



تأثیر تمرینات استقامتی و داروی آدنوزین پس از آسیب ایسکمی رپرفیوژن مغزی بر بیان برخی

ژن های آنژیوژنیک در هیپوکامپ رت های نر ویستار

محسن جعفری^۱، ارسلان بهجتی^۲، مهدی ضیغم جهانی^۳، علیرضا داوودی کوشا^۴

Doi: 10.30495/NSSEM.2023.1994712.1011

چکیده

مقدمه: درمان های افزایش آدنوزین در کاهش آسیب عضوی ناشی از سکته مؤثر هستند. هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر یک دوره تمرین استقامتی با و بدون مصرف آدنوزین بر بیان برخی ژن های آنژیوژنیک در هیپوکامپ رت های مبتلا به آسیب ایسکمی رپرفیوژن بود.

روش ها: پس از القای آسیب ایسکمی رپرفیوژن به ۳ گروه ایسکمی (گروه ۱)، ایسکمی با تمرین (گروه ۲) و ایسکمی با تمرین و دارو (گروه ۳) تقسیم شدند. گروه های تمرینی به مدت ۸ هفته (۵ جلسه در هفته) با شدت ۳۰ متر بر دقیقه به تمرینات استقامتی روی تردمیل پرداختند. دوز آدنوزین در گروه ۳ معادل ۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم بود. پس از تمرینات هیپوکامپ رت ها برای آنالیز بیان ژن جدا گردید.

یافته ها: بین گروه های ۱ با ۲ و ۳ تفاوت معنی داری در بیان ژن $HIF1\alpha$ وجود داشت ($P=0/000$)؛ در مورد بیان ژن $HIF2\alpha$ ، بین همه گروه ها تفاوت معنی داری وجود داشت ($P=0/000$)؛ بیان ژن R4 بین گروه های ۱ با ۲ و ۳ تفاوت بود ($P=0/004$)؛ بیان ژن S2 بین همه گروه ها متفاوت بود ($P=0/000$)؛ بیان ژن HMGB1 بین گروه های ۱ با ۲ ($P=0/011$)، ۱ با ۳ ($P=0/000$) و ۲ با ۳ ($P=0/000$) متفاوت بود و نیز تفاوت معنی داری بین همه گروه ها در بیان ژن AP1 مشاهده شد ($P=0/000$).

نتیجه گیری: پس از آسیب ایسکمی رپرفیوژن، هشت هفته تمرین استقامتی از طریق افزایش بیان ژن های آنژیوژنیک $HIF1\alpha$ ، $HIF2\alpha$ ، S2، R4، HMGB1 و AP1 می تواند در توسعه روند آنژیوژن مؤثر باشد و این اثر با مصرف آدنوزین تقویت می گردد.

کلمات کلیدی: تمرین هوازی، آدنوزین، آنژیوژن، سکته مغزی.

۱. گروه علوم ورزشی، واحد شیروان، دانشگاه آزاد اسلامی، شیروان، ایران
۲. گروه علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران
۳. گروه علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران
۴. واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران



Effect of Endurance Trainings and Adenosine Treatment After Brain Ischemia Reperfusion Injury on Some Angiogenic Genes Expression in Hippocampus of Male Wistar Rats

Mohsen Jafari¹, Arsalan Behjati², Mahdi Zeygham Jahani³, Alireza Davoodi KooshaMeysam⁴

Doi: 10.30495/NSSEM.2023.1994712.1011

Abstract:

Introduction: Angiogenesis improvement treatments are effective in reduction of stroke induced organ injury. The aim of this study was to investigate the effects of an endurance training with and without adenosine consumption on some antigenic genes expression in hippocampus of male Wistar rats after ischemia reperfusion injury.

Methods: After induction of ischemia reperfusion injury, rats were divided into three groups of ischemia (group1), ischemia with exercise (group2) and ischemia with exercise and adenosine (group3). Exercise groups performed endurance trainings on treadmill for 8 weeks (5 sessions per week) with intensity of 30m per minute. Adenosine dosage in group3 was 0/4 mg per kg. Hippocampus of the rats were isolated for gene expression analysis after trainings.

Results: There was difference between groups 1&3 and 2&3 in HIF1 α gene expression (P=0/000); in case of HIF2 α , all groups were different (P=0/000); R4 gene expression was different between groups 1&2 and 1&3 (P=0/004); S2 gene expression was different in all groups (P=0/000); HMGB1 gene expression was different between groups 1&2 (P=0/011), 1&3 (P=0/000) and 2&3 (P=0/000) and significant difference was observed in all groups in AP1 gene expression (P=0/000).

Conclusion: After ischemia reperfusion injury, eight weeks' endurance training may be effective in improvement of angiogenesis through elevation of HIF1 α , HIF2 α , S2, R4, HMGB1 and AP1 genes expression and this effect is reinforced by adenosine treatment.

Keywords: Aerobic Exercise, Adenosine, Angiogenesis, Cerebral Stroke.

1. Department of Physical Education and Sport Science, shirvan Branch, Islamic Azad University, shirvan
2. Department of Physical Education and Sport Science, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd
3. Department of Physical Education and Sport Science, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd
4. neyshabor Branch, Islamic Azad University, neyshbor

