مقـــاله تحقیقی

بررسی اثر یک دوره بازتوانی قلبی با تمرین ترکیبی برنسبت بیان ژن VEGF به اندوستاتین در بیماران قلبی با سابقه عمل جراحی بای پس کرونری

سید عماد علوی نیا[1]، امیر رشید لمیر[2*]، رامبد خواجه ای[3]، آمنه برجسته یزدی[3]

[1] پزشک و دانشجوی دکترای تخصصی فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، ایران.

[2] دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه فردوسی مشهد ، مشهد، ایران.

[3] استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور، ایران.

* نشانی نویسنده مسئول:

دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه فردوسی‌مشهد ،مشهد، ایران

نشانی الکترونیک:

rashidlamir@um.ac.ir

چکیده

زمینه : بیماری‌های عروق کرونر یکی از علل شایع مرگ و میر در جهان به شمار می‌روند. با افزایش نرخ ابتلا به این بیماری‌ها، مداخلات جراحی و غیر جراحی و به دنبال آن برنامه‌های بازتوانی و توان‌بخشی قلبی-عروقی اهمیت بیشتری یافته اند. فرآیند رگزایی (آنژیوژنز) و بهبود جریان خون به عنوان یکی از اهداف درمانی در این بیماران مطرح است که تحریک این فرآیند و بهبود جریان خون در بافت مجاور منطقه ایسکمیک باعث بهبود شرایط بیمار می‌شود. در میان عوامل متعدد متابولیکی اثرگذار بر این فرآیند، افزایش عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) به‌عنوان مهم‌ترین محرک و کاهش اندوستاتین به‌عنوان مهم‌ترین عامل مهارکننده این فرآیند به شمار می‌رود. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر یک دوره بازتوانی قلبی با تمرین ترکیبی برنسبت بیان ژن VEGF به اندوستاتین بیماران قلبی پس از عمل بای پس شریان کرونر (CABG) بود.

روش کار: تعداد ۳۰ نفر مرد میانسال که تحت CABG قرار گرفته بودند، به‌صورت نمونه هدفمند و بر اساس معیارهای ورود به پژوهش انتخاب شدند. شرکت‌کننده‌ها به‌صورت تصادفی به دو گروه ۱۵ نفری کنترل و تمرین ترکیبی تقسیم شدند. برنامه تمرین ترکیبی برای مدت هشت هفته با تواتر سه جلسه و زیر نظر متخصصین بازتوانی قلبی انجام شد. اندازه‌گیری سطح بیان ژن VEGF و اندوستاتین با استفاده از روش Real time-PCR صورت گرفت. از آزمون t وابسته و مستقل برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها: افزایش معنی‌داری به دنبال یک دوره تمرین ترکیبی در بیان ژن VEGF بیماران CABG مشاهده گردید (P=۰/۰۰۱). اما این تغییرات در مورد بیان ژن اندوستاتین (P=۰/۳۸) و نسبت VEGF به اندوستاتین معنادار نبود.

نتیجه‌گیری: بررسی نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که یک دوره تمرین ترکیبی بازتوانی قلب با پروتکل مورد استفاده در پژوهش حاضر، توانست بر شاخص بیان ژن VEGF تغییر معناداری ایجاد کند. اما تمرین ترکیبی نتوانست بر بیان ژن اندوستاتین تأثیرگذار باشد، همچنین تغییرات نسبت بیان ژن VEGF/ اندوستاتین در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. بنابراین، می‌توان بیان کرد که افزایش بیان ژن VEGF از نتایج سازگاری با فعالیت ورزش ترکیبی مورد استفاده در این پژوهش بوده و به احتمال زیاد فعالیت بدنی یک عامل مهم و اثرگذار در فرآیند آنژیوژنز محسوب می‌گردد و می‌تواند نقش مهمی در پیشگیری از مشکلات قلبی داشته باشد.

واژگان کلیدی: تمرین ترکیبی، عمل جراحی بای پس کرونری، اندوستاتین، VEGF، بیان ژن

مقدمه

بیماری‌های ایسکمیک قلبی (IHDs)[1]، گروهی از سندرم‌های مرتبط با هم هستند که به دلیل کاهش خون‌رسانی به میوکارد ایجاد می‌شوند. بروز این بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین عوارض جهان امروزی می‌باشد که درصد زیادی از مرگ و میر ناگهانی را در اغلب کشورها به خود اختصاص داده است. از آنجایی که شایع‌ترین علت ایسکمی میوکارد، بیماری آترواسکلروز[2] (انسداد) شریان کرونر[3] است، این بیماری را معمولاً بیماری عروق کرونر[4] می‌نامند (۱). بیماری عروق کرونر نتیجه رسوب تدریجی کلسترول و تجمع سلول‌های التهابی، سلول‌های عضلانی صاف و بافت همبند در دیواره رگ‌ها بوده که به مرور زمان باعث ایجاد پلاک و تنگی عروق کرونر شده و نتیجه آن تضعیف میوکارد و بروز نارسایی قلبی است (۲).

