

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی

مقایسه اثر یک جلسه فعالیت هوازی تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح
VEGF و $TNF\alpha$ بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق

مریم باقری

اساتید راهنما:

دکتر علی یونسیان

دکتر رحیمه مهدی‌زاده

استاد مشاور:

دکتر مریم نورشاهی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

بهمن ماه ۱۳۹۴

تقدیم به پدر و مادر مهربانم :

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه یثار و از خودگذشتگان

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگار ان بهترین پشتیبان است.

به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

تقدیر و شکر

نه زبان شکر تو را دارم نه توان شکر از بندگان تو، و اما بر حسب وظیفه از کلیه اساتید ارجمندم در طول سالهای به یاد ماندنی شاگردیشان شکر می‌نمایم.

از اساتید ارجمند آقای دکتر علی یونسیان، خانم دکتر رحیم مهدی زاده و خانم دکتر مریم نورشاهی برای راهنمایی، مشاوره و هدایت این پایان نامه و همچنین از اساتید عزیز آقای دکتر علی حسنی و آقای دکتر فرهاد غلامی که افتخار داور این پژوهش را به بنده داده و بار راهنمایی‌های خردمندانه خود را در این امریاری گردن صمیمانه شکر می‌کنم. همچنین از جناب آقای دکتر محمد حسین رضوانی که در طول تحصیل از راهنمایی‌های ارزنده ایشان استفاده نمودم، کمال شکر و قدردانی را به جامی آوردم.

از کلیه زحمات عزیزان به خصوص آقای رسول رضایی، آقای ایوب بابایی، آقای عادل دنیایی و خانم معصومه ناطقی شکر و قدردانی می‌نمایم و آرزوی موفقیت و سربلندی آنان را از خداوند متعال خواستارم. در پایان از خانواده عزیزم که با تحمل دشواری‌ها، سبب شدند تا در کمال آسودگی خیال، شوق آموختن در من زنده بماند صمیمانه سپاسگزارم و این نیست جز جلوه‌ای از لطف و رحمت پروردگاری که از ادای شکر حتی یک نعمت او ناتوانم.

تعهد نامه

اینجانب **مریم باقری** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته **فیزیولوژی ورزشی** دانشکده تربیت بدنی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه مقایسه اثر یک جلسه فعالیت هوازی تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح **VEGF** و **TNF α** بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق تحت راهنمایی دکتر علی یونسیان و دکتر رحیمه مهدی زاده متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه شاهرود » و یا « ShahroodUniversity » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

روش‌های کاهش چاقی در مطالعات اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. فعالیت ورزشی در طولانی مدت موجب رگ‌زایی، جلوگیری از التهاب و کاهش چاقی می‌شود، از این رو، پژوهش حاضر با هدف مقایسه اثر یک جلسه فعالیت هوازی تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح VEGF و TNF- α بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق انجام شد. به منظور انجام تحقیق حاضر ۴۵ سر موش نر ویستار هشت هفته‌ای به مدت هشت هفته با رژیم پرچرب تغذیه شدند. پس از پایان هشت هفته رژیم غذایی ۲۷ سر موش که به وزن مناسب ($320 \pm 10 \text{ gr}$) رسیده بودند به صورت تصادفی در سه گروه کنترل، فعالیت هوازی تداومی و فعالیت تناوبی با شدت بالا تقسیم شدند. پس از انجام آزمون وامانده‌ساز، به منظور تعیین حداکثر اکسیژن مصرفی، گروه تمرین تناوبی پروتکلی شامل گرم کردن، پنج ست با شدت بالا ($VO_{2\max} \text{ } 100\%$)، که با دوره‌های با شدت پایین ($VO_{2\max} \text{ } 30\%$) از هم جدا شده بودند و سرد کردن انجام دادند. شدت در گروه تمرین تداومی معادل $VO_{2\max} \text{ } 65\%$ بود و مدت زمان دویدن بر اساس میزان جابه‌جایی در گروه تمرین تناوبی با شدت بالا محاسبه شد. بلافاصله پس از فعالیت حیوانات تشریح و بافت عضله نعلی آن‌ها جمع‌آوری شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آماری واریانس یک طرفه استفاده شد و سطح معنی‌داری آزمون‌ها $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که یک جلسه فعالیت تناوبی با شدت بالا در مقایسه با گروه کنترل و تداومی باعث کاهش معنی‌دار سطوح VEGF شد و سطوح VEGF در گروه تداومی در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود. همچنین، سطوح TNF- α در هر سه گروه کاهش معنی‌داری نداشت. به نظر می‌رسد، انجام یک وهله فعالیت تناوبی وامانده‌ساز می‌تواند موجب کاهش VEGF و فعالیت تداومی موجب عدم تغییر VEGF در عضله نعلی شود که می‌توان علت آن را در شدت تمرینات بالاتر تناوبی نسبت به تداومی توجیه کرد. همچنین، از عدم تغییر معنی‌دار در TNF- α و عدم ایجاد التهاب، می‌تواند در برنامه‌های کاهش وزن و بهبود سلامت افراد چاق بهره برد.

کلید واژه‌ها: فعالیت تداومی، فعالیت تناوبی شدید، رگ‌زایی، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا، عضله نعلی.

لیست مقالات کنفرانسی مستخرج از پایان نامه

۱- اثر یک جلسه فعالیت هوازی تداومی بر سطح VEGF بافت عضله نعلی موش‌های چاق، در اولین همایش بین المللی یافته‌های نوین در علوم ورزشی به صورت سخنرانی مورد پذیرش قرار گرفت.

۲- اثر یک جلسه فعالیت هوازی تداومی بر سطح $TNF\ \alpha$ بافت عضله نعلی موش‌های چاق، در اولین همایش بین المللی یافته‌های نوین در علوم ورزشی به صورت سخنرانی مورد پذیرش قرار گرفت.

فهرست مطالب

فصل اول (طرح پژوهش)

۱-۱	مقدمه	۲
۲-۱	بیان مسئله	۴
۳-۱	ضرورت و اهمیت تحقیق	۹
۴-۱	اهداف تحقیق	۱۱
۱-۴-۱	هدف کلی	۱۱
۲-۴-۱	اهداف تحقیق	۱۲
۵-۱	فرضیه های تحقیق	۱۲
۶-۱	محدودیت های پژوهش	۱۲
۱-۶-۱	محدودیت های قابل کنترل	۱۲
۲-۶-۱	محدودیت های غیر قابل کنترل	۱۳
۷-۱	پیش فرض ها	۱۳
۸-۱	تعریف واژه ها و اصطلاحات تحقیق	۱۳
۱-۸-۱	فاکتور رشد آندوتلیال عروقی (VEGF)	۱۳
۲-۸-۱	فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-a)	۱۴
۳-۸-۱	فعالیت هوازی تداومی	۱۴
۴-۸-۱	فعالیت تناوبی با شدت بالا	۱۴
۵-۸-۱	چاقی (obesity)	۱۴

فصل دوم (مبانی نظری و پیشینه پژوهش)

۱-۲ مقدمه	۱۶
۲-۲ مبانی نظری	۱۶
۱-۲-۲ مکانیسم‌های اصلی عروقی شدن بافت	۱۶
۲-۲-۲ آنژیوژنز	۱۷
۳-۲-۲ مکانیسم آنژیوژنز	۱۸
۴-۲-۲ محرک‌های آنژیوژنیک	۱۹
۵-۲-۲ عامل رشد آندوتلیال عروقی (VEGF)	۲۱
۶-۲-۲ فعالیت‌های بیولوژیکی VEGF	۲۲
۷-۲-۲ خانواده VEGF	۲۳
۸-۲-۲ تنظیم بیان ژن VEGF	۲۸
۹-۲-۲ اهمیت و نقش فرآیند آنژیوژنز در فعالیت بدنی	۲۹
۱۰-۲-۲ التهاب	۳۰
۱۱-۲-۲ نقش التهاب در فعالیت‌های آنژیوژنی	۳۰
۱۲-۲-۲ سایتوکاین‌ها	۳۲
۱۳-۲-۲ فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF)	۳۲
۱۴-۲-۲ فعالیت‌های بیولوژیکی TNF	۳۴
۱۵-۲-۲ نقش TNF- α در فرایندهای آنژیوژنی شروع	۳۴
۱۶-۲-۲ تمرین پر شدت اینتروال (HIIT)	۳۷
۱۷-۲-۲ توان هوازی (VO ₂ max)	۴۱

۴۳	۳-۲ پیشینه پژوهش.....
۴۳	۱-۳-۲ تأثیر فعالیت ورزشی بر VEGF.....
۴۹	۲-۳-۲ تأثیر فعالیت های ورزشی بر $TNF-\alpha$
۵۴	۴-۲ جمع بندی.....

فصل سوم (روش شناسی پژوهش)

۵۸	۱-۳ مقدمه.....
۵۸	۲-۳ جامعه آماری.....
۵۸	۳-۳ متغیرهای پژوهش.....
۵۸	۱-۳-۳ متغیر مستقل.....
۵۸	۲-۳-۳ متغیر وابسته.....
۵۹	۴-۳ نوع پژوهش.....
۵۹	۵-۳ ابزار جمع آوری داده ها.....
۶۰	۶-۳ مواد و ابزار لازم جهت آماده سازی غذای پرچرب.....
۶۰	۷-۳ ابزار و مواد لازم جهت انجام آزمایش و سترن بلات.....
۶۱	۱-۷-۳ مواد لازم جهت و سترن بلات.....
۶۲	۸-۳ روش اجرای تحقیق.....
۶۲	۱-۸-۳ تهیه رژیم غذایی پرچرب.....
۶۳	۲-۸-۳ روش اجرای پروتکل.....
۶۵	۳-۸-۳ طرح تحقیق.....

۴-۸-۳	تعیین غلظت پروتئین به وسیله بردفورد (Bradford assay)	۶۶
۵-۸-۳	تهیه غلظت‌های مختلف BSA (Bovine Serum Albomin) برای کشیدن منحنی استاندارد	۶۷
۶-۸-۳	غلظت‌های پروتئین، آب و سمپل بافر (SB)	۶۹
۷-۸-۳	آماده سازی نمونه	۶۹
۸-۸-۳	ساخت الکتروفورز بر روی ژل SDS page	۷۰
۹-۸-۳	تهیه محلول‌ها	۷۰
۱۰-۸-۳	روش انجام آزمایش و ساختن ژل پایین و بالا	۷۲
۱۱-۸-۳	الکترو فوز بر ژل SDS page	۷۳
۱۲-۸-۳	وسترن بلات یا ایمنو بلائینگ (Western blot or immunoblotting)	۷۴
۱۳-۸-۳	مرحله انتقال از ژل به کاغذ	۷۴
۱۴-۸-۳	مرحله بلائینگ	۷۵
۱۵-۸-۳	مرحله انکوبه کردن با آنتی بادی اولیه	۷۶
۱۶-۸-۳	مرحله انکوبه کردن با آنتی بادی ثانویه	۷۶
۱۷-۸-۳	مرحله آشکار سازی (Detection)	۷۶
۱۸-۸-۳	مرحله ظهور فیلم در تاریکخانه	۷۷
۱۹-۸-۳	روش Striping	۷۷
۹-۳	روش تجزیه و تحلیل آماری و نوع آزمون	۷۸
۱۰-۳	ملاحظات اخلاقی	۷۸

فصل چهارم (یافته‌های پژوهش)

۱-۴	مقدمه	۸۰
-----	-------	----

۲-۴	تغییرات وزن حیوانات طی هشت هفته رژیم پرچرب	۸۰
۳-۴	آزمون جهت تعیین نرمال بودن داده ها	۸۱
۴-۴	آزمون فرضیه های تحقیق	۸۲
۱-۴-۴	فرضیه اول	۸۲
۲-۴-۴	فرضیه دوم	۸۵

فصل پنجم (بحث و نتیجه گیری)

۱-۵	مقدمه	۸۸
۲-۵	خلاصه پژوهش	۸۸
۳-۵	بحث و نتیجه گیری	۸۹
۴-۵	پیشنهادهای تحقیق	۹۲
۱-۴-۵	پیشنهادهای کاربردی	۹۲
۲-۴-۵	پیشنهادهای پژوهشی	۹۲
	منابع و مآخذ	۹۳

فهرست جداول

جدول ۱-۳	ترکیبات بافر لیزکننده بافت	۶۶
جدول ۲-۳	ترکیبات لازم برای ساخت محلول بردفورد	۶۷
جدول ۳-۳	ساخت بافر نمونه (3X) Sample buffer	۷۰
جدول ۴-۳	محلول استوک اکریل آمید (30.8%) Acrylamide Stock	۷۱

جدول ۳-۵ بافر ژل پایین (PH=8.8)	۷۱
جدول ۳-۶ بافر ژل بالا (PH=-6.8)	۷۱
جدول ۳-۷ بافر تانک الکتروفورز (ph=8.3) (Running Buffer)	۷۱
جدول ۳-۸ ساخت ژل پایین (Separating gel 8%)	۷۲
جدول ۳-۹ ساخت ژل بالا (Stacking gel 5%)	۷۲
جدول ۳-۱۰ ترکیبات محلول بافر انتقال	۷۵
جدول ۳-۱۱ دستور ساخت بافر شست و شو	۷۶
جدول ۳-۱۲ ساخت محلول Striping	۷۸
جدول ۴-۱ جدول میانگین و انحراف معیار وزن آزمودنی ها	۸۰
جدول ۴-۲ جدول نتایج آزمون شیپرو ویلک برای VEGF در عضله نعلی	۸۱
جدول ۴-۳ جدول نتایج آزمون شیپرو ویلک برای TNF- α در عضله نعلی	۸۲
جدول ۴-۴ نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه برای بررسی تأثیر یک جلسه فعالیت تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح VEGF در بافت عضله نعلی موش های چاق	۸۳
جدول ۴-۵ جدول نتایج آزمون تعقیبی برای بررسی تفاوت سطوح VEGF میان گروه ها در بافت عضله نعلی	۸۳
جدول ۴-۶ نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه برای بررسی تأثیر یک جلسه فعالیت تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح TNF- α در بافت عضله نعلی موش های چاق	۸۵

فهرست اشکال

شکل ۱-۲ مراحل آنژیوژنز	۱۸
شکل ۲-۲ خانواده VEGF و گیرنده های آن ها	۲۴

شکل ۳-۲ مسیره‌های پیام‌رسانی VEGF	۲۷
شکل ۴-۲ نفوذ سلول‌های التهابی و نقش آنها در رشد جوانه‌های عروقی	۳۱
شکل ۵-۲ نقش دوگانه $TNF-\alpha$ در تکثیر و مرگ سلولی	۳۶
شکل ۱-۴ پروتکل فعالیت تناوبی با شدت بالا	۶۵
شکل ۲-۴ طرح تحقیق	۶۵
شکل ۳-۴ پلیت‌الایزا ته صاف	۶۸
شکل ۴-۴ تانک الکتروفورز	۷۳
شکل ۵-۴ انتقال پروتئین از ژل به کاغذ	۷۵

فهرست نمودارها

نمودار ۱-۳ تعیین غلظت به‌وسیله بردفورد برای عضله نعلی	۶۹
نمودار ۱-۴ تغییرات وزن آزمودنی‌ها در طول هشت هفته رژیم پرچرب	۸۱
نمودار ۲-۴ (الف) نوار پروتئین VEGF و β actin	۸۴
نمودار ۳-۴ (الف) نوار پروتئین $TNF-\alpha$ و β actin	۸۶

فصل اول

طرح پژوهش

۱- مقدمه

چاقی به عنوان یک بیماری شایع، به صورت مازاد چربی در بدن تعریف می‌شود. امروزه مشخص شده است که بافت چربی یک بافت اندوکرین فعال است. همچنین، مشاهده شده است که ارتباط زیادی بین افزایش توده بافت چربی، ب ویژه چربی احشایی و افزایش مقاومت به انسولین و سندروم متابولیک وجود دارد [۱]. چاقی که با افزایش بافت چربی همراه می‌باشد، وضعیتی است که با مشخصه التهاب سیستمی خفیف معرفی می‌شود. التهاب، سازوکار اصلی ایجاد تصلب شرایین و مقاومت به انسولین نیز می‌باشد [۲].

بافت چربی که نقش آن به ذخیره چربی نسبت داده می‌شود، شماری از هورمون‌ها را که آدیپوکاین^۱ نامیده می‌شوند، ترشح می‌کند و اخیراً به عنوان میانجی بالقوه مقاومت به انسولین در نظر گرفته می‌شود. آدیپوکاین‌ها، نظیر لپتین^۲، آدیپونکتین^۳، ویسفاتین^۴، آپلین^۵، واسپین^۶، هپسیدین^۷، کمرین^۸ و سایتوکین‌های التهابی مثل $TNF\alpha$ ^۹، اثرات وسیعی بر متابولیسم کربوهیدرات و چربی دارند و آشکار شده است که نقش مهمی در پاتوژنز مقاومت به انسولین، دیابت، آترواسکلروز، اختلال در اندوتلیال عروقی و التهاب بازی می‌کنند [۳]. علاوه بر نقش مهم در دفاع داخلی، تأثیر مهمی در متابولیسم چربی و گلوکز کل بدن دارد. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهد که بافت چربی یک منبع مهم تولید $TNF-\alpha$ درونی بدن است و بیان این سایتوکاین در بافت چربی اکثر جوندگان چاق افزایش می‌-

1 Adipocin

2 Leptin

3 Adiponectin

4 Visfatin

5 Apelin

6 Vaspin

7 Hepcidine

8 Chemerin

9 Tumor necrosis factor alpha

یابد [۴]. $TNF-\alpha$ به عنوان یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر در فرایند رگ زایی (آنژیوژنز)^۱، یک سایتوکاین نیرومند است که به وسیله ماکروفاژها تولید می شود [۵].

از طرف دیگر، فعالیت بدنی منظم، عامل مهمی در پیشگیری و درمان انواع بیماری ها است. ملاحظات کلینیکی زیادی نشان داده اند که میزان بیماری و مرگ و میر در بین افرادی که از لحاظ جسمانی فعال هستند، در مقایسه با افراد کم تحرک کمتر است. به عنوان یک رویکرد پیشگیرانه، دو مایل پیاده روی در روز، میزان مرگ و میر را در مردان بازنشسته غیر سیگاری کاهش داد. در زمان بروز بیماری های کرونری، پرفشار خونی و نارسایی قلبی، فعالیت های بدنی به عنوان درمان و پیشگیری ثانویه محسوب می شوند و در مقایسه با راهکارهای مداخله ای اثبات شده دیگر، فعالیت بدنی کمترین هزینه مالی را می طلبد [۶].

فعالیت بدنی منجر به تنوعی از تغییرات در عملکرد قلبی - عروقی می شود که از جمله آن ها می توان به کاهش ضربان قلب، کاهش فشار خون، افزایش حداکثر برداشت اکسیژن توسط عضله قلب و افزایش تعداد و چگالی عروقی در سطح عضله قلبی و عضله اسکلتی اشاره کرد [۷].

یکی از سازگاری های عضلات اسکلتی به فعالیت بدنی منظم در پاسخ به افزایش نیاز عضلات، افزایش شبکه مویرگی یا آنژیوژنز است. پیدایش و تکوین عروق جدید از طریق افزایش جریان خون محیطی و تأمین اکسیژن، قابلیت برای پاسخ های فیزیولوژیک بدن می باشد که از طریق افزایش سطح انتشار، افزایش زمان تبادل و کاهش مسافت انتشار، موجب افزایش اختلاف اکسیژن خون سرخرگی - سیاهرگی و در نتیجه افزایش VO_{2max} و به تأخیر انداختن خستگی و تداوم اجرای فعالیت ورزشی با شدت بالاتر می شود [۶]. فاکتورهای آنژیوژنیکی عمده ای شناسایی شده اند که از میان آن ها فاکتور رشد آندوتلیال عروقی ($VEGF^2$) به عنوان قویترین میتوژن مخصوص سلول های آندوتلیال شناخته

1 Angiogenesis

2 Vascular endothelial growth factor

شده است [۸]. همچنین $TNF-\alpha$ یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر در فرایند رگ‌زایی است، که عمدتاً به وسیله ماکروفاژها تولید می‌شود [۵].

با توجه به اینکه افزایش چگالی مویرگی در عضلات اسکلتی و همین‌طور بافت عضله قلب، از مقدمات مهم توسعه توان هوازی و نیز پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌شمار می‌رود، شناخت صحیح فعالیت‌های ورزشی که به بهترین شکل ممکن باعث بروز پدیده آنژیوژنز فیزیولوژیکی می‌شوند اهمیت بسزایی دارد.

۱-۲ بیان مسئله

یکی از شاخص‌های مهم مرتبط با تندرستی و قابلیت‌های ورزشی، حداکثر اکسیژن مصرفی یا VO_{2max} می‌باشد. به‌طور کلی اعتقاد عمومی بر این است که با افزایش ذخایر چربی بدنی بیشتر از حد نرمال (BMI بالا) میزان حداکثر اکسیژن مصرفی کاهش می‌یابد. این تأثیرات تجمع بافت چربی بر توان هوازی، از طرق مختلف می‌تواند اتفاق بیفتد [۹]. از سوی دیگر شیوع چاقی از دلایل مهم ابتلاء به پرفشار خونی مخصوصاً در سنین بزرگسالی می‌باشد. فشار خون بالا تأثیر نامطلوب و مستقیمی بر عملکرد اندوتلیال مستقل از سایر فاکتورهای خطرزای قلبی عروقی دارد. اختلال عملکرد اندوتلیال به‌عنوان یک شاخص اولیه آسیب عروقی قبل از ظهور تغییرات ساختاری دیواره عروق در آنژیوگرافی، نقش مهمی را در پاتوژنز آترواسکلروز ایفا می‌کند [۱۰].

رشد و توسعه بافت چربی نیازمند افزایش اکسیژن رسانی و مواد مغذی به این بافت می‌باشد. بافت چربی با افزایش تعداد و قطر عروقی به این نیاز پاسخ می‌دهد. رشد بافت چربی در مراحل اولیه، به‌طور قوی با فرایند رگ‌زایی در ارتباط است. به‌طور شایع پذیرفته شده است که عملکرد سیستم $VEGF-VEGFR$ در فعالیت‌های آنژیوژنیک و ادیوژنزی دارای نقش محوری است و بیان این پروتئین‌ها در دوران رشد بافت چربی دستخوش تغییر می‌شود [۳].

مشخص شده است که برخی از هورمون‌ها، سایتوکین‌ها و سوخت‌های متابولیکی مانند اسیدهای چرب غیر استیریفه شده از بافت چربی آزاد می‌شوند و می‌توانند عملکرد هوازی در بافت عضلانی را تغییر دهند. در نتیجه، افزایش بافت چربی احشایی، آزادسازی و در حال گردش بودن سطوح گلیسرول و اسیدهای چرب غیر استیریفه، افزایش می‌یابد که باعث مقاومت انسولینی در عضلات اسکلتی می‌شود مقاومت انسولینی با تجمع چربی و متعاقباً با کاهش در متابولیسم چربی که شامل تغییر در جذب اسیدهای چرب عضلات، سنتز تری‌گلیسیرید، لیپولیز، اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌باشد، همراه است [۱۱]. این عوامل تأثیرات نامطلوبی بر سلامت و توان هوازی بافت عضلانی بر جای می‌گذارند [۱۲].

از دیگر فعالیت‌های بیولوژیکی بافت چربی می‌توان به بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی اشاره کرد. یکی از مهم‌ترین این سایتوکاین‌ها، فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا ($TNF-\alpha$) می‌باشد. نشان داده شده است که در نمونه‌های دارای اضافه وزن، سطح سرمی $TNF-\alpha$ افزایش می‌یابد. $TNF-\alpha$ با آسیب رساندن به گیرنده‌های انسولینی باعث افزایش مقاومت انسولین و کاهش فعالیت آنزیم لیپوپروتئین لیپاز (LPL) در افراد چاق می‌شود [۱۳]. فعالیت‌های ورزشی این پتانسیل را دارند که از طریق کاهش وزن باعث کاهش پرفشار خونی و همچنین از طریق مسیر آنژیوژنیک منجر به بهبود عملکرد اندوتلیال شوند [۱۴]. این امکان وجود دارد که تنظیم مثبت فاکتورهای پرو آنژیوژنیک ناشی از فعالیت‌های ورزشی، با افزایش دانسیته مویرگی و آنژیوژنز فیزیولوژیکی و همچنین توسعه فراهمی نیتریک اکسید اندوتلیالی، منجر به افزایش اتساع عروقی، کاهش مقاومت عروقی و افزایش خون رسانی به بافت‌های متابولیک همچون عضله اسکلتی شود که این عوامل در نهایت می‌توانند بهبود توان هوازی و سلامت فیزیولوژیکی در افراد چاق را در پی داشته باشند [۱۵، ۱۴].

بررسی‌ها نشان می‌دهد اجرای فعالیت‌های ورزشی شدید، باعث ایجاد هایپوکسی موضعی در سلول‌های فعال می‌شود. همچنین استرس‌های ورزشی از طریق مکانیسم‌های دیگری چون افزایش

تولید رادیکال‌های آزاد، رها سازی سایتوکاین‌های پیش التهابی، برهم‌زدن شارژ انرژی سلول و ایجاد تنش‌های برشی در عروق می‌توانند باعث تغییر بیان فاکتورهای آنژیوژنیک و التهابی شوند [۱۶]. بنابراین فعالیت‌های ورزشی به عنوان یک محرک قوی در تنظیم فاکتورهای رشدی مطرح هستند، اما پروتکل‌های ورزشی مختلف می‌توانند تأثیرات متفاوتی داشته باشند و در این زمینه عموماً بافت‌ها پاسخ‌های متفاوتی به فعالیت ورزشی دارند.

تمرینات استقامتی منظم باعث ایجاد سازگاری‌های فیزیولوژیکی متعددی می‌شود که از آن جمله می‌توان به بهبود تحمل ورزشی و ارتقای سطح تندرستی اشاره کرد. به دلیل دشواری‌های اجرای تمرینات استقامتی سنتی، تمرین اینتروال (HIIT)^۱ به عنوان تمرینی جایگزین یاد می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که تمرینات با شدت بالا (HIIT) روش بسیار قوی برای بهبود عملکرد استقامتی در مقایسه با تمرینات استقامتی با حجم بالا (HVT)^۲ است [۱۷]. تمرین اینتروال شدید HIIT عبارت از دوره‌های تمرینی کوتاه و نسبتاً شدید توأم با استراحت در بین دوره‌ها است. به تازگی نشان داده شده است که HIIT باعث ایجاد سازگاری‌های زیادی همانند سازگاری‌های ایجاد شده به وسیله تمرین استقامتی می‌شود [۱۸].

بسیاری از پژوهش‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی در عضله اسکلتی موش و انسان می‌تواند سبب آنژیوژنز شود [۱۹]. هر گونه افزایش در شبکه مویرگی عضلات، در تقویت و مبادله اکسیژن و مواد مغذی بین خون و بافت‌ها مؤثر است، زیرا شبکه مویرگی بزرگتر می‌تواند سطح مبادله اکسیژن را افزایش و فاصله طولی بین عضله و رگ‌ها را کاهش دهد. همچنین، زمان مبادله اکسیژن بین عضله و خون را طولانی‌تر می‌کند [۲۰].

1 High intensity interval training (HIIT)

2 High-volume endurance training(HVT)

فاکتور رشد آندوتلیال عروقی یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های اختصاصی رگ‌زایی است. خانواده فاکتورهای رشد آندوتلیال عروقی، شامل گلیکوپروتئین‌های ترشحی به نام‌های VEGF-A، VEGF-B، VEGF-C، VEGF-D، VEGF-E، VEGF-F و فاکتور رشد جفتی (PIGF)^۱ است [۲۰].

مطالعات بر روی تنظیم رگ‌زایی در پاسخ به ورزش و تمرین نشان داده است که تمرین شدید سبب افزایش سطوح پروتئین و سطوح mRNA در فاکتورهای آنژیوژنیک، مانند فاکتور رشد آندوتلیال عروقی، متالوپروتئیناز ماتریس-۲ (MMP-2)^۲ و سنتز نیتریک اکساید اندوتلیال (eNOS)^۳ می‌شود. میزان رگ‌زایی عموماً در شدت تمرینی برابر با ۷۰ تا ۸۰ درصد VO_{2max} دیده می‌شود، در حالی‌که، نشان داده شده است تمرین در شدت ۴۰ درصد VO_{2max} تأثیری بر مویرگ‌زایی ندارد [۲۰]. به علاوه، ورزش شدید به عنوان عامل افزایش تجمع VEGF در عضله عنوان شده که حداقل برای عکس العمل نشان دادن به آزاد سازی VEGF از سلول‌های عضله اسکلتی و قلبی ظاهر می‌شود [۲۱].

TNF- α به عنوان یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر در فرایند رگ‌زایی، یک سایتوکاین نیرومند است که عمدتاً به وسیله ماکروفاژها و بسیاری از بافت‌های دیگر تولید می‌شود. علاوه بر نقش مهم در دفاع داخلی، تأثیر مهمی در متابولیسم چربی و گلوکز کل بدن دارد [۲۲]. برون جنز و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که میزان در گردش خون و آزاد شده این فاکتورها از بافت چربی در اثر چاقی افزایش و بعد از کاهش وزن کم می‌شود [۲۳، ۲۴]. TNF- α دارای اثرات متعددی بر روی اندوتلیال، از جمله افزایش رها سازی سایتوکین‌هایی می‌باشد که در پیشبرد آنژیوژنز دخیل هستند. TNF- α از طریق بیان سایتوکین‌های پیش التهابی IL-8، IL-6 و مولکول‌های چسبان از قبیل VCAM، نقش مهمی در متاستاز و تکثیر سلولی ایفا می‌کند. علاوه بر این با فعالیت خود، تحریک بیان ماتریکس متالوپروتئینازها (MMP) و اینتگرین‌ها در انواعی از سلول‌ها را موجب می‌شود [۲۲]. همچنین TNF-

1 Placenta Growth Factor

2 Matrix Metaloprotease-2

3 Endothelial Nitric Oxide Synthesis

α به عنوان یکی از بیان کننده های قوی VEGF مطرح می باشد. مجموعه عملکردهای مذکور می توانند توسعه فعالیت های پرو آنژیوژنیک و در نهایت رگ زایی بافتی را در پی داشته باشند [۲۵].

