



Original Article

Investigation of Serum Irisin Levels and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Gene and Protein in Heart Tissue of NMRI Mice Following Resistance Training and Irisin Injection

Mohammad Hassan Olamazadeh¹, Fahimeh Esfarjani², Sayed Mohammad Marandi³, Saeed Zamani⁴, Bahman Rashidi⁵

1. Ph.D. Student, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
2. Associate Professor in Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3. Professor in Exercise Physiology, Faculty of Sports Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
4. Assistance Professor in Medical Histology, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5. Professor in Medical Histology, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received: 20/04/2024, Revised: 17/07/2024, Accepted: 10/08/2024

* Corresponding Author: Fahimeh Esfarjani, Tel: 09133163919, E-mail: f.esfarjani@yahoo.com

How to Cite: Olamazadeh, M. H; Esfarjani, F; Marandi, S. M. Zamani, S; Rashidi, B. (2024). Investigation of Serum Irisin Levels and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Gene and Protein in Heart Tissue of NMRI Mice Following Resistance Training and Irisin Injection. *Sport Physiology*, 16(61), 47-64. In Persian.

Extended Abstract

Background and Purpose

Cardiovascular diseases remain the leading cause of death globally, accounting for 31.5% of all deaths (1). While advances in medical science have reduced the mortality rate from heart diseases compared to the past, major risk factors, such as physical inactivity, continue to play a crucial role in their prevalence (2) Exercise has a positive effect on long-term cardiovascular health. Specifically, regular physical activity plays a key role in reducing vascular resistance and stiffness (2). By inducing beneficial adaptations like angiogenesis, exercise enhances heart function, lowers the risk of cardiovascular diseases and mortality, and provides protection against myocardial damage (3). Resistance training (RT), which involves muscular contraction against an external force, helps improve or maintain muscle mass and strength, and offers beneficial physiological and clinical effects on cardiovascular diseases and related risk factors (4). A key factor in these positive effects is the release of myokines (5). During and immediately after exercise, muscles produce and release molecules, cytokines, or signaling peptides known as myokines. These myokines can exert both



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

paracrine and endocrine effects. To date, several myokines have been identified as contributing to the beneficial effects of exercise (6). One of the most well-known myokines is irisin, which is produced by skeletal muscles in response to exercise (7). Irisin treatment has been shown to significantly improve cardiac function, reduce infarct size, and minimize fibrosis (8). Research suggests that the underlying mechanism for these benefits is related to angiogenesis, with irisin serving as a stimulus for angiogenesis in the heart. Thus, irisin may mediate the cardiac health-promoting effects of exercise training (6). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a key factor in angiogenesis, particularly under hypoxic conditions, where it stimulates cell proliferation (9). VEGF promotes the recruitment of stem cells into the bloodstream and serves as a potent initiator of angiogenesis. It plays a crucial role in the migration, proliferation, matrix degradation, and formation of endothelial cell networks that contribute to vascular network formation (10). VEGF is considered one of the primary mediators of angiogenesis and is influenced by physical activity (9, 11). The aim of this study was to comparatively assess VEGF gene and protein expression in heart tissue, and examine its correlation with serum irisin levels, following resistance training, in comparison to exogenous irisin injection.

Materials and Method

Twenty-one male NMRI mice (5 weeks old, 18 ± 2 g) were used in this study. The mice were housed under a controlled light-dark cycle (12 hours of light, 12 hours of darkness), with a humidity level of 50-60% and a temperature of 21°C. They had ad libitum access to food and water throughout the study. The mice were randomly assigned to one of three groups: control (no intervention), resistance exercise, and irisin injection. In the resistance exercise group, training involved climbing a 1-meter-long ladder set at an 80-degree angle. The resistance training began after a 2-week period of familiarization with the training conditions and the laboratory environment. To determine the appropriate resistance for each session, the body weight of the mice was recorded. In the first week, a weight equivalent to 30% of the mice's body weight was attached to their tails. The weight was progressively increased over the course of the training period, reaching approximately 200% of their body weight by the final week. This exercise protocol consisted of 4 sets of 5 repetitions with 2 minutes of rest between sets, performed 3 times per week for 8 weeks. The irisin used in this study was in powder form, with a dose of 100 micrograms. It was dissolved in a suitable solvent and injected intraperitoneally 3 times a week, with a dose of 100 μ g/kg/week. Thus, the mice in the irisin group received 100 μ g/kg of irisin weekly for 8 weeks. The cardiac expression of VEGF gene was measured using real-time PCR, VEGF protein levels were assessed by immunohistochemistry (IHC) and western blot analysis, and serum irisin concentration was evaluated using the ELISA method. Results from all groups were evaluated using a one-way ANOVA test. Bivariate associations between serum irisin concentration and VEGF gene/protein expression in the heart were assessed using Pearson's correlation coefficient. All data are presented as the mean \pm standard deviation (SD). A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Irisin concentration increased in exercise and irisin groups compared to the control group ($P < 0.001$). No significant difference was observed between the exercise and irisin groups ($P=0.755$). Both the resistance exercise and irisin groups showed a significant increase in VEGF gene expression compared to the control group ($P < 0.001$). No significant difference was observed between the exercise and irisin groups ($P = 0.439$). Data analysis showed that all experimental groups had significantly higher VEGF protein expression compared to the control group ($P < 0.001$). The VEGF