با افزایش بیماری‌های قلبی–عروقی؛ مداخلات جراحی و غیر جراحی و به دنبال آن برنامه‌های بازتوانی و توان‌بخشی قلبی–عروقی اهمیت بیشتری یافته‌اند. از جمله این مداخلات، عمل جراحی بای‌پس کرونری (CABG)[5] و آنژیوپلاستی است که اغلب بیماران پس از انجام آن‌ها از کاهش ظرفیت عملکردی در انجام فعالیت‌های روزمره رنج می‌برند و این امر می‌تواند در اثر بی‌تحرکی بعد از عمل باشد. تحقیقات مختلف از دهه ۱۹۷۰ به بعد نشان داده‌اند که شروع زودهنگام فعالیت بدنی بعد از عمل جراحی قلب، سبب ارتقاء روند بهبود وضعیت جسمانی و روانی بیمار و کاهش ناتوانی و مرگ‌ومیر ناشی از آن می‌گردد (۳). از طرفی کم‌تحرکی و عدم انجام فعالیت‌های فیزیکی نیز خود زمینه‌ساز ابتلا به بیماری عروق کرونری است (۴). تمرین بدنی به‌عنوان رکن اصلی برنامه بازتوانی قلبی می‌تواند موجب کاهش گسترش آترواسکلروزیس شریان‌های کرونری شود (۵). محققین توصیه کرده‌اند که بهتر است برنامه‌های توانبخشی قلبی برای بیماران قلب و عروق در اولین زمان ممکن در بیمارستان آغاز شده و تا بازگشت کامل بیمار به وضعیت عادی به صورت پیوسته ادامه یابد (۶). در بیماران مبتلا به بیماری پیشرفته عروق کرونری، تمرینات بدنی موجب بروز وضعیتی شبیه به شرایط ایسکمی قلبی شده و این ایسکمی گذرای قلبی، موجب افزایش تحمل میوکارد به استرس طولانی‌تر ایسکمی و کاهش آسیب میوکاردی و کاهش بالقوه در آریتمی‌های بطنی کشنده می‌گردد (۷). همچنین تمرینات بدنی دارای تأثیرات مطلوب هموستاتیک نیز می‌باشند که می‌تواند خطر ایجاد لخته در عروق کرونری را کاهش دهد (۸).

یکی از مهمترین تغییراتی که هنگام تمرینات ورزشی در ساختار عروقی عضله اسکلتی رخ می‌دهد، رگزایی یا آنژیوژنز[6] است. در بیماری‌های ایسکمیک قلبی، تحریک فرآیند رگزایی و بهبود جریان خون در بافت مجاور منطقه ایسکمیک باعث بهبود شرایط بیمار شده و می‌تواند به‌عنوان یکی از اهداف درمانی در این بیماران مطرح باشد (۹). در میان ده‌ها عامل متابولیکی اثرگذار بر این فرآیند، افزایش عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)[7] به‌عنوان مهم‌ترین محرک و کاهش اندوستاتین[8] به‌عنوان مهم‌ترین عامل مهارکننده توسعه عروقی ناشی از فعالیت شناخته‌شده‌اند. (۱۰). VEGF، گلیکوپروتئینی است که از سلول‌های اندوتلیال ترشح شده و از طریق اتصال به گیرنده‌های تیروزین کینازی نوع یک (VEGF-R1)[9] و نوع دو (VEGF-R2)[10] پیام‌دهی می‌کند. عوامل مختلفی بر میزان تولید VEGF تأثیرگذارند که شدت و مدت فعالیت ورزشی، انقباض و کشش عضله از مهم‌ترین آن‌ها هستند (۱۱).

اندوستاتین یک پپتید ۲۰ کیلو دالتونی است که منشا آن کلاژن ۱۸ است و با کاهش تکثیر و افزایش آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال و فعال‌سازی سایر عوامل آنژیواستاتیک سبب کاهش فرآیندهای اساسی در توسعه عروق می‌گردد. کاهش اندوستاتین با افزایش VEGF منجر به تغییر تعادل بین عوامل آنژیوژنیک و آنژیواستاتیک شده و نسبت عروق به تار عضلانی را افزایش می‌دهد(۱۲).

تمرین ترکیبی یکی از شیوه‌های تمرینی شناخته‌شده در سال‌های اخیر است. بهبود توسعه استقامت قلبی–تنفسی و قدرت عضلانی از ویژگی‌های این روش تمرینی می‌باشد. در سال‌های اخیر توجه محققین به سازگاری‌های ناشی از تمرین ترکیبی در بیماران بالینی افزایش‌یافته است. در رابطه با بیماری‌های قلبی–عروقی نیز از اثر مثبت تمرین ترکیبی حمایت شده است (۱۳). شناخت مکانیسم‌های بالقوه تمرین ترکیبی سبب بهبود ارتقاء سطح کیفی جامعه بیماران قلبی–عروقی شده و باعث می‌شود برنامه‌های راهبردی به سمت جامعه سالم تغییر جهت دهند. اگرچه پژوهش‌های متعددی در خصوص اثرات برنامه‌های ورزشی ویژه بازتوانی صورت گرفته است، با این‌حال اتفاق‌نظر قابل‌توجهی درباره شدت، مدت و حتی نوع برنامه‌های بازتوانی وجود نداشته و محققین جهت دست یافتن به مزایای بیشتر و بهتر ورزش، پروتکل‌های مختلف ورزشی را با جزئیات بیشتری مورد مطالعه قرار می‌دهند (۱۴).