پژوهش هایی در ارتباط با تأثیر تمرینات ورزشی بر سطوح VEGF و $\text{TNF-}\alpha$ انجام شده است. به طور مثال، در پژوهشی که گستافسن و همکاران^۱ (۲۰۰۷) تغییرات Ang-1، Ang-2 و VEGF-A موجود در عضلات اسکلتی را بعد از یک دوره تمرین مورد مطالعه قرار دادند. نتایج تحقیق، عدم تغییر ژن VEGF-A را نشان داد [۲۶].

جانسون و همکاران^۲ (۲۰۰۴) اثر یک مرحله فعالیت شدید را بر روی VEGF mRNA و VEGF عضلات اسکلتی افراد تمرین کرده و بی تمرین بررسی کردند. VEGF در هر دو پای افراد تمرین کرده ۲، ۶ و ۲۴ ساعت بعد افزایش پیدا کرده بود اما افزایش در VEGF mRNA در پای بی تمرین بالاتر از پای تمرین کرده بود [۲۰].

گوخال^۳ و همکاران (۲۰۰۷) پاسخ سایتوکاین ها به فعالیت ورزشی سنگین در ورزشکاران و غیر ورزشکاران را مورد بررسی قرار دادند. نتایج افزایش IL-6 و کاهش $\text{TNF-}\alpha$ را نشان داد. همچنین، تغییر کمتری در پاسخ سایتوکاین ها به ورزش در گروه ورزشکاران نسبت به گروه غیر ورزشکار مشاهده شد. این محققان چنین نتیجه گیری کردند که فعالیت ورزشی سنگین موجب افزایش در پاسخ سایتوکاین ها می شود، اما تمرین ورزشی منظم و در دوره طولانی موجب تعدیل پاسخ سایتوکاین ها به جلسه منفرد ورزش می شود [۲۷].

فرایترز^۴ و همکاران (۲۰۱۱) اثر ورزش تحت شرایط هایپوکسی را بر روی سایتوکاین ها بررسی کردند. پس از ۶ ساعت قرار گیری در شرایط هایپوکسی، تمام آزمودنی ها به مدت ۵ دقیقه فعالیت

1 Gustafsson & et al

2 Jensen et al

3 Gokhale

4 Fritzenwanger

ورزشی با شدت ۱ وات به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن انجام دادند. نتایج تغییری در میزان $TNF-\alpha$ را نشان نداد اما ورزش و هایپوکسی موجب افزایش در سطح IL-6 شد [۲۸].

از جمع‌بندی یافته‌ها می‌توان به این نتیجه رسید که اطلاعات موجود در زمینه پاسخ‌های VEGF و $TNF-\alpha$ بافت عضله اسکلتی به فعالیت ورزشی از ثبات مشخصی برخوردار نیست. دانش موجود در زمینه مقایسه پروتکل‌های تمرینی مختلف در یک تحقیق محدود می‌باشد. از این رو، محقق بر آن شد تا به این سؤال پاسخ دهد که آیا یک جلسه فعالیت هوازی تداومی و تناوبی با شدت بالا و بر سطوح VEGF و $TNF-\alpha$ بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق تأثیر متفاوتی دارد؟

۱-۳ ضرورت و اهمیت تحقیق

چاقی به‌عنوان یک بیماری متابولیک از مهم‌ترین مشکلات سلامت عمومی در سراسر جهان به شمار می‌رود که ناشی از افزایش عمومی یا موضعی چربی در بدن می‌باشد. تغییر شیوه‌ی زندگی و عادات غذایی مردم به سمت مصرف غذاهای پرچرب و انرژی‌زا و کاهش فعالیت جسمانی موجب رشد روز افزون چاقی و اضافه وزن در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه شده است [۲۹]. کشور ایران نیز همانند سایر کشورهای در حال توسعه با همه‌گیری چاقی و عوارض آن مواجه است [۲۹]. براساس آمار منتشر شده در سال ۲۰۰۵ از سوی سازمان جهانی بهداشت، ۱/۶ میلیارد از افراد بزرگسال (بالای ۱۵ سال) در جهان اضافه وزن دارند، که حداقل ۴۰۰ میلیون نفر از آن‌ها از نظر بالینی چاق هستند. بر این اساس، پیش‌بینی شده است که بیش از ۲/۳ میلیارد نفر از مردم جهان تا سال ۲۰۱۵ مبتلا به اضافه وزن شوند [۳۰].

علاوه بر این، چاقی از جمله مواردی است که از طریق ازدیاد بیان فاکتورهایی چون $TNF-\alpha$ و IL-6 باعث پیشبرد و افزایش فعالیت‌های التهابی می‌شود. مشاهده شده است در افرادی که BMI

آن‌ها بالاتر از ۲۵ می‌باشد، به واسطه بالاتر بودن سطوح التهاب، ریسک بروز انواع سرطان بالاتر است. همچنین، بافت چربی به‌عنوان یک منبع مهم برای نفوذ سلول‌های التهابی چون ماکروفاژها مطرح است که این سلول‌ها می‌توانند ساز و کارهای التهابی متعددی را راه اندازی نمایند [۳۱].

با توجه به اینکه تمرینات ورزشی تقویت سیستم ضد اکسایش و افزایش سطوح اینترلوکین‌های ضد التهابی در طولانی مدت را در پی دارند، بنابراین، شاید بتوان از فعالیت‌های ورزشی به‌عنوان ابزاری در جهت کاهش سطوح التهاب در افراد چاق بهره برد اما اطلاعات دقیقی در ارتباط با نوع پروتکل‌های تمرینی و شدت و مدت‌های مطلوب وجود ندارد. از سوی دیگر، برخورداری از شبکه مویرگی گسترده-تر، دسترسی عضله در حال کار به اکسیژن و مواد مغذی را بیشتر می‌سازد و به برداشت فرآورده‌های حاصل از متابولیسم و به تأخیر انداختن خستگی کمک می‌کند و از این لحاظ زمینه عملکرد مؤثرتر و کاراتر را تأمین می‌کند. افزایش حداکثر اکسیژن مصرفی به‌ویژه در فعالیت‌های استقامتی یکی از مهم‌ترین عوامل موفقیت در رویدادهای ورزشی است. نشان داده شده است آنژیوژنز یکی از عواملی است که باعث افزایش ۱۶ درصدی VO_{2max} می‌شود [۳۲]. مطالعات گوناگون نشان می‌دهند که فعالیت‌های ورزشی استقامتی آثار مثبتی بر رگ‌زایی افراد سالم دارد و افزایش رشد مویرگی در عضلات اسکلتی در اثر فعالیت بدنی یک اثر شناخته شده است [۳۳]. آنژیوژنز از یک طرف با افزایش اکسیژن‌رسانی به عضله اسکلتی زمینه عملکرد کارآمدتر را فراهم می‌سازد و از سوی دیگر، موجب کاهش بروز سکته مغزی، سکته قلبی و پرفشار خونی مخصوصاً در افراد دارای اضافه وزن می‌شود. همچنین، آنژیوژنز نقش مهم و حیاتی در رشد جنین و در بزرگسالی در بهبود زخم‌ها، نقرس^۱، ورم مفاصل، بهبود رگ‌های چشم و بیماری‌های قلبی دارد [۳۴].

میزان اندک فعالیت بدنی با میزان بروز چاقی، که خود یکی از عوامل مهم بسیاری از بیماری‌های مزمن است، ارتباط دارد. میزان فعالیت بدنی در بسیاری از کشورهای صنعتی و کشورهای

1 Gout

در حال توسعه کم و در این میان زنان تا حدود زیادی فعالیت بدنی کمتری نسبت به مردان دارند [۳۵]. آنژیوژنز در شرایط فیزیولوژیکی زنان در سیکل‌های قاعدگی، تخمک گذاری، لانه گزینی، رشد جنین و رشد جفت فرآیند بسیار مهمی می‌باشد [۳۶]. طبق بررسی‌هایی که انجام شد، تحقیقات در مورد تأثیر فعالیت‌های تناوبی شدید بر عامل رشد آندوتلیال عروقی و $TNF-\alpha$ بسیار نادر می‌باشد، اگرچه در مطالعات بسیار محدودی تأثیر فعالیت‌های درمانده‌ساز بر روی عامل رشد آندوتلیال عروقی بررسی شد، ولی در اکثر این تحقیقات از فعالیت‌های استقامتی طولانی مدت و زیر بیشینه استفاده شد. محققان نشان دادند پاسخ VEGF با توجه به نوع پروتکل فعالیت ورزشی و ویژگی آزمودنی‌ها متفاوت است [۳۷]. بنابراین نتایج این تحقیق می‌تواند در شناخت ما از تأثیر پروتکل‌های ورزشی مختلف بر فاکتورهای پروآنژیوزنیک نام برده مؤثر واقع شود. با توجه به اینکه افزایش چگالی مویرگی در عضلات اسکلتی از مقدمات مهم توسعه توان هوازی و همین‌طور پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها به شمار می‌رود، از این رو، شناخت صحیح فعالیت‌های ورزشی که به بهترین شکل ممکن، باعث بروز پدیده آنژیوژنز می‌شوند، از اهمیت بسزایی برخوردار است. همچنین، نتایج این تحقیق احتمالاً می‌تواند برای افراد دارای مشکلات پاتولوژیک مشخص شده توسط کاهش جریان خون به بافت محیطی، مانند ایسکمی، میوپاتی‌های مختلف و نارسایی عروقی مفید باشد.

۱-۴ اهداف تحقیق

۱-۴-۱ هدف کلی

هدف کلی از انجام این تحقیق، مقایسه اثر یک جلسه فعالیت هوازی تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح VEGF و $TNF\alpha$ بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق است.

۱-۴-۲ اهداف تحقیق

۱- مقایسه اثر یک جلسه فعالیت هوازی تداومی و تناوبی شدید بر پاسخ VEGF بافت عضله نعلی در موش‌های صحرایی نر چاق.

۲- مقایسه اثر یک جلسه فعالیت هوازی تداومی و تناوبی شدید بر پاسخ $TNF-\alpha$ بافت عضله نعلی در موش‌های صحرایی نر چاق.

۱-۵ فرضیه‌های تحقیق

۱- بین یک جلسه فعالیت هوازی تداومی و تناوبی با شدت بالا، تفاوت معنی‌داری در میزان اثر گذاری بر VEGF عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق وجود دارد.

۲- بین یک جلسه فعالیت هوازی تداومی و تناوبی با شدت بالا، تفاوت معنی‌داری در میزان اثر گذاری بر $TNF-\alpha$ عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق وجود دارد.

۱-۶ محدودیت‌های پژوهش

۱-۶-۱ محدودیت‌های قابل کنترل

۱- قد، وزن، جنس، نژاد و سن موش‌ها

۲- نوع و میزان تغذیه و آب حیوانات

۳- شرایط محیطی آزمایشگاه و محل نگهداری حیوانات (دما، رطوبت و فشار)

۴- چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی

۵- شدت و مدت تمرین

۱-۶-۲ محدودیت‌های غیر قابل کنترل

- ۱- عدم تعیین ظرفیت‌های فیزیولوژیکی پایه (ضربان قلب، سطح اسید لاکتیک) نمونه‌ها.
- ۲- عدم بررسی تأثیر استرس احتمالی وارد شده بر اثر شوک الکتریکی، جابه‌جایی حیوانات به محل تمرین.

۱-۷ پیش فرض‌ها

- ۱- تمام آزمودنی‌ها آب و غذای یکسان در اختیار داشتند.

۱-۸ تعریف واژه‌ها و اصطلاحات تحقیق

۱-۸-۱ فاکتور رشد آندوتلیال عروقی (VEGF)

یک میتوزن مخصوص برای سلول‌های اندوتلیال با وزن مولکولی ۴۵ کیلو دالتون است و موجب پاسخ رگ زایی از طریق گیرنده‌های تیروزین کینازی می‌شود [۱۵]. در این تحقیق این عامل در داخل عضله نعلی اندازه‌گیری شد.

۲-۸-۱ فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-a)

فاکتور نکروز دهنده تومور که یک سایتوکاین نیرومند است و توسط ماکروفاژها تولید می‌شود. در این تحقیق میزان این فاکتور به عنوان شاخص التهاب در بافت عضله نعلی اندازه‌گیری شده است [۵].

۳-۸-۱ فعالیت هوازی تداومی

فعالیت هوازی تداومی را می‌توان فعالیت ورزشی طولانی مدت با حالت یکنواخت تعریف نمود [۳۸].

۴-۸-۱ فعالیت تناوبی با شدت بالا

فعالیت تناوبی ترکیبی از دوره‌های تکراری با فعالیت‌های تناوبی به نسبت کوتاه با شدت تمام یا شدتی نزدیک به شدتی که VO_{2peak} به دست می‌آید ($\geq 90\% VO_{2peak}$) با دوره‌های استراحت فعال و غیر فعال است [۳۹]. در این تحقیق فعالیت تناوبی شامل ۵ مرحله با شدت بالا و ۴ تکرار با شدت پایین است.

۵-۸-۱ چاقی (obesity)

به تجمع غیر طبیعی یا بیش از حد چربی در نقاط مختلف بدن گفته می‌شود [۴۰]. برای این مطالعه از موش‌هایی با شاخص توده بدنی بیش از 0.68 g/cm^2 به عنوان موش چاق استفاده شده است [۴۱].

فصل دوم

مبانی نظری و پیشینه پژوهش

۲-۱ مقدمه

این فصل شامل دو بخش مبانی نظری و پیشینه پژوهش می‌باشد. ابتدا در بخش مبانی نظری، مطالبی در مورد مکانیسم‌های اصلی عروقی شدن بافت، آنژیوژنز، مکانیسم آنژیوژنز، محرک‌های آنژیوژنیک، عامل رشد آندوتلیال عروقی (VEGF)، فعالیت‌های بیولوژیکی VEGF، خانواده VEGF، تنظیم بیان ژن VEGF، التهاب، نقش التهاب در آنژیوژنز، فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-a)، فعالیت‌های بیولوژیکی TNF-a و نقش آن در رشد عروقی بیان شده است، ابعاد گوناگون فعالیت‌های تناوبی پر شدت و توان هوازی و در نهایت پژوهش‌های انجام شده درباره آثار ورزش و فعالیت بدنی بر فاکتورهای VEGF و TNF-a ارائه شده است.

۲-۲ مبانی نظری

۲-۲-۱ مکانیسم‌های اصلی عروقی شدن بافت

الف) **واسکلوژنز^۱**: تشکیل رگ‌های خونی جدید از آنژیوبلاست‌های تمایز یافته (سلول‌های آندوتلیال دوران جنینی)، در مدت رشد رویانی را واسکلوژنز می‌گویند. همچنین، واسکلوژنز بالغین از طریق فراخوانی، تکثیر و لوله سازی سلول‌های مشتق از مغز استخوان در جریان خون صورت می‌گیرد.

ب) **لنفوژنز^۲**: سیستم لنفاوی شبکه عروقی است که مایع میان بافتی را از لنف برداشته و آن را به خون برمی‌گرداند و نقش عمده‌ای در سیستم ایمنی دارد. تشکیل عروق لنفی از رگ‌های لنفی موجود را لنفوژنز می‌گویند [۴۲].

1 Vasculogenesis

2 Lymphangiogenesis

ج) **آرتریوژنز**^۱: فرآیندی است که در آن قطر شریانچه‌های موجود افزایش می‌یابد. آرتریوژنز در پاسخ به باریک و تنگ شدن یک شریان اصلی صورت می‌گیرد. به رشد سرخرگ‌های جانبی، افزایش قطر و ضخامت آرتریت‌ها اشاره می‌کند.

د) **آنژیوژنز (رگ‌زایی)**: فرایند تشکیل مویرگ‌های خونی جدید از مویرگ‌های خونی موجود را آنژیوژنز می‌نامند که به صورت جوانه زدن و تا حدودی از طریق انشعاب طولی رگ انجام می‌گیرد [۴۴]، [۴۳].

۲-۲-۲ آنژیوژنز

آنژیوژنز یا رگ‌زایی به فرایند بیولوژیکی جوانه زدن رگ‌های جدید از رگ‌های موجود در بافت اطلاق می‌شود. این واژه برای نخستین بار توسط هرتینگ^۲ در سال ۱۹۳۵ برای توصیف تشکیل عروق در جفت به کار رفت. پدیده‌ی آنژیوژنز برای اندام‌زایی و تکثیر و تمایز سلولی در دوره‌ی جنینی ضروری است [۴۵]. در انسان‌ها و حیوانات بالغ این پدیده مشاهده شده است که می‌توان آن را به دو شکل فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی طبقه‌بندی کرد. آنژیوژنز فیزیولوژیکی که فرآیندی به شدت تنظیم شده است در مواردی مثل ترمیم زخم، سیکل‌های قاعدگی، رشد جفت، لانه‌گزینی جنین و تخمک گذاری اتفاق می‌افتد، در حالی‌که، آنژیوژنز پاتوفیزیولوژیکی که اشاره به تکثیر غیرقابل کنترل آندوتلیوم مویرگی دارد در بیماری‌هایی مثل رتینوپاتی دیابتی^۳، آتروسکلروز^۴، رشد و متاستاز^۵ تومورها، پسوریازیس^۶، اسکلرودرمی^۷، آرتريت روماتوئید^۸ و اندومتريوز^۹ دیده می‌شود [۴۶]. آنژیوژنز در یک

1 Arteriogenesis

2 Herting

3 Diabetic retinopathy

4 Atherosclerosis

5 Metastasis

6 Psoriasis

7 Scleroderma

8 Rheumatoid arthritis

9 Endometriosis

بافت سالم بر اساس نوع تحریک اولیه، رشد مویرگ‌های جدید به دو صورت انجام می‌گیرد که عمدتاً از طریق جوانه زدن و تا حدودی از طریق دونیم شدن اتفاق می‌افتد [۴۲].

۳-۲-۲ مکانیسم آنژیوژنز

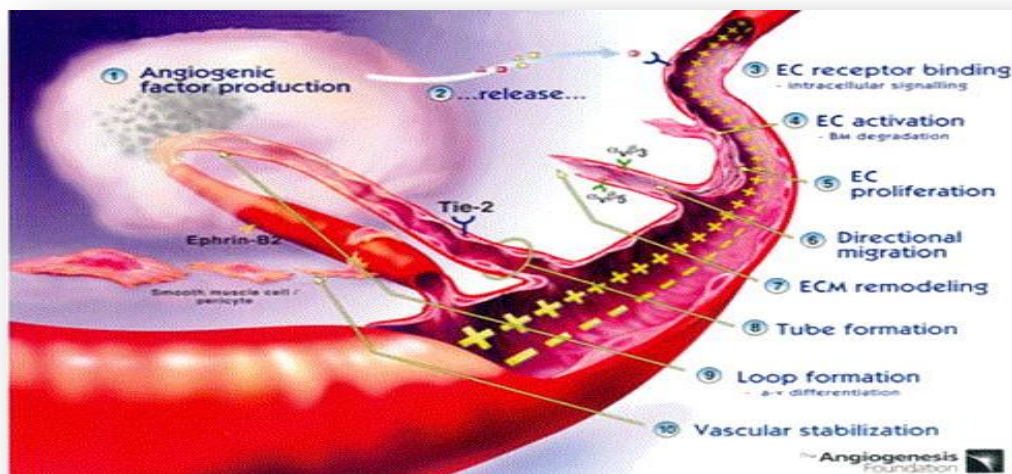
فرایند آنژیوژنز به فعل و انفعالات وسیع بین سلول‌ها و مولکول‌های مختلفی وابسته بوده و توسط پپتیدها و فاکتورهای تعدیل کننده‌ی متنوعی کنترل می‌شود [۴۶]. به‌منظور جوانه زدن عروق آبشاری از وقایع بایستی به‌وقوع به‌پیوندد که عبارتند از :

۱. تجزیه‌ی غشای پایه‌ی عروقی که از قبل وجود داشتند.

۲. مهاجرت سلول‌های آندوتلیال به فضای بین بافتی و به سمت یک محرک

۳. تکثیر سلول‌های آندوتلیال

۴. تشکیل غشای پایه‌ی جدید و بلوغ عملکردی (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲ مراحل آنژیوژنز

خلاصه مکانیسم آنژیوژنز از راه جوانه زدن به شکل زیر می‌باشند [۴۳]:

۱. تحریک سلول‌های آندوتلیال توسط عوامل رشدی مانند VEGF

۲. افزایش نفوذپذیری لایه سلول‌های آندوتلیال از راه تجزیه اتصالات پیوندی بین سلولی

۳. تکثیر سلول‌های آندوتلیال

۴. تخریب و تجزیه اجزای غشای پایه سلول‌های آندوتلیال و متعاقباً اجزای ماتریکس برون سلولی

۵. مهاجرت سلول‌های آندوتلیال با همکاری اجزای چسبندگی سلولی (مانند اینتگرین‌ها)^۱

۶. تشکیل مجرای جدید ناپایدار

۷. تشکیل غشای پایه در اطراف مویرگ جدید از راه به‌کارگیری پری سایت‌ها و سلول‌های

عضلانی صاف

۸. آمیزش رگ‌های خونی جدید با رگ‌های قبلی و آغاز جریان یافتن خون در آن‌ها

۲-۲-۴ محرک‌های آنژیوژنیک

محرک‌های آنژیوژنیک مجموعه عواملی هستند که باعث تحریک شکل‌گیری عروق عضله اسکلتی و عضله قلبی در هنگام فعالیت بدنی می‌شوند. مهم‌ترین این عوامل هیپوکسی، کشش‌های چرخه‌ای^۲ و استاتیکی^۳، تجمع متابولیت‌ها و نیروهای همودینامیکی^۴ (استرس برشی) هستند. تحقیقات زیادی در این زمینه صورت گرفته ولی هنوز معلوم نیست کدام از این عوامل تا چه حد در فرآیند عروقی شدن بافت نقش دارند.

1 Entegrines
2 Cyclic stretch
3 Static stretch
4 Shear stress

۱. هیپوکسی: به موقعیت‌های کلینیکی یا محیطی گفته می‌شود که هموستاز اکسیژن بافتی را به مخاطره می‌اندازد و در این شرایط سلول‌های هسته‌دار قادرند به کمبود اکسیژن پاسخ دهند. در شرایط هیپوکسی، افزایش چشمگیری در عامل قابل القای هایپوکسی (HIF-1)^۱ رخ می‌دهد. فعال سازی HIF-1 عملکردی (بیان ژنی اریتروپویتین، بیان ژنی VEGF، بیان ژنی آنزیم‌های گلیکولیتیک و غیره) را آغاز می‌کند که آثار منفی در معرض قرارگیری با هیپوکسی را کاهش می‌دهد. به‌طور کلی، هیپوکسی از راه تنظیم افزایشی VEGF یکی از مهم‌ترین و قوی‌ترین محرک‌هایی است که آنژیوژنز عضله اسکلتی را موجب می‌شود [۴۳].

۲. کشش چرخه‌ای و استاتیکی: کشش نسبت به تنش برشی، منجر به فعال سازی تیف وسیعی از سلول‌ها می‌شود. کشش از راه تحریک ترشح MMP-2^۲ در فرایند جوانه زدن عروقی مشارکت می‌کند. سلول‌های بدن دو نوع کشش را حس می‌کنند: کشش چرخه‌ای ناشی از چرخه‌های انقباضی است که در واحد زمان مکرراً تکرار می‌شود و کشش استاتیکی که ناشی از رشد و اتساع بافتی است. کشش چرخه‌ای به نوبه خود افزایش سریع‌تر و طولانی‌تر بیان VEGFR-2^۳ افزایش طول توبولی بیشتر، تشکیل انشعابات بیشتری را نسبت به کشش استاتیکی موجب می‌شود. کشش چرخه‌ای سبب تنظیم افزایشی عوامل آنژیوژنیک به ویژه VEGF و گیرنده‌های تیروزین کینازی Flt-1^۴، Tie2 و Tie-1 در سلول‌های آندوتلیال عروقی می‌شود و از این طریق فرایند آنژیوژنز را تسهیل می‌کند. کشش چرخه‌ای از یک مسیر مشترک و در ارتباط با تنش برشی در فرایند آنژیوژنز مشارکت می‌کند، ولی کشش استاتیکی از طریق مسیرهای وابسته به ERK^۵ و JNK^۶ موجب بیان VEGF و MMP-2 در سلول‌های میکرو عروقی می‌شوند [۴۳].

1 Hypoxia inducible factor-1

2 Matrix metalloproteinase-2

3 Vascular endothelial growth factor receptor-2

4 Fetal liver kinase

5 Intracellular regulated kinase

6 Jun N-terminal kinase

۳. انباشت متابولیت‌ها: از جمله محرک‌های آنژیوژنیک در عضلات و بافت‌ها، تجمع متابولیت‌هایی مانند آدنوزین است ولی هنوز مشخص نیست که آیا آدنوزین از راه افزایش VEGF در آنژیوژنز مؤثر است یا از روش‌های دیگر، نقش سایر متابولیت‌ها در فرآیند رگ‌زایی هنوز مشخص نیست [۴۷، ۴۸].

۴. تنش برشی: یک نیروی هیدرودینامیکی است که به دلیل اصطحاک جریان خون با دیواره‌ی عروق حاصل می‌شود و رابطه مستقیمی با سرعت جریان خون دارد. تنش برشی عمدتاً از راه تنظیم افزایشی mRNA اینتگرین‌ها در سطح داخلی عروق و فعال‌سازی آن‌ها و متعاقباً اتصال آن‌ها به لیگاند‌های ویژه خارج سلولی عمل می‌کنند. فشار برشی از راه دو نیم کردن عروق (انشعاب طولی) به رگ‌زایی منجر می‌شود [۴۵].

۲-۵-۲ عامل رشد آندوتلیال عروقی (VEGF)

از میان عوامل آنژیوژنیک، عامل رشد آندوتلیال عروق (VEGF) به‌عنوان قوی‌ترین میتوژن مخصوص سلول‌های آندوتلیال شناخته شده است. عامل رشد مشتق از آندوتلیال یا VEGF، یک پروتئین همودیم‌ر باند شونده به هپارین^۱ با وزن مولکولی ۴۵ کیلو دالتون است. VEGF دارای ۷ ایزوفرم A، B، C، D، E، F و PLGF^۲ است که در اثر اتصال متفاوت از ژن VEGF تولید می‌شوند. مطالعات زیادی نشان داده‌اند VEGF در تنظیم فرآیند رگ‌زایی در آزمایشگاه^۳ و در بدن موجود زنده^۴ درگیر است. این عامل مهم‌ترین عامل تحریک کننده آنژیوژنز است که توسط سلول‌های آندوتلیال بافت‌های مختلفی نظیر مغز، کلیه، کبد، طحال، عضله اسکلتی و قلبی و نیز شماری از سلول‌های سرطانی ترشح می‌شود [۴۹].

1 Heparin

2 Placental growth factor

3 In vitro

4 In vivo

۶-۲-۲ فعالیت‌های بیولوژیکی VEGF

عامل رشد آندوتلیال عروقی فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی دارد که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از [۴۲]:

۱. یک میتوز قوی برای سلول‌های آندوتلیال است که از سرخرگ‌ها، سیاهرگ‌ها و لنفاتیک‌ها منشعب می‌شود، در حالی که، بر انواع دیگر سلول‌ها، فعالیت میتوژنی معنی‌داری ندارد.

۲. VEGF بر آندوتلیوم عروقی موجب تحریک انتقال هگزوز می‌شود. در معرض قرار دادن سلول‌های آندوتلیال آئورت گاوی با VEGF موجب افزایش چشمگیر میزان انتقال هگزوز می‌شود. این عمل ممکن است با افزایش تقاضای انرژی در هنگام تکثیر سلول آندوتلیال یا التهاب ارتباط داشته باشد.

۳. VEGF موجب نشت عروقی در پوست می‌شود که این فعالیت در خوکچه هندی دیده شده است. القای VEGF موجب ایجاد و شکل‌گیری روزنه‌هایی در آندوتلیوم ونول‌های کوچک و مویرگ‌ها می‌شود که این رخداد با نشت‌پذیری عروقی ارتباط دارد.

۴. VEGF بیان VCAM-1^۱ و ICAM-1^۲ در سلول‌های آندوتلیال را زیاد می‌کند. این القا یا تحریک موجب چسبندگی سلول‌های کشنده طبیعی (NK)^۳ به سلول‌های آندوتلیال می‌شود. در سطح سلول‌های کشنده، دوگانه CD18 و VIA-4 وجود دارند که با VCAM-1 و ICAM-1 متصل می‌شوند.

۵. VEGF آثار تنظیمی بر سلول‌های خونی دارد. گزارش شده است VEGF ممکن است کیمیوتاکسی مونوسایت^۴ را افزایش دهد.

1 Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)

2 Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)

3 Natural killer (NK) cells

4 Monocyte chemotaxis

۶. VEGF آثار همودینامیکی دارد و موجب اتساع عروقی می‌شود که به دلیل وجود اسید نیتریک موجب کاهش فشارخون، تاکی کاردی موقت و کاهش برون ده قلبی می‌شوند. این ویژگی تنها مختص VEGF نیست، عامل‌های دیگر آنژیوژنیک مانند ^۱AFGF و ^۲BFGF این آثار را از خود نشان می‌دهند.

۷. VEGF تأثیر ضد لخته‌ای دارد که این اثر به علت بازداري انباشت پلاکت و مهار بیان و فعال سازی پروتئازهای سرین، اورکیناز و پلاسمینوژن اکتیویتور^۳ ناشی از VEGF می‌باشد که پلاسمینوژن را برای تولید آنزیم کلیدی ترومبولیتیک (انعقادی) و تبدیل به پلاسمین^۴ می‌شکنند.

۷-۲-۲ خانواده VEGF

گیرنده‌ها و لیگاندها اعضای خانواده VEGF را تشکیل می‌دهند (شکل ۲-۲).

