همکاران (۲۰۰۹) مغایرت دارد. آن ها نشان دادند که فعالیت ورزشی در موش های مبتلا شده به انفارکتوس میوکارد می تواند تظاهر VEGF و گیرنده های آن را افزایش دهد (۹). در پیشینه تحقیق آمده است که استرس برشی ناشی از تمرین ورزشی یکی از مهم ترین مکانیسم هایی است که عملکرد عروقی را بهبود می بخشد (۱۵). پس چرا تمرین استقامتی تحقیق حاضر تاثیر مطلوبی بر تظاهر VEGF نداشته است. این عدم تاثیر مطلوب ممکن است به تفاوت در روش ایجاد انفارکتوس میوکارد ربط داشته باشد. در تحقیق مذکور از روش انسداد شریان کرونری قدامی-نزولی چپ (LAD) استفاده شده بود، در حالی که در پژوهش حاضر از روش تزریق زیر جلدی ایزوپرنالین استفاده شده بود. با توجه به این که عواملی مانند شدت، مدت، نوع فعالیت ورزشی و هم چنین روش های تجربی مختلف ممکن است در بروز اثرات متفاوت فعالیت ورزشی پس از انفارکتوس میوکارد نقش داشته باشد (۴۵)، ممکن است شدت و مدت تمرین استقامتی پژوهش حاضر محرک کافی برای افزایش تظاهر نشانگر VEGF در نمونه ها را ایجاد نکرده باشد. در تحقیق حاضر، «تمرین استقامتی+آتورواستاتین» به طور غیر معنی داری باعث افزایش تظاهر VEGF نسبت به گروه کنترل گردید، که با تحقیق گوازی و

همکاران (۲۰۰۷) هم خوانی دارد. آن ها به این نتیجه رسیدند که درمان با استاتین ها می تواند کینتیک اکسیژن مصرفی در ورزش پس از MI را بهبود بخشد و به طور بالقوه اثرات مفید استاتین درمانی را مضاعف نماید (۳۲). آن ها این بهبودی را به بهبود عملکرد اندوتلیالی نسبت دادند. در این مورد ذکر این نکته ضروری است که پس از وقوع MI، عملکرد هوازی و کینتیک اکسیژن مصرفی کاهش می یابد (۳۲). استاتین ها ممکن است توزیع خون به عضلات در حال فعالیت را از طریق تاثیر بر اندوتلیال سیستمیک بهبود بخشیده (۴۶) و به این ترتیب اثر مثبت مضاعفی بر تظاهر VEGF داشته باشند. از نظر تئوریک، اثرات پلیوتروپیک و کاهش دهنده گی لیپید حاصل از استاتین درمانی ممکن است پاتوفیزیولوژی ورزش بیماران پس از انفارکتوس میوکارد را به واسطه بهبود عملکرد قلبی و یا عروقی تحت تاثیر قرار دهد (۳۲).

در مورد سابقه تعامل و تاثیر مضاعف تمرین ورزشی و داروی آتورواستاتین در بیماری های قلبی می توان به تحقیق موستارداس و همکاران (۲۰۱۴) نیز اشاره کرد. آن ها گزارش کردند که ترکیب تمرین ورزشی و داروی آتورواستاتین می تواند تاثیر مثبت مضاعفی بر ترکیب و پایداری پلاک های آترواسکلروتیک در موش ها داشته باشد (۳۳). بنا بر این، با توجه به این که در گزارشات علمی متعددی بر تعامل تمرین استقامتی و استاتین ها تاکید شده است، پس علت عدم تغییر معنی دار تظاهر VEGF در گروه «تمرین استقامتی+آتورواستاتین» چیست؟ به نظر می رسد عوامل متعددی در این زمینه نقش داشته باشند. از جمله، تاثیر استاتین ها به دوز مصرف آن ها وابسته است که با توجه به معکوس بودن نتیجه دوزهای بالای این داروها (۴۲)، ممکن است دوز مصرف آتورواستاتین در تحقیق حاضر زیاد بوده باشد. هم چنین، روش های تجربی مختلف (روش ایجاد انفارکتوس میوکارد) نیز ممکن است در بروز اثرات متفاوت فعالیت ورزشی پس از انفارکتوس میوکارد (۴۵) و شاید چگونگی تاثیر استاتین ها نقش داشته باشد. یکی دیگر از نتایج این تحقیق این بود که «تمرین

بهبود می بخشد(۱۵)، به نظر می رسد که مطلوب بودن تاثیر «تمرین استقامتی+آتورواستاتین» بر تظاهر VEGF به نقش مثبت تمرین استقامتی بر تظاهر VEGF ربط داشته باشد.