نظر به اینکه تاکنون توافقی قطعی درمورد تأثیر تمرین بر بیان ژن VEGF و اندوستاتین چه در افراد سالم و چه در بیماران وجود ندارد (۱۵, ۱۴)، و با توجه به این‌که براساس اطلاعات ما، تاکنون پژوهشی که بتواند ارتباط فعالیت بدنی بیماران قلبی را با سطح بیان ژن VEGF و اندوستاتین و نسبت این دو مورد سنجش قرار دهد انجام‌نشده است؛ به نظر می‌رسد مطالعه پیرامون این‌که تمرینات ترکیبی تا چه حد می‌تواند بر میزان سطح بیان ژن VEGF و اندوستاتین و نسبت این دو در بیماران قلبی اثرگذار باشد ضروری است. لذا هدف از انجام این

۱. Ischemic heart diseases
۲. Atherosclerosis
۳. Coronary artery
۴. Coronary Artery Disease
۵. Coronary artery bypass surgery
۶. Angiogenesis
۷. Vascular endothelial growth factor
۸. Endostatin
۹. Vascular endothelium growth factor receptor1 (VEGF-R1)
۱۰. Vascular endothelium growth factor receptor2 (VEGF-R2)

پژوهش بررسی اثر یک دوره بازتوانی قلبی مبتنی بر تمرین ترکیبی بر بهتر شدن عملکرد رگ‌زایی دربیماران قلبی با سابقه عمل جراحی بای پس کرونری، از طریق نسبت بیان ژن VEGFبه اندوستاتین بود.

روش کار

طرح تحقیق و افراد

مطالعه حاضر از نوع نیمه تجربی است که به صورت طرح پیش آزمون و پس آزمون انجام گردید. جامعه آماری این پژوهش را مردانی که پس از ابتلا به بیماری انسداد عروق قلب در بیمارستان تخصصی قلب و عروق جوادالائمه (ع) مشهد تحت عمل جراحی بای‌پس کرونری قرارگرفته بودند، تشکیل می‌دادند. از بین این بیماران تعداد ۳۰ نفر پس از ارزیابی بالینی توسط پزشک متخصص و بر اساس معیارهای ورود به تحقیق و پر کردن فرم رضایت‌نامه وارد پژوهش شدند. نمونه‌ها به طور تصادفی در دو گروه مساوی قرار گرفتند به نحوی که گروه کنترل شامل ۱۵ نفر بیمار بدون تمرین و گروه تمرین شامل ۱۵ فرد بیمار که تمرین ترکیبی (هوازی و مقاومتی) انجام می‌دادند، بود. معیارهای ورود به پژوهش حاضر عبارت بودند از: محدوده سنی ۴۰ الی ۶۰ سال، تمایل به شرکت در تحقیق، توانایی شرکت در تمرینات ورزشی مورد نظر، سلامت شناختی، بینایی و شنوایی، عدم ابتلا به بیماری‌های حاد و پیشرفته که مانع انجام تمرینات می‌شوند، عدم استفاده از داروهای آرامبخش، عدم استفاده از وسایل کمکی برای راه رفتن نظیر عصا و واکر، نداشتن فشارخون سیستولیک بالاتر از ۱۶۰ mmHg و دیاستولیک بالاتر از ۱۰۰ mmHg، نداشتن برنامه تمرین ورزشی منظم طی یک سال اخیر، موافقت کتبی و امضای رضایت‌نامه جهت شرکت در مداخله حاضر و نداشتن محدودیت پزشکی برای شرکت در تمرینات ورزشی. از تمام شرکت‌کنندگان رضایت‌نامه کتبی جهت شرکت در مطالعه اخذ گردید. در صورت وجود موارد زیر آزمودنی‌ها از پژوهش کنار گذاشته می‌شدند: بروز هرگونه مشکل بالینی یا تهدید سلامتی آزمودنی، بروز آریتمی‌های بطنی، بالا رفتن یا افتادن قطعه ST در ECG[11] بیمار در حین جلسات تمرین، بروز آنژین صدری ناپایدار، عدم شرکت منظم در برنامه تمرین ورزشی (بیش از دو جلسه)، عدم موافقت کامل با شرایط و عدم تمایل برای تداوم برنامه تمرینی. این مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.NEYSHABUR.REC.1399.009 به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی – واحد نیشابور رسیده است.