protein level in the resistance training group was significantly higher than that in the irisin group ($P = 0.02$). Both the resistance training and irisin groups demonstrated significantly higher VEGF protein expression compared to the control group ($P < 0.001$). No significant difference was found between the exercise and irisin groups ($P = 0.51$). Pearson's correlation analysis revealed a positive correlation between the analyzed parameters in each group ($P < 0.05$ and $r > 0$).

Conclusion

It appears that resistance training exerts a dynamic effect on angiogenesis in the heart, driven by complex signaling and molecular changes. This study underscores the potential role of irisin in modulating VEGF expression. Future research focusing on the underlying molecular mechanisms could lead to more effective and targeted treatments for cardiovascular health by targeting specific molecules or signaling pathways

Article Message

If irisin can replicate the positive effects of exercise in humans, there is potential for irisin supplements to serve as an effective therapeutic intervention to improve heart function and overall cardiovascular health, particularly in patients. However, further studies are required to confirm these findings and explore the long-term benefits of such interventions.

Ethical Considerations

Compliance with Research Ethical Guidelines

This research has been approved by the Research Ethics Committee of Isfahan University with code IR.UI.REC.1401.020

Funding

This study received no funding from public, commercial, or nonprofit organizations.

Authors' Contributions

All authors contributed to the design, implementation, and writing of all sections of this study

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest


Acknowledgement

This article is derived from the thesis of the Professional Doctoral Course in Sports Physiology at Isfahan University. We would like to extend our sincere gratitude to all those who contributed to the successful completion of this research.



نوع مقاله: پژوهشی

بررسی سطح سرمی آیریزین و بیان ژن و پروتئین فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در بافت قلب موش های نژاد NMRI به دنبال تمرین مقاومتی و تزریق آیریزین

محمدحسن علمازاده^۱، فهیمه اسفراجانی^۲ , سید محمد مرندی^۳، سعید زمانی^۴، بهمن رشیدی^۵

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۳. استاد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۴. استادیار بافت شناسی پزشکی، گروه علوم تشریحی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵. استاد بافت شناسی پزشکی، گروه علوم تشریحی، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۱، تاریخ اصلاح: ۱۴۰۳/۰۴/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۰

* Corresponding Author: Fahimeh Esfarjani, Tel: 09133163919, E-mail: f.esfarjani@yahoo.com

How to Cite: Olamazadeh, M. H; Esfarjani, F; Marandi, S. M. Zamani, S; Rashidi, B. (2024). Investigation of Serum Irisin Levels and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Gene and Protein in Heart Tissue of NMRI Mice Following Resistance Training and Irisin Injection. *Sport Physiology*, 16(61), 47-64. In Persian.

چکیده

اهداف: آنژیوژنز در عملکرد قلب نقش حیاتی ایفا می کند. آیریزین یک میانجی احتمالی برای اثرات ورزش است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی سطح سرمی آیریزین و بیان ژن و پروتئین فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در بافت قلب موش های نژاد NMRI به دنبال تمرین مقاومتی و تزریق آیریزین بود. مواد و روش ها: ۲۱ عدد موش (NMRI، ۵ هفته ای با وزن حدود ۱۸±۲ گرم) به صورت تصادفی به سه گروه کنترل، تمرین (مقاومتی) و آیریزین تقسیم شدند. پروتکل تمرین به مدت هشت هفته اجرا شد. وزنه ای معادل ۳۰ درصد وزن موش ها به دم آن ها متصل شده و آن ها روی یک نردبان با ارتفاع ۱.۲ متر بالا رفتند. وزنه به تدریج به دو برابر وزن موش رسید. گروه آیریزین به مدت ۸ هفته آیریزین با دوز ۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم/هفته به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. بیان ژن VEGF در قلب با روش real-time PCR، پروتئین VEGF با ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلات و غلظت سرمی آیریزین با استفاده از الایزا بررسی شد. تمامی داده های حاصل با استفاده از تست های آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و همبستگی پیرسون آنالیز و سطح معناداری $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. یافته ها: در مقایسه با گروه کنترل، گروه تمرین و گروه آیریزین افزایش بیان ژن و پروتئین VEGF و همچنین افزایش سطوح سرمی آیریزین را نشان دادند ($P < 0.05$). ضریب همبستگی پیرسون نشان داد که بین پارامترهای مورد نظر در هر گروه رابطه ای معنی دار مثبتی وجود دارد ($P < 0.05$, $r > 0$).

