



A Study on the Serum Levels of Angiogenic Factors in Response to Acute Long-term Submaximal Exercise in Sedentary Men

Kamal Ranjbar^{1*}, Maryam Nourshahi¹, Mahdi Hedayati², Hossein Taheri¹

1. Dept. Physical Education and Sport Science, Shahid Beheshti University of Tehran, Iran
2. Endocrine Research Center, Shahid Beheshti University, M.C., Iran

Received: 30 Aug 2010

Accepted: 5 Jan 2010

Abstract

Introduction: Exercise training increases skeletal muscle capillary density, but the molecular mechanisms of this process are not yet clear. The aim of the present study was to investigate the effect of acute long-term submaximal exercise on serum vascular endothelial growth factor (VEGF) as the main angiogenic factor, and matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9), as the degrading factors of basement membrane in sedentary men.

Methods: Twelve healthy sedentary men (mean age \pm SD = 22.37 \pm 2.30 years; mean BMI \pm SD = 23.91 \pm 2.74) were randomly selected among the volunteers. After determining VO₂ max, subjects exercised on ergometer for 1 h at 70% VO₂ max. Two ml of blood was taken from antecubital vein immediately after exercise and 2 hours postexercise. Serum VEGF, MMP-2 and MMP-9 were measured by ELISA.

Results: Serum levels of VEGF and MMP-2 decreased immediately after exercise. Two hours after exercise, the serum VEGF remained at a lower level but serum MMP-2 returned to basal level. No change was detected in the serum levels of MMP-9 immediately and 2 h after exercise.

Conclusion: Acute submaximal exercise decreased the main factors involved in the development of capillary network in sedentary men. This might be due to the fact that the submaximal exercise could not provide the two main stimulating factors of angiogenesis, i.e. shear stress and hypoxia. It could also be explained by the fact that the mechanism of development of capillary network following regular exercise training is different from that following an acute exercise.

Key words: angiogenesis, VEGF, Matrix metalloproteinase, acute exercise

* Corresponding author e-mail: kamal_ranjbar2010@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

بررسی سطوح سرمی فاکتورهای آنژیوژنیک در پاسخ به یک جلسه فعالیت زیربیشینه طولانی مدت در مردان غیر فعال

کمال رنجبر^{۱*}، مریم نورشاهی^۱، مهدی هدایتی^۲، حسین طاهری چادرشنین^۱

۱. گروه فیزیولوژی ورزش دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۲. مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، پژوهشکده غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۱۵ دی ۸۹

دریافت: ۸ شهریور ۸۹

چکیده

مقدمه: تمرینات ورزشی باعث افزایش چگالی مویرگی عضله اسکلتی می شود. اما مکانیسم مولکولی این فرایند هنوز به طور کامل مشخص نیست، از این رو هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر فعالیت حاد زیر بیشینه استقامتی بر فاکتورهای آنژیوژنیک، فاکتور رشد اندوتلیال عروق (VEGF) به عنوان مهمترین میتوژن مخصوص سلول های اندوتلیال و ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲ و ۹ (MMP-2, MMP-9) به عنوان تجزیه کننده های غشای پایه مویرگ، در مردان سالم غیرفعال بود.

روش ها: ۱۲ مرد سالم غیرفعال با دامنه سنی $22/91 \pm 2/74$ ساله و $BMI-23/91 \pm 2/74$ از بین داوطلبان بطور تصادفی انتخاب شدند. پس از تعیین حداکثر اکسیژن مصرفی ($VO_2 \max$)، آزمودنی ها ۱ ساعت بر روی دوچرخه با $70\% VO_2 \max$ رکاب زدند. ۲ میلی لیتر خون قبل، بلافاصله و دو ساعت بعد از ورزش از سیاهرگ آنتی کوبیتال گرفته شد. سپس میزان VEGF، MMP-2، و MMP-9 سرم به وسیله کیت الایزا مورد اندازه گیری قرار گرفت.

یافته ها: میزان VEGF و MMP-2 سرم بلافاصله بعد از فعالیت کاهش یافت. میزان VEGF در دو ساعت بعد از فعالیت نسبت به سطح پایه در سطح پایین تری باقی ماند. میزان MMP-2 سرم در دو ساعت بعد از فعالیت دوباره به سطح پایه برگشت. همچنین میزان MMP-9 سرم در پاسخ به ورزش، تغییر نکرد.

نتیجه گیری: از آنجایی که فعالیت زیر بیشینه حاد، اصلی ترین فاکتورهای آنژیوژنیک درگیر در توسعه شبکه مویرگی را در مردان جوان سالم غیر فعال به طور موقت کاهش داد؛ احتمال دارد شدت متوسط تمرین توانسته عوامل اصلی محرک آنژیوژن از جمله هایپوکسی و استرس تنشی را فراهم کند. بنابراین برای توسعه شبکه مویرگی و در نتیجه آن افزایش ظرفیت هوازی باید با شدت بیشتر از $70\% VO_2 \max$ تمرین کرد. همچنین احتمالاً "مکانیسم توسعه شبکه مویرگی به دنبال تمرینات منظم ورزشی نسبت به تمرینات تک جلسه ای متفاوت است.

واژه های کلیدی: آنژیوژن، VEGF، ماتریکس متالوپروتئینازها، فعالیت استقامتی

مقدمه

متفاوتی را به دنبال دارند که می تواند منشأ مطالعه سازوکارهای فرایند مولکولی مرتبط با آنها باشد. سازوکارهای متعددی متعاقب تمرین های ورزشی در بدن صورت می گیرد. از عمده ترین این سازوکارها، افزایش چگالی مویرگی تار عضلانی است که این تغییر وابسته به فرایند آنژیوژن^۱ می باشد [۱۸،۳۵].