پروتکل تمرینات ترکیبی

در این پژوهش که هشت هفته به طول انجامید، در هر جلسه به منظور انجام تمرینات ترکیبی ابتدا تمرینات هوازی و پس از استراحت کوتاهی (۵ تا ۱۰ دقیقه)، تمرینات مقاومتی برای بیماران انجام گردید. برنامه هوازی شامل سه جلسه تمرین در هر هشت هفته بود که در جلسات درمانی، برای گرم کردن در ابتدا و سرد کردن تدریجی در انتهای برنامه ورزشی، از تمرینات کششی استفاده شد. برنامه درمانی عبارت بود از راه رفتن روی تردمیل (۲۰ تا ۳۰ دقیقه)، رکاب زدن روی دوچرخه ثابت (۱۰ تا ۱۲ دقیقه) و استفاده از ارگومتر دست (هشت‌تا ده دقیقه). همه افراد این گروه تمرینات فوق را طی هر جلسه درمانی انجام دادند. شدت شروع فعالیت ورزشی روی نوار گردان (ترد میل) با توجه به درصد ضربان قلب ذخیره شده در تست ورزش بیماران و شدت ارگومتر دستی و دوچرخه ثابت از طریق مقاومت اعمال‌شده به دستگاه‌ها بر اساس ۵۰ و ۲۵ درصد شدت نوار گردان با واحد وات تنظیم شد. ۶۰ درصد حداکثر ضربان قلب بیماران در زمان تست ورزش به‌عنوان ضربان قلب هدف در نظر گرفته شد و بر این اساس مدت‌زمان و شدت تمرینات تنظیم گردید. شدت و مدت زمان تمرینات به‌تدریج و بر اساس توانایی بیماران افزایش یافت به نحوی‌که در هفته انتهایی تمرین به ۸۰ درصد حداکثر ضربان قلب بیماران رسید (۱۶). برنامه تمرین مقاومتی نیز به مدت هشت هفته و هر هفته سه جلسه، با هفت تکرار در جلسات اولیه و افزایش تعداد و بار حرکات تا ۱۵ تکرار در جلسات بعدی انجام شد. حرکات شامل: ۱) اسکات با فیزیوبال، ۲) فلکشن شانه، ۳) ابداکشن شانه، ۴) فلکشن آرنج، ۵) فلکشن ران، ۶) ابداکشن ران، ۷) پلانتار فلکشن مچ پا و ۸) دورسی فلکشن مچ پا بود. حرکات در ابتدا بر اساس توانایی فرد و مبتنی بر وزن بدن یا اندام خود بیمار و به‌مرور با تراباند ضعیف و درنهایت با تراباندهای قوی‌تر انجام گردید (۱۷).

نمونه‌گیری

باتوجه به نحوه طراحی پژوهش حاضر، خونگیری از ورید بازویی در دو مرحله پیش آزمون (۲۴ ساعت قبل از شروع اولین جلسه تمرینی) و پس آزمون (۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی) از تمامی آزمودنی‌ها در حالت ناشتا توسط پزشک صورت گرفت.

استخراج RNA تام و سنتز cDNA

از نمونه‌های خونی جمع‌آوری شده در لوله‌های آزمایش حاوی ضد انعقاد EDTA، جداسازی مونوسیت‌ها با استفاده از فایکول انجام گردید. سپس تخلیص RNAی مونوسیت‌ها با به کار بردن کیت RNeasy Mini Kit (QIAGEN) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. RNAهای به دست آمده تا انجام مراحل بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد، سنتز DNA مکمل (cDNA) با استفاده از پرایمر اولیگو (dT) و کیت QuantiTect Reverse Transcription Kit cDNA synthesis (QIAGEN) بر اساس پروتکل موجود در کیت صورت گرفت.

11. Electrocardiogram

طراحی پرایمر و واکنش Real-Time PCR

تخلیص mRNA مونوسیت‌ها: مونوسیت‌ها را در نیتروژن مایع قرار داده و به‌صورت کامل توسط mortal and pestle خرد گردید و سپس برای به دست آوردن mRNA در بافر RLT هموژنیزه شد و سپس همراه با نیتروژن مایع، در تیوپ میکروسانتریفیوژ RNase free، ۲ میلی‌لیتر ریخته و اجازه داده شد تا نیتروژن مایع تبخیر شود ولی مونوسیت از حالت یخزدگی خارج نشود. به میزان کافی بافر RLT اضافه شد. Lysate را مستقیماً به ستون QIAshredder که در تیوپ قرار داشت، منتقل و به مدت ۲ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. برای سنتز cDNA ۲۰۰ نانوگرم mRNA با استفاده از پرایمر اولیگو (dT) و کیت (Fermentas GmbH, St . Leon Rot-) ساخت کشور آلمان مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی بیان نسبی ژن اندوستاتین و VEGF و mRNA از روش Real-time - PCR استفاده شد. توالی پرایمرهایی که برای اندازه‌گیری اندوستاتین و VEGF مورداستفاده قرار گرفت در جدول ۱ نشان داده شده است.

بررسی بیان ژن VEGF با روش PCR-qRT[۱۲] به وسیله دستگاه BIO RADC1000 TM Thermal Cycler و در پلیت های ۹۶ چاهکی با استفاده از روش ΔΔCT-۲ انجام شد. مخلوط هر واکنش شامل ۵ میکرو لیتر SYBR - Green PCR Master Mix (QIAGEN)، ۱ میکرو لیتر از پرایمرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) اختصاصی هر ژن، ۱ میکرو لیتر cDNA و ۲ میکرو لیتر آب RNAse free به حجم نهایی ۱۰ میکرو لیتر بود. برنامه زمانی – گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله اول جهت دناتوره شدن مولکول‌های DNA و فعال شدن آنزیم پلی مراز به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم جهت واکنش تکثیری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای ۴۰ سیکل متوالی و مرحله نهایی جهت ترسیم منحنی تفکیک (Dissociation Curve) یا منحنی ذوب به‌صورت ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت.

آنالیز داده‌ها

پس از بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از طریق آزمون شاپیروویک، یافته‌های پژوهش با استفاده از آزمون t وابسته و مستقل برای بررسی تغییرات درون‌گروهی و بین گروهی مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. برای تجزیه‌وتحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و در سطح معناداری معادل $P \leq ۰/۰۵$ استفاده شد.