مقدمه

حفظ دقیق سطح اکسیژن بافت ها، نیازمند همکاری سیستمهای مختلف نظیر گردش خون، تنفس و سیستم غددی-عصبی میباشد، زیرا که افزایش یا کمبود سطح اکسیژن ممکن است منجر به مرگ سلول، بافت، و یا ارگانیسم گردد. همه سلولهای هسته دار بدن هیپوکسی را حس کرده و به آن پاسخ می دهند. یکی از نخستین پاسخ های سلول ها به هیپوکسی آنژیوژنز است (۱). آنژیوژنز یکی از فرایندهای مهم برای افزایش جریان خون بافتی و تأمین مواد غذایی و اکسیژن سلول ها همراه با دفع مواد زاید و دی اکسید کربن از آنها و یک مکانیزم گسترده حمایتی در پاسخ به ایسکمی است. برای مثال سکنه میوکاری و ایسکمی عضوی می تواند آنژیوژنز اندوژن را در هر اندامی تحریک کنند و درمان های افزایش آنژیوژنز در کاهش آسیب عضوی در این اختلالات کمک کننده هستند. همچنین در مغز پاسخ های آنژیوژنیک نقش مهمی را روی بازسازی مغزی بعد از آسیب ایسکمی ایفا می کنند. شواهد نشان می دهند که نقاط ایسکمی شده به شدت در معرض پاسخ های آنژیوژنیک قرار دارند (۲). چندین فاکتور آنژیوژنیک در آنژیوژنز مغزی درگیر هستند که $HIF1\alpha$ ، $HIF2\alpha$ ، جعبه ۱ گروه پرتحرک (HMGB1) و آنژیوپوپتین ۱ (AP1) چهار مورد از آنها هستند. مطالعات اتوپسی نشان داده اند که ایسکمی و آسیب مغزی از طریق عامل ۱ القای هیپوکسی (HIF1) آنژیوژنز را تحریک می کند. تکثیر سلول های اندوتلیال ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از رویدادهای ایسکمی آغاز می شود و تا چند هفته پس از آن ادامه دارد (۳). علیرغم نقش محوری عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در آنژیوژنز، اخیراً توجه محققین به HMGB1 در بازسازی مغزی پس از سکنه متمرکز شده است که یک پروتئین غیرهیستونی متصل به DNA است و در بیشتر سلول های یوکاریوت شامل سلول های عصبی انسانی بیان می شود (۴). HMGB1 عملکردهای مختلفی را بسته به مکان سلولی خود ایفا می نماید و می تواند توسط سلول های مصدوم به صورت غیرفعال و توسط سلول های تحریک شده به صورت فعال رها شود. رهایش HMGB1 پس از آسیب مغزی تروماتیک و سکنه ایسکمی مشاهده شده است. در مدل های موشی انسداد سرخرگ مغزی میانی، سطوح HMGB1 در هسته ایسکمیک بلافاصله کاهش می یابد و HMGB1 سرمی به سرعت افزایش می یابد. سیگنالینگ HMGB1 می تواند فعال سازی و جوانه زدن اندوتلیال را توسعه دهد و در نرون ها بقا و رشد سلولی را افزایش

^۱Angiopoietin

^۲High Mobility Group Box 1

^۳Angiopoietin

^۴Vascular Endothelial Growth Factor

می دهد (۵). یکی از مسیرهای سیگنالی مهم در فرایند آنژیوژنز اسلیت (S) و گیرنده آن ربو (R) است. تحقیقات نشان داده‌اند که سیگنالینگ S-R در تنظیم آنژیوژنز و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال برای تشکیل سلول‌های جدید نقش دارد (۶). تحقیقات نشان داده‌اند ورزش و فعالیت بدنی از طریق القای هیپوکسی بافتی می‌تواند باعث افزایش عوامل آنژیوژنیک شده و آنژیوژنز را توسعه دهد. نورشاهی و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که تمرین در شرایط هیپوکسی - نورموباریک به مدت ۸ هفته در افزایش سطوح VEGF مؤثر است (۷). کاکي و همکاران (۲۰۲۰) در تحقیقی ۴۰ موش نر و بیستار را به ۴ گروه نروپاتی دیابت، نروپاتی دیابت تمرینی، سالم تمرینی و کنترل تقسیم نمودند. القای دیابت با تزریق استروپتوزوتوسین^۳ انجام شد. گروه‌های تمرین به مدت ۶ هفته تمرین هوازی با شدت ۱۵ متر بر دقیقه و مدت ۳۰ دقیقه در هر جلسه را اجرا نمودند. نتایج نشان داد که تمرین موجب کاهش HMGB1 و مالون دی آلدئید و افزایش سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز شد (۸). ثاقب جو و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که ۲ ساعت پس از تمرین شنای زیرآبی به مسافت ۲۰ متر (۱۰ تکرار و بین هر دو تکرار یک دقیقه استراحت) میزان HIF1 α در شناگران مرد جوان کاهش پیدا کرد (۹).

یکی از مواردی که آنژیوژنز در آن بسیار مهم است هنگام سکته‌های قلبی و مغزی است، جایی که در اثر انسداد عروق، بافت مشروب شونده دچار نکروز شده و سخته رخ می‌دهد و آنژیوژنز در این محل می‌تواند با ایسکمی حاصل مقابله نماید و از سخته‌های مرگبار پیشگیری نماید (۱۰). امروزه عمده ناتوانی‌های بلندمدت و مرگ و میر در دنیا ناشی از سخته است که با تخریب جدی عصبی و نواقص جسمانی مداوم همراه است. در میان مداخلات بازتوانی سخته، تمرینات ورزشی در بازیافت عملکرد مغزی تأثیرات چشمگیری دارند و عملکرد حرمتی را تا حد زیادی بهبود می‌بخشند. عملکرد ورزش در حفاظت و بازیافت نرون‌های مغزی به طور گسترده‌ای مورد مطالعه و گزارش واقع شده است، اما مکانیزم‌های مربوطه هنوز ناشناخته هستند. بازساختاری عصبی عروقی یک مؤلفه اصلی بازیافت پس از سخته است، به طوری که آنژیوژنز مغزی نقشی اساسی در این مورد ایفا می‌کند. گزارشات نشان می‌دهند که آنژیوژنز موجب توسعه نروژنز می‌گردد و رشد مجدد ساختارهای عروقی می‌تواند حمایت مولکولی لازم برای بازیافت شبکه‌های عصبی را فراهم نماید (۱۱). مهار آنژیوژنز در بیماری‌هایی مثل سرطان موجب بهبود این بیماری می‌شود، ولی در مواردی چون ایسکمی‌های مغزی و قلبی منجر به سخته،

^۱Slit

^۲Robo

^۳Streptozotocin

تحریک آنژیوژنز موجب درمان عارضه می گردد (۱۰). بنابراین در این تحقیق تأثیر تمرینات ورزشی به همراه داروی آدنوزین بر ۶ عامل آنژیوژنیک (AP1, HIF1, HIF2 α , HMGB1, S2 و R4) مورد بررسی قرار گرفت.