۱-۷-۲-۲ گیرنده‌های VEGF

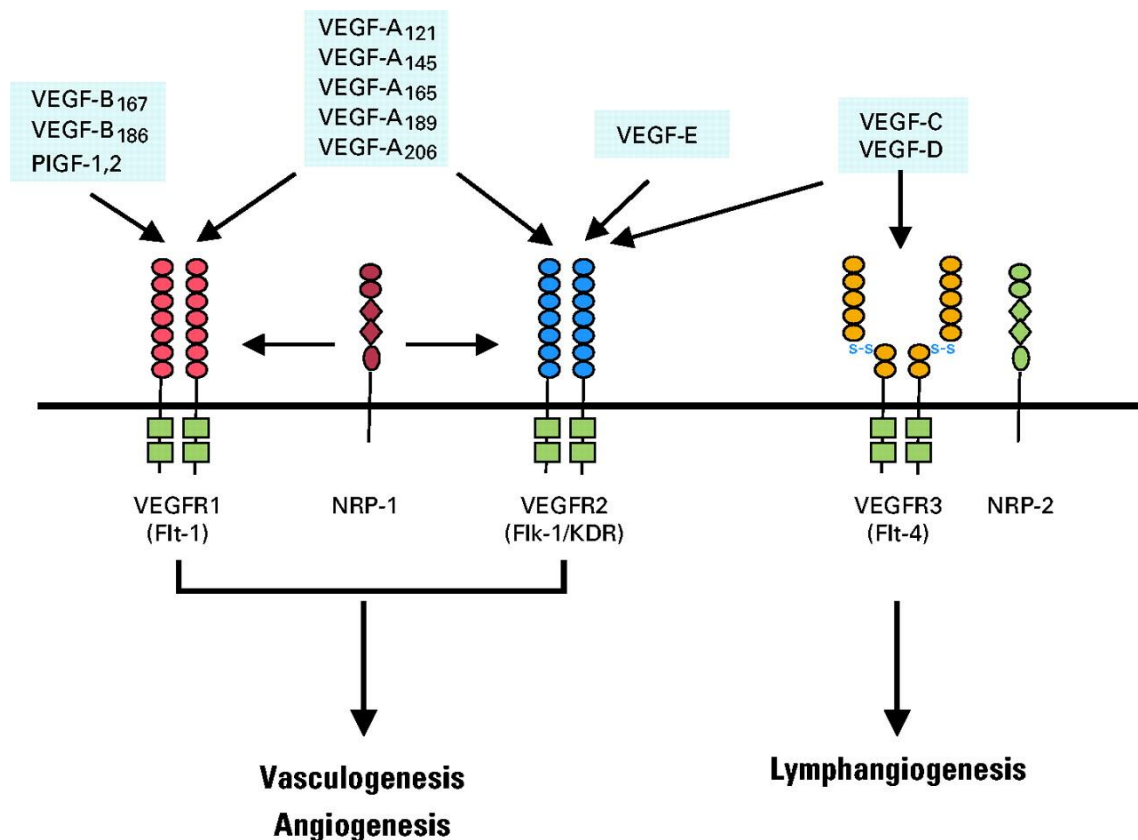
فعال‌ترین گیرنده‌های VEGF، سه گیرنده تیروزین کینازی ویژه عامل رشد آندوتلیال عروقی می‌باشد (شکل ۲-۲) [۵۰]. که عبارتند از:

۱. VEGFR-1 یا Flt-1 ۲. VEGFR-2 یا Flk-1 ۳. VEGFR-3 یا Flt-4 ۴. VEGFR-4 یا Flt-4

VEGFR-1,2 در آندوتلیوم عروقی و تا حدودی سلول‌های توموری بیان می‌شوند، ولی VEGFR-3 فقط در آندوتلیوم عروق لنفاوی بیان می‌شوند. همه این گیرنده‌ها در ناحیه برون سلولی هفت پهنه‌ی ایمونوگلوبینی دارند و نیز یک توالی تیروزین کینازی که توسط قسمت‌های کینازی از هم جدا می‌شوند. VEGFR-2 مهم‌ترین گیرنده VEGF است که آثار میتوژنیک آن را میانجی‌گری می‌کند و

1 Acidic fibroblast growth factor
2 Basic fibroblast growth factor
3 Plasminogen activators
4 Plasmin
5 Fms-like tyrosin kinase
6 Fetal liver kinase
7 Kinase domain region

برای تفکیک و تکثیر سلول‌های آندوتلیال در فرایند آنژیوژنز ضروری است. همچنین، یک مولکول گلیکوپروتئینی به نام نوروپلین یک^۱، اختصاصاً به‌عنوان گیرنده‌ی VEGF-A₁₆₅ عمل می‌کند و موجب افزایش تأثیر میتوژنیک VEGFR-2 می‌گردد. گیرنده‌های تیروزین کینازی ۱ و ۲ تمایل زیادی برای اتصال به VEGF دارند. Flt-1 و Flk-1 هر دو، دامنه‌ای شبه ایمونوگلوبولین در ناحیه خارج سلولی دارند. مطالعات دیگری نشان داده‌اند نواحی خارج سلولی شبه ایمونوگلوبولین ۲ و ۳ گیرنده‌های VEGFR-1 و VEGFR-2 مهم‌ترین قسمت اتصال لیگاندی هستند. VEGFR-1 فعالیت کینازی ضعیفی دارد و نقش آن در فرایند آنژیوژنز هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده است [۵۱].



شکل ۲-۲ خانواده VEGF و گیرنده‌های آنها

1 Neuropilin-1

۲-۷-۲-۲ لیگاندها

تاکنون هفت نوع عامل رشد آندوتلیال عروقی شناسایی شده است [۵۰]. که عبارتند از: VEGF-

A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F و PLGF^۱

همه‌ی این لیگاندها همولوگی از VEGF می‌باشند. ایزوفرم‌های A و B بیشتر برای ساخت عروق خونی و ایزوفرم‌های C و D برای ساخت عروق لنفاوی به کار می‌روند. فراوان‌ترین و فعال‌ترین ایزوفرم، VEGF-A می‌باشد. مهم‌ترین لیگاند این عامل، VEGF-A می‌باشد.

VEGF-A: گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۳۴-۴۲ کیلو دالتون است که دارای هفت ایزوفرم است که به ترتیب متشکل از ۱۴۵، ۱۲۱، ۱۴۸، ۱۶۵، ۱۸۳، ۱۸۹، ۲۰۶ اسید آمینه می‌باشند. نشان داده شده است VEGF-165 از نظر بیولوژیکی، فعال‌ترین ایزوفرم می‌باشد و قابلیت اتصال به هر دو گیرنده VEGFR-1 و VEGFR-2 را دارد. پلاسمین که در تخریب ماتریکس برون سلولی نقش دارد، هم مستقیم از راه هضم اجزای غشای پایه و هم غیرمستقیم از راه فعال کردن کلاژنازها، باعث رها شدن VEGF-165 می‌شود.

VEGF-B: در سال ۱۹۹۵ کشف شد که دو ایزوفرم ۱۶۷ و ۱۶۸ اسید آمینه‌ای دارد (به ترتیب با وزن مولکولی ۲۱ و ۳۲ کیلو دالتون). این نوع VEGF در عضله قلبی و اسکلتی به وفور یافت می‌شود.

VEGF-C: وزن مولکولی ۴۶/۹ کیلو دالتونی دارد و به‌طور عمده در عضله قلبی، غده تیروئید و تخمدان یافت می‌شود. این لیگاند در آنژیوژنز و لنفوژنز ترمیم زخم‌ها نقش دارد.

VEGF-D: عمدتاً در ریه، روده کوچک، کولون و عضله قلبی وجود دارد و در دوران جنینی باعث رشد ریه‌ها می‌شود.

1 Placental growth factor

VEGF-E: لیگاندی است که ساختار اسید آمینه‌ای آن ۱۹-۲۵ درصد VEGF-A و هیچ پهنه‌ی آشکاری ندارد. این لیگاند تنها در آنژیوزنز پاتولوژیکی که ناشی از عوامل ویروسی باشد دخیل است.

۲-۷-۳ پیام‌رسانی گیرنده‌های VEGF

تنظیم نفوذ پذیری و نشت پذیری عروقی: VEGF در ابتدا تنها به‌عنوان عامل افزایش دهنده نشت پذیری و نفوذ پذیری عروقی شناخته می‌شد. با وجود این، هنوز مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی آن به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند. تشکیل نواحی ویژه و شبکه مانند غشای پلاسمایی که به محلول‌های کوچک نفوذپذیرند مکانیسم مهمی است که با VEGF تنظیم می‌شوند. عامل رشد آندوتلیال عروقی فسفریله شدن اجزای چسبنده بین سلول‌های آندوتلیال مانند β -کاتنین^۱ و VE-کاده‌رین^۲ و نیز پروتئین‌های اتصالات محکم مانند اوکلودین^۳ را میانجی‌گری می‌کند و از این راه به افزایش نفوذپذیری عروقی منجر می‌شود [۵۲، ۵۰].

مهاجرت سلول‌ها آندوتلیال: VEGF به سه روش زیر می‌تواند باعث مهاجرت سلول‌های آندوتلیال شود [۵۳].

۱. VEGF باعث تنظیم افزایشی بیان آنزیم‌های متالوپروتئینازهای ماتریکس خارج سلولی می‌شود که این آنزیم‌ها از راه تخریب غشای پایه، زمینه مهاجرت سلول‌های آندوتلیال را فراهم می‌آورند.

۲. VEGF باعث تحریک فسفریله شدن تیروزین FAK^۴ می‌شود. اتصال FAK با سوبسترای خود (paxilin)، برای تنظیم تغییر و تبدیل چسبنده موضعی سازماندهی، سازمان‌دهی فیلامنت اکترین و مهاجرت سلول حیاتی است.

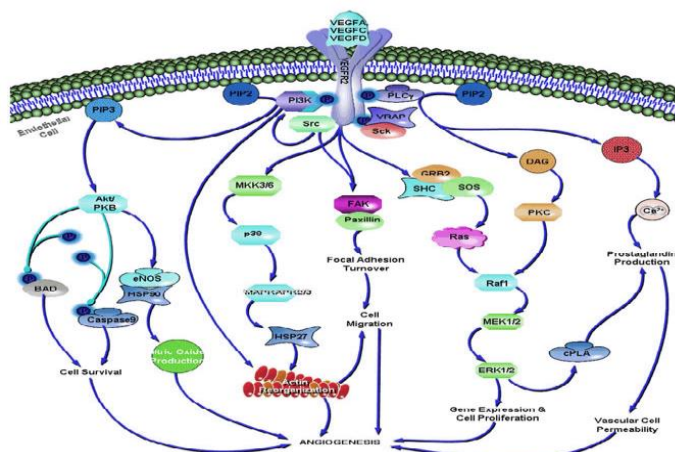
1 β -catenin

2 Vascular endothelial(VE)- cadherin

3 Occludin

4 Focal adhesion kinase

۳. VEGF موجب تولید NO^۱ می‌شود و NO باعث حرکت نردبانی شکل و مهاجرت سلول‌های آندوتلیال می‌شود. هرچند که این مکانیسم در حد فرضیه است و مکانیسم واقعی آن هنوز مشخص نشده است.



شکل ۲-۳ مسیرهای پیام‌رسانی VEGF

بقای سلول‌های آندوتلیال: VEGF از راه فعال‌سازی مسیر درون سلولی PI3K^۲ به فعال شدن مسیر AKt/PKB^۳ منجر می‌شود. این مسیر با کاهش فعالیت پروتئین‌های آپوپتوزی و افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی در نهایت افزایش سلول‌های آندوتلیال را باعث می‌شود [۵۴].

تکثیر سلول‌های آندوتلیال: VEGF با فسفریله کردن تیروزین‌های موجود بر روی گیرنده‌های VEGFR-2 باعث می‌شود در سلول‌های آندوتلیال تغییراتی ایجاد شود که این به نوبه خود به فعال شدن مسیر پیام‌رسانی ERK و MAPK^۴ منجر می‌گردد. ERK می‌تواند در هسته‌ی سلول‌های آندوتلیال، عوامل نسخه برداری را فسفریله و فعال کند. این امر در نهایت باعث نسخه برداری ژن c-fos شده و موجب افزایش تکثیر سلول‌های آندوتلیال می‌شود [۵۰].

1 Nitric oxide
2 Phosphatidylinositol 3 kinase
3 Protein kinase B
4 Mitogen-activated protein kinase

۸-۲-۲ تنظیم بیان ژن VEGF

۱. هایپوکسی: نسخه برداری ژن VEGF به طور قابل توجهی توسط هایپوکسی تحریک می شود که این نوع نسخه برداری در نتیجه اتصال HIF-1 با یک HRE^۱ روی می دهد [۵۵، ۵۶].
۲. سایتوکاین ها و عوامل رشدی: $TNF-\alpha$ ^۲ که یک سایتوکاین التهابی می باشد طیف وسیعی فعالیت های بیولوژیکی از جمله رگ زایی دارد و غیرمستقیم تشکیل رگ های جدید را تحت تأثیر قرار می دهد. آزادسازی مولکول هایی مانند VEGF-A, VEGF-C, PAF^۳, bFGF و تنظیم دستگاه پروتئولیزی (uPA) رویدادهای بیولوژیکی هستند که با $TNF-\alpha$ آغاز می شوند. چندین عامل رشدی دیگر مانند $TGF-\beta$ ^۴, PDGF-BB^۵, EGF^۶ بیان ژن VEGF-A را تحریک می کنند [۵۷].
۳. $COX1,2$ ^۷: که برای عملکرد طبیعی کلیه و پلاکت های خونی بیان می شوند یکی دیگر از عواملی است که موجب آزادسازی VEGF می شود و مهارکننده های سیکلواکسیژنازها آنژیوزنز را مهار می کنند.
۴. پروستاگلاندین ($PGE-2$)^۸: محرک قوی استخوان سازی در داخل بدن به شمار می رود باعث القای سریع و تولید VEGF در سلول های استخوان در شرایط آزمایشگاهی می شود. از آنجا که آنژیوزنز با فاز اولیه شکل گیری استخوان همراه است، القای VEGF می تواند نقش کلیدی را در تحریک $PGE-2$ تشکیل استخوان ایفا کند [۵۰].

1 Hypoxia response element

2 Tumor necrosis factor-alpha

3 Platelet-activating factor

4 Transforming growth factor β

5 Epidermal growth factor

6 Epidermal growth factor

7 Cyclooxygenase

8 Prostaglandin

۵. **تنظیم هورمونی:** هورمون‌های مختلف مانند استروژن، پروژسترون و تستوسترون موجب تحریک رونویسی و افزایش بیان ژن VEGF-A در انسان و در نمونه‌های حیوانی - هردو - می‌گردند. تأثیر هورمونی بر سایر ایزوفرم‌های VEGF ناچیز است [۵۰].

۹-۲-۲ اهمیت و نقش فرآیند آنژیوژنز در فعالیت بدنی

با فعالیت ورزشی میزان سوخت و ساز افزایش می‌یابد، این افزایش سوخت و ساز باید همراه با دو فرآیند کلیدی باشد. اولاً، این که باید میزان اکسیژن رسانی به بافت افزایش یابد؛ ثانیاً، مواد زائد مانند اسیدلاکتیک و CO_2 باید خیلی سریع از بدن دفع شوند. این دو فرآیند به سیستم گردش خون توسعه یافته نیازمند می‌باشند. میزان جریان خون عضله هنگام فعالیت تا ۶۰ درصد برون ده قلب افزایش می‌یابد. برای حمل این مقدار جریان خون به بافت‌ها نیازمند روی دادن دو فرآیند آنژیوژنز و آرتریوژنز می‌باشد [۵۸]. این تغییرات سازگاری‌های بدن به نیازهای متابولیکی هنگام فعالیت ورزشی را نشان می‌دهند. از طرفی، یکی از عواملی که می‌تواند هنگام فعالیت ورزشی پیش‌آید و ممکن است مانع از ادامه تمرین شود، انتقال اکسیژن به بافت‌ها و دفع دی‌اکسید کربن از بافت‌های فعال بدن است. این عوامل می‌توانند عامل مهمی در کاهش ظرفیت تمرینی فرد باشد. در افراد تمرین کرده به‌علاوه توسعه شبکه مویرگی، چون تعداد مویرگ‌ها افزایش می‌یابد، بنابراین، مسافت انتشار برای انتقال اکسیژن کاهش و سطح انتشار افزایش می‌یابد. این افزایش عروق باعث کاهش سرعت جریان خون و افزایش زمان تبادل اکسیژن و مواد متابولیکی می‌شود که این موارد عامل مهمی برای موفقیت ورزشکار به حساب می‌آیند. افزایش تبادل، یعنی، تحویل بیشتر اکسیژن به بافت‌ها و دفع مواد زائد از بافت‌ها که باعث افزایش ظرفیت عملکرد افراد پس از تمرینات استقامتی می‌شود. همچنین، افزایش سطح آندوتلیال باعث افزایش گلوکز مصرفی، افزایش حساسیت انسولینی و افزایش تجزیه تری‌گلیسرید خون به‌وسیله افزایش فعالیت LPlase^۱ موجود در سلول‌های آندوتلیال در بدن می‌شود [۴۷، ۵۹].

1 Lipoprotein lipase

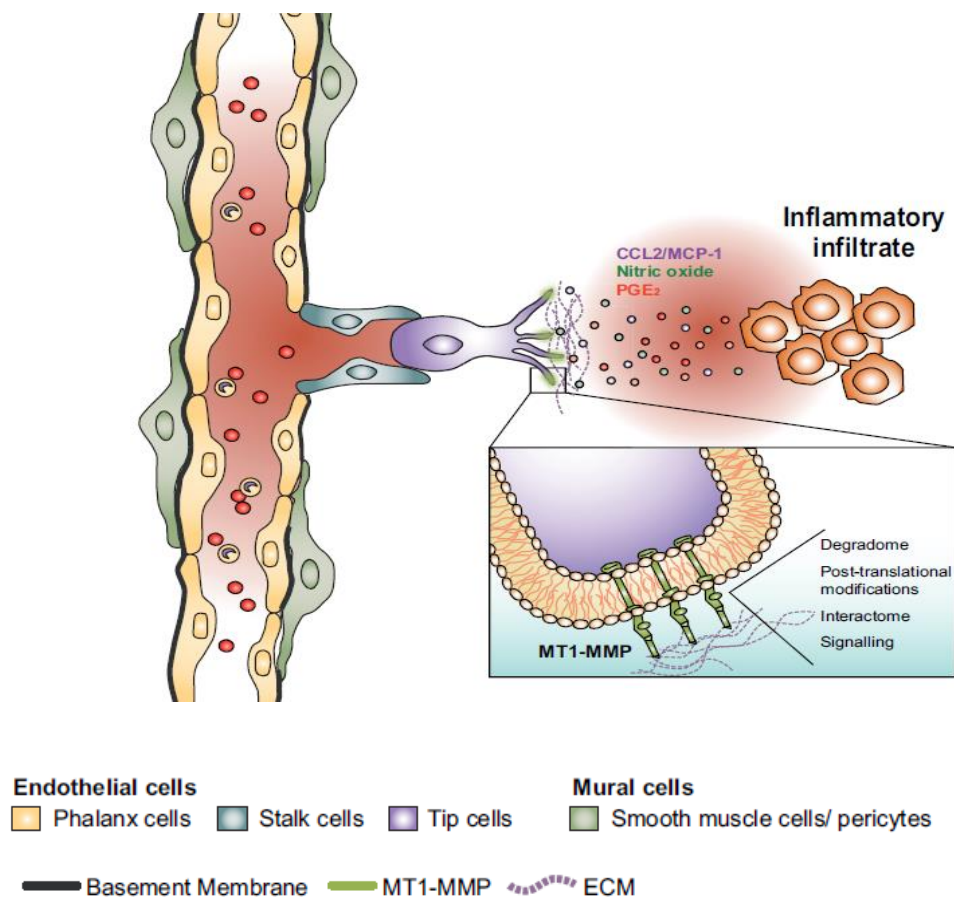
۲-۲-۱۰ التهاب

التهاب سازوکار طبیعی است که میزبان را از عفونت و دیگر عوامل مضر حمایت می‌کند که ابتدا با کشتن پاتوژن‌ها و به همان نسبت فرایندهای تخریب بافت آغاز و به حفظ هموستاز در حالت عفونت و یا جایگاه‌های تخریب شده کمک می‌کند. این حالت با نشانه‌هایی چون قرمزی، تورم، گرما، درد و کاهش عملکرد مشخص می‌شود [۶۱]. التهاب در تعامل انواع بسیاری از سلول‌ها و تولید و پاسخ به بسیاری از واسطه‌های شیمیایی دخالت دارد. کاملاً واضح است که هر جا التهابی رخ می‌دهد، برای آسیب به میزبان رخ نمی‌دهد، بلکه، خود محدود کننده و برطرف کننده سریع مشکل است. این تنظیم خودکار ایمنی شامل ساز و کارهای فیدبک منفی چون ترشح سایتوکاین‌های ضد التهابی، مهار آبشارهای سیگنال‌دهی التهابی، دفع گیرنده‌های واسطه‌های التهابی و فعالیت سلول‌های تنظیمی است. همچنین، پاسخ‌های التهابی تنظیم شده برای حفظ سلامتی و هموستاز ضروری هستند. التهاب پاتولوژیکی شکل کاهش تحمل یا کاهش فرایندهای تنظیمی است و در جایی که این فرایندها افزایش یابد، آسیب جبران ناپذیری برای بافت‌های میزبان رخ می‌دهد که می‌تواند موجب بیماری شود [۶۱].

۲-۲-۱۱ نقش التهاب در فعالیت‌های آنژیوژنزی

بارها مشاهده شده است که رشد جوانه‌های عروقی در انسان و حیوانات بالغ، با نفوذ عوامل و رخداد فرایندهای التهابی همراه است. همچنین شواهد رو به رشدی نشان می‌دهند که از مشخصه‌های مهم آنژیوژنز در بزرگسالان، وجود فعل و انفعالات بین اندوتلیال و سلول‌های التهابی، مخصوصاً مونوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌باشد. اگرچه VEGF عمدتاً به وسیله سلول‌های اندوتلیال ترشح می‌شود، اما لکوسیت‌ها نیز منبع مهم ترشحی برای این VEGF و دیگر سایتوکاین‌های پروآنژیوژنیک از جمله $TNF-\alpha$ ، کموکاین‌ها (CCL2/MCP-1 و IL-8)، فاکتورهای رشدی و پروتئازها به‌شمار می‌روند که ممکن است با عملکرد خود باعث القاء یا تعدیل پاسخ‌های عروقی شوند [۶۲]. برخی از اعمالی که سلول‌های التهابی برای پیشبرد فرایندهای پروآنژیوژنیک انجام می‌دهند عبارتند از: ارتقای فعالیت‌های

گیرنده VEGFR-3 در آنژیوژنز و لنفوژنز، تولید کموکاین‌ها و فاکتورهای پروآنژیوژنیک و شرکت در آنژیوژنز بافت ریوی القاء شده با ایسکمی. تمام این موارد، در نهایت، می‌توانند به ساخت لوله‌های جدید در ساختارهای اندوتلیالی منجر شوند [۶۳]. مکانیسم‌های مولکولی که به وسیله آن‌ها سلول‌های تک هسته‌ای و سلول‌های در گردش EPCs به جوانه‌های عروقی در حال رشد فراخوان می‌شوند و در ساخت عروق جدید شرکت می‌کنند، هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند، هرچند تصور بر این است که پروتئازها یک نقش مهم در این زمینه ایفا می‌کنند [۵۹]. تعامل بیش از حد بین سلول‌های التهابی و سلول‌های اندوتلیال در طول آنژیوژنز، با چندین بیماری التهابی همانند پسوریاس و روماتوئید آرتریت همراه است که مشخصه آن‌ها توسعه بیش از حد بستر عروقی است در موضع می‌باشد.



شکل ۲-۴ نفوذ سلول‌های التهابی و نقش آن‌ها در رشد جوانه‌های عروقی

۱۲-۲-۲ سایتوکاین‌ها

سایتوکاین‌ها پلی پپتید های کوچکی هستند که در ارتباط بین سلول‌های لنفوئیدی و غیر لنفوئیدی دخالت می‌کنند [۶۴]. عبارت سایتوکاین به گروهی از عوامل تنظیم کننده عمومی گفته می‌شود که شامل لنفوکاین‌های ساخته شده از لنفوسیت‌ها و مونوکاین‌های ساخته شده از مونوسیت‌ها می‌شود. در واقع، انواع مختلفی از سلول‌های ایمنی و غیر ایمنی قادرند سایتوکاین‌ها را تولید کنند. سایتوکاین‌ها در درجه اول عوامل تنظیم کننده رشد هستند، ولی ممکن است اعمال دیگری نظیر ایفای نقش در پاسخ‌های التهابی نیز داشته باشند. یک سایتوکاین خاص ممکن است بر روی سلول‌های هدف مختلفی تأثیر بگذارد و باعث به‌وجود آمدن پاسخ‌های ایمنی متفاوتی شوند. سایتوکاین‌ها عملاً در تمام فعالیت‌های ایمنی درگیر شده و ممکن است بر روی سلول‌های غیر ایمنی نیز اعمال اثر کنند. از طرفی دیگر، برخی از عوامل طبیعی دیگر ممکن است در عملکرد سایتوکاین‌ها تداخل کرده و اعمال آن‌ها را مهار کنند. گروه‌های متعددی از سایتوکاین‌ها می‌توانند اعمال متفاوتی را انجام دهند. سایتوکاین‌هایی که پیشوند یکسان دارند (مانند اینترلوکین) لزوماً از نظر ساختمانی و عملکرد به هم وابسته نیستند [۶۵].

۱۳-۲-۲ فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF)

TNF ها یکی از مهم‌ترین واسطه‌های دفاع میزبان بر علیه عفونت‌های ویروسی و باکتریایی به حساب می‌آیند TNF آلفا و بتا به طور موازی در جهت از بین بردن برخی از سلول‌های هدف عمل می‌کنند. این سایتوکاین‌ها فعالیت سلول کشی سلول‌های TCD8، NK و ماکروفاژها را تحریک و فعالیت ضد باکتریایی ماکروفاژها را تقویت می‌کند. این سایتوکاین‌ها به دو صورت موضعی و عمومی عمل می‌کنند. عملکرد موضعی آن‌ها در بافت‌ها شامل افزایش نفوذپذیری عروق و مهاجرت گلبول‌های سفید به محل بروز عفونت یا التهاب می‌باشد. آثار عمومی TNF به همراه اینترلوکین یک و شش

باعث ایجاد پروتئین‌های مرحله حاد و تب می‌گردد. عملکرد موضعی این سایتوکاین‌ها می‌تواند زیان‌آور بوده و در صورت عدم اقدامات درمانی ممکن است باعث گسترش عفونت و ایجاد شوک شود [۶۶].

۲-۱۳-۱ فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF- α)

سایتوکینی التهابی است که آثار بسیار زیادی چون افزایش دمای بدن، کاهش اشتها و تحریک دیگر سایتوکاین‌های تعدیل‌کننده ایمنی دارد. TNF- α سایتوکاینی است که نقش التهاب سیستماتیک دارد و عضو خانواده‌ای از سایتوکاین‌هاست که واکنش مرحله حاد را تحریک می‌کند. نقش اولیه TNF در تنظیم ایمنی سلولی است. TNF می‌تواند مرگ برنامه ریزی شده سلولی را القاء و موجب التهاب شود. از سوی دیگر، می‌تواند با عملکرد خود تولید تومور را مهار کند یا بر رشد آن دامن بزند. همچنین، در مهار تکثیر ویروس می‌تواند مؤثر واقع شود [۶۵].

TNF- α توسط ماکروفاژها، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، سلول‌های T و سلول‌های NK، به دنبال تحریک باکتریایی ترشح می‌شود. سنتز TNF آلفا توسط محرک‌های بسیاری چون اینترفرون‌ها، IL-2 و کمپلکس‌های ایمنی القا می‌شود. از سوی دیگر تولید TNF توسط IL-6 و TGF- β مهار می‌شود. TNF- α پروتئین ۱۵۷ اسید آمینه‌ای است که هیچ جایگاه گلیکولیزه شده‌ای ندارد. طول ژن انسانی TNF- α حدود ۳,۶Kb است که حاوی ۴ اگزون می‌باشد و نقشه کروموزومی آن 6p23-2q12 می‌باشد [۶۵، ۶۶].

دو نوع گیرنده برای TNF یافت شده است که گیرنده نوع I دارای وزن مولکولی حدود 33-60Kda و گیرنده نوع II حدود 75-80Kda وزن دارد. این گیرنده‌ها در همه انواع سلول‌های بدنی به جز گلبول‌های بالغ یافت می‌شوند. همچنین TNF دارای گیرنده‌های محلول نیز می‌باشد که این گیرنده می‌تواند اثر ضد تکثیری TNF را مسدود کرده و از این طریق تأثیر زیان‌بار TNF را کاهش دهد [۶۷].

۲-۲-۱۴ فعالیت های بیولوژیکی TNF

TNF- α طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی را نشان می‌دهد. فعالیت‌های متنوع TNF- α را می‌توان به صورت زیر طبقه بندی نمود که معمولاً این فعالیت‌ها را به همراه IL-1 β و IL-6 به انجام می‌رساند.

تأثیر بر روی هیپوتالاموس: تحریک محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال، کاهش اشتها، تب

تأثیر بر کبد: تحریک واکنش مرحله حاد، القای مقاومت انسولینی

علاوه بر این موارد، TNF- α به‌عنوان جاذب شیمیایی بالقوه نوتروفیل‌ها (که کمک می‌کند جهت مهاجرت، به سلول‌های اندوتلیال متصل شوند) عمل می‌کند. همچنین با تأثیر بر روی ماکروفاژها، تحریک فاگوسیتوز، سنتز اینترلوکین ۱- و تولید لیپید التهابی پروستاگلاندین E2 را در پی دارد. افزایش تراکم TNF- α در یک منطقه باعث ایجاد علائم التهابی همچون دما، درد، قرمزی و تورم می‌شود [۶۵].

برخی از زیر گروه‌های سلول‌های T تنها در حضور IL-2 و TNF- α موجب تکثیر و تمایز سلول‌های β می‌شوند. همچنین TNF- α بسیار شبیه به IL-1 β می‌باشد. تأثیر آن با مقادیر کم، متوسط و زیاد، شبیه به IL-1 β می‌باشد، اما با وجود شباهت‌ها، بین TNF- α و IL-1 β اختلافاتی نیز دیده می‌شود. به عبارتی IL-1 β حتی در غلظت‌های زیاد قادر نیست مرگ سلولی را القاء کند و به تنهایی قادر به ایجاد شوک سپتیک نیست [۶۷].