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل توصیفی ویژگی‌ها و متغیرهای آزمودنی‌های تحقیق نتایج آزمون شاپیروویک نشان می‌دهد که متغیرهای سن، قد، وزن و شاخص توده بدنی شرکت‌کنندگان و همچنین متغیر VEGF در هر دو گروه کنترل و تمرین ترکیبی در مراحل پیش‌آزمون و پس‌آزمون دارای توزیع نرمال می‌باشند (جدول ۲).

نتایج درون‌گروهی و بین گروهی نسبت بیان ژن VEGF/اندوستاتین در گروه‌های پژوهشی

ابتدا مقدار ژن VEGF را بر مقدار ژن اندوستاتین در دو گروه پیش‌آزمون و پس‌آزمون تقسیم کرده و سپس با توجه به نرمال بودن داده‌ها، از آزمون تی مستقل جهت آزمون تفاوت معنی‌دار نسبت ژن VEGF به اندوستاتین در گروه تجربی نسبت به کنترل استفاده گردید. با توجه به نتایج جدول فوق، مشخص گردید که تغییرات درون‌گروهی در گروه تجربی معنی‌دار (P=۰/۰۰۱) و در گروه کنترل غیر معنی‌دار می‌باشد و برای رد یا قبول فرض صفر از آزمون تی مستقل استفاده گردید. جدول ۳ نشان می‌دهد که تغییرات نسبت بیان ژن VEGF/اندوستاتین در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود (P=۰/۶۲). باوجود تأثیر افزایشی هشت هفته تمرین ترکیبی بر نسبت بیان ژن VEGF/ اندوستاتین در گروه تجربی، ولی این تغییرات در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری را نشان نداد.

بحث و نتیجه گیری

هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر هشت هفته تمرین ترکیبی در قالب یک دوره بازتوانی قلبی برنسبت بیان ژن VEGF به اندوستاتین دربیماران قلبی با سابقه عمل جراحی بای پس کرونری بود.

جدول ۱. توالی الیگو نوکلئوتیدی پرایمرها

توالی پرایمرها	نوع	نام ژن
5'-GTAGCAAGAGCTCCAGAGAGAAGT-3'	رفت	VEGF
5'-TGGACGAAAAGTTTCAGT GCGACG-3'	برگشت	
AGCGCTAGCTCACAGCCACCGCGACTTCCAGCCG	رفت	Endostatin
GTCGGCGGCCGCGGTGGCTACTTGGAGGCAGTCA	برگشت	

۱۲. Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR

جدول ۲. یافته‌های مربوط به ویژگی‌های جمعیت شناختی و آنتروپومتریکی شرکت‌کنندگان همراه با آزمون شاپیرو ویلک

متغیرها	گروه	پیش‌آزمون		پس‌آزمون	
		میانگین و انحراف معیار	معنی‌داری	میانگین و انحراف معیار	معنی‌داری
سن(سال)	کنترل	۵۶/۱۶±۷/۵	۳۶۴/۰۰	-	-
	تمرین ترکیبی	۵۴/۵۸±۶/۴۷	۰/۲۳۷	-	-
قد(سانتی‌متر)	کنترل	۳/۶۹±۱۷۳/۵	۴۸۵/۰۰	-	-
	تمرین ترکیبی	۳/۱۵±۱۷۳/۰۴	۰/۸۴۳	-	-
وزن(کیلوگرم)	کنترل	۵/۲۳±۷۶/۱۶	۰/۹۸۶	۴/۸۵±۷۵/۶۳	۰/۸۲۴
	تمرین ترکیبی	۶/۶±۷۴/۷۵	۰/۷۶۹	۶/۴۴±۷۳/۴۸	۰/۶۳۵
شاخص توده بدنی (کیلوگرم مترمربع)	کنترل	۱/۳۴±۲۵/۲۸	۰/۰۸۹	۱/۲۷±۲۵/۱۱	۰/۰۹۱
	تمرین ترکیبی	۱/۸±۲۴/۹۴	۰/۷۱۵	۱/۷۴±۲۴/۵۲	۰/۶۲۵
VEGF	کنترل	۱±۰	۰/۳۵۴	۰/۳۸۶±۱/۰۵۵	۰/۲۹۸
	تمرین ترکیبی	۱±۰	۰/۲۵۴	۰/۹۹±۵/۰۵۸	۰/۲۳۸
اندوستاتین	کنترل	۱±۰	۰/۵۳۲	۰/۵۱±۰/۹۵	۰/۵۸۵
	تمرین ترکیبی	۱±۰	۰/۳۲۴	۰/۲۴±۱/۰۸۹	۰/۳۰۱

جدول ۳. نتایج درون‌گروهی و بین گروهی نسبت بیان ژن **VEGF**/اندوستاتین در گروه‌های پژوهشی

گروه	نسبت بیان ژن VEGF/اندوستاتین		تغییرات درون‌گروهی			تغییرات بین گروهی		
	پیش‌آزمون انحراف معیار± میانگین	پس‌آزمون انحراف معیار± میانگین	T	درجات آزادی	سطح معناداری	میانگین اختلاف	t	سطح معناداری
تجربی	۱±۰/۰	۴/۷۸±۱/۵۲	۹/۱۵	۱۳	*۰/۰۰۱	۱/۰۳	۰/۷۹۴	۰/۶۲
کنترل	۱±۰/۰	۳/۸۴±۷/۰۶	۱/۳۹	۱۳	۰/۱۹			