روش شناسی

این پژوهش تجربی مورد تأیید کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم ورزشی با کد IR.SSRI.REC.1395.115 می باشد. با توجه به اینکه آزمودنی های گروه های مختلف این تحقیق را موش های صحرایی نر تشکیل می دادند که در یک محیط کنترل شده و در یک طرح پس آزمون تحت تاثیر متغیرهای مستقل (تمرین استقامتی) قرار گرفتند، لذا روش انجام اگر چه از نوع تحقیق تجربی بود؛ و به نحوی که فقط در شرایط آزمایشگاهی محض می باشد. بدین منظور موش های نر صحرایی نژاد ویستار از مرکز تحقیقات بنیادی علوم ورزشی و پزشکی مولکولی شهید میرغنی خریداری شدند. برای همه آن ها شرایط مناسب آزمایشگاهی و چرخه ی روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت با میانگین دمای 22 ± 3 درجه سانتیگراد فراهم شد. پس از گذشت یک هفته، جهت سازگاری با محیط جدید، تمامی رت ها تا رسیدن به میانگین سن ۸-۷ هفته و وزن اولیه ۱۸۰ گرم از رژیم غذایی نرمال استفاده می کردند که پس از آن به گروه های ۱ (ایسکمی)، ۲ (ایسکمی + تمرین) و ۳ (ایسکمی + تمرین + دارو) (هر گروه ۵ موش) تقسیم شدند. هر ۴ سر موش در یک قفس و در شرایط کنترل شده دمایی 22 ± 2 درجه سانتی گراد) و چرخه روشنایی / تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری می شدند. وزن موش ها به وسیله ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۰۱ گرم (ساخت کمپانی Sartarias آلمان) هر هفته یک بار اندازه گیری می شد.

حیوانات مورد آزمایش در این پژوهش در قفس های پلی کربنات شفاف به طول ۳۰، عرض و ارتفاع ۱۵ سانتی متر ساخت شرکت رازی راد، در دمای محیطی با 22 ± 2 درجه سانتیگراد، چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت هوای 50 ± 5 درصد با تهویه مناسب نگهداری می شدند. غذای آزمودنی ها، از شرکت خوراک دام به پرور کرج تهیه شد. در این پژوهش آب مورد نیاز حیوان به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آنها قرار داده شد. ابزار گردآوری اطلاعات شامل کیت های مخصوص آزمایشگاهی، تردمیل ۱۰ لاینه، دستگاه سانتریفیوژ، دماسنج جیوه ای (ساخت ایران)، رطوبت سنج ساخت آلمان، ترازو با حساسیت بالا، لوله های فالکون، و سایر دستگاه ها و وسایل ویژه آنالیز نمونه ها بودند.

ابتدا ۵ رت به صورت گروه مطالعه مقدماتی برنامه تمرینی را به مدت ۳ جلسه آشنا سازی و ۵ جلسه فعالیت اصلی اجرا کردند. مبنای شدت فعالیت ورزشی در این مطالعه سرعت ۳۰ متر در دقیقه معادل ۷۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی رت ها بود.

بنابراین در این مطالعه گروه های تمرینی به مدت ۱ هفته برای ۳ روز متناوب به منظور آشنا سازی با فعالیت ورزشی و دستگاہ تردمیل با سرعت ۱۵ متر در دقیقه به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه (تقریباً ۴۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی) تمرین می کردند. بعد از یک روز استراحت پروتکل ۵ جلسه اجرا شد. با توجه به رعایت اصل افزایش تدریجی شدت و حجم تمرین، در تمامی رت های گروه های تمرین، پروتکل تمرین استقامتی را با سرعت ۱۸ متر بر دقیقه و مدت ۲۰ دقیقه در هفته ی اول شروع را انجام می دادند و به تدریج به سرعت ۳۰ متر بر دقیقه و مدت ۵۰ دقیقه با شیب ۱۰ درجه در هفته ی ۸ می رسید که معادل ۷۰٪ حداکثر اکسیژن ارزیابی شده به عنوان شدت مورد نظر در گروه های تمرین استقامتی در نظر گرفته شد. مرحله ی گرم کردن شامل گرم کردن به مدت ۳ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه و بدنبال آن به مدت ۲ دقیقه با شدت ۱۵ متر در دقیقه در نظر گرفته شد و همچنین پس از اجرای تمرین اصلی در هر گروه، رت ها به مدت ۱ دقیقه با شدت ۱۵ متر در دقیقه و سپس مدت ۲ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه، به عنوان پروتکل سرد کردن انجام شد. مدت تمرینات ۸ هفته (۵ جلسه در هفته) بود (۱۲).

قبل از انجام جراحی اقدامات بهداشتی و ایمنی و رفتاری (حرکت طبیعی اندام ها) اجرا شد. سپس با توجه به پایلوت انجام شده در جهت بررسی مقدار آسیب دیدگی ناشی از مدت زمان انسداد شریان ها و نیز بواسطه ی بررسی بهتر و دقیق تر ورزش و دارو شریان های مشترک کاروتید به مدت پس از مشاهده و جدا شدن از عصب واگ با استفاده از گیره های میکرو سرحری به ۴۵ دقیقه مسدود شد و سپس پس از پایان زمان میکروسرجری ها برداشته شد و جریان خون شریان مشترک برقرار شد. به منظور بررسی میزان آسیب دیدگی در نتیجه ی ۴۵ دقیقه ایسکمی رپرفیوژن مغزی در اندام، از ازمون حسی حرکتی لدر ۱ ساعت پس از ایسکمی انجام شد. برای تأمین داروی آدنوزین، این ماده از آزمایشگاه دانشکده پزشکی تهران خریداری شد. آدنوزین ۲۴ ساعت پس از القای ایسکمی رپرفیوژن به آزمودنی های گروه ۳ هر روز به مدت یک هفته با دوز ۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم تزریق شد. این دوز بر اساس ۵۰٪ دوز کشنده بود (۱۳).