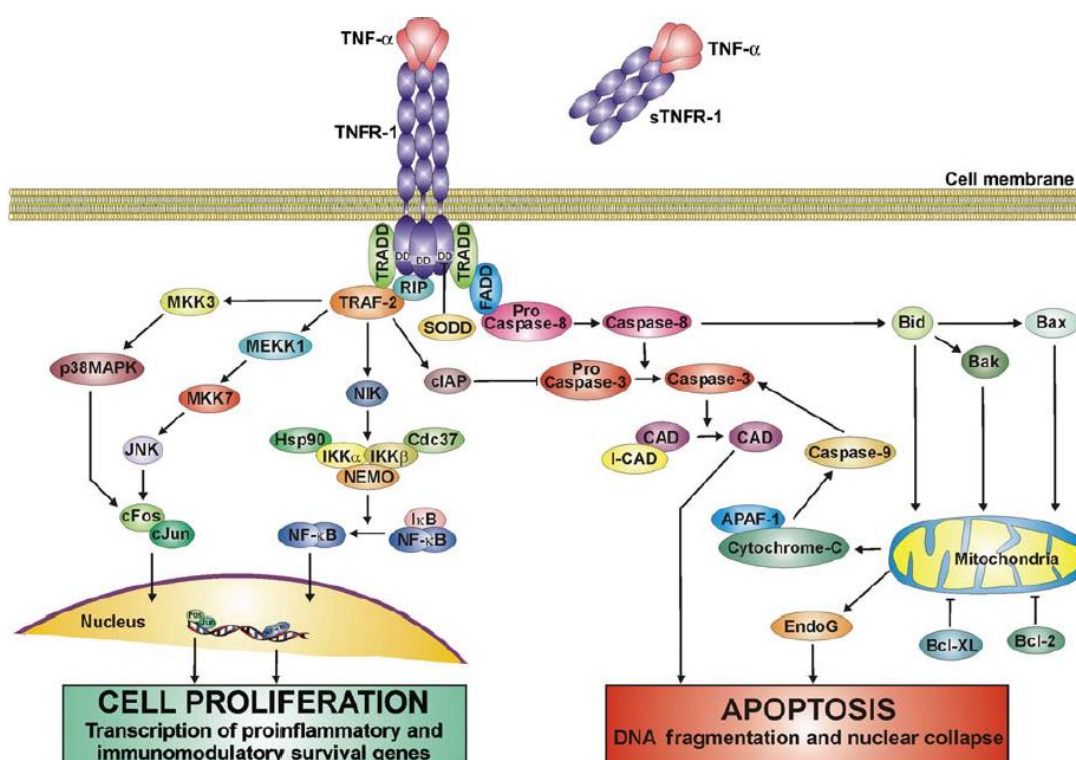
۲-۲-۱۵ نقش TNF- α در فرایندهای آنژیوژنزی شروع ۶

در التهاب و رگ‌زایی، TNF- α یک نقش دوگانه بازی می‌کند. TNF- α هم در تخریب و هم در بازبانی بافتی دخیل می‌باشد و این نقش‌ها توسط زمینه‌ای که این سایتوکاین در آن فعالیت می‌کند تعیین می‌شوند. به‌طور مثال، در رشد تومور و گسترش سرطان، دوز بالای القای بیرونی از این

سایتوکاین باعث القای مرگ سلول‌های توموری می‌شود، در حالی که سطوح پایین درونی بدن $\text{TNF-}\alpha$ موجب ترویج و گسترش تومور می‌شود [۶۸]. در طول ۱۵ سال گذشته، گزارشات متناقض و جالبی از در مورد تأثیر $\text{TNF-}\alpha$ بر روی آنژیوژنز ثبت شده است. در ۱۹۸۷، در شرایط آزمایشگاهی، $\text{TNF-}\alpha$ به‌عنوان یک میانجی ضد رگ‌زایی قوی توصیف شد، اما در همان سال آزمایشات انجام شده در داخل بدن نشان از تأثیر پروآنژیوژنیک این سایتوکاین داشتند. چند ماه بعد، محققان دیگری گزارش کردند که $\text{TNF-}\alpha$ یک میانجی محوری آنژیوژنیک ناشی از عملکرد ماکروفاژ می‌باشد. این یافته‌ها خاطر نشان کردند که سلول‌های التهابی و میانجی‌های موجود در محیط تومور، احتمالاً یک نقش هماهنگ در آنژیوژنز بازی می‌کنند [۶۹]. در حال حاضر، به‌طور گسترده‌ای پذیرفته شده است که $\text{TNF-}\alpha$ یک فاکتور آنژیوژنیک مهم به‌حساب می‌آید [۷۰]. باید خاطر نشان کرد که در التهاب و بهبود زخم، $\text{TNF-}\alpha$ با تسریع فرایندهای آنژیوژنیک، موجب تسریع در التیام و بهبودی می‌شود. در رشد تومورها، $\text{TNF-}\alpha$ ممکن است با توسعه بستر مویرگی و شرکت در تخریب اندوتلیوم به پیشرفت سرطان کمک کند. در همین راستا، گزارش شده است که $\text{TNF-}\alpha$ از طریق بیان افرین A1 در EC به پیشبرد آنژیوژنز کمک می‌کند. در مقابل، دیگر محققان گزارش کردند که به دلیل آنکه $\text{TNF-}\alpha$ موجب کاهش ثبات سیکلین mRNA می‌شود، توقف رشد در EC را تشدید می‌کند. همچنین، $\text{TNF-}\alpha$ در القای کموکاین‌ها که فرایندی ضروری در سازوکار نفوذ ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها می‌باشد، دخیل است [۶۹].

نقش $\text{TNF-}\alpha$ و دیگر سایتوکاین‌های پیش التهابی و کموکاین‌ها به‌عنوان میانجی‌های بین سلولی در آنژیوژنز، که در ماکروفاژها و EC به اثبات رسیده است، با FGF-2 و استئوپوننتین در ارتباط می‌باشند. استئوپوننتین یک اسید فسفریله شده حاوی RGD گلیکوپروتئین می‌باشد که به‌عنوان یک جزء حرکت‌پذیر در ماتریکس برون سلولی و یک مولکول محلول مطرح می‌باشد [۷۱]. استئوپوننتین یک سایتوکاین قدرتمند است که نقش مهمی در فعالیت‌های ماکروفاژ/ مونوسیت بازی می‌کند و در توسعه التهاب، رم‌دیلینگ بافتی و متاستاز تومور اهمیت زیادی دارد. در شرایط آزمایشگاهی، سلول‌های اندوتلیالی که مورد هدف القای IL-1 واقع می‌شوند، و همچنین در طول آنژیوژنز، دیده شده است که

استئوپونتین دچار تنظیم مثبت می‌شود [۷۲]. این موضع گویای این واقعیت است که احتمالاً استئوپونتین اثرات آنژیوژنیک خود را به صورت مستقیم بر روی سلول‌های اندوتلیال و یا به صورت غیر مستقیم از طریق تعامل با سلول‌های بیگانه خوار تک هسته‌ای اعمال می‌دارد. علاوه بر این، استئوپونتین اثرات عمیق پروآنژیوژنیک بر مونسیت‌های انسانی دارد. با توجه به $TNF-\alpha$ ، استئوپونتین بیان آن را در سلول‌های تک هسته‌ای انسانی زیاد می‌کند [۷۲]. این یافته‌ها به طور کلی متذکر می‌سازند که در فعالیت‌های پروآنژیوژنیک، نفوذ سلول‌های تک هسته‌ای از اهمیت بالایی برخوردار است و از طرف دیگر، سایتوکاین‌هایی چون $TNF-\alpha$ و استئوپونتین در این نفوذ سلول‌های التهابی نقش مؤثر دارند [۶۹].



شکل ۵-۲ نقش دوگانه $TNF-\alpha$ در تکثیر و مرگ سلولی

۱۶-۲-۲ تمرین پر شدت اینتروال (HIIT)

تمرین در شدت بالا نقش کلیدی در ایجاد حداکثر سازگاری فیزیولوژیکی و عملکرد بازی می‌کند [۷۳]. این تمرینات می‌تواند شامل تمرینات تداومی و یا تناوبی باشد. پژوهشگران مختلف تأکید دارند که تمرین تناوبی شدید، روشی مؤثرتر برای افزایش سازگاری فیزیولوژیکی و بهبود عملکرد ورزشکاران تمرین کرده‌ی استقامتی است [۷۴]. پژوهش‌ها حاکی از آن است که تمرین اینتروال سرعتی کوتاه مدت، سبب کاهش خستگی و افزایش سازگاری فیزیولوژیک شده و همراه با کاهش بار تمرینی موجب بهبود قابلیت و مدت عملکرد ورزشکاران می‌شود [۷۵].

تمرین اینتروال شدید (HIIT) توصیف فعالیت بدنی است که شامل فعالیت‌های انفجاری تناوبی کوتاه مدت با دوره‌های استراحت یا فعالیت با شدت کم است. تمرینات HIIT با سازگاری‌های خاص فیزیولوژیکی و به‌وسیله فاکتورهای زیادی (شدت، مدت و تعداد تکرار انجام شده و همچنین مدت زمان و الگوی فعالیت در زمان ریکاوری) تغییر پذیر هستند [۷۶]. با توجه به پروتکل‌های مختلفی که از HIIT در پژوهش‌ها مورد استفاده قرار گرفته است، HIIT را می‌توان از دو دیدگاه تقسیم بندی نمود. تقسیم بندی اول از نظر زمان و هله‌های تمرینی خیلی شدید است که شامل ۳ دسته می‌شود:

HIIT با و هله‌های فعالیت کوتاه مدت (۱۰ ثانیه تا ۱ دقیقه با شدت ۱۲۰-۱۰۰ درصد VO2max)

HIIT با و هله‌های فعالیت متوسط (۳-۱ دقیقه با شدت ۱۰۰-۹۵ درصد VO2max)

HIIT با و هله‌های فعالیت طولانی مدت (۱۵-۳ دقیقه با شدت ۹۰-۸۵ درصد VO2max)

جیابالا و همکاران (۲۰۱۱) مدل دیگری را نیز پیشنهاد کردند که از تکرارهای ۳۰ ثانیه‌ای فعالیت در شدت تقریباً ۲۵۰ درصدی VO2peak تشکیل شده و با دوره‌های ۴ دقیقه‌ای بازیافت با ۶۵ درصد VO2max از هم جدا می‌شوند.

تقسیم بندی دوم از نظر نسبت‌های زمانی تناوب شدید به تناوب سبک می‌باشد که به‌طور کلی به ۳ دسته تقسیم می‌شوند [۷۷، ۷۸].

۱- زمان تناوب شدید طولانی‌تر از تناوب سبک است

۲- زمان تناوب شدید کوتاه‌تر از تناوب سبک است

۳- زمان ۲ تناوب یکسان است.

HIIT می‌تواند ب عنوان یک جایگزین مؤثر به جای تمرین هوازی بکار گرفته شود. در ارتباط اثرات تمرینات تناوبی شدید با حجم کم، شناخت کمی وجود دارد اما شواهد در حال افزایش نشان می‌دهد این نوع تمرین در مقایسه با تمرینات تداومی با شدت متوسط، با وجود زمان و حجم کلی تمرین کمتر، باعث تحریک فیزیولوژیکی بیشتری می‌شود [۷۹]. نشان داده شده است که HIIT می‌تواند منجر به بهبودی آمادگی قلبی عروقی در طیف وسیعی از افراد، از جمله افرادی با بیماری کرونری قلبی، نارسایی قلبی، در افراد جوان و بالغین مبتلا به سندرم متابولیک و افراد چاق شود [۷۶]. عملکرد اندوتلیال^۱ با استفاده از جریان شریان بازویی بررسی شد و بهبود بیشتری بعد از HIIT نسبت به تمرینات تداومی با شدت متوسط در این فاکتور دیده شد. ممکن است که فعالیت‌های شدید انفجاری کوتاه مدت با حجم کم HIT موجب افزایش زیادی در استرس عروق محیطی و سلولی شود. این فشارهای حاصل از تمرین با زمان کوتاه می‌تواند به‌طور موثری از قلب در برابر تمرینات شدید طولانی محافظت کند [۷۶، ۸۰]. تحقیقات اخیر نشان داد که ۶ جلسه تمرین HIT (پروتکل وینگیت) و همچنین پروتکل با بار ثابت در طول دو هفته، حساسیت انسولین را در افراد بی‌تحرك دارای اضافه وزن بهبود می‌بخشد [۸۲، ۸۱]. حساسیت به انسولین محیطی پس از تمرین ورزشی ممکن است با افزایش ظرفیت انتقال دهنده‌های گلوکز عضله اسکلتی، در بخشی از پروتئین واسطه GLUT4 بهبود یافته باشد. مقدار GLUT4 بعد از HIIT کوتاه مدت در عضلات اسکلتی افزایش می‌یابد که در مقایسه با آنچه که بعد از تمرینات استقامتی با حجم بالا افزایش می‌یابد، برابری می‌کند [۸۱].

شواهد نشان می‌دهد که تمرین تناوبی با شدت بالا دارای پتانسیلی به عنوان یک پروتکل مقرون به صرفه و مؤثر برای کاهش چربی افراد چاق است [۸۳]. گزارش شده بعد از این تمرینات، آمادگی هوازی در حداقل زمان به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد [۸۴]. دو هفته تمرین تناوبی شدید با سه

1 Endothelial function

جلسه HIIT در هفته که هر جلسه شامل چهار تا شش آزمون وینگیت با چهار دقیقه ریکاوری بود باعث افزایش ۹ درصدی در VO_{2max} شد. همچنین، گزارش شد با یک برنامه تمرینی تناوبی شدید که شامل چهار دقیقه دویدن با دو دقیقه استراحت و ۱۰ تکرار انجام شده است، یک افزایش ۱۳ درصدی در حداکثر اکسیژن مصرفی به دست آمد [۸۵]. در مجموع، این نتایج نشان می‌دهد که شرکت بزرگ-سالان، جوانان و بیماران در انواع مختلف برنامه تمرینی تناوبی شدید، به مدت ۲ تا ۱۵ هفته موجب افزایش قابل توجه حداکثر اکسیژن مصرفی از ۴ تا ۴۶ درصد می‌شود. مکانیسم‌های اصلی پاسخ آمادگی هوازی به HIIT به‌طور واضح مشخص نیست.

۲-۱۶-۱ سازگاری‌های متابولیکی با HIIT

برای اجرای وهله‌های تمرینی با شدت بالا، به مقدار زیادی از ATP در دسترس نیاز است. شواهد نشان می‌دهد افزایش فاکتورهای همانند کراتین فسفات، کراتین کیناز، گلیکوژن، لاکتات دهیدروژناز و لاکتات محرک‌های قوی در بازسازی سریع ATP به‌شمار می‌روند [۳۹]. نقش این تغییرات همگی در قالب سیستم انرژی بی‌هوازی به انجام می‌رسد. محققان دریافته‌اند اگرچه در طی اجرای وهله‌های شدید تمرینی سطوح کراتین فسفات کاهش می‌یابد اما به‌طور کلی اجرای تمرینات HIIT موجب افزایش فاکتورهای مذکور در حالت استراحت می‌شود [۳۹]. گلیکولیز بی‌هوازی سیستم تولید انرژی است که در آن گلیکوژن در کمتر از ۳-۲ دقیقه به ATP تبدیل می‌شود. تغییرات در گلیکوژن، همانند تغییر در محتوای گلیکوژن سطوح استراحتی و یا کاهش استفاده از ذخایر گلیکوژنی در طی کار همسان، با اجرای ورزش‌های تناوبی شدید دیده شده است [۷۷]. گزارش شده اجرای ۲ هفته تمرینات پر شدت تناوبی به‌طور قابل توجهی میزان گلیکوژنولیز در بار کار یکسان را کاهش می‌دهد. همچنین، افزایش کراتین کیناز، پیرووات کیناز و فعالیت لاکتات دهیدروژناز نیز دیده شد. فعالیت‌های با شدت بالا و کمتر از ۱۰ ثانیه عمدتاً از طریق ساز و کارهای بی‌هوازی تأمین انرژی می‌شوند، اما اگر زمان فعالیت پر شدت بیشتر از ۱۰ ثانیه طول بکشد، باعث افزایش مشارکت سیستم تولید انرژی هوازی

می‌شود [۸۶]. نتایج نشان داده‌اند اگر یک فعالیت ۳۰ ثانیه‌ای با حداکثر شدت به تعداد بیشتر از ۳ مرتبه به اجرا در بیاید، در مرتبه چهارم به‌طور عمده تأمین کننده انرژی سیستم فسفوریلاسیون هوازی خواهد بود. این تغییر سهم مسیرهای انرژی در احیای ATP ممکن است به دلیل افزایش انتقال و به کارگیری اکسیژن باشد [۸۷]. بررسی‌ها با استفاده از تمرینات ۱۰ ثانیه‌ای دویدن با حداکثر سرعت با زمان‌های استراحت ۵۰ ثانیه‌ای در بین آن‌ها، نشان از افزایش رها سازی Ca^{2+} از شبکه سارکوپلاسمیک متعاقب این تمرینات داشتند. همچنین تحقیقات دیگر افزایش در فعالیت پیرووات دهیدروژناز، Ca^{2+} ، سیتрат سنتاز و $PGC-1\alpha$ با اجرای فعالیت‌های تناوبی شدید را نشان دادند [۸۸]. مطالعات محدودی بیان افزایش $PGC-1\alpha$ با این تمرینات را دیده‌اند. این پروتئین به عنوان یکی از تنظیم گرهای مهم بایوژنز میتوکندری اعمال وظیفه می‌کند. با توجه به نتایج تحقیقات، HIT دارای پتانسیل مناسب برای تحریک مسیرهای سیگنالینگ پاسخ‌پذیر در فرایند بایوژنز میتوکندریایی است. درگیری واحدهای حرکتی بزرگتر در تمرینات HIT و به کارگیری بیشتر میتوکندری موجب افزایش تولید ATP می‌شود [۸۹].

۲-۲-۱۶-۲ انتقال اکسیژن و سازگاری با HIIT

اخیراً تحقیقات مبین این واقعیت است که تمرینات پر شدت اینتروال بهبود مکانیسم‌های درگیر در انتقال اکسیژن را دارا می‌باشند. بر اساس یک مطالعه، نشان داده شد تمرینات پر شدت تناوبی باعث پاسخ‌های رگ‌گشایی بیشتر در طی اجرای فعالیت ورزشی می‌شوند و از این رو باعث کاهش مقاومت عروقی و افزایش جریان خون بافتی می‌شوند. همچنین، محققان دریافتند در اثر اجرای تمرینات اینتروال شدید از نوع شنا کردن، عملکرد اندوتلیال بهبود یافته و محتوای نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) آئورت در عضله دوقلوی رت‌ها افزایش می‌یابد [۹۱، ۹۰]. افزایش اتساع عروقی منجر به کاهش مقاومت عروقی می‌شود. بیشترین میزان این تغییرات با HIT در ناحیه سفید عضله، یعنی، در تارهای عضلانی تند انقباض مشاهده شد. این رخدادها در نهایت جریان خون

1 peroxisome proliferator-activated receptor coactivator

بالا تر بافتی را رقم می‌زنند. با بهبود عملکرد اندوتلیال، استرس اکسیداتیو کاهش و در مقابل دفاع آنتی اکسیدانی افزایش می‌یابد. علاوه بر این، با تنظیم مثبت بیان ژنی eNOS، میزان در دسترس نیتریک اکساید بالا می‌رود. نیتریک اکساید با عملکرد خود می‌تواند شل شدگی عضلات صاف را موجب شود [۸۵]. افزایش جریان خون از طریق کاهش مقاومت، اجازه می‌دهد خون بیشتری به بافت در حال فعالیت تحویل داده شود. از این رو، با دریافت بیشتر اکسیژن، VO_{2max} افزایش می‌یابد و زمان خستگی به تعویق خواهد افتاد. در مطالعاتی که از ۶ جلسه تمرین اینتروال شدید در هفته و به مدت ۲ هفته استفاده کردند، افزایشی در سطح VO_{2max} مشاهده نشد. با این حال تحقیقاتی که از چهار تا هشت هفته HIT استفاده کردند افزایش معنی‌دار در حداکثر اکسیژن مصرفی را گزارش نموده‌اند [۹۲، ۸۵]. تمام این مطالعات از پروتکل‌های پدال زدن دوچرخه ثابت استفاده کردند.

۲-۲-۱۷ توان هوازی (VO_{2max})

مصرف اکسیژن کلید تمرینات استقامتی است. بدن برای تولید انرژی به اکسیژن نیاز دارد ولی چون قادر به ذخیره آن نیست باید به‌صورت مداوم آن را تهیه نموده و در اختیار بافت‌ها و عضلات قرار دهد. مقدار اکسیژنی که بدن در هر دقیقه قادر به جذب و رساندن آن به بافت‌ها یا عضلات می‌باشد، به‌عبارتی، حداکثر اکسیژن مصرفی (VO_{2max}) دقیقه‌ای هر فرد، بهترین مقیاس و معیار آمادگی وی برای اجرای اعمال ورزشی طولانی مدت می‌باشد. حداکثر اکسیژن مصرفی عبارتست از، بیشترین مقدار اکسیژنی که در طول فعالیت می‌تواند مصرف شود. عبارت حداکثر اکسیژن مصرفی و اصطلاح توان هوازی بیشینه با یکدیگر هم معنی و مترادف هستند [۴۲].

حداکثر توان هوازی عامل مهمی در عملکرد فعالیت‌های دراز مدت به حساب می‌آید. این موضوع ناشی از این واقعیت است که مسیر هوازی سهم بیشتر انرژی مورد نیاز این قبیل فعالیت‌ها را تأمین

می‌کند. هر اندازه حداکثر توان هوازی فرد بیشتر باشد، موفقیت او در رشته‌های استقامتی بیشتر بوده، مشروط بر اینکه به سایر عواملی که در انجام مسابقات قهرمانی مؤثرند توجه شده باشد [۹۳].

اجرای مسابقات هوازی و فعالیت‌های استقامتی از قبیل دوهای استقامت، دوچرخه سواری، اسکی صحرانوردی و شنا، نیاز به توان هوازی بالایی دارند. به عبارت دیگر، هرچه میزان اکسیژنی که سیستم - قلبی عروقی می‌تواند به عضلات انتقال دهد بیشتر باشد و خون رسانی به توده عضلاتی که درگیر فعالیت هستند افزایش یابد، فرد از توانایی بیشتری در اجرای این گونه فعالیت‌ها برخوردار خواهد بود.

هنگامی که فرد درگیر اجرای فعالیت‌های ورزشی طولانی مدت و شدید می‌باشد، اکسیژن مصرفی وی نیز افزایش پیدا می‌کند. روند افزایش اکسیژن مصرفی تا سرحد خستگی ادامه می‌یابد اما پس از رسیدن به آستانه خستگی دیگر افزایش نمی‌یابد، بلکه، در یک خط افقی باقی می‌ماند و یا اندکی کاهش پیدا می‌کند [۹۴]. رسیدن به آستانه خستگی با خط افقی نشان‌دهنده خاتمه تمرین است، زیرا برای رساندن اکسیژن به عضلات فعال، به فرد فشار وارد می‌شود. در واقع، می‌توان اظهار کرد که عضلات به حد محدود کارایی خود می‌رسند. در واقع، این حد نشان‌دهنده اندازه فعالیت است که فرد می‌تواند تحمل نماید. پس از رسیدن به این حد یا همان اکسیژن مصرفی بیشینه، ورزشکار با استفاده از ذخیره غیر هوازی خود به مدت کوتاهی به فعالیت ادامه خواهد داد. البته باید توجه داشته باشیم که مدت این ظرفیت بی‌هوازی نیز محدود است و از طریق برنامه تمرینی ویژه، بر میزان اکسیژن مصرفی بیشینه افزوده گردیده و به ازای این افزایش، حد محدود نیز بالاتر می‌رود و در مجموع ورزشکار قابلیت اجرای فعالیت در سطح بالاتری را کسب می‌کند، بدین معنی که تندتر می‌دود و استقامت بیشتری از خود نشان می‌دهد [۹۵].

۲-۳ پیشینه پژوهش

یکی از مهم‌ترین محرک‌هایی که به نظر می‌رسد در تغییر مقادیر عضلانی VEGF و $TNF-\alpha$ نقش داشته باشد، فعالیت ورزشی است. در فعالیت ورزشی، بافت‌های بدن دچار کمبود اکسیژن به صورت موضعی می‌شوند. این عامل به همراه فعالیت ورزشی موجب افزایش و شروع فرآیندهای التهابی-آنژیوژنزی می‌شود. تحقیقات نتایج متناقضی را در مورد پاسخ VEGF و $TNF-\alpha$ به یک وهله فعالیت ورزشی نشان می‌دهند و این تناقض در مراحل زمانی مختلف بعد از فعالیت نیز وجود دارد. در این بخش به‌طور خلاصه به بررسی مهم‌ترین تحقیقاتی که تاکنون در زمینه ارتباط فعالیت ورزشی با التهاب-آنژیوژنز و $TNF-\alpha$ -VEGF انجام گرفته پرداخته می‌شود.

۲-۳-۱ تأثیر فعالیت ورزشی بر VEGF

تاکانو^۱ و همکارانش (۲۰۰۵)، در تحقیقی پاسخ هورمون‌های رشد^۲، نور آدرنالین (NE)، VEGF و عامل رشد شبه انسولینی (IGF_1)^۳ به فعالیت مقاومتی کم‌شدت^۴ را بررسی کردند. آزمودنی‌های این تحقیق ۱۱ فرد سالم غیرفعال با میانگین سنی (34 ± 6) سال بودند. پروتکل تمرینی شامل باز کردن اندام پایینی تحت شرایط کاهش جریان خون بود. شدت تمرین شامل ۲۰ درصد یک تکرار بیشینه بود که آزمودنی‌ها آن را با محدودیت جریان خون و تا سرحد خستگی انجام دادند. نمونه‌های خونی قبل، هنگام فعالیت، ۱۰ و ۳۰ دقیقه بعد از فعالیت گرفته شد. نتایج تحقیق نشان داد فعالیت مقاومتی با شدت پایین در حد معنی‌داری مقادیر هورمون رشد، VEGF و $IGF-1$ را افزایش می‌دهد. این افزایش مقادیر در پاسخ به فعالیت مقاومتی کم شدت ممکن است با کاهش پیش بار هنگام

1 Takano

2 Growth factor

3 Insuline growth factor-1

4 Short-term low intensity resistance exercise

فعالیت ارتباط داشته باشد که می‌تواند روش منحصر به فردی در بازتوانی بیماران قلبی و عروقی باشد [۹۶].

کرولی^۱ و همکاران (۲۰۰۵)، در مطالعه‌ای به بررسی و مقایسه تأثیر یک جلسه فعالیت ورزشی بر بیان ژن VEGF، پروتئین VEGF و گیرنده‌های آن در عضله پهن جانبی زنان بی‌تحرك سالمند (۹ نفر با میانگین سنی 70 ± 8 سال) و زنان جوان (۱۱ نفر با میانگین سنی 22 ± 3 سال) پرداختند. پروتکل تمرینی شامل ۴۵ دقیقه رکاب زدن روی چرخ کارسنج با شدت ۵۰ درصد VO_{2max} (۲۵ دقیقه فعالیت، ۵ دقیقه استراحت و ۲۰ دقیقه فعالیت) بود. بافت برداری از عضله پهن جانبی قبل و چهار ساعت بعد از فعالیت ورزشی زیر بیشینه به عمل آمد. نتایج تحقیق نشان داد در زنان مسن در مقایسه با زنان جوان، پروتئین VEGF در حالت استراحت ۳۵ درصد کمتر بود و افزایش ژن VEGF ناشی از فعالیت ورزشی در زنان سالمند در مقایسه با زنان جوان ۵۰ درصد کمتر بود. به‌طور خلاصه، می‌توان گفت پاسخ‌های پروتئین VEGF و VEGFmRNA به فعالیت در زنان مسن در مقایسه با زنان جوان کمتر بود [۹۷].

زارکوسکا^۲ و همکاران (۲۰۰۶)، در تحقیقی در پاسخ به یک جلسه فعالیت بدنی مقادیر عوامل رشدی VEGF، $TGF-\beta^3$ و PDGF را بررسی کردند. آزمودنی‌های این تحقیق ۱۴ مرد دوچرخه سوار (میانگین سنی 18 ± 0.5 سال) بودند. پروتکل تمرین شامل یک آزمون بیشینه ۱۸ دقیقه‌ای بود. نمونه‌های خونی قبل، بلافاصله و دو ساعت بعد از فعالیت ورزشی گرفته شد. مقادیر VEGF سرم از سطح پایه $91/83$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر قبل از فعالیت به $165/61$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بلافاصله بعد از فعالیت ورزشی رسید و در ۲ ساعت بعد از فعالیت به $137/23$ پیکوگرم بر میلی‌لیتر افزایش یافت که این افزایش معنی‌دار نبود. میزان $TGF-\beta$ بلافاصله بعد از فعالیت ورزشی $2/7$ برابر و ۲ ساعت بعد

1 Kroley

2 Czarowska

3 Transforming growth factor- β

از فعالیت ۱/۹۷ برابر افزایش یافت. مقدار PDGF بلافاصله و ۲ ساعت بعد از فعالیت به ترتیب ۲/۷ و ۱/۹۴ برابر افزایش یافت [۹۸].

گاون^۱ و همکاران (۲۰۰۷)، در تحقیقی تأثیر فعالیت ورزشی شدید مقاومتی بر افزایش VEGF و آنژیوژنز را بررسی کردند. بدین منظور، ۷ آزمودنی جوان غیر فعال انتخاب شدند. فعالیت ورزشی مقاومتی شامل باز کردن زانو (۱۰ ست ۴۰ تایی) بود. VEGF قبل، ۲ و ۴ ساعت پس از فعالیت ورزشی از راه پلاسما و بافت برداری اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد انجام فعالیت ورزشی مقاومتی شدید، باعث افزایش VEGF و گیرنده‌های آن شد [۹۹].

رولمن^۲ و همکارانش (۲۰۰۷)، در تحقیقی تأثیر یک جلسه فعالیت ورزشی را بر VEGF-A، MMP-9 و MMP-2 عضلات اسکلتی بررسی کردند. ۱۰ مرد سالم (با میانگین سنی ۲۵ سال، میانگین قد ۱۸۰ سانتی متر و میانگین وزن ۷۷ کیلوگرم) آزمودنی‌های این تحقیق بودند. بافت‌برداری عضله قبل، بلافاصله و ۲ ساعت بعد از فعالیت ورزشی از عضله پهن جانبی گرفته شد. پروتکل فعالیت ورزشی شامل ۶۵ دقیقه فعالیت روی چرخ کارسنج بود. به این صورت که افراد ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه با شدت ۵۰ درصد VO_{2max} و سپس به مدت ۴۰ دقیقه با شدت ۶۵ درصد VO_{2max} روی دوچرخه رکاب زدند و سرانجام ۵ دقیقه آخر با حداکثر شدت به رکاب زدن پرداختند. نمونه‌های خونی قبل، حین فعالیت (دقیقه ۱۷ و ۵۷) و ۲ ساعت بعد از فعالیت ورزشی از سرخرگ و سیاهرگ رانی بدست آمد. نتایج نشان داد میزان پروتئین VEGF عضله بلافاصله بعد از فعالیت ورزشی نسبت به قبل از فعالیت ورزشی تغییری نداشت و ۲ ساعت بعد از فعالیت ۱/۵ برابر افزایش پیدا کرد. ژن VEGF بلافاصله و ۲ ساعت بعد از فعالیت ورزشی به ترتیب ۲ و ۶ برابر افزایش یافت. میزان MMP-2 mRNA بعد از فعالیت ۱/۲ برابر و ۲ ساعت بعد از فعالیت ورزشی ۱/۳ برابر افزایش یافت، ولی این افزایش معنی‌دار نبود و ۲ ساعت بعد از فعالیت ورزشی کاهش معنی‌داری داشت. میزان پروتئین

1 Gavin

2 Rullman

VEGF سیاهرگی در دقیقه ۱۷ درحد معنی‌داری افزایش یافت و ۲ ساعت بعد از فعالیت میزان آن کاهش یافت. میزان پروتئین VEGF سرخرگی در دقیقه‌های ۱۷ و ۵۷ کاهش داشت که این کاهش معنیدار نبود، ولی ۲ ساعت بعد از فعالیت ورزشی کاهش معنی‌داری داشت. میزان پروتئین اندوستاتین تغییر معنی‌داری بلافاصله و ۲ ساعت بعد از فعالیت ورزشی نسبت به قبل از فعالیت نداشت [۱۰۰].