عدم فعالیت بدنی، تمرین های ورزشی و در نهایت فعالیت های ورزشی شدید و تمرین حرفه ای هر کدام سازوکاری

1. Angiogenesis

* نویسنده مسئول مکاتبات: kamal_ranjbar2010@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

[۴۵]. (در این تحقیق منظور از VEGF، VEGF-A می باشد). عوامل مختلفی بر میزان تولید VEGF تاثیرگذار هستند؛ که از مهمترین آن ها می توان هایپوکسی، فشارهای برشی^۴، انقباض و کشش عضله، کاهش غلظت گلوکز خون، انواع سایتوکین ها و HIF-1^۵ را نام برد [۱۶،۴۰]. بیان ژن VEGF در انسان ها توسط کروموزوم ۳، ۶P۲۱، صورت می گیرد [۴۵]. VEGF از طریق گیرنده های تیروزین کینازی (VEGFR-1، VEGFR-2، VEGFR-3) باعث رشد، تکثیر، زنده ماندن و مهاجرت سلول های اندوتلیال و افزایش نفوذپذیری عروق می شود [۲۵،۲۹].

از طرفی دومین مرحله آنژیوژنز به ترشح آنزیم های پروتئولیتیک (ماتریکس متالوپروتئینازها) وابسته است. ماتریکس متالوپروتئینازها اندوپپتیدازهایی هستند که اولین بار در سال ۱۹۶۲ با شناخته شدن نقش آن ها در تکامل نوزاد قورباغه توسط گراس و لاپیر مطرح شدند [۵]. MMPs زیر مجموعه ای از پروتئازها هستند که بر اساس تشابه ساختاری و ویژگی سوبسترای اختصاصی به ۵ زیر گروه تقسیم می شود: [۱] کلاژنازها [۲] ژلاتینازها [۳] استرومیلیزین ها [۴] متالوپروتئینازهای غشایی [۵] و دیگر انواع MMPs [۴۲]. MMPs حدود ۲۴ آنزیم پروتئولیتیک هستند، که باعث تخریب غشای پایه مویرگ ها می شوند. این آنزیم ها از درون بر زنجیره پلی پپتید عمل می کنند و یک یا چند اسید آمینه را از بخش درونی ساختمان پروتئین کلاژن قطع می کنند. و زمینه لازم را برای مهاجرت و تکثیر سلول های اندوتلیال فراهم می کنند [۲،۱۴،۲۶]. این فرایند موجب جوانه زدن سلول های اندوتلیال از رگ قبلی می شود. مدارکی در دسترس است که به نقش MMPs در جدا کردن سلول های عضله صاف از ماتریکس برون سلولی اشاره دارد و این عامل اجازه مهاجرت را به سلول ها می دهد. فعالیت MMPs موقت و گذرا بوده و برای فرایندهای آنژیوژنز و ترمیم زخم ضروری می باشد [۲۲]. همچنین MMPs نقش مهمی را در رشد و تکامل آکسون در سیستم عصبی مرکزی ایفا می کند [۸]. نتایج بررسی ها نشان می دهد در فرایندهای پاتولوژیکی، کنترلی که روی تولید

آنژیوژنز به معنی شکل گیری مویرگ جدید از مویرگ های قبلی است [۲۴]. مکانیسم مولکولی فرایند آنژیوژنز در پاسخ به فعالیت ورزشی هنوز معلوم نیست و نیاز به تحقیقات بیشتری در این زمینه دارد. آنژیوژنز فرایند پیچیده ای است که مستلزم فراهم شدن فاکتورهای آنژیوژنیک مختلف است. فاکتورهای آنژیوژنیک پس از اتصال به گیرنده هایشان که روی سلول های اندوتلیال قرار دارد موجب فعال شدن این سلول ها می شوند. با شروع فعالیت سلول های اندوتلیال، انواع خاصی از متالوپروتئینازها از سلول های فوق ترشح می شوند و غشای پایه را در منطقه مذکور تجزیه می کنند. با هضم غشای پایه، سلول های اندوتلیال اقدام به مهاجرت و تکثیر می نماید. علاوه بر این، مولکول های اتصالی از قبیل اینتگرین ($\alpha_v\beta_3$ و $\alpha_v\beta_5$) نیز به فرایند کشیدن و جلو رفتن جوانه های رگ های خونی در حال رشد کمک می کنند. در مراحل بعدی فرایند آنژیوژنز، ماتریکس متالوپروتئینازها جهت تجزیه ماتریکس خارج سلولی و آغاز بازسازی مجدد آن تولید می شوند. سپس با برهم کنش آنژیوپوئیتین-۲ و گیرنده Tie-۲ فرایند تشکیل لوله آغاز می شود. در مرحله بعد، سیستم EphB-ephrinB نیز تنظیم فرایند تشکیل لوله ها را بر عهده گرفته و در نهایت پری سایت ها و سلول های ماهیچه ای صاف برای پایداری رگ خونی تازه تشکیل شده، به این ساختار اضافه می شوند [۳۶].

در فرایند آنژیوژنز فاکتورهای رشد آنژیوژنیک و پروتئازها نقش کلیدی را ایفا می کنند [۳۸،۴۲]. از میان فاکتورهای آنژیوژنیک، فاکتور رشد اندوتلیال عروق (VEGF)^۲ به عنوان قوی ترین میتوژن مخصوص سلول های اندوتلیال، شناخته شده است [۲۰]. VEGF پروتئین ترشحي با حجم مولکولی ۳۵ تا ۴۵ کیلو دالتونی است که عمدتاً توسط سلول های اندوتلیال، عضله صاف، تاندون، پلاکت ها، تیموس و عضله اسکلتی ترشح می شود. VEGF دارای پنج ایزوفرم A، B، C، D و PDGF^۳ است [۲۰،۳۸]. ایزوفرم های A و B بیشتر برای ساخت عروق خونی و ایزوفرم های C و D برای ساخت عروق لنفاوی به کار می روند. فعال ترین و فراوانترین ایزوفرم، VEGF-A می باشد