پس از ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرینی نمونه گیری خون از موش ها در حالت ناشتایی و از ورید اجوف گرفته شد. موش ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین و زایلوزین بیهوش شدند. سپس هیپوکامپ رت ها برای آنالیز بیان ژن جدا شد. برای هموژن کردن بافت مراحل زیر انجام شد:

(۱) بافت مورد نظر از فریزر خارج و با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن کشی شد.

Ladder Walking Test

(۲) بافت داخل لوله آزمایش فالكون ۱۵ قرار داده خواهد شد و به نسبت هر ۰/۵ گرم بافت مقدار ۲۰۰ ميكروليتر از محلول ليز كننده تك فازی روی آن ريخته شد.

(۳) برای حفظ پروتئين های بافت، آپروتئين به آن اضافه گرديد.

(۴) با استفاده از هموزنايزر به مدت پنج دقيقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقيقه بافت هموزن گرديد.

(۵) محلول بدست آمده به مدت ۱۵ دقيقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقيقه سانترفوژ گرديد.

(۶) محلول رویی توسط سمپلر به داخل ميكروتيوب منتقل و رسوب باقیمانده دور ريخته شد.

برای بررسی بیان ژن های *AP1*، *HIF1*، *HIF2α*، *HMGB1*، *S2* و *R4* از تکنیک واکنش زنجیره پلیمرز^۱ (RT-PCR)^۲ استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت ها استخراج^۳ گرديد و به cDNA^۴ تبدیل گرديد. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. این تکنیک دارای ۴ مرحله اساسی می باشد:

(۱) RNA کل از سلول های جمع آوری شده در هر گروه استخراج گرديد.

(۲) با استفاده از آنزیم کپی برداری معکوس به cDNA تبدیل شد.

(۳) cDNA حاصل جهت حذف DNA ژنومی با آنزیم DNase I تیمار شد.

(۴) به روش Real time PCR تکثیر گرديد.

اولین و مهم ترین مسئله در هنگام کار با RNA، دقت در جلوگیری از آلودگی با RNase است. آنزیم RNase، نوکلئازی است که در هنگام پاره شدن سلول ها در بافت خارج می شود و روی سطح پوست و درون مایعاتی همچون عرق و بزاق، به فراوانی موجود است. از طرفی، RNase به دلیل دارا بودن باند های دی سولفیدی درون زنجیره ای، در مقابل جوشاندن طولانی و دناتوراسیون ملایم به شدت مقاوم است. بنابراین بهترین راه جهت جلوگیری از بروز مشکل، اجتناب از آلودگی ظروف شیشه ای، لوله ها و سطوح، با این آنزیم است. دقت در ساخت و استفاده از بافر ها و پیتور ها نیز یکی از راه های جلوگیری از بروز مشکل می باشد. در صورت آلودگی بافر ها با میکروارگانيسم، تنها راه، تعویض بافر است، زیرا RNase با اتوکلاو کردن از بین نمی رود. لذا هنگام کار با RNA رعایت نکات زیر ضروری است:

^۱Abi Applied Biosystems, Real-Time Pcr Systems, Stepone™, Real-Time Pcr Systems

^۲Real Time Polymerase Chain Reaction

^۳Rna Extraction Was Performed Manually Using A Solution Of Trizol

^۴Cdna Synthesis Kits - Thermo Scientific, Revert Aid First Strand Cdna Synthesis Kit

۱) تمامی ظروف و پیت های مورد استفاده باید به ترتیب زیر عاری از آنزیم RNase شوند: ابتدا به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و یا ۲۴ ساعت در دمای اتاق در محلول ۰/۱ درصد DEPC قرار داده شدند تا DEPC از بین برود. وجود DEPC می تواند مانعی در روند بررسی و تجزیه و تحلیل RNA ایجاد کند.

۲) پوشیدن دستکش و زدن ماسک در تمامی مراحل کار با RNA الزامی است.

۳) تمام بافرها و محلولها باید در آب مقطر تیمار شده با DEPC تهیه شود.

۴) مراحل استخراج RNA زیر هود که نیم ساعت قبل از آن با UV استریل شده باشد انجام شود.

جهت بررسی های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافتها در همه گروه های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیژن، آلمان) انجام گرفت. ابتدا به تخمکها ۱-۳۰۰-۲۰۰ لاندا کیازول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آن را در دمای ۸۰- قرار گرفت.

پس از ۲۴ ساعت پلاک موجود در کرایوتیوب را در حالت نیمه انجماد توسط سرسمپلر خرد کرده، سپس کمی آن را پیپتاژ گردید. سپس به نمونه حدود ۱۰۰ لاندا کلروفرم اضافه شد تا سلولها لیز شود. این محلول حدود ۱ دقیقه باید با سلولها در تماس بود. پس از ۱ دقیقه محلول را با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ محلول به سه فاز تقسیم شد:

۱) قسمت بالایی لوله که شفاف و حاوی RNA بود.

۲) قسمت وسطی لوله که سفید رنگ و محتوی بافت لیز شده بود.

۳) قسمت پایینی لوله که صورتی و حاوی کیازول بود.

مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. پس از ۱ سی سی ایزوپروپانول را بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. ایزوپروپانول شفاف بوده و RNA نیز شفاف می باشد اما وقتی این دو با هم مخلوط شوند مایع کدری را به وجود می آورند. بهتر است این محلول به دست آمده یک شب در دمای ۸۰- قرار گیرد. پس از افزودن ایزوپروپانول نمونه ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ سی سی الکل ۷۰ اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه گردید و سپس پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. به منظور حل کردن RNA به میزان ۲۰ لاندا آب مقطر

۶۰ درجه بر روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرسمپلر پیتاژ و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه ی ۶۰ درجه قرار داده شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۸۰- قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری از روش انوای یک طرفه و تست تعقیبی ال اس دی استفاده شد.