به طور خلاصه، به نظر می رسد که استفاده از ترکیب تمرین و داروی آتورواستاتین(۱۰ mg/kg)، نسبت به تمرین تنها و یا داروی تنها، تاثیر مطلوب تری بر فرآیند آنژیوژنز و تظاهر VEGF پس از انفارکتوس میوکارد دارد. با این حال، پیشنهاد می شود که جهت بررسی دقیق تر اثرات تمرین و داروی آتورواستاتین، در تحقیقات آینده از شدت های مختلف تمرین و هم چنین دوزهای مختلف داروی آتورواستاتین استفاده شود.

### سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی دانشگاه شهرکرد می باشد. از همکاری عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش یاری نموده اند، سپاسگزاریم.

### References

1. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF task force for the redefinition of myocardial infarction. universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;28:2525-38.
2. Talebizade N, Hagdust AA, Mirzazade A. [An epidemiological model of cardiovascular disease in Iran]. *Payesh J* 2009;8:163-70. (Persian)
3. Takahashi M. Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction. *Circ J* 2010;74:418-23.
4. Carr AN, Howard BW, Yang HT, Ebywilkins E, Loos P, Varbanov A, et al. Efficacy of systemic administration of SDF-1 in a model of vascular insufficiency support for an endothelium dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 2006 ;69:925-35.
5. Oneal WT, Griffin WF, Kent SD, Virag JAI. Cellular pathways of death and survival in acute myocardial infarction. *J Clin Exp Cardiol* 2012;6:3.
6. Cencioni C, Capogrossi MC, Napolitano M. The SDF-1/CXCR4 axis in stem cell

استقامتی+آتورواستاتین» نسبت به هر یک از «تمرین استقامتی» و آتورواستاتین تاثیر مطلوب تری بر تظاهر VEGF داشته است. اگر چه به نظر می رسد که با توجه به عدم تاثیر مثبت هر سه مورد «ترکیب تمرین استقامتی+آتورواستاتین»، «تمرین استقامتی» و آتورواستاتین بر تظاهر VEGF دیگر نیازی به بحث در این مورد نیست. اما این نتیجه به نوعی نشان می دهد که انجام تمرین استقامتی می تواند تا حدودی و به طور نسبی اثر مخرب این دوز(۱۰ mg/kg) از داروی آتورواستاتین بر تظاهر VEGF را خنثی نماید. این نتیجه، گزارش موسستارداس و همکاران(۲۰۱۴) مبنی بر این که ترکیب تمرین ورزشی و داروی آتورواستاتین می تواند تاثیر مثبت مضاعفی داشته باشد(۳۳) را تایید می نماید. با توجه به این که در تحقیق حاضر، صرف مصرف داروی آتورواستاتین اثر مطلوبی بر تظاهر VEGF نداشته است و با عنایت به این که استرس برشی ناشی از تمرین ورزشی با شدت متوسط یکی از مهم ترین مکانیسم هایی است که عملکرد عروقی را

- preconditioning. *Cardiovasc Res* 2012;94:400-7.
7. Satchell SC, Mathieson PW. Angiotensin microvascular modulators with potential roles in glomerular pathophysiology. *J Nephrol* 2003;16:168-78.
  8. Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, et al. Exercise promotes angiogenesis and improves beta-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovasc res* 2008;78:385-94.
  9. Wu G, Rana JS, Wykrzykowska J, Du Z, Ke Q, Kang P, et al. Exercise induced expression of VEGF and salvation of myocardium in the early stage of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;296:389-95.
  10. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 2000;342:626-33.