* معنی‌داری تغییرات درون‌گروهی با استفاده از آزمون تی همبسته

نتایج به دست آمده از این پژوهش بیانگر این بود که با توجه به افزایش معنی‌دار بیان ژن VEGF در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل (P=۰/۰۰۱). تغییر معنی‌داری در بیان ژن اندوستاتین بیماران CABG مشاهده نگردید (P=۰/۳۸) وهشت هفته تمرین ترکیبی منجر به تغییر معنی‌دار نسبت بیان ژن VEGF به اندوستاتین در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل در بیماران قلبی با سابقه CABG نگردید (P=۰/۶۲).

در حال حاضر شیوع بیماری‌های عروق کرونر و مرگ‌ومیر حاصل ازآن رو به افزایش است به‌طوری‌که اولین علت مرگ‌ومیر در افراد بالای ۳۵ سال محسوب می شوند (۱۸). در بیماری‌های عروق کرونر، تحریک فرآیند رگزایی و بهبود جریان خون در بافت مجاور منطقه ایسکمیک باعث بهبود شرایط بیمار شده و می‌تواند به‌عنوان یکی از اهداف درمانی در این بیماران مطرح باشد (۹). فعالیت ورزشی بر فرآیند رگزایی مؤثر است و VEFG مهم‌ترین عامل موثر محرک در این فرآیند است. VEGF، گلیکوپروتئینی است که باواسطه دو رسپتور تیروزین کینازی (VEGFR-1 و VEGFR-2) که بر روی سلول‌های اندوتلیال عروق قرار دارند و به نام گیرنده‌های VEGF مشخص‌شده‌اند، وظایف آنژیوژنیک خود را اعمال می‌کند. در شرایط طبیعی، VEGF نفوذپذیری عروق را نیز تنظیم می‌کند که برای شروع رگ‌زایی ضروری است، به همین دلیل به آن فاکتور نفوذپذیری عروق هم گفته می‌شود و در این مورد ۵۰۰۰۰ بار قوی‌تر از هیستامین عمل می‌کند (۱۹). فاکتور های زیادی بر میزان تولید VEGF ناشی از فعالیت ورزشی،

اثرگذار هستند که شاخص‌ترین آن‌ها عبارت از هایپوکسی، فشار برشی (نیروی همودینامیکی ناشی از اصطکاک جریان خون با دیواره عروقی)، انقباض، کشش عضله و اختلال سوخت و ساز می‌باشند (۲۰ و ۱۱). از طرفی تمرینات ورزشی هوازی با شدت متوسط، به‌عنوان تنظیم‌کننده VEGF mRNA شناخته‌شده اند (۲۰). با توجه به این‌که افزایش چگالی مویرگی در عضلات اسکلتی و همین‌طور بافت عضله قلب، از مقدمات مهم توسعه توان هوازی و پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها به شمار می‌رود، شناخت روش‌های تمرینی مناسب و محیط‌های فعالیتی بهتر برای تحریک هرچه بیشتر فرآیندهای آنژیوژنز، برای بیماران قلبی اهمیت بسیاری دارد (۲۱).

اندوستاتین یک مهارکننده‌ی درون‌زای آنژیوژنز مشتق شده از پایانه C کلاژن ۱۸ است. این عامل آنژیواستاتیک، به‌وسیله سلول‌های اندوتلیال با فرآیند آنژیوژنز از طریق جلوگیری از تکثیر، مهاجرت و تشکیل مجاری جدید مقابله می‌کند (۲۲). با توجه به نتایج مطالعاتی که به بررسی آثار بیولوژیکی اندوستاتین پرداخته‌اند، مشخص شده است که اندوستاتین در تداخل پیام القاء شده توسط 2-FGF، مهار تحریک سلول‌های اندوتلیال، تحریک آپوپتوز، توقف مرحله G1 در سلول‌های اندوتلیال از طریق مهار سیکلین D1، مهار پیام‌رسانی از طریق VEGF به‌وسیله برهم‌کنش مستقیم با گیرنده تیروزین کینازی VEGF - R در سلول‌های اندوتلیال و درنهایت سرکوب عامل نکروزی محرک نقش دارد. اندوستاتین می‌تواند از فعال شدن eNOS که ناشی از عملکرد VEGF می‌باشد، جلوگیری کند و مانع از تولید نیتریک اکساید شود (۲۳ و ۱۲). همچنین بااتصال اندوستاتین به گیرنده‌هایش، زنجیره‌ای از واکنش‌ها را ایجاد می‌کند که تغییرات گسترده ژنتیکی را ایجاد می‌کند، بطوریکه بیان بیش از ۱۲ درصد از ژنوم در سلول‌های اندوتلیوم عروقی تحت تأثیر اندوستاتین می‌باشد. در ۵۰ سال اخیر تعداد زیادی از تحقیقات کاهش میزان بروز بیماری عروق کرونری را در افراد فعال ازنظر بدنی نشان داده‌اند (۲۴). تمرین ترکیبی یکی از شیوه‌های تمرینی شناخته‌شده در سال‌های اخیر است که توجه محققین به سازگاری‌های ناشی از آن در بیماران بالینی افزایش‌یافته است. در رابطه با بیماری‌های قلبی–عروقی نیز از اثر مثبت تمرین ترکیبی حمایت‌شده است (۱۲). نتایج پژوهش‌های انجام‌شده درباره تأثیر تمرینات ورزشی بر عوامل رگزایی به‌ویژه VEGF حاکی از آن است که تغییرات این عامل بیوشیمیایی متعاقب فعالیت های ورزشی مختلف، متفاوت می‌باشد و تاکنون مکانیسم آن در پاسخ به انواع فعالیت‌ها به‌خوبی شناخته نشده است. بررسی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که یک دوره تمرین ترکیبی بازتوانی قلب توانست سبب افزایش معنادار شاخص بیان ژن VEGF شود. تجزیه اطلاعات آماری به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد در گروه تجربی، هشت هفته تمرین ترکیبی در مقایسه با گروه کنترل، منجر به تغییرات اندک بیان ژن اندوستاتین گردید، ولی این تغییرات به‌اندازه‌ای نبود که ازنظر آماری معنی‌دار باشد (P=۰/۳۸)، بنابراین تمرین ترکیبی نتوانست بر تغییرات بیان ژن اندوستاتین تأثیرگذار باشد و تمرینات ترکیبی موجب کاهش سطح اندوستاتین در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل نشده است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تغییرات نسبت بیان ژن VEGF/ اندوستاتین در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نیست (P=۰/۶۲).