یافته ها

مقادیر توصیفی متغیرهای وابسته در هر گروه در جدول ۱ آمده است. نتایج انوای یک طرفه نشان داد که بین گروه ها در همه متغیرها تفاوت معنی دار وجود دارد (جدول ۲). بنابراین براساس نتایج تست تعقیبی ال اس دی، در مورد $HIF1\alpha$ ، بین گروه های ۳با۱ و ۳با۲ تفاوت معنی داری در بیان ژن این ماده وجود داشت ($P=0/000$)؛ در مورد بیان ژن $HIF2\alpha$ ، بین همه گروه ها تفاوت معنی داری وجود داشت ($P=0/000$)؛ بیان ژن R4 بین گروه های ۲با۱ و ۳با۱ متفاوت بود ($P=0/004$)؛ بیان ژن S2 بین همه گروه ها متفاوت بود ($P=0/000$)؛ بیان ژن HMGB1 بین گروه های ۲با۱ ($P=0/011$)، ۳با۱ ($P=0/000$) و ۳با۲ ($P=0/000$) متفاوت بود و نیز تفاوت معنی داری بین همه گروه ها در بیان ژن AP1 مشاهده شد ($P=0/000$).

جدول ۱: نتایج آزمون انوای یک طرفه

متغیر	گروه ۱ (ایسکمی)	گروه ۲ (ایسکمی + تمرین)	گروه ۳ (ایسکمی + تمرین + دارو)	P-value*
HIF1 α	۰/۰۰۸۱۷۸۶۷۸۸ ± ۰/۰۰۴۵	۰/۰۱۰۶۲۳۲ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۳۰۵۲۱۲۹۱۸ ± ۰/۰۰۸۸	۰/۰۰۰
HIF2 α	۰/۰۰۰۰۲۱۷۷۱ ± ۰/۰۰۰۰۰۳۵	۰/۰۰۰۰۷۱۳۳۵۱ ± ۰/۰۰۰۰۰۶۵۶	۰/۰۰۰۰۲۰۹ ± ۰/۰۰۰۰۲۵۸۴۲۳	۰/۰۰۰
ROBO4	۰/۰۰۴۶۲۲۴۲۱۸ ± ۰/۰۰۲۸۲۸۴۶	۰/۰۰۹۸۳۳ ± ۰/۰۰۱۷۹۶۳۵۲۸	۰/۰۰۹۹۵۱۳۴۵۲ ± ۰/۰۰۲۳۴۱۴۷	۰/۰۰۵
SLIT2	۰/۰۰۰۳۴۵۹۳ ± ۰/۰۰۰۰۵	۰/۰۰۱۵۱۴۶۲۲۸ ± ۰/۰۰۰۱۱۳۸	۰/۰۰۲۶۸۸۵۹۳۴ ± ۰/۰۰۰۵۲۹۳۳۶۴	۰/۰۰۰
HMGB1	۰/۰۸۳۹۲۳۸ ± ۰/۰۱۴۸۵۷	۰/۱۶۹۸۹ ± ۰/۰۲۴۵۲۴۸	۰/۳۴۳۸۵۲۹۹۳۸ ± ۰/۰۷۲۷۲۶	۰/۰۰۰
AP1	۰/۰۰۰۳۵۲۲۵۹۸ ± ۰/۰۰۰۰۸۵۶۶۶۸	۰/۰۰۰۵۸۱۷۹۳۵۲ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۰۹۳۱۹۴۳۶۶ ± ۰/۰۰۱۵۹۸۲۲۵۳	۰/۰۰۰

* تفاوت بین گروه ها براساس آزمون انوای یک طرفه

بحث و نتیجه گیری

هیچ تحقیق مشابهی با این تحقیق که در آن اثر تعاملی تمرین استقامتی و داروی آدنوزین بر بیان چندین ژن آنژیوژنیک پس از آسیب ایسکمی رپر فیوژن مغزی موش ها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته باشد یافت نشد. یکی از یافته های این تحقیق تفاوت معنی دار در بیان ژن $HIF1\alpha$ بین گروه های ۳با۱ و ۳با۲ بود که نشان می دهد بیان ژن این ماده بیشتر تحت تأثیر آدنوزین است تا تمرین به تنهایی، چرا که تفاوت معنی داری بین گروه ۲با۱ مشاهده نشد. همچنین میزان بیان ژن

HIF2 α بین همه گروه ها متفاوت بود. میردار و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که ۳ هفته تمرین شنا (۵ جلسه در هفته، هر جلسه ۶۰ دقیقه) موجب افزایش میزان HIF1 α در موش های باردار شد (۱۴). وانگ و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که ۴ هفته (۶ جلسه در هفته، هر جلسه ۶۰ دقیقه) تمرین شنا با افزایش بیان ژن HIF1 α موجب کاهش حجم ناحیه سکنه زده پس از آسیب ایسکمی رپرفیوژن می گردد (۱۵). فلورا و همکاران (۲۰۱۶) اظهار نمودند که HIF1 α و VEGF با یکدیگر همبستگی دارند و تمرینات بی هوازی موجب افزایش آنها می شود (۱۶). آنها در تحقیق دیگری نیز بیان کردند که تمرینات هوازی و بی هوازی موجب افزایش HIF1 α و VEGF در میوکارد رت ها می شود (۱۷). در تحقیق سیلویانا و همکاران (۲۰۱۸) ۴ هفته تمرین شنا (۵ جلسه در هفته، هر جلسه ۳۰ دقیقه) موجب افزایش بیان ژن هم فعال ساز ۱ آلفای گیرنده گامای تکثیرشونده با پراکسیزوم (PGC1 α)^۱ و کاهش بیان ژن HIF1 α در عضله قلبی موش ها شد (۱۸).