4. Shear Stress
5. Hypoxia Inducible Factor - 1

1. Matrix Metalloproteinase; MMP
2. Vascular Endothelial Growth Factor
3. Placental Derive Growth Factor

بر فاکتورهای آنژیوژنیکی MMP-2، MMP-9 و VEGF سرم در مردان غیر فعال سالم می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه ۱۲ مرد غیر فعال سالم با میانگین سنی $22/37 \pm 2/30$ و $BMI^1 = 23/91 \pm 2/74$ شرکت کردند. ابتدا آزمودنی ها پرسشنامه اطلاعات عمومی و سلامتی را کامل کرده و رضایت نامه کتبی را مبنی بر حضور داوطلبانه در این تحقیق امضا کردند. آزمودنی ها سابقه بیماری قلبی - عروقی و مصرف سیگار و یا هر نوع دارویی را نداشتند. نحوه انتخاب آزمودنی ها به صورت تصادفی ساده از میان داوطلبانی بودند که به صورت فراخوان ثبت نام کرده بودند. منظور از افراد غیر فعال کسانی بودند که در یک سال اخیر در هیچ گونه برنامه ورزشی منظم شرکت نکرده بودند. مشخصات آزمودنی ها در جدول شماره ۱ - خلاصه شده است.

از آزمودنی ها خواسته شد که در روز مشخص برای اندازه گیری شاخص توده بدنی (BMI) و تعیین حداکثر اکسیژن مصرفی ($VO_2 \max$) به آزمایشگاه مراجعه کنند. میزان $VO_2 \max$ از طریق دوچرخه کار سنچ (Monark - آلمان) و دستگاه گاز آنالیزور (Cortex - آلمان) اندازه گیری شد. نحوه کار بدین صورت بود که آزمودنی ها به مدت ۵ دقیقه بدون مقاومت شروع به گرم کردن می کردند. بعد از گرم کردن، میزان بار کار به میزان ۵۰ وات افزایش می یافت. بعد از آن به ازای هر دو دقیقه، ۲۵ وات به میزان مقاومت دوچرخه افزوده می شد، تا آزمودنی به حالت واماندگی می رسید. آزمودنی ها برای رسیدن

جدول ۱- مشخصات توصیفی و فیزیولوژیکی آزمودنی ها	
متغیرها	Mean \pm SD
سن	$22/37 \pm 2/30$
BMI	$23/91 \pm 2/74$
درصد چربی بدن	$13/79 \pm 3/51$
$VO_2 \max$	$37/99 \pm 3/82$

BMI = body mass index

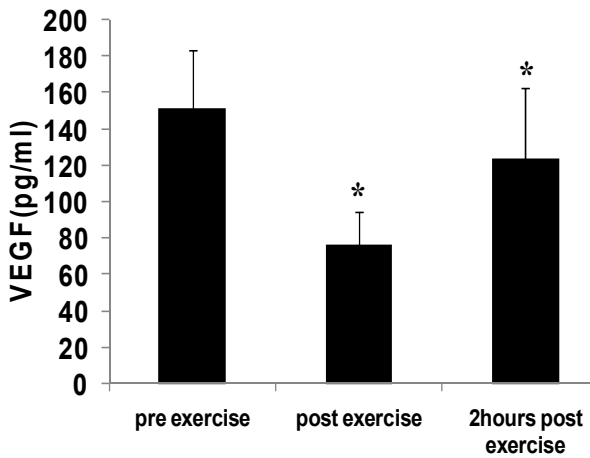
1. Body Mass Index

VEGF و MMPs است، برداشته شده و میزان تولید آن ها افزایش می یابد که نتیجه آن تشدید التهاب و بروز بیماری های مختلف مانند سرطان می باشد [۱۳]. در ابتدا، MMPs به شکل غیرفعال آن ترشح می شوند که بعداً توسط پلاسمین و دیگر آنزیم های خانواده MMPs فعال می شوند [۱۵،۳۳]. از خانواده MMPs دو آنزیم ژلاتیناز A یا MMP-2 (۷۲KDa) و ژلاتیناز B یا MMP-9 (۹۲KDa) نقش مهمی را در تخریب کلاژن ها و پروتئین های موجود در ماتریکس سلول را دارد [۳]. MMP-2 و MMP-9 بیشترین انتشار و فعالیت را در بین خانواده MMPs دارند. MMP-2 در فیبروبلاست ها، کندروسیت ها، سلول های اندوتلیال و مونوسیت ها و MMP-9 توسط نوتروفیل ها، ماکروفاژها، استئوکلاست ها، لنفوسیت های T و سلول های اندوتلیال و سلول های سرطانی تولید می شود. ژلاتیناز های A و B می توانند به تعدادی از پیوندهای پپتیدی کلاژن حمله کرده و آن ها را بشکنند. سایر سوبستراهایی که ژلاتینازها می توانند بر آن ها اثر کنند شامل کلاژن نوع ۴، ۵، ۷، ۱۰، ۱۱، ژلاتین، فیبرونکتین و الاستین می باشد [۴۱،۴۴]. MMP-2 و MMP-9 هر دو پروتئین های یکسانی را تجزیه می کنند، ولی از نظر الگوی فعال شدن و نحوه بیان ژنی کاملاً با هم متفاوت هستند [۴۲].