وانکران بروک^۱ و همکاران (۲۰۰۸)، در تحقیقی تأثیر یک جلسه فعالیت ورزشی استقامتی فزاینده بر تغییرات VEGF، NO و EPC را بررسی کردند. ۱۱ فرد سالم (میانگین سنی $41 \pm 23/9$ سال و شاخص توده بدنی $25 \pm 21/6$ کیلوگرم بر مترمربع) آزمودنی‌های این تحقیق بودند. پروتکل فعالیت ورزشی شامل یک آزمون فزاینده رکاب زدن روی دوچرخه بود که پروتکل با مقاومت ۴۰ وات شروع می‌شد و به ازای هر دقیقه فعالیت ۲۰ وات به میزان مقاومت اضافه می‌شد تا زمانی که آزمودنی به سرحد واماندگی می‌رسید. نتایج تحقیق نشان داد یک جلسه فعالیت ورزشی استقامتی فزاینده روی دوچرخه باعث افزایش مقدار EPC^۲ و VEGF ($142 \pm 246/9$ به $160 \pm 262/92$ پیکوگرم بر دسی‌لیتر) شد در حالی که مقدار NO تغییری نداشت [۱۰۱].

هلستن^۳ و همکاران (۲۰۰۸)، در تحقیقی تأثیر ۹۰ دقیقه فعالیت بازکردن زانو، بر روی پروتئین VEGF بین بافتی، ژن VEGF، eNOS و MMP-2 را بررسی کردند. آزمودنی‌های این تحقیق، ۱۸ مرد سالم با دامنه سنی ۱۹ تا ۳۱ بود. نتایج تحقیق نشان داد پروتئین VEGF بین بافتی افزایش یافت. میزان ژن VEGF و MMP-2 بدون تغییر باقی ماند اما میزان ژنی eNOS نسبت به قبل از تمرین در حد معنی‌داری افزایش پیدا کرد [۱۰۲].

1 Van Craenenbroeck

2 Endothelial progenitor cell

3 Hellesten

سالم^۱ و همکاران (۲۰۱۱) پاسخ VEGF و bFGF پلاسما به یک جلسه فعالیت ورزشی استقامتی در آب‌های آزاد را مطالعه کردند. آزمودنی‌های تحقیق ۸ شناگر آب‌های آزاد (میانگین سن 16 ± 1 سال و سابقه شنا 7 ± 1 سال) بودند که ۵ کیلومتر شنا کردند. نمونه‌های خونی قبل، بلافاصله، ۲ و ۴ ساعت بعد از فعالیت ورزشی گرفته شد. نتایج تحقیق افزایش معنی‌دار VEGF، bFGF پلاسما را در پاسخ به یک جلسه فعالیت ورزشی استقامتی شنا بلافاصله، ۲ و ۴ ساعت بعد از فعالیت ورزشی نشان داد [۱۰۳].

زارکوسکا و همکارانش (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای در ۵۹ موش صحرایی تأثیر فعالیت ورزشی را بر ترشح TGF- $\beta 1$ ، PDGF-AA و VEGF-A موجود در بافت چربی زیرپوستی بررسی کردند. در شروع مطالعه موش‌ها فعالیت ۵ روزه‌ای شامل ۱۰ دقیقه دویدن بر روی نوارگردان با سرعت ۱۵ متر در هر دقیقه برای ایجاد سازگاری با فعالیت انجام دادند و بعد از سازگاری به صورت تصادفی به دو گروه تمرینی (۲۹ موش) و غیر تمرینی (۳۰ موش) تقسیم شدند. فعالیت ورزشی شامل یک آزمون فزاینده بر روی نوارگردان به مدت ۶ هفته و ۵ روز در هر هفته بود. نمونه‌ها از هر دو گروه قبل بلافاصله و سه ساعت بعد از فعالیت ورزشی جمع‌آوری شد. نتایج تحقیق نشان داد در مقادیر ژنی VEGF-A، TGF- β و PDGF-AA در نتیجه فعالیت ورزشی استقامتی طولانی مدت در گروه تمرین کرده نسبت به گروه تمرین نکرده افزایش معنی‌داری داشت. در حالی که در گروه تمرین نکرده فعالیت ورزشی کوتاه‌مدت باعث کاهش مقادیر ژنی TGF- β و PDGF-AA سه ساعت بعد از فعالیت ورزشی نسبت به قبل از فعالیت ورزشی شد و مقادیر ژنی VEGF-A بلافاصله در سه ساعت بعد از فعالیت ورزشی نسبت به قبل از فعالیت ورزشی تغییری نداشت. مقادیر پروتئینی همچنان ثابت باقی ماند. بنابراین، فعالیت بدنی مداوم بیان عوامل رشدی بافت چربی را افزایش داد [۱۰۴].

تورل و همکاران^۱ (۲۰۰۹) تأثیر یک جلسه فعالیت شدید بر روی روی فاکتورهای OECs^۲، VEGF و سطوح سلول‌های التهابی در ۱۱ فرد سالم (دامنه سنی بین ۲۴ تا ۴۷ سال و شاخص توده بدنی بین ۱۹ تا ۲۶ (کیلو گرم بر متر مربع) را مورد بررسی قرار دادند. هر آزمودنی یک ساعت فعالیت ورزشی بر روی دوچرخه کارسنج (۸۰ درصد ضربان قلب پیش بینی شده بر حسب فرمول (سن - ۲۲۰)) را انجام داد. نمونه‌های خونی ۱، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از فعالیت ورزشی جمع‌آوری شدند. نتایج بدین صورت بودند که OEC یک ساعت بعد از جلسه تمرینی دو برابر ($4/5 \pm 4/3$) در مقابل $9/0 \pm 3/7$ و $P \leq 0/01$ و VEGF سرم از سطح پایه 194 ± 107 به $224 \pm 0/111$ پیکو گرم بر میلی لیتر افزایش یافت. گرانولوسیت‌های نوتروفیلیک نیز یک ساعت بعد از فعالیت ۳ برابر افزایش یافتند (از $3/73 \pm 1/38$ به $9/08 \pm 10/5$ و $P \leq 0/01$). سطوح VEGF ($P = 0/903$) و گرانولوسیت‌های نوتروفیلیک ($P = 0/85$) به‌طور بالایی با سطوح OEC همبسته بودند. به‌طور کلی، پاسخ التهابی ناشی از فعالیت ورزشی حاد، ممکن است مسئول آزاد شدن VEGF و افزایش بعدی OECs شده باشد [۱۰۵].

نورشاهی و همکاران (۱۳۹۱) در تحقیقی تحت عنوان تأثیر یک جلسه فعالیت برون‌گرا بر میزان عامل رشدی اندوتلیال عروق و اندوستاتین سرم درموش‌های نر ویستار از ۳۶ سر موش با دامنه سنی 49 ± 7 روزه با وزن 290 ± 10 استفاده شد. موش‌ها به دو گروه کنترل ($n=12$) و برون‌گرا ($n=24$) تقسیم شدند فعالیت برون‌گرا شامل ۴۵ دقیقه دویدن روی نوارگردان با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه با شیب ۱۶- درجه بود. بلافاصله و ۲۴ ساعت بعد از فعالیت، ۲ ml خون از سرخرگ آئورت پایین رونده موش‌ها گرفته شد. نتایج نشان داد میزان VEGF سرم در گروه کنترل $16/5 \pm 1/44$ pg/ml بود این میزان بلافاصله و ۲۴ ساعت بعد از فعالیت به ترتیب ۲۸٪ و ۱۲٪ کاهش یافت ($p \leq 0/05$) همچنین، میزان اندوستاتین سرم نیز در گروه کنترل $187/33 \pm 23/19$ ng/ml بود که بلافاصله و ۲۴ ساعت بعد از تمرین به ترتیب ۲۶٪ و ۳۴٪ کاهش یافت ($p \leq 0/05$) از طرفی دیگر، نسبت VEGF به اندوستاتین

1 Thorel et al

2 (Outgrowth endothelial cells) نوعی سلول بنیادی که به نظر می‌رسد به شکل سلول‌های آندوتلیال بالغ رشد کند

بلافاصله بعد از فعالیت کاهش ($P=0/02$) و ۲۴ ساعت بعد از فعالیت به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P=0/001$) [۱۰۶].

کردی و همکاران (۱۳۹۴) در پژوهش تحت عنوان تأثیر هشت هفته تمرین هوازی تداومی و تناوبی شدید بر بیان ژن سلول‌های اندوتلیال عروقی در عضله نعلی رت‌های نر سالم از ۱۸ رت سالم در سن هشت هفتگی با میانگین وزنی $210/5 \pm 9/77$ گرم انتخاب شدند و به سه گروه کنترل، تداومی و تناوبی شدید تقسیم شدند. تمرین تداومی هوازی پنج روز در هفته و در مجموع به مدت هشت هفته شامل ۳۰ دقیقه با شدت ۷۰ تا ۷۵ درصد VO_{2max} و تمرین تناوبی شدید شامل سه تناوب به مدت چهار دقیقه با شدت ۹۰ تا ۱۰۰ درصد VO_{2max} و دو دقیقه با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد VO_{2max} بود. نتایج نشان داد که سطح بیان ژن عامل رشد آندوتلیال عروقی در گروه تمرین تداومی هوازی و تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. تغییرات در دو گروه تمرینات تداومی هوازی و تناوبی شدید نسبت به یکدیگر معنی‌دار نبوده است [۱۰۷].

۲-۳-۲ تأثیر فعالیت‌های ورزشی بر $TNF-\alpha$

دن نمت^۱ و همکاران (۲۰۰۲) در تحقیقی اثر ورزش شدید بر سایتوکاین‌های پیش التهابی را در نوجوانان بررسی کردند. در این تحقیق یازده نوجوان سالم با میانگین سنی ۱۶ سال شرکت کردند. هر آزمودنی ۱/۵ ساعت فعالیت ورزشی کشتی را اجرا کرد و نمونه‌های خونی قبل و بعد از فعالیت گرفته شد. نتایج این تحقیق افزایش قابل توجهی در سایتوکاین‌های $IL-6, IL-1\beta, TNF-\alpha$ نشان داد. این تحقیق افزایش سایتوکاین‌های پیش التهابی در پاسخ به فعالیت ورزشی شدید را تأیید کرد [۸۳].

1 Nemet

روسی^۱ و همکاران (۲۰۰۹) در تحقیقی اثر تمرین بلند مدت بر روی سایتوکاین‌های سرم را بررسی کردند. در این تحقیق از موش‌های ماده ۴۵ روزه با میانگین وزنی ۹۰-۱۱۰ گرم استفاده شد. نتایج نشان داد یک دوره تمرین ورزشی باعث کاهش ناچیز IL-6 و عدم تغییر در TNF- α می‌شود [۱۰۸].

اوستروسکی^۲ و همکاران (۱۹۹۹) پاسخ سایتوکاین‌های پیش التهابی و ضد التهابی به فعالیت ورزشی شدید را بررسی کردند. در این تحقیق ۱۰ مرد با میانگین سنی ۲۷/۵ سال شرکت کردند. فعالیت ورزشی شامل شرکت در دوی ماراتون بود که میانگین دویدن آزمودنی‌ها ۳/۲۶ ساعت بود. خون‌گیری قبل، بعد و تا ۴ ساعت پس از فعالیت، هر ۳۰ دقیقه صورت گرفت. فاکتورهای گرفته شده شامل TNF- α , IL-6, IL-1ra, IL-1 β بود که نتایج نشان داد میزان TNF- α و IL-1 β پس از یک ساعت بعد از اتمام فعالیت به حد اکثر میزان خود رسید. همچنین سطح IL-6 بلافاصله پس از فعالیت در بالاترین حد ممکن بود. این تحقیق نشان داد فعالیت ورزشی سنگین موجب افزایش سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌شود [۱۰۹].

گوخال^۳ و همکاران (۲۰۰۷) پاسخ سایتوکاین‌ها به فعالیت ورزشی سنگین در ورزشکاران و غیر ورزشکاران را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق از ۱۰ مرد سالم که حداقل ۶ ماه فعالیت بدنی منظم داشتند و ۱۰ مرد که فعالیت بدنی منظمی نداشتند با میانگین سنی همسان استفاده شد. قبل و بعد از فعالیت ورزشی خون‌گیری صورت گرفت. نتایج افزایش IL-6 و کاهش TNF- α را نشان داد. همچنین تغییر کمتری در پاسخ سایتوکاین‌ها به ورزش در گروه ورزشکاران نسبت به گروه غیر ورزشکار مشاهده شد. این محققان چنین نتیجه‌گیری کردند که فعالیت ورزشی سنگین موجب افزایش در پاسخ سایتوکاین‌ها می‌شود، اما تمرین ورزشی منظم و در دوره طولانی موجب تعدیل پاسخ سایتوکاین‌ها به یک جلسه منفرد ورزش می‌شود [۱۱۰].

1 Rowsey
2 Ostrowski
3 Gokhale

فرایتزر^۱ و همکاران (۲۰۱۱) اثر ورزش تحت شرایط هایپوکسی را بر روی سایتوکاین‌ها بررسی کردند. در این آزمایش ۱۴ آزمودنی به مدت ۶ ساعت در ارتفاع شبیه سازی شده برابر با ۵۵۰۰ متر بود شرکت کردند. پس از ۶ ساعت قرار گیری در شرایط هایپوکسی، تمام آزمودنی‌ها به مدت ۵ دقیقه فعالیت ورزشی با شدت ۱ وات به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن انجام دادند. نتایج تغییری در میزان $TNF-\alpha$ را نشان نداد اما ورزش و هایپوکسی موجب افزایش در سطح IL-6 شد [۱۱۱].

هاگویان^۲ و همکاران (۲۰۰۶) اثر مکمل آنتی اکسیدانت را بر تعدیل پاسخ سایتوکاین‌ها (IL-6, $TNF-\alpha$, CRP) در پاسخ به فعالیت ورزشی و استراحت و در شرایط هایپوکسی (۴۳۰۰ متر) را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق ۱۷ مرد تمرین کرده به ۲ گروه دارونما و اصلی تقسیم شدند و ۳ هفته پیش از رفتن به ارتفاع مصرف مکمل به صورت هر دو روز یک بار را شروع نمودند. هر دو گروه فعالیت ورزشی با شدت ۵۵ درصد VO_{2max} در سطح دریا، در روز اول قرار گیری در ارتفاع و ۱۳ روز پس از سازگاری در ارتفاع را انجام دادند. خون‌گیری در حالت استراحت، بلافاصله پس از ورزش، ۲، ۴ و ۲۰ ساعت پس از اجرای ورزشی صورت گرفت. نتایج تفاوتی بین ۲ گروه در میزان سایتوکاین‌ها در پاسخ به ورزش و در حالت استراحت نشان نداد. همچنین، میزان IL-6 و CRP در دو گروه در روز اول اجرا و ۱۳ روز پس از سازگاری به ارتفاع بالا بود. علاوه بر این، $TNF-\alpha$ پاسخی به اجرای ورزشی از خود نشان نداد [۱۱۲].

وین استوک و همکاران (۱۹۹۷) در تحقیقی اثر ورزش وامانده ساز را بر روی سایتوکاین‌های پیش التهابی بررسی کردند. در این تحقیق ۱۵ ورزشکار شرکت کردند و خون‌گیری ۲۴ ساعت قبل، ۱ و ۲۰ ساعت پس از اجرای ورزشی به عمل آمد. در این تحقیق میانگین زمان فعالیت ورزشی ۶۸ دقیقه بود. سایتوکاین‌ها از طریق سرم، ادرار و سلول‌های خونی اندازه‌گیری شد. $TNF-\alpha$, IL-6 بعد از یک ساعت در سرم و ادرار افزایش نشان دادند. همچنین، بعد از ۲۰ ساعت تمام تغییرات به مقادیر

1 Fritzenwanger

2 Hagobian

اولیه خود رسید. محققان نتیجه گیری کردند که پاسخ سیستم ایمنی به مدت و شدت ورزش بستگی دارد [۱۱۳].

ملانوری و همکاران (۱۳۹۳) به بررسی اثرات تمرین مقاومتی شدید بر بیان پروتئین مایوکاین-های IL-6، IL-1 β و TNF- α در عضله تند تنش در موش‌های صحرایی دیابتی پرداختند. به همین منظور، موش‌های صحرایی به گروه‌های کنترل، تمرین، دیابتی ایجاد شده با استرپتوزوتوسین و دیابتی تمرین تقسیم شدند. گروه‌های تمرین برای تمرین مقاومتی بالا رفتن از یک نردبان ۱ متری با وزنه‌ای که به دم آن‌ها آویزان بود را اجرا کردند. بعد از ۵ هفته تمرین مقاومتی محتوایی پروتئین مایوکاین‌های IL-6، IL-1 β و TNF- α در عضله FHL با روش الایزا اندازه گیری شد. نتایج پژوهش نشان دهنده تأثیر دیابت و اثر متقابل تمرین و دیابت بر بیان مایوکاین IL-6 در عضله FHL بود. همچنین، دیابت باعث افزایش سطوح IL-1 β و در عضله تند تنش FHL گشت. اما تمرین مقاومتی نتوانسته تغییری در سطوح IL-1 β و TNF- α ایجاد کند. در نهایت، محققان گزارش کردند تمرین مقاومتی توانسته است باعث کاهش مایوکاین IL-6 در دیابت شود. در مورد مایوکاین‌های التهابی IL-1 β و TNF- α تمرین مقاومتی تغییری ایجاد نکرده است [۱۱۴].

ملانوری و همکاران (۱۳۹۳) در تحقیقی دیگر به بررسی اثرات تمرین مقاومتی بر میزان سایتوکاین‌های IL-6 و TNF- α در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی دیابتی پرداختند. به همین منظور، موش‌های صحرایی به گروه‌های کنترل سالم، تمرین سالم، دیابتی کنترل و دیابتی تمرین تقسیم شدند. گروه‌های تمرین برای تمرین مقاومتی بالا رفتن از یک نردبان ۱ متری با وزنه‌ای که به دم آن‌ها آویزان بود، را اجرا کردند. میزان پروتئین IL-6 و TNF- α عضله EDL با روش الایزا اندازه‌گیری شد. یافته‌های این مطالعه حاکی از افزایش بیان پروتئین IL-6 و TNF- α در عضله EDL موش‌های صحرایی دیابتی بود. تمرین مقاومتی نتوانست تغییر معنی‌داری در میزان این دو سایتوکاین التهابی در عضله تند تنش ایجاد کند. همچنین، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین سطوح این

سایتوکاین‌ها و میزان گلوکز جریان خون مشاهده شد. محققان نتیجه گرفتند افزایش سایتوکاین‌های التهابی و مایوکاین‌ها را می‌توان مکانیسمی جبرانی در عضله اسکلتی برای دیابت دانست و به نظر می‌رسد این نوع تمرین ورزشی به تنهایی نمی‌تواند تغییری در سطوح این مایوکاین‌ها ایجاد کند [۱۱۵].

باتیستا و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی تأثیر فعالیت‌های ورزشی بر IL-10 (ضد التهابی) و TNF- α (پیش التهابی) عضلات اسکلتی پا در رت‌های ویستار پرداختند. رت‌ها از طریق القای انسداد در کروئر چپ انفارکتوس میوکارد را تجربه نمودند و به‌صورت تصادفی در ۲ گروه تمرین و کنترل قرار گرفتند. برنامه تمرینی شامل ۱۰ هفته دویدن بر روی تردمیل به مدت ۶۰ دقیقه، ۵ جلسه در هفته، با شیب صفر تا ۲۰ درجه بود. یافته‌های این تحقیق نشان داد ۱۰ هفته تمرین استقامتی کاهش معنی‌دار پروتئین و بیان ژن TNF- α و افزایش بیان IL-10 را در پی دارد [۱۱۶].

لیرا و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی تأثیر فعالیت بدنی مزمن بر تولید IL-10 و TNF- α بافت چربی سفید پرداختند. در این تحقیق نمونه‌ها (رت ویستار) به‌طور تصادفی به ۲ گروه کنترل و تمرین تقسیم شدند. گروه تمرین به مدت ۸ هفته با شدت ۵۵ تا ۶۵ درصد VO_{2max} و به تعداد پنج جلسه در هفته به اجرای تمرین استقامتی پرداختند. در پایان دوره پژوهش متغیرهای بیان ژن و پروتئینی TNF- α و IL-10 و همچنین بیان ژن PPAR- γ مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. نتایج نشان داد در گروه تمرین حجم بافت چربی کاهش داشت. همچنین، میزان IL-10 بافت چربی افزایش معنی‌دار نشان داد. میزان TNF- α نیز افزایش یافته بود در حالی که این افزایش از IL-10 کمتر بود. علاوه بر این بیان ژنی PPAR- γ نیز افزایش یافته بود. بر اساس این گزارشات محققان نتیجه گرفتند که تمرینات ورزشی پتانسیل افزایش نسبت IL-10/TNF- α را دارا هستند [۱۱۷].

لنک و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی تغییرات بیان میوستاتین و تأثیر پذیری آن از TNF- α به وسیله تمرینات ورزشی پرداختند. بافت مورد بررسی آن‌ها عضله اسکلتی و قلبی بود. نتایج نشان داد در نمونه رت‌های مبتلا به CHF میزان بیان میوستاتین (عامل قوی آتروفی عضله) در عضلات اسکلتی

۲/۴ و در عضله قلبی ۴ برابر بالاتر از نمونه‌های سالم بود. همچنین نتایج نشان داد ۴ هفته تمرین ورزشی بر روی تردمیل موجب کاهش قابل توجه در بیان این متغیر می‌شود. همچنین، در سلول‌های تمایز یافته C2C12، TNF- α از طریق مسیر p38MAPK موجب تحریک بیان میوستاتین شده بود و تغییرات سطح سایتوکاین TNF- α مرتبط با تغییرات میوستاتین گزارش شد [۱۱۸].

لیرا و همکاران (۲۰۰۹) به ارزیابی تغییرات سطوح IL-1 β , TNF- α , IL-6 و IL-10 عضلات اسکلتی رت متعاقب یک دوره تمرینات استقامتی پرداختند. به همین منظور، نمونه‌های تحقیق به ۲ گروه کنترل و تمرین تقسیم شدند. پروتکل تمرینی شامل ۵ جلسه در هفته، با شدت ۶۰ درصد VO_{2max} و به مدت ۸ هفته بود. در پایان دوره تحقیق سطح پروتئینی متغیرهای وابسته با روش الایزا اندازه‌گیری شد. محققان کاهش در بیان IL-1 β , IL-6، TNF- α و IL-10 را گزارش نمودند [۱۱۹].

لیگت و همکاران (۲۰۱۳) اثرات ورزش تردمیل بر بیان UCP-2 بافت چربی قهوه‌ای و TNF- α عضله نعلی موش‌های زوکر چاق پرداختند. بدین منظور ۲۸ سر موش به چهار گروه کنترل، ورزش با شدت کم، ورزش با شدت متوسط، ورزش با شدت بالا تقسیم شدند. پروتکل تمرینی اجرا بر روی نوارگردان، به مدت ۸ هفته، هر روز ۳۰ دقیقه فعالیت داشتند. در پایان سطح پروتئینی متغیرها از طریق روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد. میزان UCP-2 در گروه ورزش با شدت کم و ورزش با شدت متوسط افزایش و میزان TNF- α در گروه ورزش با شدت کم و ورزش با شدت متوسط کاهش را گزارش نمودند [۱۲۰].

۲-۴ جمع‌بندی

بررسی تحقیقات نتایج متناقضی را در مورد پاسخ VEGF و TNF- α به یک وهله فعالیت ورزشی نشان می‌دهد. این تناقض در نتایج احتمالاً می‌تواند ناشی از ویژگی‌های آزمودنی‌ها (فعال یا غیرفعال

بودن آزمودنی‌ها)، نوع پروتکل‌های تمرینی و جنسیت آزمودنی‌ها باشد. از طرف دیگر، تحقیقاتی که در زمینه آنژیوژنز و التهاب در داخل و خارج از کشور انجام شده بیشتر تأثیر یک نوع فعالیت بدنی را بر عوامل آنژیوژنیک بررسی کرده‌اند و درباره آنژیوژنز و التهاب هنگام فعالیت ورزشی و پس از آن نتایج متفاوتی گزارش کرده‌اند؛ از این رو، مطالعه حاضر به دنبال بررسی پاسخ VEGF-TNF- α عضله نعلی به دو نوع فعالیت ورزشی در موش‌های نر نژاد ویستار می‌باشد.

فصل سوم

روش شناسی پژوهش

۳-۱ مقدمه

در این فصل ابتدا جامعه، نمونه آماری، ابزار اندازه‌گیری و روش استفاده از آن معرفی خواهد شد، سپس، روش انجام پژوهش، جمع‌آوری داده‌ها، روش تجزیه و تحلیل آماری و در پایان ملاحظات اخلاقی ارائه خواهد شد.

۳-۲ جامعه آماری

جامعه آماری در این پژوهش شامل ۴۵ سر موش نر از نژاد ویستار بود که از هشت هفتگی وارد این تحقیق شدند. موش‌ها از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه و در گروه‌های پنج تایی در قفس‌های مخصوص از جنس پلی کربنات نگهداری شدند. پس از پایان هشت هفته رژیم غذایی پرچرب، حیواناتی که دارای وزن مناسب برای ورود به تحقیق بودند به‌عنوان نمونه آماری انتخاب شدند. نمونه آماری شامل ۲۷ سر موش ۱۶ هفته‌ای بود که شاخص توده بدنی آن‌ها بیشتر از 0.68 g/cm^2 بود [۱۲۱].

۳-۳ متغیرهای پژوهش

۳-۳-۱ متغیر مستقل

یک جلسه فعالیت هوازی تداومی یا یک جلسه فعالیت تناوبی با شدت بالا

۳-۳-۲ متغیر وابسته

میزان پروتئین VEGF و $\text{TNF-}\alpha$ در بافت عضله نعلی

۳-۴ نوع پژوهش

تحقیق حاضر از نوع تجربی که به شیوه میدانی و آزمایشگاهی انجام شد.

۳-۵ ابزار جمع آوری داده‌ها

- ۱- آنتی بادی اولیه ساخت شرکت abcam به منظور اندازه‌گیری میزان VEGF و $TNF-\alpha$
- ۲- فریزر هانوور آلمان
- ۳- دستگاه تردمیل موش به منظور انجام تمرینات هوازی مداومی و تناوبی با شدت بالا
- ۴- ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی با دقت 0.0001 گرم، جهت اندازه‌گیری مواد مورد نیاز جهت استخراج پروتئین و روش آزمایشگاهی وسترن بلات
- ۵- ترازوی دیجیتال آزمایشگاهی با دقت 0.001 کیلوگرم، ساخت شرکت آلمان جهت وزن نمودن آزمودنی‌ها
- ۶- تانک ازت و فریزر -80 و -20 درجه سلیسیوس
- ۷- قفس موش
- ۸- کتامین زایلازین برای بی‌هوشی موش‌ها
- ۹- وسایل جراحی (تیغ کارپل، قیچی، پنس و ...)
- ۱۰- تایمر (جهت تنظیم تاریکی و روشنایی محیط آزمایشگاه)
- ۱۱- دماسنج (جهت تنظیم دمای محیط آزمایشگاه)
- ۱۲- لوله آزمایشگاهی، بشر، میکروتیوب، دستکش جراحی (لاتکس)، سینی تشریح، پنبه، سرم شست و شو و ...