باینکه همه گروه های این تحقیق در بیان ژن HIF2 α با یکدیگر متفاوت بودند، ولی در مورد HIF1 α فقط گروه های ۳با۱ و ۳با۲ باهم متفاوت بودند، یعنی فقط گروهی که هم تمرین دیده بود و هم آدنوزین مصرف کرده بود، با گروه های دیگر متفاوت بود، بنابراین احتمالاً آدنوزین تأثیر بیشتری بر HIF1 α نسبت به HIF2 α می گذارد که البته برای چنین نتیجه گیری نیاز به تحقیقات بیشتری است. البته محققان قبلی نیز نشان داده اند که آدنوزین باعث افزایش بیان ژن و فعالیت VEGF و HIF1 α از طریق مکانیزم های مربوط به پروتئین کیناز فعال شونده با میتوزن (MAPK)^۲ می گردد (۱۹). هایپوکسی از طریق سازوکارهای MAPK موجب فعال شدن HIF1 α می شود که این ماده نیز از طریق افزایش بیان ژن هایی چون VEGF، ناقل ۱ گلوکز (Glut1)^۳، فسفوفروکتوکیناز، اریتروپویتین و ... در تنظیم متابولیسم لیپید و کربوهیدرات و آنژیوژنز درگیر است. لازم به ذکر است که یکی از محرک های هایپوکسی تمرینات ورزشی هستند. همچنین پراکسیژنی از طریق آسپاراژینیل هیدروکسیلاز^۴ و پرولین هیدروکسیلاز وابسته به آهن باعث تثبیت HIF1 α می گردد که متعاقباً توسط پروتئین هیپل لیندای سرکوبگر تومور (pVHL)^۵ تجزیه شده و فعالیت آن پایان می یابد. تمرینات ورزشی همچنین از طریق افزایش گونه های واکنشگر اکسیژن (ROS) موجب فعال شدن دو مسیر کیناز تنظیم شوند با سیگنال برون سلولی (ERK)^۶

^۱Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Coactivator 1 Alpha

^۲Mitogen Activated Protein Kinase

^۳Glucose Transporter 1

^۴Asparaginyl Hydroxylase

^۵Fe²⁺ Dependent Proline Hydroxylase

^۶Von Hippel Lindau Tumor Suppressor Protein

^۷Extracellular Signal Regulated Kinase

و فسفاتیدیل اینوزیتول-۳-کیناز / پروتئین کیناز B (PI3K/Akt) می گردند که هر دو در فعال سازی HIF1 α مؤثرند که این ماده هم در آنژیوژنز، بیوژنز میتوکندری و ... درگیر است (۲۰).

در این تحقیق، باینکه بیان ژن S2 بین همه گروه ها متفاوت بود، ولی بیان ژن R4 فقط بین گروه های ۲با و ۳با متفاوت بود، بنابراین برعکس HIF1 α ، به نظر می رسد آدنوزین تأثیر کمتری بر بیان ژن R4 دارد. علیرغم اهمیت S2 و R4 در آنژیوژنز، هیچ تحقیقی که در آن تأثیر مداخلات ورزشی بر S2 و یا R4 مورد بررسی قرار گرفته باشد یافت نشد. چندین مسیر اصلی لیگاند سیگنالی لیگاند/گیرنده برای آنژیوژنز وجود دارد که عبارتند از: VEGF/VEGFR، Ephrin/Eph، Wnt/Frizzled، Jagged1/Notch و S2/R4. سیگنالینگ S2/R4 یکی از جدیدترین مسیرهای شناخته شده در تنظیم مهاجرت سلول های اندوتلیال در طی تشکیل عروق جدید است. این ترکیب سیگنالی، در ابتدا به عنوان یک علامت برون سلولی در هدایت مسیر اکسون، توسعه انشعابات اکسونی و کنترل مهاجرت نورونی شناخته می شد. تحقیقات نشان داده اند این مسیر سیگنالی از طریق مکانیزم های مربوط به ERK، کیناز چسبان فوکال (FAK) و کیناز MAPK (MEK)^۳ موجب مهاجرت سلول های اندوتلیال و آنژیوژنز مغزی می گردد (۲۱،۲۲). با توجه به اهمیت سیگنالینگ S2/R4 در آنژیوژنز، نیاز به تحقیقات بیشتر در زمینه تأثیر تمرینات ورزشی بر این پروتئین هاست.

یکی دیگر از یافته های این تحقیق، تفاوت بیان ژن HMGB1 در همه گروه ها پس از پایان تمرینات بود. در مورد این ماده نیز به عنوان یک عامل آنژیوژنیک، تحقیقات ورزشی زیادی انجام نگرفته است. در تحقیق گاه و همکاران (۲۰۲۰) ۳ هفته تمرین موازی (هوازی + مقاومتی) موجب افزایش HMGB1 پلاسما شد (۲۳). تقی بیگی حسین آبادی و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که ۸ هفته تمرین هوازی باعث کاهش بیان ژن های HMGB1، ریج^۴، گیرنده ۴ شبه گذرگاهی (TLR4)^۵ و عامل هسته ای کاپابی (NF κ B)^۶ در بافت قلبی موش های صحرایی شد که موجب کاهش هایپرگلیسمی می شود (۲۴). در تحقیق کاکو و همکاران (۲۰۲۰) ۶ هفته تمرین تداومی روی تردمیل با شدت ۱۵ متر بر دقیقه باعث کاهش سطوح سرمی HMGB1 و مالون دی آلدئید و افزایش سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در موش های صحرایی مبتلا به

^۱Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B

^۲Focal Adhesion Kinase

^۳Mitogen Activated Protein Kinase Kinase

^۴Rage

^۵Toll-Like Receptor 4

^۶Nuclear Factor Kappa B

نروپاتی دیابت شد (۸). در تحقیق گیالوریا و همکاران (۲۰۱۱) ۶ ماه باز توانی قلبی پس از انفارکتوس میوکارد موجب کاهش سطوح HMGB1 در بیماران مربوطه شد (۲۵). آنها در تحقیق دیگری اظهار نمودند ۱۲ ماه تمرین ورزشی سطوح HMGB1 را در زنان مبتلا به سرطان پستان کاهش داد (۲۶).