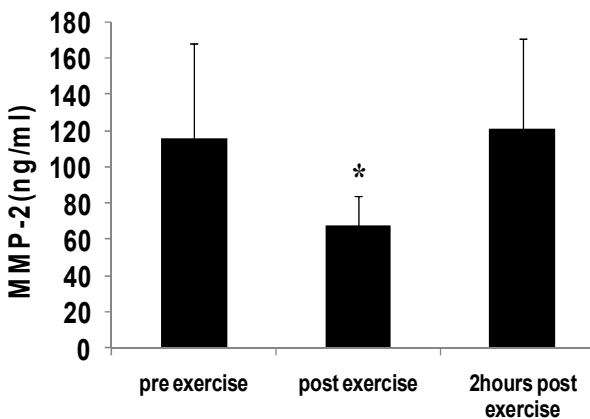
اگر چه فعالیت های ورزشی توانایی تنظیم سطوح سرمی فاکتورهای آنژیوژنیکی را دارند تا بدین شکل از به وجود آمدن شرایط پاتولوژیکی مانند: آرترئواسکلروزیز و آرتریت روماتوئید جلوگیری کند، اما هنوز مکانیسم مولکولی شروع فرایند توسعه شبکه مویرگی در پاسخ به تمرینات ورزشی به خوبی شناخته نشده است [۳۰]. از طرفی، تاثیر ورزش روی VEGF سرم دارای نتایج متناقض است چنانکه امیلین و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که به دنبال فعالیت ورزشی حاد میزان VEGF سرم افزایش می یابد [۱۱] در حالی که فرانک و همکاران (۲۰۰۷) به دنبال فعالیت ورزشی حاد عدم تغییر VEGF سرم را گزارش کردند [۳۹]. از طرفی دیگر جیان و همکاران (۲۰۰۴) کاهش غلظت VEGF سرم را گزارش کردند [۲۱]. تاکنون مطالعات کمی در مورد نقش MMPs در آنژیوژنز ناشی از ورزش صورت گرفته به همین دلیل پاسخ این آنزیم ها به فعالیت ورزشی به خوبی شناخته نشده اند. بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر ورزش زیر بیشینه طولانی مدت

یافته ها

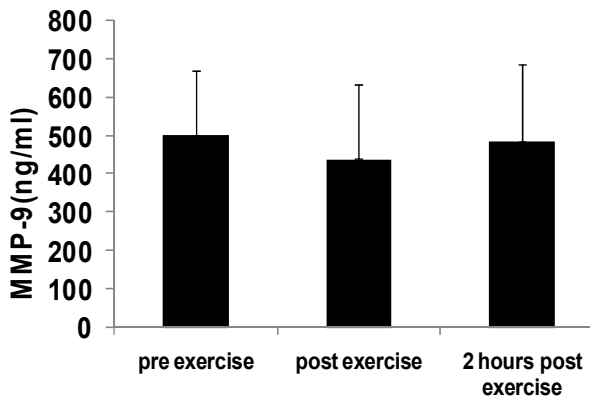
نتایج تحقیق نشان داد که یک جلسه فعالیت حاد میزان



شکل ۱- تغییرات VEGF در پاسخ به یک جلسه فعالیت حاد، * نشانه اختلاف معنادار نسبت به سطح قبل از فعالیت. سطح معناداری $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد



شکل ۲- تغییرات MMP-2 در پاسخ به یک جلسه فعالیت حاد، * نشانه اختلاف معنادار نسبت به سطح قبل از فعالیت، سطح معناداری $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد



شکل ۳- تغییرات MMP-9 در پاسخ به یک جلسه فعالیت حاد، سطح معناداری $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

به حداکثر تلاش اجرایی به صورت کلامی تشویق می شدند. از سه معیار زیر برای تشخیص $VO_2 \max$ استفاده کردیم. ۱: وقتی که ضربان قلب به بیش از ۹۰ درصد ضربان بیشینه (سن -۲۲۰) برسد. ۲: نسبت تبادل تنفسی به بیش از ۱/۱ برسد. ۳: میزان اکسیژن مصرفی علی رغم افزایش شدت تمرین به فلات برسد. رسیدن به ۲ معیار از ۳ معیار بالا برای متوقف کردن پروتکل کافی بود [۳۱].

۷۲ ساعت پس از تعیین $VO_2 \max$ ، از آزمودنی ها درخواست شد مجدداً به آزمایشگاه مراجعه کنند. برای این افراد توصیه شده بود که ۴۸ ساعت قبل از این روز از فعالیت شدید خودداری کنند [۳۱]. سپس پروتکل اصلی که شامل یک ساعت رکاب زدن دوچرخه با شدت $VO_2 \max$ ۷۰٪ بود را انجام دادند. قبل، بلافاصله و دو ساعت بعد، از آزمودنی ها به میزان ۲ میلی لیتر خون از سیاهرگ زند اسفلی در حالت نشسته گرفته شد. در حین اجرا دستگاه گاز آنالیزور به آزمودنی ها وصل بود. نمونه خونی قبل از آزمون بعد از ۳۰ دقیقه استراحت گرفته شد. آزمودنی ها می توانستند در حین فعالیت آب بنوشند. سرم نمونه های اخذ شده توسط روش سانتری فیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه ۱۰ به مدت دقیقه) جدا سازی شد و تا زمان اندازه گیری ها در دمای $80^{\circ}C$ - نگهداری شد. برای آنالیز داده های مربوط به VEGF از کیت الایزا (VEGF-A, ELISA, USCN LIFE Science Inc Wuhan, P. R. China (Intraassay CV%: 7.1 & Sensitivity: 19.8 pg/ml برای MMP-2, ELISA, USCN) الایزا (MMP-2, ELISA, USCN LIFE Science Inc, Wuhan, P. R. china C.V = 7.2% sensitivity = 0.039 ng/ml و برای MMP-9 از کیت الایزا (MMP-9, ELISA, USCN LIFE Science Inc, Wuhan, P. R. china C.V = 5.9% , sensitivity = 0.043 ng/ml) استفاده شد. کار آماری تحقیق با استفاده از نرم افزار آماری SPSS با $Ver=16$ انجام شد. نرمال بودن داده ها توسط کولموگروف-اسمیرنوف مشخص شد. از آزمون تحلیل واریانس با اندازه گیری های مکرر و همچنین از آزمون تعقیبی بونفرونی برای بررسی تفاوت معناداری بین وهله های مختلف زمانی استفاده شد. داده ها به صورت $mean \pm SD$ نشان داده شده اند و سطح معناداری $P \leq 0.05$ مشخص شد.