۳-۶ مواد و ابزار لازم جهت آماده‌سازی غذای پرچرب

- ۱- پودر آسیاب شده حاصل از غذای پایه موش
- ۲- روغن حیوانی و گیاهی
- ۳- وانیل
- ۴- آب مقطر
- ۵- ورق آلومینیومی
- ۶- مخلوط‌کن صنعتی
- ۷- آون صنعتی شرکت Memmert
- ۸- ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ شرکت Sartorius

۳-۷ ابزار و مواد لازم جهت انجام آزمایش وسترن بلات

- ۱- ست مخصوص وسترن بلات (Western blot apparatus) شامل تانک الکتروفورز اختریان، تانک وسترن Bio-rad، شیشه مخصوص ژل عمودی، اسپیسر و شانه، گیره جهت ثابت کردن شیشه روی پایه، منبع تغذیه اختریان و Bio-rad
- ۲- کاغذ PVDF ساخت شرکت Millipore
- ۳- Acrylamid، Bisacrylamide، Bromo phenol blue، TEMED، آمونیوم پرسولفات (APS) و رنگ کوماسی بلو (Coomassie ®Billirant Blue G-250) ساخت شرکت MERK
- ۴- Wattman paper و Complete tablet inhibitor protease ساخت شرکت ROCHE
- ۵- کیت ECL ساخت شرکت Amersham Bioscience
- ۶- EDTA ساخت شرکت سیناژن
- ۷- محلول‌های ثبوت و ظهور فیلم عکاسی ساخت شرکت CHAMPION photochemistry

- ۸- فیلم عکاسی ۱۸×۱۳ ساخت شرکت Kodak
 - ۹- تاریک‌خانه، گیره فیلم، ظرف‌های مخصوص ظهور فیلم
 - ۱۰- کاست مخصوص فیلم عکاسی ۱۸×۱۳
 - ۱۱- انواع ظروف آزمایشگاهی شامل: بشر، ارلن، پیپت و انواع سمپلر و سرسمپلر
 - ۱۲- Tris (hydroxymethyl)-aminometane ساخت شرکت MERK
 - ۱۳- SDS^۱ ساخت شرکت MERK
 - ۱۴- BSA^۲، NaCl^۳، Glycin، Glycerol، β -Mercaptoethanol، Methanol، Ethanol، ساخت شرکت MERK
 - ۱۵- دستگاه اسپکتروفتومتر BIOTEK
 - ۱۶- دستگاه هموژنایزر Micro SmashTMMS-100 و ویال‌ها و Bead مخصوص
 - ۱۷- دستگاه سانتریفیوژ ependorf 5415R
 - ۱۸- دستگاه vortex
 - ۱۹- دستگاه میکروسانتریفیوژ
 - ۲۰- PH meter مدل Metrom
 - ۲۱- Page Ruler TM prestained protein ladder (مارکر پروتئینی رنگی) ساخت شرکت Fermentas
 - ۲۲- آنتی‌بادی اولیه VEGF و TNF- α ساخت شرکت abcam آمریکا
 - ۲۳- آنتی‌بادی ثانویه ساخت شرکت abcam آمریکا
- ۳-۷-۱ مواد لازم جهت وسترن بلات
- ۱- پلی‌آکریل آمید (8.00830 MERCK)

1 Sudium dodesyl sulphate
2 Bovine Serum Albomine
3 Sudium chloride

۲- دی بیس آکریل آمید (1.10897 MRCK)

۳- تریس (A1379 APPLICHEM)

۴- TEMED

۵- Glycine (1.04201 Merck)

۶- SDS (8.1734 Merck)

۷- Methanol (1.06007 Merck)

۸- سدیم کلرید (A1371Applichem)

۹- TWEEN (8.22184 Merck)

۱۰- مرکاپتواتانول (8.05740 Merck)

۱۱- برموفنول بلو (1.08122 Merck)

۱۲- آلبومین (1.012018 Merck)

۱۳- EDTA (سینا ژن)

۱۴- (Roche) protease inhibitor

۱۵- (Roche) inhibitor phosphatase

۱۶- کوماسی بلو (254933 panreac)

۱۷- فسفوریک اسید (MERCK)

۱۸- اتانول (1.00983 MERCK)

۱۹- Triton 100

۲۰- Sodium deoxycholate (556-54 Aldrich)

۳-۸ روش اجرای تحقیق

۳-۸-۱ تهیه رژیم غذایی پرچرب

رژیم غذایی پرچرب شامل:

۱. ۲۰٪ کل رژیم روزانه چربی و ۸۰٪ پلیت عادی بود.

۲. از ۲۰٪ چربی استفاده شده در پلیت ۸۰٪ آن روغن حیوانی و ۲۰٪ آن روغن گیاهی بود.

۳. برای کم کردن بوی چربی غذا، به مخلوط حاصله وانیل بدون شکر اضافه شد.

انرژی حاصل از غذای پایه موش معادل ($3/57 \text{ kcal/g}$) و انرژی حاصل از غذای جدید معادل ($4/69 \text{ kcal/g}$) بود. (انرژی رژیم غذایی برای القاء چاقی در رت‌ها معمولاً بین $3/7 \text{ kcal/g}$ تا $4/69 \text{ kcal/g}$ است [۱۲۲]). پس از انجام یک دوره یک ماهه آزمایشی^۱ برای رژیم غذایی پرچرب، نهایتاً رژیم پرچرب با درصدهای ذکر شده به‌منظور استفاده در این تحقیق برای حیوانات تهیه شد. برای تهیه غذا، پلیت‌های عادی حیوان پودر شده و با میزان‌های روغن ذکر شده و کمی آب و وانیل مخلوط شد [۱۲۳]. خمیر حاصل درون آون با دمای ۱۲۰ درجه به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه قرار داده شد و بعد از خنک شدن، به تکه‌های کوچک مناسب جهت استفاده حیوان تقسیم شد. کل مراحل تهیه غذا در انستیتو تغذیه و مواد غذایی شهید بهشتی و تحت نظارت متخصص تغذیه انجام شد.

۳-۸-۲ روش اجرای پروتکل

۴۵ سر موش هشت هفته‌ای پس از تقسیم‌بندی در گروه‌های پنج تایی، در قفس‌های مخصوص از جنس پلی کربنات و در محیطی با میانگین دمای $22 \pm 1/4$ درجه سانتی‌گراد، رطوبت $4 \pm 55\%$ و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ نگهداری شدند. سپس، به مدت هشت هفته با رژیم غذایی پرچرب تغذیه شدند [۱۲۳، ۱۲۴]. قد، وزن بدن آزمودنی و وزن غذا به‌صورت هفتگی محاسبه شد. از پایان هفته ششم موش‌ها به مدت دو هفته با تردمیل آشنا شدند. سپس، موش‌هایی که به وزن مناسب ($320 \pm 10 \text{ gr}$) رسیده بودند برای انجام فعالیت وامانده‌ساز انتخاب شدند. فعالیت وامانده‌ساز به منظور تعیین حداکثر اکسیژن مصرفی استفاده شد و به شرح زیر بود:

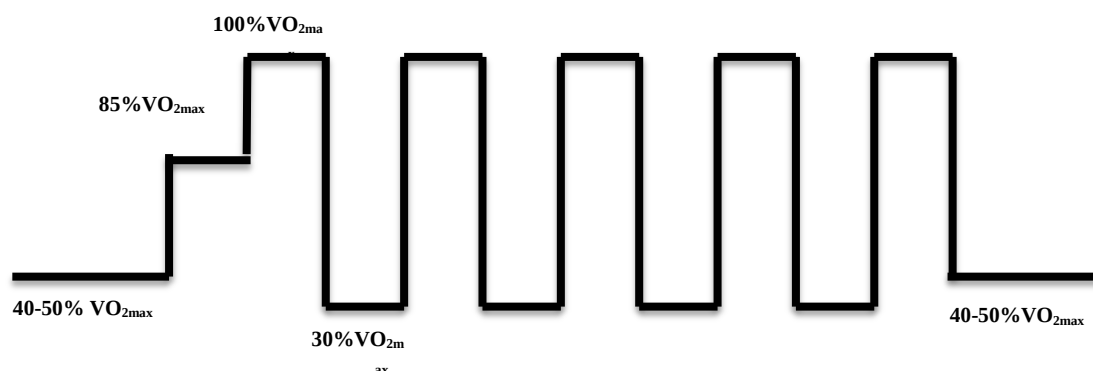
۳-۸-۲-۱ آزمون جهت تعیین حداکثر اکسیژن مصرفی:

آزمون شامل ۱۰ مرحله سه دقیقه‌ای بود. سرعت در مرحله اول ۰/۳ متر بر دقیقه بود و در مراحل بعدی ۰/۳ متر به سرعت نوار گردان اضافه شد در حالی که، شیب تردمیل در همه مراحل صفر بود. در هر مرحله از آزمون که حیوان دیگر قادر به ادامه کار نبود، سرعت در آن مرحله معادل سرعت حیوان در حداکثر اکسیژن مصرفی در نظر گرفته شد [۱۲۵].

آزمودنی‌ها به گونه‌ای در سه گروه تجربی تقسیم شدند که میانگین وزنی در هر سه گروه یکسان (320 ± 10 gr) باشد. گروه‌های تجربی شامل: تمرین تناوبی با شدت بالا ($n=9$)؛ تمرین تداومی ($n=9$) و گروه کنترل ($n=9$) بود. پس از آزمون وامانده‌ساز موش‌ها به مدت ۲۴ ساعت فعالیت انجام ندادند، همچنین، گروه‌ها در این مدت از غذای معمول موش‌ها تغذیه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، گروه‌های تجربی فعالیت تداومی و تناوبی با شدت بالا را به شرح زیر انجام دادند.

۳-۸-۲-۲ فعالیت تناوبی با شدت بالا

ابتدا موش‌ها با سرعتی معادل ۵۰-۴۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی به مدت پنج دقیقه گرم کردند. بعد از آن مرحله آماده سازی برای ورود به ست‌های تناوبی با شدت بالا، به مدت سه دقیقه با سرعتی معادل ۸۵٪ حداکثر اکسیژن مصرفی دویدند. مرحله بعد ست‌های اینتروال شامل پنج ست دو دقیقه‌ای با سرعت ۱۰۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی و چهار ست دو دقیقه‌ای با سرعت ۳۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی بود که به صورت تناوبی قرار گرفتند. در انتها موش‌ها با سرعت ۵۰-۴۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی سرد کردند (شکل ۳-۱).



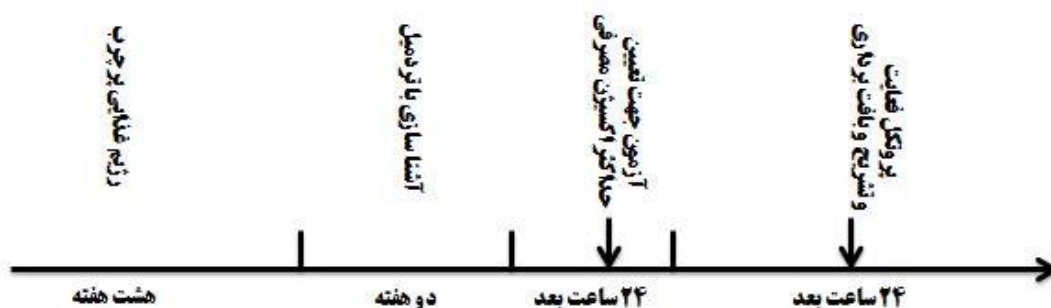
شکل ۳-۱ پروتکل فعالیت تناوبی با شدت بالا

۳-۲-۸-۳ فعالیت تداومی

شدت فعالیت در گروه تمرین تداومی برابر با سرعتی معادل ۶۵٪ حداکثر اکسیژن مصرفی بود و مدت زمان دویدن بر اساس میزان جابجایی در گروه تمرین تناوبی با شدت بالا محاسبه شد. به این- صورت که جابه‌جایی‌ها در زمان سرد کردن و گرم کردن از مسافت کل کم شد و مسافت جابه‌جا شده در هر نه ست اصلی با شدت بالا و پایین محاسبه و با توجه به سرعت مورد نظر ($VO_{2max} \times 0.65$) زمان برای پروتکل تداومی مشخص شد.

۳-۸-۳ طرح تحقیق

به‌طور کلی طرح تحقیق در شکل زیر آمده است:



شکل ۳-۲ طرح تحقیق

بلافاصله پس از انجام پروتکل یک جلسه فعالیت حاد موش‌ها بی‌هوش، تشریح و بافت عضله نعلی جدا شد.

بافت‌ها پس از قرار گرفتن در تانک ازت، تا زمان انجام آزمایشات ملکولی در فریزر ۸۰- درجه نگهداری شدند. پس از آن نمونه‌ها لیز و در دستگاه هموژن Micro Smash MS-100 قرار گرفتند. برای لیز کردن بافت‌ها از Lysis buffer با ترکیب زیر استفاده شد: (جدول ۱-۳)

جدول ۱-۳ ترکیبات بافر لیزکننده بافت

Tris-HCL	500μL , PH=8
EDTA	0.003gr
NaCl	0.08gr
Sodium Deoxycholate	0.025gr
SDS	0.01gr
Protease inhibitor cocktail	1tablet
Triton(NP40)(1%)	10μl

سپس، نمونه‌ها در سانتریفیوژ مدل Eppendorph 5415 R در دمای منفی چهار درجه سانتی-گراد و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع شفاف (Supernatant) حاوی پروتئین استخراج و در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

۴-۸-۳ تعیین غلظت پروتئین به وسیله بردفورد (Bradford assay)

از جمله روش‌های تعیین غلظت پروتئین روش بردفورد می‌باشد که اساس آن تفاوت در جذب نور در طول موج ۶۳۰ در دستگاه است. با افزایش غلظت پروتئین محلول رنگ آبی حاصل بیشتر شده و میزان جذب نوری آن افزایش می‌یابد. مواد لازم برای درست کردن محلول بردفورد در جدول ۲-۳ آمده است. برای ساخت محلول بردفورد کوماسی بلو کاملاً در الکل به مدت ۲۰ دقیقه حل می‌شود، سپس اسید فسفوریک قطره قطره به آن اضافه می‌شود. سپس، آب را قطره قطره اضافه می‌کنیم تا

محلول حاصل به حجم ۵۰ میلی لیتر برسد. محلول تهیه شده با کاغذ صافی دو بار صاف شده و در بطری تیره داخل یخچال نگهداری می شود.

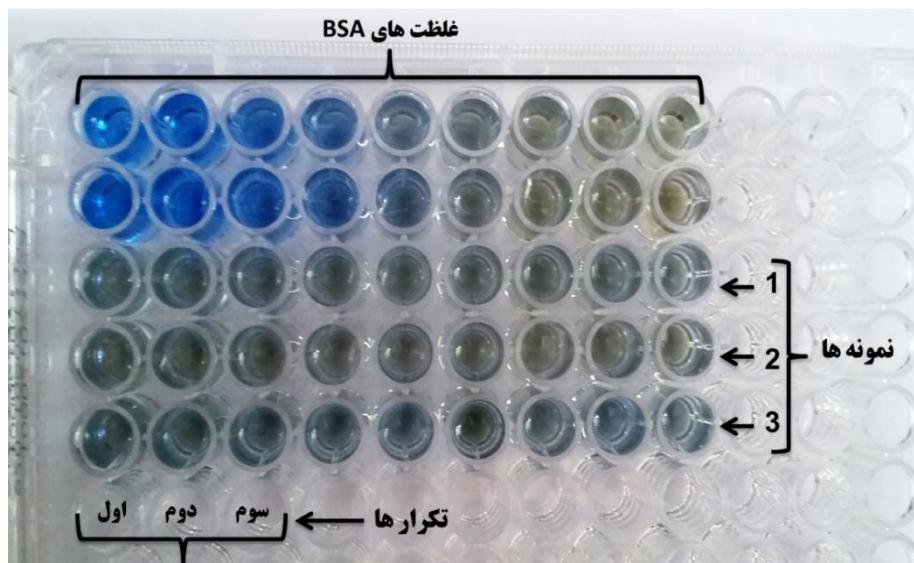
جدول ۲-۳ ترکیبات لازم برای ساخت محلول بردفورد

Comassie Blue G250	5mgr
Ethanol 95%	2.5mgr
Phosphoric acid	5 mgr
Distilled Water	50ml
Filter by	کاغذ صافی

۵-۸-۳ تهیه غلظت های مختلف (BSA) Bovine Serum Albomin برای کشیدن

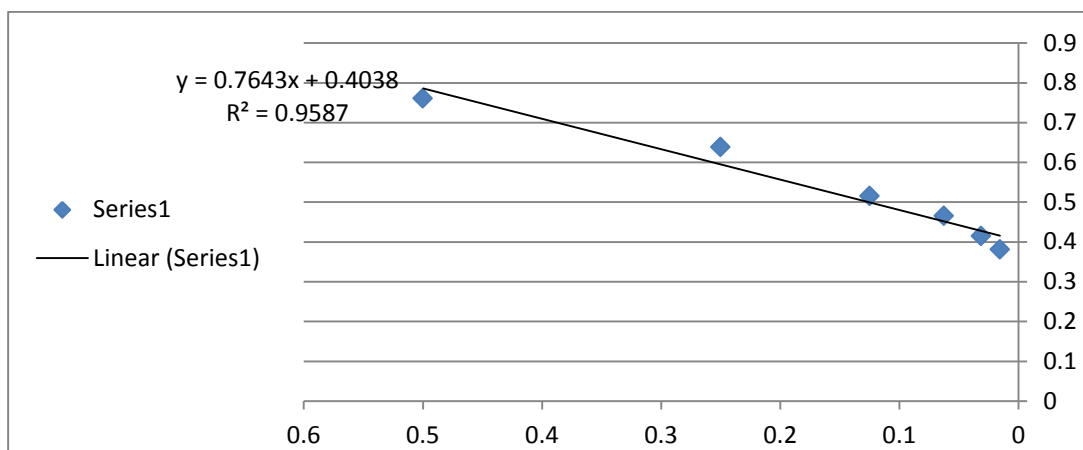
منحنی استاندارد

از BSA به عنوان پروتئین استاندارد برای اندازه گیری میزان پروتئین استفاده می شود. غلظت های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۰/۱۲۵ از پروتئین استاندارد با افزودن نصف حجم آب به غلظت قبلی ایجاد شد. بدین ترتیب، در تمامی چاهک های یک ردیف از پلیت الایزا ته صاف (شکل ۳-۳)، به جزء اولی ۲۵ میکرو لیتر آب ریخته شد. سپس در چاهک اول ۵۰ میکرو لیتر از BSA با غلظت ۱ mgr/kg ریخته شد. سپس، ۲۵ میکرو لیتر از آن برداشته و در چاهک دوم ریخته شد. پس از مخلوط کردن کامل مجدداً ۲۵ میکرو لیتر از چاهک دوم برداشته و به چاهک سوم اضافه می کنیم. این روند تا انتها ادامه یافته، ولی، در چاهک آخر ۲۵ میکرو لیتر برداشته شده و دور ریخته می شود. از جذب نوری میانگین هر غلظت برای کشیدن منحنی استاندارد که جذب نوری پروتئینی با غلظت های مشخص را نشان می دهد، استفاده می شود. نمونه ها نیز هر کدام به مقدار ۲۵ میکرو لیتر با ۳ تکرار در چاهک ها ریخته می شود. در نهایت، در چاهک ها ۲۰۰ میکرو لیتر محلول بردفورد ریخته می شود و واکنش محلول بردفورد با پروتئین باعث ایجاد رنگ آبی می شود.



شکل ۳-۳ پلیت الایزا ته صاف

سپس، پلیت را در دستگاه الایزا ریدر قرار داده و جذب نوری OD آن در طول موج ۶۳۰ نانومتر برای هر چاهک خوانده می‌شود. برای به دست آوردن غلظت پروتئین مورد نظر منحنی استاندارد را از جذب نوری BSA با غلظت‌های معین با استفاده از نرم افزار Excel رسم شده (نمودار ۳-۱) و با به دست آوردن معادله شیب خط نمودار به طوری که R^2 بین ۱ و ۰/۹۰ باشد غلظت پروتئین مورد نظر با توجه به جذب نوری آن بر حسب mgr/ml محاسبه می‌شود.



نمودار ۱-۳ تعیین غلظت به وسیله بردفورد برای عضله نعلی

۶-۸-۳ غلظت‌های پروتئین، آب و سمپل بافر (SB)

به وسیله میانگین داده‌های بردفورد هر نمونه و همچنین، داده‌های بالا و پایین منحنی استاندارد غلظت پروتئین و متعاقب آن آب و سمپل بافر برای ساخت نمونه تعیین شد. برای افزایش حجم نمونه‌ها همگی در عدد ۳ ضرب شدند.

۷-۸-۳ آماده سازی نمونه

نمونه‌های پروتئینی تهیه شده قبل از ریخته شدن در چاهک باید هم غلظت شده و با بافر نمونه مخلوط و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شود. این بافر موجب سنگین شدن، احیا و خطی شدن پروتئین‌ها می‌شود، علاوه بر آن، برموفنول بلو موجود در بافر طریقه حرکت پروتئین‌ها را در ژل نشان می‌دهد طریقه ساخت بافر نمونه در جدول (۳-۳) نشان داده شده است.

جدول ۳-۳ ساخت بافر نمونه (3X) Sample buffer

Tris (*PH=6.8)	0.6mgr
Glycerol	2.5mgr
□-mercapto etkanol	0.5mgr
Bromo phenol bule	0.01gr
SDS	0.2gr

۳-۸-۸ ساخت الکتروفورز بر روی ژل SDS page

ژل SDS page از پلیمر آکریل آمید ساخته شده است که بیس آکریل آمید این پلیمر را به صورت عرضی به هم مرتبط کرده است. به گونه ای که منافذ با قطر معین و یکسان در ژل حاصل می شود. پلیمریزاسیون ژل با افزودن آمونیوم پرسولفات (APS) شروع شده و با اضافه کردن tetramethylethylenediamine (TEMED) موجب تشکیل رادیکال های آزاد از APS شده که این رادیکال ها باعث پلیمریزاسیون می شود به دلیل این که برای انجام این مراحل OH- آزاد موجود در TEMED مورد نیاز است. از این رو، در PH پایین پلیمریزاسیون کاملاً متوقف یا کند می شود. پلی پپتیدها به علت حضور SDS دارای بار الکتریکی منفی شدند و که نسبت این بار به وزن مولکولی برای تمام پلی پپتیدهای موجود در نمونه یکسان می باشد و در واقع مولکول ها به واسطه اندازه منافذ ژل و بر اساس اندازه خود از یکدیگر جدا می شوند.

۳-۸-۹ تهیه محلول ها

مواد لازم برای تهیه ی محلول های استوک اکریل آمید، بافر ژل پایین، بافر ژل بالا و بافر ژل تانک الکتروفورز به ترتیب در جدول های زیر آمده است.

جدول ۳-۴ محلول استوک اکریل آمید (30.8%) Acrylamide Stock

acrylamid	15gr
Bais acrylamid	0.4gr
water	50ml

جدول ۳-۵ بافر ژل پایین (PH=8.8)

Tris	9.1gr
SDS	0.2gr
water	50 ml

جدول ۳-۶ بافر ژل بالا (PH=-6.8)

Tris	3.5gr
SDS	0.2gr
water	50 ml

جدول ۳-۷ بافر تانک الکتروفورز (ph=8.3) (Running Buffer)

Tris	1.5gr
SDS	1.5gr
Glycine	7.2gr
Water	500ml

۳-۸-۱۰ روش انجام آزمایش و ساختن ژل پائین و بالا

جدول ۳-۸ ساخت ژل پائین (Separating gel 8%)

بافر ژل پائین	2.5ml
استوک اکریل آمید	2.7ml
آب مقطر	4.6ml
APS10%	0.1ml
TEMED 10%	0.06ml

ابتدا دورگیری ژل را انجام می‌دهیم . ۱۰۰۰ میکرولیتر از ژل پائین کاملاً فاقد تمد را برداشته و به آن ۴ میکرولیتر تمد اضافه می‌کنیم. سپس، محلول حاصل را به سرعت از گوشه‌هایی از فضایی دو ژل می‌ریزیم، بعد از دورگیری ۱۵ دقیقه، فرصت می‌دهیم تا کاملاً بگیرد و سپس محلول ژل کامل به همراه تمد را برداشته به وسیله سمپلر در فضایی بین دو شیشه ریخته به طوری که تا دو سوم شیشه‌ها پر شود. سپس، مقداری اتانول اشباع شده اسپری می‌کنیم تا مانع خشک شدن ژل شود و به علت سنگینی حاصل از آن سطح ژل صاف می‌شود. حدود ۴۵ دقیقه برای پلیمریزاسیون ژل پائین لازم است و در این مرحله ژل بالا ۵ درصد آماده می‌شود (جدول ۳-۹).

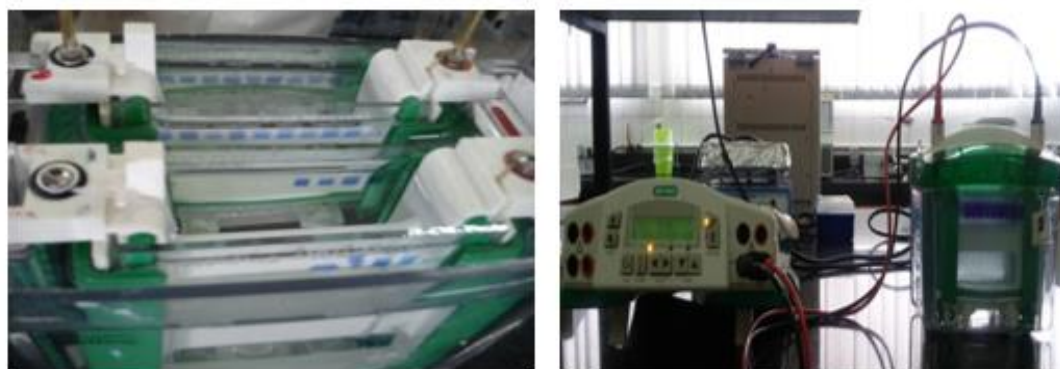
جدول ۳-۹ ساخت ژل بالا (Stacking gel 5%)

بافر ژل بالا	1.25ml
استوک اکریل آمید	0.81ml
آب مقطر	2.9ml
APS10%	0.5ml
TEMED 10%	0.003ml

پس از خالی کردن اتانول از سطح ژل پایین، محلول ژل بالا به‌طوری که تمام فضای بین دو شیشه پر شود اضافه می‌گردد. سپس شانه دارای ۱۰ دندانه برای ایجاد ۱۰ چاهک در داخل ژل بالا به‌آرامی به‌طوری که، حباب ایجاد نگردد به‌داخل فرو داده می‌شود. ۴۵ دقیقه بعد ژل بالا پلیمریزه شده و شانه به‌آهستگی بیرون کشیده می‌شود و چاهک ژل تشکیل می‌شود و سپس، شیشه‌ها توسط دستگاه نگه‌دارنده تانک الکتروفوز به‌طوری که روی چاهک‌ها را فرا بگیرد پر می‌شود سپس ۱۲ میکرولیتر از نمونه‌ها با سرنگ همیلتون در چاهک‌ها ریخته می‌شود.

۳-۸-۱۱ الکتروفوز بر ژل SDS page

شیشه‌های حاوی ژل، درون تانک الکتروفوز قرار داده می‌شوند. بافر الکتروفوز اضافه می‌گردد و سپس، ابتدا مارکر پروتئین رنگی (دارای پروتئین‌هایی با وزن مولکولی مشخص می‌باشد که رنگی می‌باشد و از ژل به کاغذ منتقل می‌شود) به‌میزان دو میکرولیتر در چاهک اول و نمونه‌ها در سایر چاهک‌ها به‌میزان ۱۲ میکرولیتر توسط سرنگ همیلتون لود می‌شود. سپس، الکترودها را به‌دستگاه مولد جریان وصل کرده و تا رسیدن پروتئین‌ها به ژل پایین، حدود ۴۵ دقیقه جریان با ولتاژ ۱۲۰ برقرار می‌شود (شکل ۳-۵).



شکل ۳-۴ تانک الکتروفوز

۱۲-۸-۳ وسترن بلات یا ایمنو بلاتینگ (Western blot or immunoblotting)

ایمنوبلاتینگ روشی است که طی آن باندهای پروتئینی جدا شده توسط ژل الکتروفورز (SDS-page) به غشایی از جنس نیترو سلولوز یا (PVDF) انتقال یافته و سپس به وسیله آنتی بادی اختصاصی پروتئین‌های روی آن شناسایی می‌شود. انتقال نمونه‌ها از ژل به کاغذ توسط جریان الکتریکی صورت می‌گیرد.

۱۳-۸-۳ مرحله انتقال از ژل به کاغذ

بعد از اتمام الکتروفورز ژل به آرامی از شیشه‌ها جدا شده و در بافر انتقال قرار می‌گیرد (جدول ۳-۱۰). سپس، کاغذ PVDF به اندازه ژل بریده شده و برای فعال شدن به مدت یک دقیقه در متانول شیک شده و با آب مقطر شسته می‌شود و درون بافر انتقال قرار می‌گیرد. انتقال پروتئین از ژل به کاغذ در دستگاه وسترن بلات صورت می‌پذیرد. این دستگاه حاوی تانکی حاوی بافر انتقال است که حاوی اسفنج، ظرف یخ و کاست مخصوص نیز می‌باشد. کاغذها اسفنج و ژل در درون این کاست قرار می‌گیرد. ترتیب قرارگیری در کاست شامل اسفنج، کاغذ صاف، ژل، کاغذ PVDF، کاغذ صافی و اسفنج است که اصطلاحاً ساندویچ گفته می‌شود. در حین قرار دادن کاغذ صافی روی کاغذ PVDF و کاغذ PVDF روی ژل، حباب‌هایی ایجاد شده توسط حرکت آهسته اسپیسر روی کاغذ صافی خارج می‌گردد. در نهایت دستگاه و با ولتاژ ۱۲۰ میلی ولت به مدت یک و نیم ساعت به منبع مولد جریان متصل گشته و پروتئین‌های موجود در ژل به کاغذ منتقل می‌گردد (شکل ۳-۶).



شکل ۳-۵ انتقال پروتئین از ژل به کاغذ

جدول ۳-۱۰ ترکیبات محلول بافر انتقال

Tris	2.42gr
Glycin	11.25gr
Methanol	200ml
Water	100 ml

۳-۸-۱۴ مرحله بلاکینگ

در مرحله بلاکینگ، محلول Blocking به منظور پوشاندن کاغذ برای جلوگیری از واکنش غیر اختصاصی آنتی بادی اولیه به کار می‌رود. برای ساختن این محلول ۲ درصد شیر خشک بدون چربی در بافر TBS-T اضافه می‌شود، پس از اتمام انتقال پروتئین‌ها بر سطح کاغذ PVDF کاغذ به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با محلول بلاکینگ شیک می‌شود. نکته بسیار مهمی که در این مرحله وجود دارد این است که هر چه محلول بلاکینگ این مرحله به تعداد دفعات بیشتر حدود ۵ الی ۶ بار استفاده شده باشد، پشت زمینه کمتری از پلات در فیلم‌های ظاهر شده ایجاد می‌شود.

۳-۸-۱۵ مرحله انکوبه کردن با آنتی بادی اولیه

پس از پایان یافتن زمان بلاکینگ کاغذ با آنتی بادی اولیه‌ای که با محلول بلاکینگ به مقدار معین آنتی بادی اولیه $\text{TNF-}\alpha$ (1:1000)، VEGF (1:1000) و $\beta\text{-actin}$ (1:1000) مخلوط و رقیق شده است، به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه می‌شود.

۳-۸-۱۶ مرحله انکوبه کردن با آنتی بادی ثانویه

پس از اتمام مرحله قبل، کاغذ را سه بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با بافر TBS-T شست‌وشو داده می‌شود. جدول (۳-۱۱). دقت شود در برخی موارد این زمان تغییر داده می‌شود، سپس، کاغذ با آنتی بادی ثانویه Anti Rabbit با غلظت (1:1000) برای آنتی بادی اولیه $\beta\text{-actin}$ و Anti mouse (1:1000) برای آنتی بادی‌های اولیه $\text{TNF-}\alpha$ و VEGF به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق شیک می‌شود. در پایان این مرحله نیز کاغذ سه بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با بافر TBS-T شست و شو داده می‌شود.