HMGB1 یک پروتئین متصل به اسید دزوکسی ریبونوکلیک (DNA) است که نقش مهمی در فرایندهای التهابی و آنژیوزنیک بازی می کند. این ماده پس از آسیب ایسکمی به سرعت از سلول ترشح می شود و تبدیل به میانجی فرایندهای التهابی از جمله ترشح سایتوکاین های پیش التهابی، مولکول های چسبان و احتمالا عوامل آنژیوزنیک می گردد (۲۵). مطالعات نشان داده اند افزایش فعالیت نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات (NADPH) اکسیداز و مکانیزم های مربوط به NFκB در افزایش بیان ژن HMGB1 مؤثرند (۲۴). استرس ناشی از مسمومیت با گلوکز موجب ترشح HMGB1 از اندوتلیوم، نرون ها، سلول های شوان و میکروگلیاها به فضای خارج سلولی می شود، سپس این ماده از طریق تعامل با گیرنده هایی چون ریج و TLR، NFκB را فعال نموده و متعاقبا بیان ژن های التهابی و احتمالا آنژیوزنیک را تحریک می نماید. همچنین اختلال در عملکرد HMGB1 می تواند از طریق عوارضی چون استرس اکسایشی، اختلال جریان خون نرونی، تجزیه میلین، کاهش نروتروفین ها و اختلال در نوزایش عصبی، موجب آتروفی آکسونی، اختلال هدایت عصبی و حساسیت نرون های حسی محیطی گردد (۸). پروتئین های شوک گرمایی مانند پروتئین ۷۰ شوک گرمایی (HSP70)، پروتئین ۱ جذاب شیمیایی (MCP1)، فعالیت مونوسیتی، استرس اکسایشی، سایتوکاین های ضد التهابی مانند اینترلوکین ۱۰ و عامل ۲ تنفسی هسته ای (NRF2) از عوامل مؤثر بر HMGB1 هستند (۸،۲۳). HMGB1 از طریق فعال سازی ریج، NFκB، AP1 و HIF1α موجب افزایش بیان ژن و ترشح VEGF و متعاقبا آنژیوژنز می گردد (۲۷).

آخرین یافته این تحقیق افزایش بیان ژن AP1 در گروه های ۲ و ۳ نسبت به گروه ۱ بود. ژنگ و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که ۲ هفته تمرین تردمیل باعث افزایش بیان ژن AP1 و Tie2 در رت های نرشد (۱۱). احمدیان و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که ۱۰ هفته تمرین استقامتی (۵ جلسه در هفته، هر جلسه ۶۰ دقیقه) باعث افزایش بیان ژن AP1 در موش های سرطانی شد. AP1 با تحریک فسفوریلاسیون Tie2 باعث القای تشکیل مویرگ و عروق جدید می شود (۲۸). به طور کلی تحقیقات درباره تأثیر ورزش بر AP1 و دیگر متغیرهای وابسته در این تحقیق بسیار محدود است و همین موضوع تفسیر نتایج

^۱Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase

^۲70 Kilo Dalton Heat Shock Protein

^۳Monocyte Chemoattractant Protein 1

را با مشکل مواجه می‌سازد. آنژیوژنز یک فرایند بسیار پیچیده است که شامل فعال سازی، مهاجرت و تکثیر سلول های اندوتلیال است. به غیر از API، بسیاری از عوامل آنژیوژنیک دیگر مانند عامل رشد فیروبلاست و عامل رشد تبدیلی و عوامل آنتی آنژیوژنیک مانند اندوستاتین و آنژیوستاتین در آنژیوژنز درگیرند و هرگونه اثر محافظتی ورزش بر سگته مغزی از طریق آنژیوژنز از طریق تعامل این عوامل صورت می‌پذیرد (۱۱). بنابراین نیاز به تحقیقات گسترده ای درباره تأثیر انواع فعالیت های بدنی بر انواع عوامل آنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک در جمعیت های مختلف می‌باشد.

به طور کلی یافته های این تحقیق نشان داد پس از آسیب ایسکمی رپرفیوژن، هشت هفته تمرین استقامتی از طریق افزایش بیان ژن های آنژیوژنیک $HIF1\alpha$ ، $HIF2\alpha$ ، S2، R4، HMGB1 و API می‌تواند در افزایش جریان خون مغزی و بهبود نرون های آسیب دیده از سگته مؤثر باشد و چنانچه تمرینات همراه با مصرف آدنوزین باشد این اثر بیشتر خواهد بود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پژوهشگاه شهید میرغنی بخصوص جناب آقای دکتر سید جواد میرغنی در عملیات آزمایشگاهی کمال تقدیر و تشکر را دارد.

منابع

1. Rostami A, Khazaei MA. Inflammation and angiogenesis: role of inflammatory cells and mediators. J Isfahan Med Sch. 2016;34(384):1-1.
2. He QW, Li Q, Jin HJ, Zhi F, Suraj B, Zhu YY, et al. MiR-150 regulates poststroke cerebral angiogenesis via vascular endothelial growth factor in rats. CNS Neurosci Ther. 2016;22(6):507-17.
3. Yan J, Xing J, Li T, Zheng L, Wang Y, Su J, et al. Downregulation of microRNA-519 promotes angiogenesis induced by cerebral ischemia via upregulating HIF-1 α expression. Int J Clin Exp Pathol. 2016;9(10):9974-83.
4. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. J Leukocyte Biol. 2005;78(1):1-8.
5. Qiu J, Nishimura M, Wang Y, Sims JR, Qiu S, Savitz SI, et al. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. J Cerebr Blood F Met. 2008;28(5):927-38.
6. Ni W, Wang Hy, Liu T. Review of Recent Research of Slit/Robo Signal in Angiogenesis and Endothelial Cell Migration. Adv Cardiovas Dis. 2012;5.
7. Nourshahi M, Taheri Chadorneshin H, Pirouz M. Effect of endurance training in hypoxia-normobaric and normal conditions on serum VEGF concentration, hemoglobin and blood hematocrit. Horizon Med Sci. 2012;18(3):135-40.