جدول ۲- تغییرات VEGF، MMP-2 و MMP-9 در پاسخ به فعالیت زیربیشینه استقامتی حاد

متغیر	قبل	بلافاصله	دو ساعت بعد
VEGF-A	۱۵۲/۱۷ ± ۳۱/۱۵	۷۷/۵۰ ± ۱۸/۷۲ *	۱۲۴/۸۱ ± ۳۹/۲۹ *
MMP-2	۱۱۶/۰۸ ± ۵۲/۱۳	۶۸/۶۶ ± ۱۶/۴۸ *	۱۲۱/۴۸ ± ۵۰/۶۲
MMP-9	۵۰۶/۳۱ ± ۱۶۸/۴۳	۴۴۰/۰۹ ± ۱۹۴/۶۸	۴۸۵/۵۱ ± ۲۰۱/۳۹

اعداد به صورت Mean ± SD نشان داده شده اند. * نشانه اختلاف معنادار نسبت به قبل از فعالیت. سطح معناداری $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

ورزش تغییری نمی کند این در حالی است که دانزینگ افزایش MMP-9 را بلافاصله بعد از فعالیت گزارش کرده بود [۴۳]. علت اختلاف نتایج این تحقیق با مطالعه دانزینگ و املین می تواند مربوط به شدت و مدت فعالیت باشد. هر دوی این تحقیقات از پروتکل های و امانده ساز فزاینده کوتاه مدت (کمتر از ۲۰ دقیقه) استفاده کرده بودند و افزایش و عدم تغییر VEGF را گزارش کردند. در حالی که شدت تمرین در تحقیق حاضر ثابت ($VO_2 \max$ ۷۰٪) و مدت فعالیت طولانی تر (یک ساعت) بود، که این شدت تمرین منتج به کاهش VEGF سرم گردید. مطالعات قبلی نشان داده اند که افزایش شدت تمرین موجب افزایش میزان جریان خون و همچنین سرعت جریان خون می شود که هر دوی این عوامل به افزایش فشارهای برشی منجر می شود. فشارهای برشی با فعال کردن کانال های پتاسیمی موجب هایپرپلاریزاسیون و متعاقباً با آزادسازی کلسیم، مسیرهای پیام دهی درون سلولی را تحریک می کند که این امر موجب افزایش تولید نیتریک اکساید (NO) و افزایش میزان ترشح VEGF از سلول های اندوتلیال می شود [۳۹]. از طرفی، نتیجه تحقیق حاضر مخالف با تحقیق کوسکینن^۱ و همکاران (۲۰۰۱) است که عدم تغییر MMP-2 سرم را متعاقب فعالیت حاد گزارش کرده بود [۲۳].

دلیل آن ممکن است نوع تمرینی باشد که در آن تحقیق از دویدن در سرازیری که یک تمرین برونگرا بود استفاده شده بود. تمرینات برونگرا باعث افزایش آسیب دیدگی تارهای عضلانی و ایجاد التهاب می شوند. فاکتورهای التهابی مانند اینترلوکین-۱ و تومور نکروز فاکتور الف^۲ فرایند نسخه برداری و ترجمه متالوپروتئینازها را تغییر می دهند. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد میزان MMP-9 در پاسخ به فعالیت تغییری

VEGF سرم را تغییر داد ($F_{[2, 22]} = ۳۰/۹۲$, $P = ۰/۰۰۰۱$). میزان VEGF سرم استراحتی بلافاصله بعد از فعالیت به میزان ۴۹٪ درصد کاهش یافت ($P = ۰/۰۰۰۱$) و در دو ساعت بعد از فعالیت نسبت به قبل تمرین در سطح پایین تری قرار داشت ($P = ۰/۰۱۵$). (نمودار ۱-)

میزان MMP-2 سرم نیز تحت تاثیر فعالیت حاد قرار گرفت ($F_{[2, 22]} = ۱۳/۵$, $P = ۰/۰۲۸$). میزان MMP-2 سرم بلافاصله بعد از فعالیت، ۴۱٪ کاهش یافت ($P = ۰/۰۳۰$). اما میزان MMP-2 در دو ساعت بعد از فعالیت مجدداً به سطح اولیه برگشت ($P = ۰/۲۱$). (نمودار ۲-)

همچنین نتایج تحقیق نشان داد که میزان MMP-9 تحت تاثیر یک جلسه فعالیت حاد قرار نگرفت؛ و میزان این آنزیم بلافاصله و در دو ساعت بعد از فعالیت به طور معناداری تغییر نکرد. ($F_{[2,22]} = ۰/۳۷$, $P = ۰/۶۹$) (نمودار ۳-). مقادیر VEGF، MMP-2 و MMP-9 در قبل، بلافاصله و دو ساعت بعد در جدول ۲- نشان داده شده است.

بحث

اولین یافته این تحقیق کاهش VEGF سرم بلافاصله بعد از ورزش بود که با یافته های دانزینگ و همکاران (۲۰۰۹) و املین و همکاران (۲۰۰۸) مخالف و با یافته های جیان و همکاران (۲۰۰۴) موافق بود. با توجه به اطلاعات موجود از بین محدود تحقیقات صورت گرفته که تاثیر فعالیت حاد را بر غلظت MMPs سرم مورد مطالعه قرار داده بودند این تحقیق اولین مطالعه ای است که کاهش MMP-2 سرم را متعاقب تمرین حاد گزارش کرده اند. دانزینگ و همکاران (۲۰۱۰) و املین و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که میزان VEGF بلافاصله و دو ساعت بعد از فعالیت تغییری نمی کند. همچنین دانزینگ و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که میزان MMP-2 در پاسخ به

1. Koskinen
2. Tumour Necrosis Factor - α

MMP-2 سرم باشد. دو ساعت بعد از فعالیت میزان MMP-2 با افزایش ۴۴ درصدی به سطح اولیه برگشت در حالی که VEGF با ۳۹ درصد افزایش نسبت به بعد از ورزش به طور معناداری افزایش یافت ($P = 0/003$).