جدول ۳-۱۱ دستور ساخت بافر شست و شو

Tris-HCL	20ml
Sodium chloride	8gr
Tween20 0.1 v/v	1ml
Distal water	100 ml

۳-۸-۱۷ مرحله آشکار سازی (Detection)

از جمله دقیق‌ترین و حساس‌ترین تکنیک‌های آشکار سازی باند پروتئینی مورد نظر (که با آنتی بادی اولیه اختصاصی خود شناسایی شده است) استفاده از کیت‌های Chemoluminescence می‌باشد. کیت ECL advanced reagents که در این بررسی استفاده شد شامل non-fat milk و Reagents A,B است و برای آشکار سازی Reagents A,B با نسبت ۱:۱ مخلوط شده و حجم نهایی محلول

مذکور برای هر سانتی متر مکعب از کاغذ ۰,۱ میلی لیتر در نظر گرفته می‌شود. پس از شست و شوی نهایی مرحله قبل آب اضافی کاغذ PVDF روی سلفون قرار می‌گیرد و محلول کمولومینسانس با سمپلر روی نواحی باند مورد نظر ریخته و کاغذ در سلفون گذاشته می‌شود و درون کاست فیلم قرار داده می‌شود.

۳-۸-۱۸ مرحله ظهور فیلم در تاریکخانه

برای مشاهده باند پروتئینی مورد نظر فیلم عکاسی را بر کاغذ دارای پوشش نایلونی گذاشته و در کاست را می‌بندیم. مدت زمان باقی ماندن فیلم در کاست به نوع آنتی بادی و شدت نور دیده شده از باند پروتئینی بستگی دارد. در مورد آنتی بادی‌های TNF- α و VEGF، ۶۰ تا ۸۰ ثانیه و در مورد آنتی بادی β -actin ۱۰ ثانیه زمان مناسبی است. پس از خارج کردن فیلم از کاست آن را ابتدا در تشتک حاوی محلول ظهور به مدت ۲۰ ثانیه قرار می‌دهیم تا باندها ظاهر شوند. سپس، در تشتک آب فیلم را به مدت ۲۰ ثانیه شسته و بعد از آن به مدت ۲۰ ثانیه در محلول ثبوت تکان می‌دهیم. سپس، مجدداً فیلم را با آب جاری شسته و با گیره آویزان می‌کنیم تا خشک شود.

۳-۸-۱۹ روش Striping

با استفاده از روش بلات دوباره و برای تشخیص میزان پروتئین دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد. محلول striping جدول (۳-۱۲)، آنتی بادی اولیه، ثانویه و کیت ECL را از روی بلات می‌شوید و بلات را برای اندازه‌گیری پروتئین دیگر آماده می‌سازد. بلات را به مدت دو تا سه دقیقه در محلول Striping در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا آنتی بادی‌ها و ECL از روی آن شسته شود. سپس بلات‌ها را دو بار و هر بار به مدت پنج دقیقه با بافر TBS-T شست و شو داده می‌شود و کار مجدداً از مرحله بلاکینگ با آنتی بادی پروتئین مورد نظر تا انتها دوباره تکرار می‌شود. این روش در واقع از تکرار آزمایش روی یک نمونه خاص جلوگیری می‌کند و معمولاً برای سنجش میزان β -actin استفاده می‌شود. β -actin جزء پروتئین‌هایی است که میزان بیان آن در سلول ثابت است از

این پروتئین برای برطرف کردن خطای لود کردن پروتئین‌ها به صورت مساوی در چاهک‌ها استفاده می‌شود. در صورت لود کردن مقادیر مساوی پروتئین‌ها در چاهک‌های ژل باندهای حاصل از β -actin تمامی نمونه‌ها دانسیته یکسانی خواهد داشت.

جدول ۳-۱۲ ساخت محلول Striping

Mercaptanol	208 μ l
Tris ,IM	12.5ml
SDS	4gr
Water	تا 200ml

۳-۹ روش تجزیه و تحلیل آماری و نوع آزمون

به منظور کمی سازی باندهای مشاهده شده بر روی فیلم، نرم افزار Image J استفاده شد و دانسیته باندها توسط آن محاسبه شد ابتدا از فیلم‌های گرفته شده از باندهای پروتئینی با دوربین عکس گرفته شد و تصاویر به رایانه منتقل شد. به منظور حذف خطای احتمالی لود مقادیر مساوی پروتئین‌ها، دانسیته‌های به دست آمده از باندهای مربوط به VEGF و $TNF-\alpha$ را بر دانسیته باند بتا اکتین بلات-های آن‌ها تقسیم کرده و توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ و آنالیز واریانس یک طرفه معنی-داری داده‌ها بررسی شدند. مقدار $Mean \pm S.E.M$ در هر گروه محاسبه شده است و سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

۳-۱۰ ملاحظات اخلاقی

تمامی مراحل نگهداری و کشتار موش‌ها بر اساس کمیته اخلاقی حیوانات دانشگاه شهید بهشتی انجام گرفت.

فصل چهارم

یافته‌های پژوهش

۴-۱ مقدمه

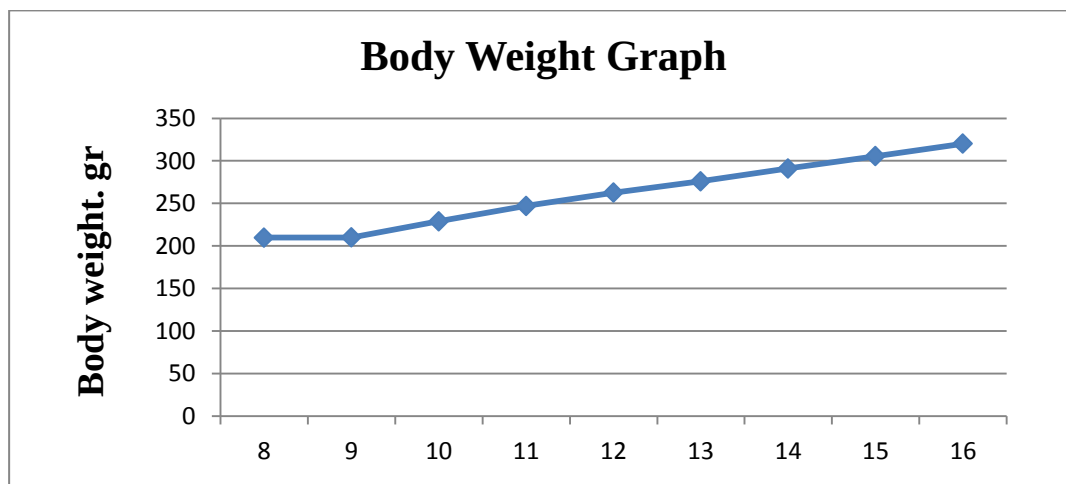
در این فصل فرضیه‌های پژوهش به کمک روش‌های آماری مناسب تجزیه و تحلیل و از طریق جدول و نمودار توصیف می‌شوند. در بخش آمار توصیفی از شاخص‌های میانگین و انحراف استاندارد استفاده شد و در بخش آمار استنباطی برای بررسی تغییرات گروه‌های مختلف از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مختلف، برای یافتن محل تفاوت‌ها به آزمون‌های تعقیبی مراجعه شد. سطح معنی‌داری برای تمام تحلیل‌های آماری $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

۴-۲ تغییرات وزن حیوانات طی هشت هفته رژیم پرچرب

به‌منظور مشاهده روند وزن‌گیری آزمودنی‌ها و تأثیر رژیم پرچرب بر وزن آزمودنی، وزن‌کشی از ورود آزمودنی‌ها به تحقیق، به‌صورت هفتگی و تا پایان هفته شانزدهم انجام شد. میانگین و انحراف معیار تغییرات وزن (برحسب گرم) گروه‌ها در طول هشت هفته رژیم پرچرب در جدول ۴-۱ و نمودار ۴-۱ نشان داده شده است.

جدول ۴-۱ جدول میانگین و انحراف معیار وزن آزمودنی‌ها

میانگین و انحراف استاندارد تغییرات وزن (گرم)									
هفته	هفته	هفته	هفته	هفته	هفته	هفته	هفته	هفته	
هشتم	نهم	دهم	یازدهم	دوازدهم	سیزدهم	چهاردهم	پانزدهم	شانزدهم	هفته
۹	۹	۹	۹	۹	۹	۹	۹	۹	نمونه قابل قبول
۲۰۹/۲۸	۲۱۰/۰۵	۲۲۹/۰۵	۲۴۷/۰۰	۲۶۲/۶۱	۲۷۶/۰۰	۲۹۱/۰۵	۳۰۵/۵۹	۳۲۰/۲۶	میانگین
۸/۴۰	۸/۱۷	۹/۲۴	۱۰/۳۲	۱۰/۳۲	۱۲/۸۲	۱۳/۲۸	۱۰/۰۰	۱۴/۹۸	انحراف استاندارد



نمودار ۱-۴ تغییرات وزن آزمودنی‌ها در طول هشت هفته رژیم پرچرب

۳-۴ آزمون جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها

جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون آماری شاپیرو ویلک استفاده شد. نتایج گروه در جدول

۲-۴ و ۳-۴ به ترتیب برای VEGF و $TNF-\alpha$ آمده است.

جدول ۲-۴ جدول نتایج آزمون شاپیرو ویلک برای VEGF در عضله نعلی

آزمون جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها				
شاپیرو ویلک			گروه‌ها	
sig	df	Statistic		
۰/۹۴۰	۹	۰/۹۷۶	کنترل	VEGF
۰/۳۴۹	۹	۰/۹۱۵	تداومی	
۰/۶۱۸	۹	۰/۹۴۳	تناوبی با شدت بالا	

نتایج آزمون شاپیرو ویلک برای مقادیر VEGF نشان داد که در هر سه گروه کنترل، تداومی و تناوبی با شدت بالا $P \geq 0.05$ است، بنابراین، بین توزیع داده‌ها و توزیع نرمال تفاوت معنی‌دار وجود ندارد و داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار هستند.

جدول ۳-۴ جدول نتایج آزمون شاپیرو ویلک برای $TNF-\alpha$ در عضله نعلی

آزمون جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها				
شاپیرو ویلک			گروه‌ها	
sig	Df	Statistic		
0.274	9	0.904	کنترل	$TNF-\alpha$
0.181	9	0.886	تداومی	
0.906	9	0.971	تناوبی با شدت بالا	

نتایج آزمون شاپیرو ویلک برای مقادیر $TNF-\alpha$ نشان داد که در هر سه گروه کنترل، تداومی و تناوبی با شدت بالا $p \geq 0.05$ است، بنابراین، بین توزیع داده‌ها و توزیع نرمال تفاوت معنی‌دار وجود ندارد و داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار هستند.

۴-۴ آزمون فرضیه‌های تحقیق

۱-۴-۴ فرضیه اول

H_0 : بر اساس فرض صفر، بین اثر یک جلسه فعالیت تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح VEGF در عضله نعلی موش‌های نر چاق تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

به‌منظور بررسی تفاوت میان گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. جدول ۴-۴ آماره‌های مربوط به آزمون فرضیه اول را نشان می‌دهد.

جدول ۴-۴ نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه برای بررسی تأثیر یک جلسه فعالیت تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح VEGF در بافت عضله نعلی موش‌های چاق

ANOVA	مجموع مجزورات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig
درون گروهی	۰/۰۰۱	۲	۰/۰۰۱	۱۱/۶۵۸	۰/۰۰۱
بین گروهی	۰/۰۰۱	۲۴	۰/۰		
کل	۰/۰۰۲	۲۶			

نتایج تجزیه و تحلیل آماری حاصل از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که میان سطوح VEGF در بافت عضله نعلی موش‌های چاق در بین سه گروه تحقیق مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P=0/001$ و $F_{2,24}=11/658$). لذا فرض صفر رد می‌شود (جدول ۴-۴).

با توجه به اینکه آزمون تحلیل واریانس یک طرفه تفاوت گروه‌ها را به صورت جفتی نشان نمی‌دهد بنابراین، برای مشخص کردن محل تفاوت به آزمون تعقیبی توکی مراجعه شد. نتایج مربوط به آزمون تعقیبی در جدول شماره ۴-۵ نشان داده شده است.

جدول ۴-۵ جدول نتایج آزمون تعقیبی برای بررسی تفاوت سطوح VEGF میان گروه‌ها در بافت عضله نعلی

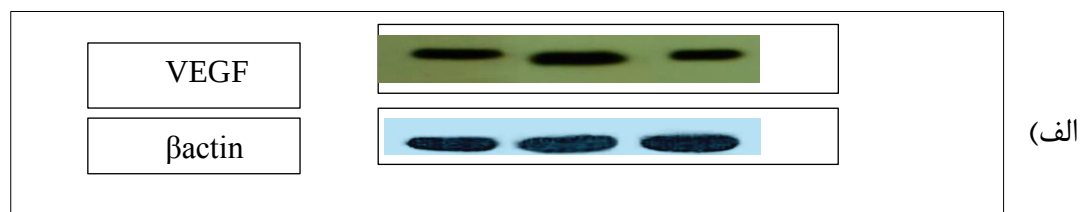
آزمون تعقیبی				
Sig. (2-tailed)	اختلاف میانگین	مقایسه‌ها		VEGF
۰/۰۰۳*	۰/۰۱۲	تداومی	تناوبی با شدت بالا	
۰/۷۱۱	-۰/۰۰۳		کنترل	
۰/۰۰۳*	-۰/۰۱۲	تناوبی با شدت بالا	تداومی	
۰/۰۰۰*	-۰/۰۱۵		کنترل	
۰/۷۱۱	۰/۰۰۳	کنترل	تداومی	
۰/۰۰۰*	۰/۰۱۵		تناوبی با شدت بالا	

$P \leq 0/05^*$

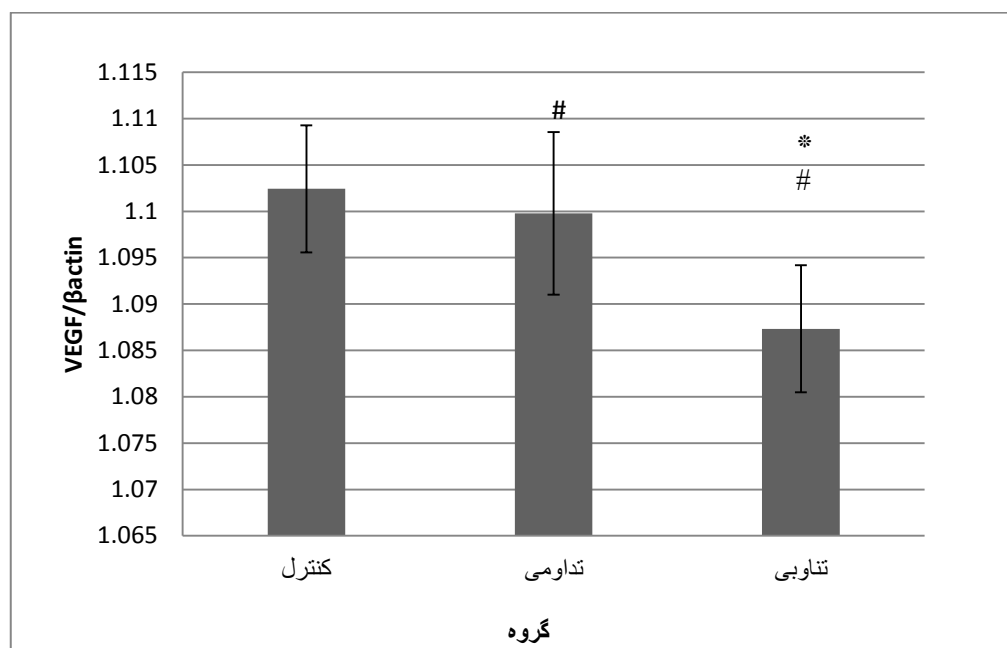
با مراجعه به نتایج آزمون تعقیبی توکی مشخص شد که بین گروه تمرین تداومی و تمرین تناوبی با شدت بالا ($P=0/003$) و همچنین، بین گروه کنترل و تمرین تناوبی با شدت بالا ($P=0/000$) تفاوت

معنی‌دار وجود دارد. اما بین گروه کنترل و گروه تمرین مداومی ($P=0/711$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

در پایان باند و میانگین نسبت VEGF/ β -actin از سمت چپ به ترتیب کنترل، هوازی مداومی و تناوبی باشدت بالا گزارش می‌شود (نمودار ۴-۲).



ب)



علامت * نشان‌دهنده تفاوت گروه‌ها با گروه کنترل و علامت # نشان‌دهنده تفاوت دو گروه تجربی با هم است ($P \leq 0/05$).

نمودار ۴-۲ الف) نوار پروتئین VEGF و β -actin.

ب) میانگین و انحراف معیار پروتئین VEGF در عضله نعلی موش‌های چاق

۲-۴-۴ فرضیه دوم

H_0 : بر اساس فرض صفر، بین اثر یک جلسه فعالیت تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح

TNF- α در بافت عضله نعلی موش‌های نر چاق تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

به‌منظور بررسی تفاوت میان گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. جدول ۴ -

۶ آماره‌های مربوط به آزمون فرضیه دوم را نشان می‌دهد.

جدول ۴-۶ نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه برای بررسی تأثیر یک جلسه فعالیت تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح TNF- α در بافت عضله نعلی موش‌های چاق

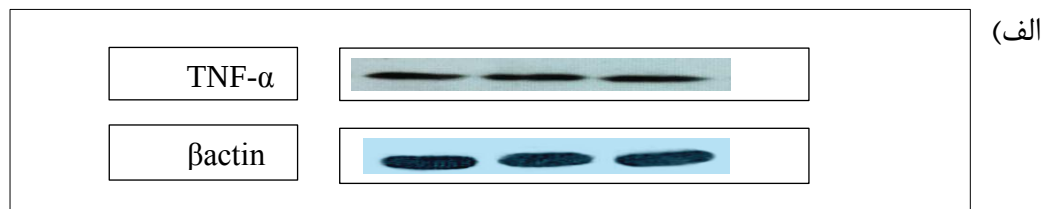
ANOVA	مجموع مجزورات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	Sig
درون گروهی	۰/۰۰۴	۲	۰/۰۰۲	۰/۷۵۶	۰/۴۸۰
بین گروهی	۰/۰۶۸	۲۴	۰/۰۰۳		
کل	۰/۰۷۲	۲۶			

نتایج تجزیه و تحلیل آماری حاصل از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که میان سطوح

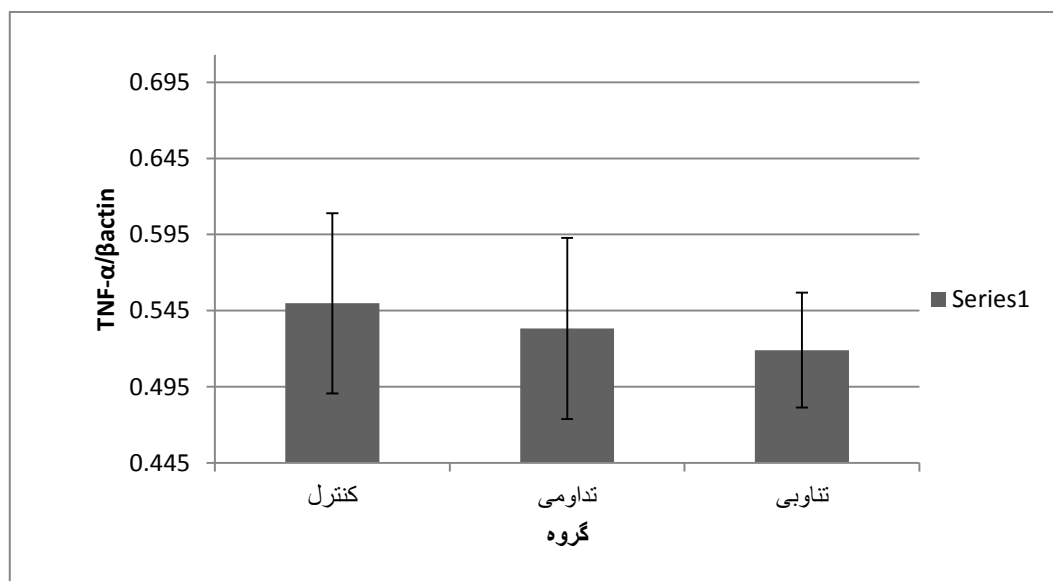
TNF- α در بافت عضله نعلی موش‌های چاق در بین سه گروه تحقیق مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری

مشاهده نمی‌شود ($P=۰/۴۸۰$ و $F_{۲,۲۴}=۰/۷۵۶$). لذا فرض صفر تأیید می‌شود (جدول ۴-۶).

در پایان باند و میانگین نسبت $TNF-\alpha/\beta\text{-actin}$ از سمت چپ به ترتیب کنترل، هوازی تداومی و تناوبی باشدت بالا گزارش می‌شود (نمودار ۳-۴).



ب)



علامت * نشان‌دهنده تفاوت گروه‌ها با گروه کنترل و علامت # نشان‌دهنده تفاوت دو گروه تجربی با هم است ($P \leq 0.05$).

نمودار ۳-۴ الف) نوار پروتئین $TNF-\alpha$ و $\beta\text{-actin}$

ب) میانگین و انحراف معیار پروتئین $TNF-\alpha$ در بافت عضله نعلی موش‌های چاق

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

۵-۱ مقدمه

در این فصل، ابتدا خلاصه‌ای از طرح پژوهش سپس، یافته‌های تحقیق با توجه به اهداف و نتایج تحقیقات انجام شده در این حیطه مورد بحث و بررسی قرار می‌گیرد. در انتها، نیز براساس نتایج برخاسته از تحقیق پیشنهاداتی ارائه و همچنین راهکارهایی جهت ادامه‌ی تحقیقات توسط محققان دیگر نیز ارائه می‌شود.

۵-۲ خلاصه پژوهش

پژوهش حاضر با هدف مقایسه اثر یک جلسه فعالیت هوازی تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح VEGF و $TNF-\alpha$ در بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق انجام شد. بدین منظور، ابتدا تعداد ۴۵ سر موش از نژاد ویستار با سن هشت هفته‌ای از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی خریداری شدند. موش‌ها به مدت ۸ هفته رژیم غذایی پرچرب (۲۰٪ روغن گیاهی و ۸۰٪ روغن حیوانی) داشتند از میان آن‌ها ۲۷ موش به وزن مناسب (320 ± 10 gr) انتخاب شدند و به سه گروه هوازی تداومی، تناوبی با شدت بالا و کنترل تقسیم شدند در پایان هفته‌ی ششم رژیم غذایی پرچرب، موش‌های گروه تجربی به مدت دو هفته در دوره آماده سازی با تردمیل را داشتند و در جلسه آخر یک جلسه فعالیت حاد را اجرا و میزان VO_{2max} را اندازه‌گیری کرده و به مدت ۲۴ ساعت هیچ‌گونه فعالیتی (تغذیه موش‌ها از نوع پرچرب نبود) انجام نداده و بعد از آن پروتکل اجرا شده و موش‌ها بی‌هوش و عضله نعلی آن‌ها جهت اندازه‌گیری VEGF و $TNF-\alpha$ جدا شد. از طریق وسترن بلات متغیرهای مورد نظر اندازه‌گیری شد. کلیه‌ی داده‌های خام شامل وزن، نمونه‌های اندازه‌گیری شده، در نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در دو سطح توصیفی و استنباطی صورت گرفت. در سطح آمار توصیفی از میانگین و انحراف استاندارد و در سطح آمار استنباطی به جهت نرمال‌سازی داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه هم‌چنین برای مقایسه زوجی از آزمون تعقیبی (Tukey) استفاده شد. نتایج نشان

داد VEGF بین گروه کنترل با گروه تناوبی با شدت بالا و همچنین، گروه تناوبی با شدت بالا با گروه هوازی تداومی تفاوت معنی‌دار و اما بین گروه هوازی تداومی با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار نشد. همین‌طور سطح $TNF-\alpha$ در بین هیچ کدام از گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

۵-۳ بحث و نتیجه‌گیری

در این قسمت فرضیه‌های پژوهش به تفکیک مورد بحث قرار می‌گیرد. فرضیه صفر نخست که مورد بررسی قرار گرفت عبارت است از بین یک جلسه فعالیت هوازی تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح VEGF در بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. بر اساس نتایج میان گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌دار بود. به عبارت دیگر، دریافت کردن تمرینات مختلف سطح VEGF را در گروه‌ها به میزان متفاوتی تغییر داده است. بررسی دوتایی گروه‌ها با هم نشان داد که بین گروه فعالیت تداومی با گروه فعالیت تناوبی با شدت بالا و همچنین، گروه فعالیت تناوبی با شدت بالا با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار وجود دارد اما بین گروه کنترل و گروه تداومی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق گستاغن و همکاران (۲۰۰۷) و رولمن و همکاران (۲۰۰۷) همسو و با نتایج تحقیق کردی و همکاران (۱۳۹۴) ناهمسو بود [۱۰۰، ۹۷، ۲۶]. کردی و همکاران (۱۳۹۴) نشان دادند هشت هفته تمرین تداومی هوازی و تناوبی شدید را بر بیان ژن سلول‌های رشد اندوتلیال عروقی عضله نعلی رت‌های نر سالم باعث افزایش VEGF در عضله نعلی می‌شود [۱۰۷]. مطالعات گوناگون نشان می‌دهند که فعالیت‌های ورزشی استقامتی آثار مثبتی بر رگ‌زایی افراد سالم دارد و افزایش رشد مویرگی در عضلات اسکلتی در اثر فعالیت بدنی یک اثر شناخته شده است [۳۳]. محققان نشان دادند پاسخ VEGF با توجه به نوع پروتکل فعالیت ورزشی و ویژگی آزمودنی‌ها متفاوت است [۳۷]. پروتکل پژوهش حاضر تنها یک جلسه بوده است می‌تواند عدم تغییر VEGF در گروه هوازی تداومی را توجیه کند.

همچنین، نتایج تحقیق حاضر کاهش معنی‌داری در سطوح VEGF در گروه فعالیت تناوبی با شدت بالا را نشان می‌دهد که با نتایج تحقیق نورشاهی و همکاران (۱۳۹۱)، گاوین و همکاران (۲۰۰۳) و جیان و همکاران (۲۰۰۴) کاهش معنی‌داری سطوح VEGF را نشان دادند همسو بوده است [۱۵ ۵۹،۱۰۶] و با نتایج زارکوسکا و همکاران (۲۰۰۶) که افزایش سطوح VEGF ناهمسو بود [۹۸]. زارکوسکا و همکاران افزایش سطوح VEGF سرم را در پاسخ به یک جلسه فعالیت بدنی اندازه‌گیری کردند نوع تمرینی ۱۸ دقیقه‌ای بیشینه بود. تمرینات تناوبی با شدت بالا از طریق درگیر کردن فرایند هایپوکسی و فشار برشی بر میزان نسخه برداری و ترجمه mRNA VEGF تأثیر می‌گذارد و این تغییرات موجب افزایش میزان VEGF در گردش خون می‌شود [۱۰۶]. وقتی میزان VEGF در جریان خون زیاد می‌شود، در نتیجه، مقدار VEGF در بافت عضله با یک جلسه فعالیت تناوبی با شدت بالا کاهش می‌یابد. یکی از مواردی که می‌توان علت کاهش VEGF در تحقیق حاضر باشد این است که بلافاصله بعد از تمرین موش‌ها جهت اندازه‌گیری VEGF کشته شدند و در زمان‌های مختلف (۲ ساعت بعد، ۴ ساعت) سطوح VEGF اندازه‌گیری نشد. در تحقیق رولمن و همکاران (۲۰۰۷) و سالم و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده شد که با گذشت زمان بعد از فعالیت میزان VEGF عضله افزایش می‌یابد [۱۰۳،۱۰۰].

فرضیه صفر دوم عبارت است از بین یک جلسه فعالیت هوازی و تداومی و تناوبی با شدت بالا بر سطوح $TNF-\alpha$ در بافت عضله نعلی موش‌های صحرایی نر چاق تفاوت معنی‌دار وجود ندارد. با توجه به مطالعه مورد نظر تفاوت بین گروه‌ها معنی‌دار مشاهده نشد. که نتایج پژوهش حاضر با نتایج فرایتزر و همکاران (۲۰۱۱)، روسی و همکاران (۲۰۰۹)، هاگوبیان و همکاران (۲۰۰۶)، ملانوری شمسی و همکاران (۱۳۹۳) همسو [۱۱۵، ۱۱۴، ۱۱۱، ۱۰۸] و با نتایج باتیستا و همکاران (۲۰۱۰) و لیرا و همکاران (۲۰۰۹) کاهش معنی‌دار سطوح $TNF-\alpha$ را بعد از تمرین استقامتی نشان دادند ناهمسو بوده است [۱۱۹،۱۱۶]. باتیستا و همکاران (۲۰۱۰) برنامه تمرینی شامل ۱۰ هفته دویدن بر روی تردمیل به مدت ۶۰ دقیقه، پنج جلسه در در هفته و با شیب صفر تا ۲۰ درجه و لیرا و همکاران (۲۰۰۹) به

مدت هشت هفته با شدت ۶۰ درصد VO_{2MAX} و به تعداد پنج جلسه در هفته به اجرای تمرین استقامتی پرداختند [۱۱۶، ۱۱۹]. با توجه به اینکه پروتکل مورد استفاده موجب سازگاری می‌شود، در نتیجه، کاهش التهاب را به دنبال دارد. سایتوکاین‌های پروآنژیوژنیک مانند $TNF-\alpha$ فاکتورهای رشد به-شمار می‌روند که ممکن است با عملکرد خود، باعث القاء یا تعدیل پاسخ‌های عروقی شوند یک دلیل احتمالی برای عدم وجود اختلاف در گروه‌ها به تحریکات مثبت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال برمی‌گردد که توسط فعالیت‌های ورزشی موجب ایجاد سازگاری شده که این دلیل منطقی برای عدم اختلاف سطوح $TNF-\alpha$ در تحقیق حاضر باشد پروتکل مورد استفاده در پژوهش حاضر تنها یک جلسه فعالیت ورزشی بوده و نمی‌تواند باعث سازگاری شده باشد. از سوی دیگر، به نظر می‌رسد میزان $TNF-\alpha$ در اثر فعالیت به جریان خون انتقال یافته و در طی فعالیت به عضله رفته و دوباره به جریان خون منتقل شده و این روند ادامه داشته و یا اینکه مقدار این فاکتور در دیگر بافت‌ها از جمله چربی تغییر پیدا کرده باشد در نتیجه ما شاهد تغییر $TNF-\alpha$ در بافت عضله نعلی نشده‌ایم.