باوجود تأثیر افزایشی هشت هفته تمرین ترکیبی بر نسبت بیان ژن VEGF/اندوستاتین در گروه تجربی، ولی این تغییرات در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری را نشان نداد.

اطلاعاتی درزمینهٔ تأثیر تمرین ورزشی و بخصوص تمرین ترکیبی بر بیان ژن‌های VEGF و اندوستاتین بیماران CABG و متعاقب آن تغییرات قلبی–عروقی در دسترس نیست. بااین‌حال نتایج مطالعات گذشته درزمینهٔ اثر فعالیت ورزشی بر تغییر مقادیر پلاسمایی و سرمی VEGF و اندوستاتین در چندین پژوهش گزارش‌شده است (۲۹–۲۵). از آنجاییکه بر اساس مطالعه پژوهشگر، پژوهشی درزمینهٔ ی تغییرات بیان ژن متغیرهای مذکور یافت نشد، نتایج این پژوهش با پژوهش‌های انجام‌شده درزمینهٔ تأثیر تمرین بر مقادیر پلاسمایی و یاسرمی متغیرهای مذکور انجام گردید.

نتایج پژوهش حاضر با نتایج ملاحسن‌زاده و همکاران (۱۱) و مطهری راد و همکاران (۱۲) همسو نیست. مطهری راد و همکاران در پژوهش خود نشان دادند که مصرف مکمل یک دوره ال–آرژنین توأم با انجام تمرینات تخصصی کشتی سبب تغییرات معنادار نسبت VEGF به اندوستاتین شده است.

در تحقیقی دیگر اثر شش هفته تمرین استقامتی بر نسبت VEGF به اندوستاتین بافت توموری موش‌های مبتلابه سرطان پستان مورد آزمایش قرار گرفت که نشان داده شد که این تمرینات موجب تغییرات معنادار VEGF به اندوستاتین شده است. نتایج تحقیقات گذشته نشان داده است که فعالیت بدنی و بیماری‌ها با تغییر شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی افراد باعث بر هم خوردن تعادل بین فاکتورهای آنژیوژنیکی و آنژیواستاتیکی می‌شود (۱۲).

فرایند آنژیوژنز توسط تعادل بین فاکتورهای آنژیوژنیک و آنژیواستاتیک کنترل می‌شود و نسبت VEGF به اندوستاتین ازاین‌جهت ارزشمند است که VEGF به‌عنوان یکی از عوامل مهم آنژیوژنیک تلقی می‌شود و اندوستاتین به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل آنژیواستاتیک شناخته‌شده است. بنابراین تغییر این نسبت نشان‌دهنده تغییرات تعادل بین عوامل آنژیوژنیک و آنژیواستاتیک هست؛ که اگر فاکتورهای آنژیوژنیکی ازجمله VEGF بر فاکتورهای آنژیواستاتیکی مانند اندوستاتین غلبه کند موجب ساخت مویرگ جدید می‌شود و بالعکس زمانی که میزان فاکتورهای آنژیواستاتیکی بیشتر از فاکتورهای آنژیوژنیکی باشد تخریب مویرگ‌های بافتی روی می‌دهد (۱۱ و ۱۲).

منابع

1. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. Ann Thorac Surg 2005;79(3):1072-80.

2. Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, Tomaselli GF. Braunwald's Heart Disease E-Book: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Elsevier Health Sciences; 2018

3. Gustafsson T, Knutsson A, Puntschart A, Kaijser L, Nordqvist AC, Sundberg CJ, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. Pflugers Arch 2002;444(6):752-9.

4. Esteki Ghashghaei F, Sadeghi M, Yazdekhasti S ,The effect of cardiac rehabilitation on quality of life in patients with cardiovascular disease, Research in Rehabilitation Sciences 2012; 7(4); 516 -524 .