تحقیقات نشان داده است که مهمترین عامل تنظیم میزان VEGF سرم دو ساعت بعد از فعالیت، میزان نسخه برداری VEGF در عضله اسکلتی است [۳۱]. رولمن و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند دو ساعت بعد از فعالیت میزان mRNA و پروتئین VEGF در عضله اسکلتی به ترتیب شش و ۱/۶ برابر افزایش یافت [۳۴]. از طرفی هافنر و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که میزان VEGF بین بافتی بعد از ورزش افزایش یافت. بنابراین می توان نتیجه گرفت که افزایش VEGF سرم در دو ساعت بعد از فعالیت ناشی از انتقال VEGF از عضله اسکلتی به داخل جریان خون است [۱۹]. رولمن عکس این موضوع را که افزایش VEGF عضله اسکلتی به علت انتقال VEGF از سرم به داخل عضله اسکلتی است را رد کرد و نشان داد که کاهش VEGF سرم بعد از فعالیت به علت مصرف این پروتئین توسط سایر بافت ها غیر از عضلات اسکلتی در گیر است. همچنین در نتایج تحقیق نشان داده شد که میزان MMP-2 بلافاصله بعد از فعالیت کاهش یافت و در دو ساعت بعد از فعالیت به میزان اولیه برگشت.

تغییرات به وجود آمده در میزان سرم MMPs ناشی از تغییرات به وجود آمده MMPs در بافت ها است [۳۴]. TIMPs و α_2 ماکروگلوبولین و TSP-1^۲ مهمترین بازدارنده های MMPs هستند [۲۶]. رولمن و همکاران (۲۰۰۷) اشاره کردند که در شرایط نرمال بین فاکتورهای آنژیوژنیکی و آنژیوستاتیکی تعادل برقرار است ولی در حین تمرینات ورزشی این تعادل به سمت فاکتورهای آنژیوستاتیکی تغییر می یابد. این محققان نشان دادند که بعد از یک جلسه فعالیت حاد میزان TIMPs mRNA بلافاصله بعد از ورزش ۱/۵ برابر و ۲ ساعت بعد، ۲/۶ برابر افزایش یافت. ممکن است این فاکتورها باعث کاهش MMP-2 سرم در پاسخ به ورزش باشند [۳۴].

در همین راستا کوسکینن و همکاران نشان دادند که میزان

نکرده است. این نتیجه مخالف یافته های رولمن و همکاران (۲۰۰۷) است که افزایش MMP-9 را متعاقب ۶۵ دقیقه فعالیت گزارش کرده بودند. در توجیه این اختلاف می توان به این مسأله اشاره نمود که رولمن در پروتکل خود از فعالیت فزاینده با شدت بالاتر استفاده کرده و همچنین میزان MMP-9 mRNA را اندازه گیری کرده بود [۳۴]. شدت تمرین [۱۰] و نوع تمرین [۱] از عوامل اصلی تاثیرگذار بر غلظت MMPs سرم می باشند. مطالعات صورت گرفته در این زمینه نشان داده است که تمرینات با شدت بالاتر باعث فراخوانی بیشتر ماکروفاژها که از تولید کننده های MMP-9 می باشند، می شود [۳۴].

مکانیسم کاهش VEGF در پاسخ به تمرین حاد به خوبی مشخص نشده است. جیان و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که کاهش VEGF سرم به دنبال فعالیت حاد به این معنی نیست که فعالیت ورزشی میزان تولید VEGF را کاهش می دهد. اما امکان دارد که این کاهش موقتی VEGF در پاسخ به ورزش، ناشی از اتصال VEGF به گیرندهای موجود بر روی سلول های اندوتلیال می باشد که این اتصال محرکی برای رخ دادن فرایند آنژیوژنز در عضله قلبی و عضله اسکلتی است. همچنین کاهش VEGF می تواند ناشی از اتصال به سایر پروتئین ها از جمله سولفات هپارین [۳۹] و EPC^۲ [۳۴] باشد. سوهر و همکاران [۲۰۰۷] نشان دادند که VEGF نقش مهمی را در فراخوانی EPC از مغز قرمز استخوان دارد [۳۹]. لازم به ذکر است که میزان EPC متعاقب فعالیت حاد افزایش می یابد. از طرفی دیگر اندوستاتین به عنوان فاکتور آنژیوستاتیکی که مانع از فعال شدن VEGF می شود [۲۷]، متعاقب ورزش حاد افزایش می یابد [۹]. بنابراین این احتمال وجود دارد که کاهش VEGF ناشی از افزایش اندوستاتین باشد. از طرفی دیگر VEGF با MMP-2 رابطه مستقیمی دارد. MMP-2 باعث جدا شدن VEGF از پروتئوگلیکان ها می شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان MMP-2 بلافاصله بعد از فعالیت کاهش یافت، پس این احتمال نیز وجود دارد که یکی از عوامل کاهش ۴۹ درصدی VEGF، کاهش ۴۱ درصدی

3. Thrombospondin-1

1. Heparin sulfate
2. Endothelial progenitor cell

همچنین مطالعات نشان می دهد که پلاسمین و MMP-2 از اصلی ترین فعال کننده های MMP-9 می باشند. در این مطالعه میزان پلاسمین اندازه گیری نشد ولی میزان MMP-2 به طور معناداری کاهش یافته بود. بنابراین این احتمال وجود دارد که کاهش MMP-2 مانع از افزایش MMP-9 شده باشد [۳۴].

میزان فاکتورهای آنژیوژنیک دو ساعت بعد از فعالیت نسبت به بلافاصله بعد از فعالیت به طور معناداری افزایش پیدا کرد. این تغییرات نشان داد که کاهش که بلافاصله بعد از فعالیت مشاهده شد موقت و زودگذر است. بنابراین به منظور مشاهده تغییرات واقعی فاکتورهای آنژیوژنیک بعد از فعالیت برای تحقیقات آینده پیشنهاد می شود که مدت زمان بیشتر از دو ساعت را برای اندازه گیری فاکتورهای VEGF و MMP-2 در نظر بگیرند.