به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد یک جلسه فعالیت تناوبی با شدت بالا منجر به کاهش سطوح VEGF در بافت عضله نعلی موش‌های نر چاق می‌شود همین‌طور، در فاکتورهای پیش التهابی در گروه تجربی تناوبی با شدت بالا کاهش غیر معنی‌دار پیدا کرده بود می‌توان گفت که فعالیت ورزشی، به‌ویژه فعالیت تناوبی با شدت بالا که انجام آن برای افراد دارای اضافه وزن و یا چاق سخت و یا خطرناک است. به نظر می‌آید منجر به افزایش VEGF بافت عضله نشد و احتمال افزایش التهاب سیستمی و مشکلات به دنبال آن را در یک فعالیت ورزشی شدید رد می‌کند. از طرفی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سطوح VEGF و $TNF-\alpha$ به دنبال یک جلسه فعالیت هوازی تداومی در بافت عضله نعلی کاهش غیر معنی‌دار یافت. اگر چه تحقیقات نشان داده‌اند که تمرین طولانی مدت ورزشی منجر به کاهش التهاب و افزایش VEGF می‌شود. اما تحقیق حاضر کاهش ناچیز را به دنبال یک جلسه فعالیت هوازی نشان داد. با توجه به عدم افزایش التهاب می‌توان این نوع تمرینات را، به جهت کاهش وزن و التهاب ناشی از چاقی، برای افراد مربوطه تجویز کرد.

۴-۵ پیشنهادهای تحقیق

۱-۴-۵ پیشنهادهای کاربردی

۱- با توجه به اینکه چاقی و اختلالات آن از مشکلات رایج جوامع امروز است و سلامتی افراد چاق نسبت به کاهش اندازه و وزن در الویت است توصیه می‌شود تحقیق حاضر بر روی آزمودنی انسان چاق و دارای اضافه وزن، مورد بررسی قرار گیرد و مشخص کنند که آیا ممکن است یک جلسه فعالیت تناوبی با شدت بالا برای آزمودنی انسان چاق از نظر تغییرات التهابی با آسیب همراه و باعث کاهش فاکتورهای پروآنژیوژنیک باشد.

۲-۴-۵ پیشنهادهای پژوهشی

۱- با توجه به اهمیت مسئله التهاب در افراد چاق پیشنهاد می‌شود در تحقیقات بعدی فاکتورهای پیش‌التهابی بیشتری از جمله IL-6 و CRP که از عوامل التهابی مهم در ارتباط با چاقی است در کنار هم اندازه‌گیری شوند تا نسبت تام پروتئین‌های التهابی در بافت عضله در بین گروه‌ها ارزیابی شود.

۲- توصیه می‌شود میزان VEGF و $TNF-\alpha$ را در سرم همزمان با بافت عضلانی اندازه‌گیری و پاسخ آن فعالیت را در زمان‌های مختلف (بعد از ۲ ساعت و ۴ ساعت) اندازه‌گیری کنند.

۳- با توجه به این که بیشتر مطالعات بر روی آزمودنی‌های انسان، ورزشکار بودند توصیه می‌شود پروتکل مورد نظر بر روی آزمودنی‌های زن و چاق بررسی و اندازه‌گیری شود.

۴- از آنجا که در این پژوهش از عضله کند انقباض استفاده شده است، می‌تواند برای مقایسه بیشتر از یک عضله تند انقباض استفاده کرد تا تفاوت کاهش VEGF در دو نوع عضله مقایسه شود.

منافع و مآخذ

1. Panchal SK, Bhaswant M, Brown L. Obesity and metabolic syndrome. In *Vivo Models for Drug Discovery*, 2014. 333-348.
2. Illán-Gómez F, González-Ortega M, Orea-Soler I, Alcaraz-Tafalla MS, Aragón-Alonso A, Pascual-Díaz M, et al. Obesity and inflammation: change in adiponectin, C-reactive protein, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 after bariatric surgery. *Obesity surgery*. 2012;22(6):950-5.
3. Rogers NH, Obin MS, Greenberg AS. Obesity and Adipokines. *Treatment of the Obese Patient*: Springer; 2007. p. 69-85.
4. Remels A, Gosker H, Verhees K, Langen R, Schols A. TNF- α -induced NF- κ B activation stimulates skeletal muscle glycolytic metabolism through activation of HIF-1 α . *Endocrinology*. 2015;156(5):1770-81.
5. Naldini A, Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*. 2005;4(1):3-8.
6. Keong CC, Singh HJ, Singh R. Back Issues. *Journal of Sports Science and Medicine*. 2006;5:629-39.
7. Tang K, Xia FC, Wagner PD, Breen EC. Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2010;170(1):16-22.
8. Islami D, Bischof P, Chardonens D. Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Molecular human reproduction*. 2003;9(7):395-8.
9. Amedro P, Picot M, Moniotte S, Dorka R, Bertet H, Guillaumont S, et al. Correlation between cardio-pulmonary exercise test variables and health-related quality of life among children with congenital heart diseases. *International journal of cardiology*. 2016;203:1052-60.
10. Bolad I, Delafontaine P. Endothelial dysfunction: its role in hypertensive coronary disease. *Current opinion in cardiology*. 2005;20(4):270.
11. Eckardt K, Taube A, Eckel J. Obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle: role of lipid accumulation and physical inactivity. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2011;12(3):163-72.
12. Dubé JJ, Sitnick MT, Schoiswohl G, Wills RC, Basantani MK, Cai L, et al. Adipose triglyceride lipase deletion from adipocytes, but not skeletal myocytes,

- impairs acute exercise performance in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2015;308(10):E879-E90.
13. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 2001;280(5):E745-E51.
 14. Higashi Y, Yoshizumi M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacology & therapeutics*. 2004;102(1):87-96.
 15. Gavin TP, Stallings HW, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Ryan NA, Moore RA, et al. Lower capillary density but no difference in VEGF expression in obese vs. lean young skeletal muscle in humans. *Journal of applied physiology*. 2005;98(1):315-21.
 16. Prior BM, Yang H, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *Journal of Applied Physiology*. 2004;97(3):1119-28.
 17. Hoier B, Passos M, Bangsbo J, Hellsten Y. Intense intermittent exercise provides weak stimulus for vascular endothelial growth factor secretion and capillary growth in skeletal muscle. *Experimental physiology*. 2013;98(2):585-97.
 18. Dunham C, Harms CA. Effects of high-intensity interval training on pulmonary function. *European journal of applied physiology*. 2012;112(8):3061-8.
 19. Olfert IM, Howlett RA, Wagner PD, Breen EC. Myocyte vascular endothelial growth factor is required for exercise-induced skeletal muscle angiogenesis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2010;299(4):R1059-R67.
 20. Jensen L, Pilegaard H, Neufer PD, Hellsten Y. Effect of acute exercise and exercise training on VEGF splice variants in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004;287(2):R397-R402.
 21. Hellsten Y, Rufener N, Nielsen JJ, Høier B, Krstrup P, Bangsbo J. Passive leg movement enhances interstitial VEGF protein, endothelial cell proliferation, and eNOS mRNA content in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008;294(3):R975-R82.

22. Waterston A, Bower M. TNF and cancer: good or bad. *Cancer therapy*. 2004;2:131-48.
23. Bruun JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2006;290(5):E961-E7.
24. Cao YL, Hu CZ, Meng X, Wang DF, Zhang J. Expression of TNF- α protein in omental and subcutaneous adipose tissue in obesity. *Diabetes research and clinical practice*. 2008;79(2):214-9.
25. Kosmadaki MG, Yaar M, Arble BL, Gilchrest BA. UV induces VEGF through a TNF-alpha independent pathway. *The FASEB journal*. 2003;17(3):446-8.
26. Gustafsson T, Rundqvist H, Norrbom J, Rullman E, Jansson E, Sundberg CJ. The influence of physical training on the angiopoietin and VEGF-A systems in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2007;103(3):1012-20.
27. Gokhale R, Chandrashekara S, Vasanthakumar K. Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes—an adaptive response. *Cytokine*. 2007;40(2):123-7.
28. Fritzenwanger M, Jung C, Goebel B, Lauten A, Figulla HR. Impact of short-term systemic hypoxia on phagocytosis, cytokine production, and transcription factor activation in peripheral blood cells. *Mediators of inflammation*. 2011;2011.
۲۹. محمدی ن، شبیری ف، خیراللهی ا، امیدى ا، امینی ر (۱۳۹۰). "بررسی فراوانی اضافه وزن و چاقی در زنان مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی شهر همدان" *مجله علمی دانشکده پرستاری و مامایی همدان*، شماره ۲، دوره نوزدهم، ص ۳۶.
۳۰. شکوری م، رشیدی آ، امیری ز (۱۳۹۲). "بررسی رابطه نوع چاقی با میزان تغییر شاخص‌های چاقی متعاقب پیروی از رژیم غذایی کاهش وزن" *مجله دانشگاه علوم پزشکی قم*، شماره ۳، دوره هفتم، ص ۴۳.
31. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(12):1785.
32. Ahmetov I, Khakimullina A, Popov D, Missina S, Vinogradova O, Rogozkin V. Polymorphism of the vascular endothelial growth factor gene (VEGF) and aerobic performance in athletes. *Human Physiology*. 2008;34(4):477-81.

۳۳. شکرچی زاده پ، خزاعی م، قراخلو ر (۱۳۹۱)، "اثر تمرینات مقاومتی بر سطح پلاسمایی نیتریک اکساید، فاکتور رشد آندوتلیال عروق و گیرنده‌ی نوع یک آن در رت‌های نر سالم"، مجله دانشکده پزشکی اصفهان، سال سی‌ام، شماره ۱۷۶

34. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76.

۳۵. مومنان ا، دلشاد م، میرمیران م، قنبریان ا، صفرخانی م، عزیزی ف (۱۳۹۱). "میزان کم تحرکی و عوامل مرتبط با آن در جمعیت بزرگسال تهرانی: مطالعه‌ی قند و لیپید تهران" مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران، دو ماهنامه پژوهشی مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، ۱۳(۵): ۴۹۳-۵۰۳.

۳۶. صالحی ا، امجدی ف، خزاعی م (۱۳۹۰). "آنژیوزنز در سلامت و بیماری: نقش فاکتور رشد آندوتلیوم عروقی"، مجله دانشکده پزشکی اصفهان، سال بیست و نهم، شماره ۱۳۲، ص ۳۲۵-۳۱۲

۳۷. رواسی ع، یادگاری م، چوبینه س (۱۳۹۳). "تأثیر دو نوع فعالیت بدنی بر پاسخ VEGF-A سرمی مردان غیرورزشکار" علوم زیستی ورزشی، دوره ۶، شماره ۱، ص ۴۱-۵۶.

38. MacLaren D, Morton J. *Biochemistry for sport and exercise metabolism*: John Wiley & Sons; 2011.

39. Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, Rakobowchuk M, MacDonald MJ, McGee SL, et al. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *The Journal of physiology*. 2008;586(1):151-60.

40. Golbidi S, Laher I. Exercise induced adipokine changes and the metabolic syndrome. *Journal of diabetes research*. 2014;2014.

41. Novelli E, Diniz Y, Galhardi C, Ebaid G, Rodrigues H, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*. 2007;41(1):111-9.

۴۲. طاهری چادرشین حسین (۱۳۸۹)، "تأثیر یک دوره مکمل دهی آنتی اکسیدان بر میزان آنژیوزنز (سطوح VEGF سرم) در مردان فعال"، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید بهشتی.

۴۳. پیروز مهدی (۱۳۸۸)، "تأثیر هشت هفته تمرین در شرایط هایپوکسی، نورموباریک و شرایط طبیعی بر غلظت VEGF سرم، VO_{2max} و برخی دیگر از فاکتورهای خون" پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید بهشتی.

44. Egginton S. Invited review: activity-induced angiogenesis. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2009;457(5):963-77.

۴۵. کرمی برمی ف (۱۳۹۰)، "تأثیر شدت‌های مختلف هایپوکسی بر سطح VEGF سرم در پاسخ به فعالیت زیر بیشینه" پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید بهشتی.

۴۶. صالحی ا، امجدی ف، خزاعی م (۱۳۹۰)، "آنژیوژنز در سلامت و بیماری: نقش فاکتور رشد آندوتلیوم عروقی"، مجله دانشکده پزشکی اصفهان، سال بیست و نهم، شماره ۱۳۲، ص ۳۱۲-۳۲۵

۴۷. رنجبر کاظم (۱۳۸۹)، "تأثیر لپتین پایه بر میزان تغییرات پروتئین VEGF و MMP سرم در حالت استراحت و در پاسخ به فعالیت استقامتی"، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید بهشتی.

48. Haas TL. Molecular control of capillary growth in skeletal muscle. *Canadian journal of applied physiology*. 2002;27(5):491-515.

49. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis a crucial target for anti-and pro-angiogenic therapies. *Genes & cancer*. 2011;2(12):1097-105.

50. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews*. 2004;56(4):549-80.

51. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical pharmacology*. 2001;61(3):253-70.

52. Koch S, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(7):a006502.

53. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):4-25.

54. Christopoulos A, Ahn SM, Klein JD, Kim S. Biology of vascular endothelial growth factor and its receptors in head and neck cancer: beyond angiogenesis. *Head & neck*. 2011;33(8):1220-9.

55. Muche A, Bigl M, Arendt T, Schliebs R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA, VEGF receptor 2 (Flk-1) mRNA, and of VEGF co-receptor neuropilin (Nrp)-1 mRNA in brain tissue of aging Tg2576 mice by in situ hybridization. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2015;43:25-34.
56. Thom R, Rowe GC, Jang C, Safdar A, Arany Z. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis in muscle by truncated peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator (PGC)-1 α . *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(13):8810-7.
57. Joško J, Mazurek M. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Medical Science Monitor*. 2004;10(4):RA89-RA98.
58. Prior BM, Yang H, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *Journal of Applied Physiology*. 2004;97(3):1119-28.
59. Gu J-W, Gadonski G, Wang J, Makey I, Adair TH. Exercise increases endostatin in circulation of healthy volunteers. *BMC physiology*. 2004;4(1):2.
60. Goldstein BI, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *The Journal of clinical psychiatry*. 2009;70(8):1,478-1090.
61. Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance—a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(4):379-86.
62. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Yung S, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 2006;124(1):175-89.
63. Böhmer R, Neuhaus B, Bühren S, Zhang D, Stehling M, Böck B, et al. Regulation of developmental lymphangiogenesis by Syk⁺ leukocytes. *Developmental cell*. 2010;18(3):437-49.
64. Blazek AD. A Simulated Altitude Device can Improve Endurance Performance without Mucosal Immune System Compromise: The Ohio State University; 2010.

۶۵. دست بر حق حسین (۱۳۹۱)، "تأثیر یک دوره تمرین مستمر شدید در شرایط هایپوکسی و نورموکسی

بر سایتوکاین ها در پاسخ به فعالیت وامانده ساز". پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید بهشتی.

66. Ware CF. TNF superfamily 2008. Cytokine & growth factor reviews. 2008;19(3-4):183.
67. Mackay F, Kalled SL. TNF ligands and receptors in autoimmunity: an update. Current opinion in immunology. 2002;14(6):783-90.
68. Chen J-X, Chen Y, DeBusk L, Lin W, Lin PC. Dual functional roles of Tie-2/angiopoietin in TNF- α -mediated angiogenesis. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2004;287(1):H187-H95.
69. Naldini A, Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. Current Drug Targets-Inflammation & Allergy. 2005;4(1):3-8.
70. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? The lancet. 2001;357(9255):539-45.
71. Leali D, Dell'Era P, Stabile H, Sennino B, Chambers AF, Naldini A, et al. Osteopontin (Eta-1) and fibroblast growth factor-2 cross-talk in angiogenesis. The Journal of Immunology. 2003;171(2):1085-93.
72. Pröls F, Loser B, Marx M. Differential Expression of Osteopontin, PC4, and CEC5, a Novel mRNA Species, during in Vitro Angiogenesis. Experimental cell research. 1998;239(1):1-10.
73. Mujika I. Intense training: the key to optimal performance before and during the taper. Scandinavian journal of medicine & science in sports. 2010;20(s2):24-31.
۷۴. شفیعی ا، کردی م، گائینی ع، سلیمانی م، نکویی ا، حدیدی و (۱۳۹۳) "تأثیر هشت هفته تمرینات تناوبی خیلی شدید بر بیان ژن های **ir-210 M** و گیرنده **EphrinA3** در عضله نعلی رت های نر سالم"
- مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک ۱۷(۳): ۲۶-۳۴.
۷۵. میردار ش. (۱۳۹۴) "مقایسه دوره های زمانی و الگوهای مختلف تیپر با مکمل سیاهدانه بر تغییرات وزنی و عملکرد استقامتی رت های ویستار نر در حال بالیدگی" پژوهشنامه فیزیولوژی ورزشی کاربردی
- ۱۰(۲۰): ۱۱۵-۱۲۸.
76. Gibala MJ, Little JP, MacDonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low- volume, high- intensity interval training in health and disease. The Journal of physiology. 2012;590(5):1077-84.
77. Gibala MJ, Ballantyne C. High-intensity interval training: New insights. Sports Science Exchange. 2007;20(2):1-5.

78. Guiraud T, Nigam A, Gremeaux V, Meyer P, Juneau M, Bosquet L. High-intensity interval training in cardiac rehabilitation. *Sports medicine*. 2012;42(7):587-605.
79. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo Ø, Haram PM, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients a randomized study. *Circulation*. 2007;115(24):3086-94.
80. Ørtenblad N, Lunde PK, Levin K, Andersen JL, Pedersen PK. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release following intermittent sprint training. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2000;279(1):R152-R60.
81. Hood MS, Little JP, Tarnopolsky MA, Myslik F, Gibala MJ. Low-volume interval training improves muscle oxidative capacity in sedentary adults. *Medicine and science in sports and exercise*. 2011;43(10):1849-56.
82. Whyte LJ, Gill JM, Cathcart AJ. Effect of 2 weeks of sprint interval training on health-related outcomes in sedentary overweight/obese men. *Metabolism*. 2010;59(10):1421-8.
83. Boutcher SH. High-intensity intermittent exercise and fat loss. *Journal of obesity*. 2010;2011.
84. Nemet D, Oh Y, Kim H-S, Hill M, Cooper DM. Effect of intense exercise on inflammatory cytokines and growth mediators in adolescent boys. *Pediatrics*. 2002;110(4):681-9.
85. Talanian JL, Galloway SD, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL. Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women. *Journal of applied physiology*. 2007;102(4):1439-47.
86. Dunham CA. The effects of high intensity interval training on pulmonary function: Citeseer; 2010.
87. Gibala MJ, McGee SL. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? *Exercise and sport sciences reviews*. 2008;36(2):58-63.
88. Burgomaster KA, Cermak NM, Phillips SM, Benton CR, Bonen A, Gibala MJ. Divergent response of metabolite transport proteins in human skeletal muscle after

- sprint interval training and detraining. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2007;292(5):R1970-R6.
89. Mogensen M, Bagger M, Pedersen PK, Fernström M, Sahlin K. Cycling efficiency in humans is related to low UCP3 content and to type I fibres but not to mitochondrial efficiency. The Journal of physiology. 2006;571(3):669-81.
۹۰. الوار ی، رواسی ع، احمدی زاد س، حسنوند س (۱۳۹۲) "تأثیر فعالیت متناوب با شدت بالا در شرایط هایپوکسی نورموباریک و نورموکسی بر پاسخ فاکتور رشد اندوتلیال عروقی سرم در مردان غیر فعال." نشریه علوم زیستی ورزشی. انتشار آنلاین.
91. Terada S, Kawanaka K, Goto M, Shimokawa T, Tabata I. Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1 α protein expression in rat skeletal muscle. Acta physiologica scandinavica. 2005;184(1):59-65.
92. Juel C, Klarskov C, Nielsen JJ, Krstrup P, Mohr M, Bangsbo J. Effect of high-intensity intermittent training on lactate and H⁺ release from human skeletal muscle. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2004;286(2):E245-E51.
۹۳. کمال ر، نورشاهی م، هدایتی م، طاهری چادرنشین ح (۱۳۹۰) "تأثیر جنسیت و فعالیت بدنی بر میزان تغییرات فاکتور رشد اندوتلیال عروق، در حالت استراحت و در پاسخ به فعالیت ورزشی زیر بیشینه" مجله غدد درون ریز و متابولیسم ایران. دوره ۱۳، شماره ۳، ۲۹۴-۳۰۰.
۹۴. خداداد ا (۱۳۶۹)، اصول عمومی آمادگی جسمانی، انتشارات دفتر تحقیقات و آموزش تربیت بدنی.
95. Thompson J. The repeatability of the measurement of aerobic power in man and factors affecting it. Quarterly journal of experimental physiology and cognate medical sciences. 1977;62(1):83-97.
96. Takano H, Morita T, Iida H, Asada K-i, Kato M, Uno K, et al. Hemodynamic and hormonal responses to a short-term low-intensity resistance exercise with the reduction of muscle blood flow. European journal of applied physiology. 2005;95(1):65-73.
97. Croley AN, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Ryan NA, Pendergast AM, Hickner RC, et al. Lower capillarization, VEGF protein, and VEGF mRNA response to acute exercise in the vastus lateralis muscle of aged vs. young women. Journal of Applied Physiology. 2005;99(5):1872-9.

98. Czarkowska-Paczek B, Bartlomiejczyk I, Przybylski J. THE SERUM LEVELS OF GROWTH FACTORS: PDGF, TGF-BETA AND. *Journal of physiology and pharmacology*. 2006;57(2):189-97.
99. Gavin T, Drew J, Kubik C, Pofahl WE, Hickner RC. Acute resistance exercise increases skeletal muscle angiogenic growth factor expression. *Acta physiologica*. 2007;191(2):139-46.
100. Rullman E, Rundqvist H, Wågsäter D, Fischer H, Eriksson P, Sundberg CJ, et al. A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle. *Journal of applied physiology*. 2007;102(6):2346-51.
101. Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VF, et al. A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *Journal of applied physiology*. 2008;104(4):1006-13.
102. Hellsten Y, Rufener N, Nielsen JJ, Høier B, Krstrup P, Bangsbo J. Passive leg movement enhances interstitial VEGF protein, endothelial cell proliferation, and eNOS mRNA content in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008;294(3):R975-R82.
103. Hussein HHSA, Mohammed YA, editors. ENDURANCE TRAINING ENHANCES CIRCULATING PLASMA VEGF AND b-FGF IN OPEN WATER SWIMMERS. *JOURNAL OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES*; 2009: SPRINGER TOKYO 1-11-11 KUDAN-KITA, CHIYODA-KU, TOKYO, 102-0073, JAPAN.
104. Czarkowska-Paczek B, Zendzian-Piotrowska M, Bartlomiejczyk I, Przybylski J, Gorski J. The influence of physical exercise on the generation of TGF- β 1, PDGF-AA, and VEGF-A in adipose tissue. *European journal of applied physiology*. 2011;111(5):875-81.
105. Thorell D, Borjesson M, Larsson P, Ulfhammer E, Karlsson L, DuttaRoy S. Strenuous exercise increases late outgrowth endothelial cells in healthy subjects. *European journal of applied physiology*. 2009;107(4):481-8.

۱۰۶. نورشاهی م. فیاض میلانی ر. غلامعلی م. (۱۳۹۱) "تأثیر یک جلسه فعالیت برونگرا بر میزان عامل رشدی

اندوتلیال عروق و اندوستاتین سرم در موش‌های نر ویستار". *مجله ورزش و علوم زیست حرکتی*. سال

سوم شماره ۱، پیاپی ۵، ص ۹۴-۸۶.

۱۰۷. کردی م. ر. نکویی ا. شفیع ا. حدیدی و (۱۳۹۴). "تأثیر هشت هفته تمرین تداومی هوازی و تناوبی

شدید بر بیان ژن سلول‌های اندوتلیال عروقی در عضله نعلی رت‌های نر سالم" مجله علمی پژوهشی

دانشگاه علوم پزشکی اراک. سال ۱۸، شماره ۸ (شماره پیاپی ۱۰۱)، ص ۶۲-۵۳

108. Rowsey PJ, Metzger BL, Carlson J, Gordon CJ. Long-term exercise training selectively alters serum cytokines involved in fever. *Biological research for nursing*. 2009.
109. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *The Journal of physiology*. 1999;515(1):287-91.
110. Gokhale R, Chandrashekara S, Vasanthakumar K. Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes—an adaptive response. *Cytokine*. 2007;40(2):123-7.
111. Fritzenwanger M, Jung C, Goebel B, Lauten A, Figulla HR. Impact of short-term systemic hypoxia on phagocytosis, cytokine production, and transcription factor activation in peripheral blood cells. *Mediators of inflammation*. 2011;2011.
112. Hagobian TA, Jacobs KA, Subudhi AW, Fattor JA, Rock PB, Muza SR, et al. Cytokine response at high altitude: effects of exercise and antioxidants at 4300 m. *Medicine and science in sports and exercise*. 2006;38(2):276.
113. Weinstock C, König D, Harnischmacher R, Keul J, Berg A, Northoff H. Effect of exhaustive exercise stress on the cytokine response. *Medicine and science in sports and exercise*. 1997;29(3):345-54.

۱۱۴. ملانوری شمسی م، مهدوی م، قراخلو ر و زهیر م ح (۱۳۹۳). "تأثیر یک دوره تمرین مقاومتی شدید بر

بیان پروتئین مایوکاین‌های IL-1 β ، IL-6 و TNF- α در عضله تند تنش موش‌های صحرایی دیابتی".

نشریه ورزش و علوم زیست حرکتی، دوره ۶، شماره ۱، ص ۷۷-۶۹.

۱۱۵. ملانوری شمسی م، فلاح م، مهدوی م (۱۳۹۳). "تأثیر یک دوره تمرین مقاومتی بر سطوح عوامل التهابی

عضله اسکلتی در موش‌های صحرایی دیابتی". مجله فیض، دوره ۱۸، شماره ۵، ص ۴۸۳-۴۷۷.

116. Batista M, Rosa J, Lopes R, Lira F, Martins E, Yamashita A, et al. Exercise training changes IL-10/TNF- α ratio in the skeletal muscle of post-MI rats. *Cytokine*. 2010;49(1):102-8.

117. Lira FS, Koyama CH, Yamashita AS, Rosa JC, Zanchi NE, Batista ML, et al. Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. *Cell biochemistry and function*. 2009;27(7):458-61.
 118. Lenk K, Schur R, Linke A, Erbs S, Matsumoto Y, Adams V, et al. Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. *European journal of heart failure*. 2009;11(4):342-8.
 119. Lira FS, Koyama CH, Yamashita AS, Rosa JC, Zanchi NE, Batista ML, et al. Chronic exercise decreases cytokine production in healthy rat skeletal muscle. *Cell biochemistry and function*. 2009;27(7):458-61.
 120. Kim D-H, Kim S-H, Kim W-H, Moon C-R. The effects of treadmill exercise on expression of UCP-2 of brown adipose tissue and TNF- α of soleus muscle in obese Zucker rats. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*. 2013;17(4):199-207.
 121. Xu X, Ying Z, Cai M, Xu Z, Li Y, Jiang SY, et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011;300(5):R1115-R25.
 122. Von Diemen V, Trindade EN, Trindade MRM. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2006;21(6):425-9.
۱۲۳. قربان زاده ب، شهریاری ع، فاطمی طباطبایی س (۱۳۹۱). "اثر پیشگیری کننده چای سبز و سیاه ایرانی بر چاقی تغذیه‌ای در موش‌های صحرایی". *مجله تحقیقات دامپزشکی*، دوره ۶۷، ش ۲، صفحات: ۱۴۳-۱۴۸.
۱۲۴. سعیدپور آ، کیمیگر م، زاهدی اصل ص، وقا م ر، قاسمی ا، ابدی ع و همکاران (۱۳۹۰). "مقایسه رژیم غذایی پرچرب بر پایه روغن سویا، روغن زیتون، روغن ماهی و کره بر مقاومت به انسولین و دآسیل گرلین پلاسما در موش‌های صحرایی". *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*. پاییز، ۱۳۹۰، سال ششم، شماره ۳، صفحات: ۳۹-۴۸.
125. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, MANHAS-DE-CASTRO R, De-Castro CB, Curi R, et al. APROGRAM OF MODERATE PHYSICAL TRAINING FOR WISTAR RATS BASED ON MAXIMAL OXYGEN CONSUMPTION. *The Journal of Strength & Conditioning Research*. 2007;21(3):751-6.

Abstract

Methods of reducing obesity have been of interest to researchers in recent studies. Physical activity in the long-term causes angiogenesis and prevents inflammation, hence the present study aimed to compare of the effect of one session a continues and high intensity intermittent aerobic exercise on VEGF and TNF α levels of soleus muscle tissues in obese male rats. To carry out this study, 45 adult male eight weeks Wistar rats were fed a high-fat diet for eight weeks. After the end of eight-week diet, when 27 rats had the appropriate weight (320 ± 10 gr), they randomly were divided into three groups: control, the continuous aerobic activity and the high intensity intermittent activity. After exhaustive tests, to determine the maximum of oxygen consumption, groups of periodic training protocol includes warm-up, five sets of high intensity ($100\% \text{VO}_{2\text{max}}$), which were separated with periods of low intensity ($30\% \text{VO}_{2\text{max}}$) and did cool down. Intensity in the continuous training group was equivalent to $65\% \text{VO}_{2\text{max}}$ and run duration based on the displacement of high intensity interval training group were calculated. The description and soleus muscle tissue were collected immediately after animals' activity. In order to analyze the data, one-way ANOVA test were used and significance level was set at $p \leq 0/05$ The results showed that one session of a high intensity intermittent exercise compared to the control and continuous group significantly decreased in the levels of VEGF and VEGF levels in continues group compared to the control group was not significant. Also, TNF- α level in all three groups showed no significant decrease. It seems, doing an intermittent exhaustive exercise can reduce VEGF and continuous exercise causes no changes in VEGF in soleus muscle, which may be it could be justified due to the higher training intensity of the intermittent against continues training. Also, according to the lack of significant changes in TNF- α and lack of inflammation, can benefit in weight loss programs and improve the health of obese people.

Keywords: continuous exercise, intermittent high-intensity activity, angiogenesis, vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, soleus muscle.



Shahrood University of Technology

Faculty of Physical Education & Sport Sciences

Comparison of the Effect of one Session a Continuous and High-Intensity Intermittent Aerobic Exercise on VEGF and TNF α Levels of Soleus Muscle tissues in Obese Male Rats

Maryam Bagheri

Supervisors:

Dr. Ali Younesian

Dr. Rahimeh Mehdi Zadeh

Advisor

Dr. Maryam Nourshahi

February 2016