5. Razaghi A, Sadeghi H. Effect of Exercise-based Cardiac Rehabilitation on Coronary Artery Biomechanical Variables in Atherosclerotic Patients:ASystematicReviewStudy.JRehabMed2020;9(1):270-283.

6. Leon AS, Franklin BA, Costa F, Balady GJ, Berra KA, Stewart KJ, et al. Cardiac rehabilitation and secondary prevention of coronary heart disease: an American Heart Association scientific statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity), in collaboration with the American association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation. Circulation 2005;111(3):369-76.

7. Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman JI, Smith Jr SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Circulation 2004;109(3):433-8.

8. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986;74(5):1124-36.

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(2):H389-95.

10. Bloor CM. Angiogenesis during exercise and training. Angiogenesis 2005;8(3):263-71.

11. Molla Hasanzadeh F, Bizheh N, Moazami M, Nourshahi M. The Effects of Eight Weeks Aerobic Training on Angiogenes Factor and Body Composition in Overweight Women. Physiology of Sport and Physical Activity 2016; 9(2): 1365-74.

12. Motahari RM, Attarzadeh HS. The Effect of Selected Wrestling Training With L-Arginine Supplementation on Angiogenic and Angiostatic Serum Markers in Elite Wrestlers. Sport Physiology (Research on Sport Science) 2016; 8(31): 153-70.

13. Ramos AM, Senna GW, Scudese E, Dantas EH, Silva-Grigoletto ME, Fuqua JD, et al. Cardiovascular and strength adaptations in concurrent training in hypertensive women. Revista Brasileira de Medicina do Esporte 2019;25(5):367-71.

14. Eftekhar Sadat B, Toofan Tabrizi M, Shakouri SK, Aalavi Milani S, Kazemi L. The effects of cardiac rehabilitation on physical tolerance in patients after coronary artery bypass graft. Journal of Birjand University of Medical Sciences 2009;16(4):13-8.

15. Ghroubi S, Elleuch W, Abid L, Abdenadher M, Kammoun S, Elleuch MH. Effects of a low-intensity dynamic-resistance training protocol using an isokinetic dynamometer on muscular strength and aerobic capacity after coronary artery bypass grafting. Annals of physical and rehabilitation medicine 2013;56(2):85-101.

16. Sousa M, Duarte AM, Fernandes TR, Chaves SR, Pacheco A, Leão C, et al. Genome-wide identification of genes involved in the positive and negative regulation of acetic acid-induced programmed cell death in Saccharomyces cerevisiae. BMC Genomics 2013;14(1):838.

17. Khajei R, Haghighi A H ,Hamedinia MReza Rashid Lamir A. Effects of Eight Week Aerobic Training on Monocytes ABCG5 Gene Expression in Middle-Aged Men after Heart Bypass Surgery. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences2017; 24(1):79-88.

18. Pollock ML, Franklin BA, Balady GJ, Chaitman BL, Fleg JL, Fletcher B, et al. AHA Science Advisory. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association; Position paper endorsed by the American College of Sports Medicine. Circulation 2000;101(7):828-33.

19. Rowell LB. Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. Physiol Rev 1974;54(1):75-159.

20. Nourshahi M, Fayaz-Milani R, Gholamali M. Effects of acute eccentric exercise on serum vascular endothelial growth factor and endostatin concentration in male wistar rats. J Sport Biomotor Sci 2011;3(5):86-94.

21. Ravasi A, Mehrialvar Y, Ahmadizade S, Hasanvand S. The effect of high intensity intermittent exercise (HIE) in Hypoxia and normoxia on response of Vascular Endothelial Growth Factor in non-athletic men. Journal of Sport Biosciences 2015;7(4):519-40.

22. Hudlicka O, Brown MD. Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor. Journal of vascular research 2009;46(5):504-12.

23. Nourshahi M, Taheri Chadorneshin H, Ranjbar K. The stimulus of angiogenesis during exercise and physical activity. Quarterly of the Horizon of Medical Sciences 2013;18(5):286-96.

24. Ades PA. Cardiac rehabilitation and secondary prevention of coronary heart disease. N Engl J Med 2001;345(12):892-902.

25. Vizvari E, Farzanegi P, Abaszade Sourati H. Effect of Moderate Aerobic Training on Serum Levels of Angiogenic and Angiostatic Factors in Women with Type 2 Diabetes. scientific journal of ilam university of medical sciences 2019;27(1):112-21.

26. Bashiri J, Gaeini A, Hadi H. Endurance training affects muscular angiogenesis and serum VEGF concentration in diabetic rats. Koomesh 2015;17(1):123-32.

27. Hadi H, Gaeini A, Mo'tamedi P, Rajabi H. The effect of aerobic training on VEGF expression in diabetic rats. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services 2017;39(5):81-90.

28. Brixius K, Schoenberger S, Ladage D, Knigge H, Falkowski G, Hellmich M, et al. Long-term endurance exercise decreases antiangiogenic endostatin signalling in overweight men aged 50-60 years. Br J Sports Med 2008;42(2):126-9; discussion 129.

29. Jensen L, Pilegaard H, Neufer PD, Hellsten Y. Effect of acute exercise and exercise training on VEGF splice variants in human skeletal muscle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004;287(2):R397-402.