به طور کلی این تحقیق نشان داد که میزان فاکتورهای آنژیوژنیک VEGF و MMP-2 که نقش حیاتی را در توسعه شبکه مویرگی ایفا می کنند به دنبال یک جلسه فعالیت حاد زیربیشینه در مردان جوان غیر فعال به ترتیب ۴۹ و ۴۱ درصد کاهش یافت. این کاهش، موقتی و زود گذر بود. از آنجایی که شدت متوسط ورزش در مطالعه حاضر نتوانسته بود شرایط فشار تنشی یا هایپوکسی را که از عوامل محرک آنژیوژنز هستند را ایجاد کند، بنابراین توصیه می شود برای تمریناتی که به منظور توسعه چگالی مویرگی و در نتیجه آن، توسعه ظرفیت هوازی صورت می گیرد، از شدت های بالاتر یا فعالیت فزاینده و امانده ساز استفاده شود. این که تمرینات منظم ورزشی چگونه باعث توسعه شبکه مویرگی می شوند ممکن است دارای مکانیسمی متفاوت نسبت به تمرین تک جلسه ای باشند، بنابراین در زمینه مولکولی فرایند آنژیوژنز نیازمند تحقیقات بیشتری در آینده می باشد.

سپاسگزاری

از زحمات خانم آزاده موحدی و خانم حسنا رشیدی که در امر خونگیری همکاری نمودند تشکر می شود.

کمپلکس MMP-2/TIMP-2 سرم متعاقب فعالیت حاد افزایش می یابد [۲۳]. α_2 ماکروگلوبولین، بزرگترین آنتی پروتئاز سرمی است که توسط ماکروفاژها و فیبروبلاست های کبدی ساخته شده و تقریباً روی تمام پروتئینازها، بدون توجه به طبقه آن ها، تأثیر می گذارد. α_2 ماکروگلوبولین فقط به MMPs فعال متصل می شود [۶]. فرگوسن و همکاران (۱۹۸۷) افزایش در سطوح α_2 ماکروگلوبولین را متعاقب یک وهله فعالیت ورزشی مشاهده کردند [۱۲]. همچنین TSP-1، از طریق اتصال به زیموژن های MMP-2 و MMP-9 مانع از فعال شدن MMP-2 و MMP-9 می شود. بنابراین TSP-1 باعث کاهش سطح فعالیت MMP-2 و MMP-9 می شود [۳۲، ۴]. تحقیقات نشان داده اند که میزان TSP-1 در پاسخ به فعالیت حاد افزایش می یابد [۲۸]. از طرفی دیگر گیرنده های گلیکوپروتئینی بنام اینتگرین، عامل اتصال لیگاندهای ماتریکس خارج سلولی و ساختار های ستیواسکتال^۱ هستند. تحقیقات نشان داده است MMPs توانایی اتصال به این نوع گیرنده ها را دارد؛ در نتیجه اتصال MMP-2 به گیرنده های اینتگرینی نیز می تواند یکی از عوامل کاهش MMP-2 سرم باشد [۳۷، ۷].

میزان MMP-2 دو ساعت بعد از ورزش به سطح اولیه برگشت این تغییرات نشان داد که کاهش MMP-2 متعاقب تمرین حاد، موقتی و زودگذر است و این تغییر می تواند به دلیل انتقال و ترشح MMP-2 از داخل عضله اسکلتی و ویزیکول های غشاء پلاسمایی سلول های اندوتلیال به داخل جریان خون باشد [۳۴، ۱۷].

همچنین میزان MMP-9 بلافاصله و در دو ساعت بعد از فعالیت به طور معناداری تغییر نکرد. اگر چه در بعضی از تحقیقات افزایش MMP-9 را متعاقب ورزش حاد گزارش کردند؛ این اختلاف میتواند به دلیل پاسخ های التهابی و فراخوانی ماکروفاژها و آسیب تارهای عضلانی باشد، چون هر یک از عوامل ذکر شده توانایی تنظیم میزان نسخه برداری MMP-9 را دارند [۱]. در این مطالعه چون شدت تمرین نسبت به مطالعاتی که افزایش MMP-9 را گزارش کرده بودند پایین تر بود، در نتیجه کمتر بودن پاسخ های التهابی، فراخوانی ماکروفاژها و میزان پارگی تار عضلانی طبیعی به نظر می رسد.