11. Lundby C, Calbet JA, Robach P. The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:3615-23.
12. Martinez A. A new family of angiogenic factors. *Cancer Lett* 2006;236:157-63.
13. Zadhoush F, Panjehpour M. [Physiological role of adenosine and its receptors in tissue hypoxia-induced angiogenesis]. *Physio and Pharmacol* 2012;16:209-21. (Persian)
14. Shen M, Gao J, Li J, Su J. Effect of ischaemic exercise training of a normal limb on angiogenesis of a pathological ischaemic limb in rabbits. *Clin Sci* 2009;117:201-8.
15. Rodriguez I, Gonzalez M. Physiological mechanisms of vascular response induced by shear stress and effect of exercise in systemic and placental circulation. *Front Pharmacol* 2014;5:209.
16. Taheri H, Nourshahi M, Ranjbar K. [Response of vascular endothelial growth factor to exhaustive Exercise and its relationship with VO<sub>2</sub>max]. *J Sport Biosci* 2010;7:59-75. (Persian)
17. Lee HJ, Koh GY. Shear stress activates Tie2 receptor tyrosine kinase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:399-404.
18. Reihill JA, Ewart MA, Hardie DG, Salt IP. AMP-activated protein kinase mediates VEGF-stimulated endothelial no production. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:1084-8.
19. Toyama K, Sugiyama S, Oka H, Iwasaki Y, Sumida H, Tanaka T, et al. Combination treatment of rosuvastatin or atorvastatin, with regular exercise improves arterial wall stiffness in patients with coronary artery disease. *PLoS One* 2012;7:41369.
20. Zaafan MA, Zaki HF, Elbrairy AI, Kenawy SA. Protective effects of atorvastatin and quercetin on isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *Pharm Cair UniJ* 2013;51:35-41.
21. Andrews TC, Raby K, Barry J, Naimi CL, Allred E, Ganz P, et al. Effect of cholesterol reduction on myocardial ischemia in patients with coronary disease. *Circulation* 1997;95:324-8.
22. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 1995;332:488-93.
23. Vanboven AJ, Jukema JW, Zwinderman AH, Crijns HJ, Lie KI, Bruschke AV. Reduction of transient myocardial ischemia with pravastatin in addition to the conventional treatment in patients with angina pectoris. *Circulation* 1996;94:1503-5.
24. Golomb BA, Evans MA. Statin adverse effects a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *Am J Cardiovasc Drugs* 2008;8:373-418.
25. Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T, Faergeman O, Faergeman G, et al. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease the Scandinavian Simvastatin survival study 1994. *Atheroscler Suppl* 2004;5:81-7.
26. Fogarty JA, Mullerdelp JM, Delp MD, Mattox ML, Laughlin MH, Parker JL. Exercise training enhances vasodilation responses to vascular endothelial growth factor in porcine coronary arterioles exposed to chronic coronary occlusion. *Circulation* 2004;109:664-70.
27. Guimaraes DA, Rizzi E, Ceron CS, Pinheiro LC, Gerlach RF, Tanussantos JE. Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension. *Redox Biol* 2013;1:578-85.
28. Bloor CM. Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis* 2005;8:263-71.
29. Kraus RM, Stallings HW, Yeager RC, Gavin TP. Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance trained men. *J Appl Physiol* 2004;96:1445-50.
30. Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, et al. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005;181:305-10.
31. Calvert JW. Cardioprotective effects of nitrite during exercise. *Cardiovasc Res* 2011;89:499-506.