8. Kaki A, Nikbakht M, Habibi A, Fathi MH. The effect of aerobic exercise on HMGB1 protein levels and some oxidative stress indices in rats with diabetic neuropathic pain. *Danehvar Med.* 2019;27(3):27-38.
9. Eidi Yusef Abad H, Nezamdoust Z. The response of serum levels of hypoxia inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and peripheral capillary oxygen saturation to one session of underwater swimming training (Apnea) in young men. *J Appl Exerc Physiol.* 2017;12(23):181-191.
10. Salehi E, Amjadi FS, Khazaei M. Angiogenesis in Health and Disease: Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Isfahan Med Sch.* 2011;29(132).
11. Zheng Q, Zhu D, Bai Y, Wu Y, Jia J, Hu Y. Exercise improves recovery after ischemic brain injury by inducing the expression of angiopoietin-1 and Tie-2 in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2011;224(3):221-8.
12. Mirghani SJ, Peeri M, Yekani OY, Zamani M, Feizolah F, Nikbin S, et al. Role or synergistic interaction of adenosine and vitamin D3 alongside high-intensity interval training and isocaloric moderate intensity training on metabolic parameters: Protocol for an Experimental Study. *JMIR Res Prot.* 2019;8(1):e10753.
13. Jozaie A, Movahedi M, Khosravi M, Golab F. The effects of adenosine injection after of brain ischemia reperfusion injury on gene expression of NF-kB/p65 and activity level of ROS in hippocampus tissue of male wistar rats. *Razi J Med Sci.* 2019;26(2):74-84.
14. Mirdar S, Hedayati M, Hajizade A. The effect of endurance swimming exercise on hif-1 levels in livers of pregnant rats exposed to cadmium toxicity. *J Rafsanjan Univ Med Sci.* 2014;12(11):919-28.
15. Wang L, Deng W, Yuan Q, Yang H. Exercise preconditioning reduces ischemia reperfusion-induced focal cerebral infarct volume through up-regulating the expression of HIF-1 α . *Pak J Pharm Sci.* 2015;28(2 Suppl):791-8.
16. Flora R, Zulkarnain M, Sorena E, Deva ID, Widowati W. Correlation between hypoxia inducible factor-1 α and vesicular endothelial growth factor in male Wistar rat brain tissue after anaerobic exercise. *Trends Med Res.* 2016;11(1):35-41.
17. Flora R, Freisleben HJ, Ferdinal F, Wanandi SI, Sadikin M. Correlation of hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelium growth factor in rat myocardium during aerobic and anaerobic exercise. *Med J Ind.* 2012;21(3):133-40.
18. Sylviana N, Helja N, Qolbi HH, Goenawan H, Lesmana R, Syamsunarno MR, et al. Effect of Swimming Exercise to Cardiac PGC-1 α and HIF-1 α Gene Expression in Mice. *Asian J Sports Med.* 2018;9(4).
19. Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Simioni C, et al. Caffeine inhibits adenosine-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and interleukin-8 expression in hypoxic human colon cancer cells. *Mol Pharmacol.* 2007;72(2):395-406.
20. Ohno H, Shirato K, Sakurai T, Ogasawara J, Sumitani Y, Sato S, Imaizumi K, Ishida H, Kizaki T. Effect of exercise on HIF-1 and VEGF signaling. *J Phys Fit Sports Med.* 2012;1(1):5-16.
21. Tong M, Jun T, Nie Y, Hao J, Fan D. The role of the Slit/Robo signaling pathway. *J Can.* 2019;10(12):2694.
22. Fujiwara M, Ghazizadeh M, Kawanami O. Potential role of the Slit/Robo signal pathway in angiogenesis. *Vasc Med.* 2006;11(2):69-74.

23. Goh J, Hofmann P, Aw NH, Tan PL, Tschakert G, Mueller A, et al. Concurrent high-intensity aerobic and resistance exercise modulates systemic release of alarmins (HMGB1, S100A8/A9, HSP70) and inflammatory biomarkers in healthy young men: a pilot study. *Trans Med Com.* 2020;5(1):1-5.
24. Taghibeigi Hoseinabadi H, Esfarjani F, Marandi M, Karami H. Effects of Eight Weeks of Aerobic Training on Expression Levels of the HMGB1-RAGE/TLR4-NF-kB Proinflammatory Pathway in Cardiac Tissue of Male Rats with Hyperglycemia. *Iran J Endocrinol Metab.* 2019;20(5):246-52.
25. Giallauria F, Cirillo P, D'agostino M, Petrillo G, Vitelli A, Pacileo M, et al. Effects of exercise training on high-mobility group box-1 levels after acute myocardial infarction. *J Card Fail.* 2011;17(2):108-14.
26. Giallauria F, Gentile M, Chiodini P, Berrino F, Mattiello A, Maresca L, et al. Exercise training reduces high mobility group box-1 protein levels in women with breast cancer: findings from the DIANA-5 study. *Mon Arch Chest Dis.* 2014;82(2).
27. Talebi S, Bolhassani A, Mokhtari Azad T, Arashkia A, Modarressi MH. The roles of HMGB1 nuclear protein and its major domains in different biological fields. *New Cell Mol Biotech J.* 2018;8(29):9-22.
28. Ahmadian M, Azizbeigi K, Delfan M, Atashak S. Effects of 10-week continuous endurance training on angiopoietin-1 gene expression and the tie2 protein in mice with breast cancer. *Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services.* 2019;41(1):7-13.