1. Cytoskeleton

References

- [1] Abigail LM, Alan ED, Alan S, Fiona M, The effects of impact and non-impact exercise on circulating markers of collagen remodeling in humans. *J Sports Sci* 24 (2006) 843-848.
- [2] Alex JC, Andrew CN, Regulation of Matrix Metalloproteinase. *J Vasc Res* 40 (2003)329-343.
- [3] Anitha J, Alicia RF, Teresa S, Elena L, Luis M, Ana A, George T, The Role of Matrix Metalloproteinases in Tumor Angiogenesis and Tumor Metastasis. *Pathology oncology research* 7 (2001) 11-21.
- [4] Bein K, Simons M, Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J. Biol. Chem* 275 (2000) 32167-32173.
- [5] Bendeck MP, Irvin C, Reidy MA, Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ Res* 78 (1996) 38-43.
- [6] Borth. W, Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB J* 6 (1992) 3345-3353.
- [7] Brian P. Eliceiri A, David A, The role of integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The J Clinical Investigation* 9 (2003) 1227-1230.
- [8] Bristol L, Carlos B, Lucia J, Ana A, Olivia GS, Aurora A, Martina K, Metalloproteinase MT5-MMP is an essential modulator of neuro-immune interactions in thermal pain stimulation. *PNAS* 106 (2009) 16451-16456.
- [9] Bruserud M, Grovan F, Lind R, Blymke CM, Sterhus K, Serum levels of angioregulatory mediators in healthy individuals depend on age and physical activity. *J Clinical and Laboratory investigation* 65 (2005) 505-512.
- [10] Eli Carmeli, Miri M, Shannon L, Scott KP, High intensity exercise increases expression of matrix metalloproteinases in fast skeletal muscle fibres. *Exp Physiol* 90 (2005) 613-619.
- [11] Emelien M, Van C, Christiaan JV, Steven EH, Katrien V, Inge G, Viggo F, Van Tendeloo, Vicky YH, Viviane C, A maximal exercise bout increases the number of circulating CD34/KDR_endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *J Appl Physiol* 104 (2008) 1006-1013.
- [12] Fergusen EW, Bernier LI, Banta GR, Effect of exercise and conditioning on clotting and fibrinolytic activity in men. *J Appl Physiol* 62 (1987)1416-1421.
- [13] Folkman J, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat MED* 1 (1995)27-31.
- [14] Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM, Ivan E, Targeted, disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res* 91 (2002) 852-859.
- [15] Gavin TP, Drew JL, Kubik CJ, Hickner C, Acute resistance exercise increases skeletal muscle angiogenic growth factor expression. *Acta Physiol* 191 (2007) 139-146.
- [16] Georg K, Rainer H, Molecular mechanisms of vascular adaptations to physical activity as an effective antioxidant therapy. *Cardiovascular Research* 67 (2005) 187-197.
- [17] Giulia T, Sandra D, Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *American Journal of Pathology* 160 (2002) 673-681.
- [18] Gustafsson T, Knutsson A, Puntchart A, Kaijser L, Sandberg AN, Sundberg CJ, Jansson E, Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. *Eur J Physiol*, 444 (2002)752-759.
- [19] Hoffner L, Jens JN, Henning L, Ylva H, Exercise but not prostanoids enhance levels of vascular endothelial growth factor and other proliferative agents in human skeletal muscle interstitium. *J Physiol* 5 (2003) 217-225.
- [20] Islami D, Bischof P, Chardonnens D, Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and HCG. *Molecular Human Reproduction* 9 (2003) 395-398.
- [21] Jian-Wei Gu, Giovanni G, Julie W, Ian M, Exercise increases endostatin in circulation of healthy volunteers. *J Physiology* 4 (2004) 1-6.
- [22] Jung YH, Robert M, Staci G, Zena W, Jung L, Alpa T, Matrix Metalloproteinase-2 Facilitates Wound Healing

- Events That Promote Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J Appl Physiol*. 21 (2006) 16-25.
- [23] Kosken SA, Hoity M, Huainan T, Martikkala V, Marine T, Oaks J, Oberg M, Sumer H, Serum concentrations of collagen degrading enzymes and their inhibitors after downhill running. *Scand J Med Sci Sports*, 11 (2001) 9-15.
- [24] Laughlin M.H. and B. Roseguini, Mechanism for exercise training induced increases in skeletal muscle blood flow capacity. *J Physiol Pharmacol* 59 (2008) 71-88.
- [25] Luisa M. Iruela A, The Cell Biology of Angiogenesis. *Iruela-Arispe* 36 (2005) 1-30.
- [26] Marsha A. Moses, The Regulation of Revascularization by Matrix Metalloproteinase and Their Inhibitors. *Stem Cells* 15 (1997) 180-189.
- [27] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, and Folkman, Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell J* (1997) 277-285.
- [28] Olfert IM, Breen EC, Gavin TP, Temporal mRNA thrombospondin-1 response in skeletal muscle exposed to acute and chronic exercise. *Growth Factors* 24 (2006) 253-259.
- [29] Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI, Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors. *Eur J Physiol* 38 (2007) 258-268.
- [30] Prior BM, Yang HT, and Terjung RL, What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol* 97 (2004) 1119-1128.
- [31] Raymond MK, Howard WS, Robert CY, Timothy PG, Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men. *J Appl Physiol*. 96 (2004) 1445-1450.
- [32] Rodriguez-M, Lane T, Ortega M.A, Hynes R.O, Lawler J, Iruela-Arispe ML, Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci* 98 (2001) 12485-12490.
- [33] Roger L, Angiogenesis and obesity. *Cardiovascular Research* 10 (2007) 1-8.
- [34] Rullman EH, Wagsater D, Fischer H, Eriksson P, Sundberg CJ, Jansson E, Gustafsson T, A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102 (2007) 2346-2351.
- [35] Siafakas MN, Jordan M, Wagner H, Breen EC, Benoit H, Wagner PD, Diaphragmatic angiogenic growth factor mRNA responses to increased ventilation caused by hypoxia and hypercapnia. *Eur Respir J* 17 (2001) 681-687.
- [36] Stehbens WE, Structural and architectural changes during arterial development and the role of hemodynamics. *Acta Anas*. [Basel] 157 (1996) 261-274.
- [37] Steve S, Kessler T, Joel G, Dale LB, David AC, Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin $\alpha\beta 3$ by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *PNAS* 98 (2001) 119-124.
- [38] Stuart Egginton, Invited review: activity-induced angiogenesis. *Eur J Physiol*, 457 (2009)963-977.
- [39] Suhr F, Klara B, Markus M, Birgit B, Silvia A, Wilhelm B, Joachim M, Effects of short-term vibration and hypoxia during high-intensity cycling exercise on circulating levels of angiogenic regulators in humans. *J Appl Physiol*. 103 (2007) 474-483.
- [40] Suhr F, Rosenwick C, Vassiliadis A, Bloch W, Brixius K, Regulation of extracellular matrix compounds involved in angiogenic processes in short- and long-track elite runners. *J Appl Physiol*. 26(2009) 1222-1223.
- [41] Veronique M, Laura R, Carine M, Ben W, Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *The Journal express article* 10 (2004) 1096- 1106.
- [42] Victor WM, Hinsbergh V, Pieter K, Endothelial sprouting and angiogenesis. *Cardiovascular Research* 78 (2008) 203-212.
- [43] Danzig V, Blanka M, Petr K, Levels of circulating biomarkers at Rest and after exercise in coronary artery disease patients. *Physiological research*, 102 (2010) 1374-1379.
- [44] Vincent L, Ben W, Carine M, Catherine G, Maud J, MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. *The Journal express article* 10 (2003) 1096- 1116.
- [45] Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G, Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome6p21.3. *Circulation* 93 (1996) 1493-1495.