32. Guazzi M, Tumminello G, Reina G, Vicenzi M, Guazzi MD. Atorvastatin therapy improves exercise oxygen uptake kinetics in post-myocardial infarction patients. *Eur J Clin Invest* 2007;37:454-62.
33. Moustardas P, Kadoglou NP, Katsimpoulas M, Kapelouzou A, Kostomitsopoulos N, Karayannacos PE, et al. The complementary effects of atorvastatin and exercise treatment on the composition and stability of the atherosclerotic plaques in ApoE knockout mice. *PLoS One* 2014;9: 108240.
34. Galvao TF, Matos KC, Brum PC, Negrao CE, Luz PLD, Chagas ACP. Cardioprotection conferred by exercise training is blunted by blockade of the opioid system. *Clinics* 2011;66:151-7.
35. Shukla SK, Sharma SB.  $\beta$ -adrenoreceptor agonist isoproterenol alters oxidative status, inflammatory signaling, injury markers and apoptotic cell death in myocardium of Rats. *Indian J Clin Biochem* 2015;30:27-34.
36. Xu X, Zhao W, Lao S, Wilson BS, Erikson JM, Zhang JQ. Effects of exercise and L-arginine on ventricular remodeling and oxidative stress. *Med Sci Sports Exe* 2010;42:346-54.
37. Xu X, Wan W, Ji L, Lao S, Powers AS, Zhao W, et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post infarct ventricular remodelling in Rats. *Cardiovasc Res* 2008;78:523-32.
38. Stumpf C, Petzi S, Seybold K, Wasmeier G, Arnold M, Raaz D, et al. Atorvastatin enhances interleukin-10 levels and improves cardiac function in rats after acute myocardial infarction. *Clin Sci* 2009;116:45-52.
39. Chen J, Zhang C, Jiang H, Li Y, Zhang L, Robin A, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:281-90.
40. Ruizvelasco N, Dominguez A, Vega MA. Statins upregulate CD36 expression in human monocytes, an effect strengthened when combined with PPAR-gamma ligands Putative contribution of Rho GTPases in statin-induced CD36 expression. *Biochem Pharmacol* 2004;67:303-13.
41. Walter DH, Zeiher AM, Dimmeler S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. *Coron Artery Dis* 2004;15:235-42.
42. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002;105:739-45.
43. Chiong M, Wang Z, Pedrozo Z, Cao D, Troncoso R, Ibacache M, et al. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis* 2011;2: 244.
44. Laufs U. Beyond lipid-lowering effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;58:719-31.
45. Wan W, Powers AS, Li J, Ji L, Erikson JM, Zhang JQ. Effect of post-myocardial infarction exercise training on the renin-angiotensin-aldosterone system and cardiac function. *Am J Med Sci* 2007;334:265-73.
46. Jarvisalo MJ, Toikka JO, Vasankari T, Mikkola J, Viikari JS, Hartiala JJ, et al. HMG CoA reductase inhibitors are related to improved systemic endothelial function in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1999;147:237-42.

## The Effect of Endurance Exercise Training and Atorvastatin on VEGF in Rat Following Experimental Myocardial Infarction

AzamianJazi A<sup>1\*</sup>, Haffezi M<sup>2</sup>, Opera H<sup>1</sup>, Abdi H<sup>3</sup>

(Received: September 7, 2015)

Accepted: October 25, 2015)

### Abstract

**Introduction:** Statins and exercise training may have synergic beneficial effects on angiogenesis process following myocardial infarction. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of endurance exercise training (EET), atorvastatin and their combination on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the cardiac muscle of male rat following experimental myocardial infarction.

**Materials & methods:** 45 rats (8-10 weeks old, 230 ±10 g body weight) were randomly divided to five groups: Sham, control, EET, atorvastatin, and EET + atorvastatin. Myocardial infarction was induced by subcutaneous injection of isoprenaline (150 mg/kg) in two consecutive days. Drug and training interventions were initiated 2 days after infarction and continued for 4 weeks. In order to assess the expression of VEGF, immunohistochemical staining was used. Data were analyzed by using one-way

analyses of variance (ANOVA) and scheffe test at P<0.05 level.

**Findings:** VEGF expression in the atorvastatin group was significantly less than the control group (P=0.006). Also, VEGF expression in the Combined (EET + atorvastatin) and EET groups was not significant (P=0.534 and P=0.055 respectively), but its expression was significantly higher in the combined group (EET + atorvastatin) compared to the EET group (P=0.002) and atorvastatin group (P=0.001).

**Discussion & conclusion:** It seems that combination of EET and atorvastatin compared to EET and or atorvastatin alone has a favorable effect on VEGF expression and as a result, on angiogenesis process following myocardial infarction.

**Keywords:** Endurance exercise training, Atorvastatin, VEGF, Myocardial infarction, Rat

1. Dept of Exercise Physiology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2. Dept of Pathobiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3. Dept of Physical Education, Payame Noor University, Tehran, Iran

\*Corresponding author Email: azamianakbar@yahoo.com