نتیجه گیری: احتمالاً آیریزین واسطه ای برقراری ارتباط بین تمرین مقاومتی و آنژیوژنز در بافت قلب می باشد. کلیدواژه ها تمرین مقاومتی، آیریزین، قلب، آنژیوژنز، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی



مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی شامل طیف گسترده‌ای از شرایطی است که سیستم قلبی عروقی را متاثر می‌کنند و سهم به‌سزایی در بیماری‌زایی و مرگ‌ومیر دارند و متعاقباً هزینه‌های مالی قابل توجهی تحمیل می‌کنند (۱). یکی از عوامل حیاتی و موثر در حفظ و بهبود عملکرد قلب، تشکیل عروق خونی جدید از عروق موجود است که به عنوان آنژیوژنز شناخته می‌شود. این فرآیند توسط عوامل تحریک‌کننده (پروآنژیوژنیک) و مهارکننده (آنتی آنژیوژنیک) به طور دقیق کنترل می‌شود. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)^۱، فاکتور رشد فیبروبلاست^۲، اینترلوکین-۸^۳ از جمله عوامل پروآنژیوژنیک و اندوستاتین^۴ و آنژیوستاتین^۵ از جمله عوامل آنتی آنژیوژنیک می‌باشند (۲، ۳). VEGF، از خانواده سوپرن فاکتور رشد مشتق از پلاکت^۶، یک عامل پروآنژیوژنیک بسیار مهم می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که در شرایط فیزیولوژیک مختلف مانند ورزش، رشد جنین، چرخه‌های تولیدمثلی، ترمیم زخم و همچنین در وضعیت‌های پاتولوژیک مانند رشد تومور، ایسکمی و هیپرتروفی پاتولوژیک قلب، VEGF ماتریکس خارج سلولی را تغییر داده و در نتیجه بر تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال اثر می‌گذارد (۴-۶).

مشخص شده است که تمرینات ورزشی منظم در کاهش و بهبود بیماری‌های قلبی عروقی موثر هستند (۷). ورزش باعث تولید و رهاسازی مواد مختلفی از جمله سایتوکاین‌ها و میوکاین‌هایی نظیر آیریزین می‌شود که تأثیرات پاراکرینی و اندوکرینی در انواع بافت‌های بدن دارند. آیریزین به دنبال شکسته شدن پروتئین تراغشایی فیبرونکتین نوع ۳ دامنه حاوی پروتئین ۵ (FNDC5)^۷ آزاد می‌شود. طبق مطالعات صورت گرفته، FNDC5 در پاسخ به فعالیت عضلانی ترشح می‌شود. فعالیت‌های بدنی منجر به ترشح گیرنده فعال شده با تکثیرکننده پراکسی زوم، کوکتیواتور گاما-۱^۸ و در نتیجه فعال شدن گیرنده‌ی فعال‌کننده‌ی تکثیر پروکسی زوم گاما^۹ می‌گردد که نقش به‌سزایی در متابولیسم انرژی ایفا می‌کند و سبب ترشح پروتئین FNDC5 می‌شود.

غلظت آیریزین گردش خون افراد دارای بیماری‌های مرتبط با قلب و عروق خونی در مقایسه با افراد سالم متفاوت است که شاید نشان‌دهنده‌ی نقش جدیدی برای آیریزین باشد (۹، ۸). علاوه بر این گزارش شده است که غلظت آیریزین در عضله قلب افراد در سنین مختلف به دنبال انجام تمرینات ورزشی افزایش می‌یابد (۱۰). ورزش منظم یا تزریق آیریزین در بیماران دچار انفارکتوس میوکارد^{۱۰} منجر به پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در روند بهبودی این افراد شده است (۱۱).

1. Vascular Endothelial Growth Factor
2. Fibroblast Growth Factor
3. Interleukin-8
4. Endostatin
5. Angiostatin
6. Platelet-Derived Growth Factor
7. Fibronectin Type III Domain-Containing Protein 5
8. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha (PGC1- α)
9. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ)
10. Myocardial Infarction

در طی سال‌های اخیر، ورزش‌های مقاومتی به دلیل اثراتی که بر افزایش قدرت عضلانی، سرعت و تعادل فرد دارند، مورد توجه قرار گرفته است. علاوه بر این، سازمان‌هایی مانند انجمن قلب آمریکا و کالج پزشکی ورزشی آمریکا از عملکرد مثبت ورزش‌های مقاومتی در افراد دارای بیماری‌های قلبی عروقی، حمایت می‌کنند (۱۳، ۱۲). ورزش‌های مقاومتی در مقایسه با ورزش‌های استقامتی نقش موثرتری در افزایش سطح آیریزین در پلاسمای خون داشته‌اند. علاوه بر این، تمرینات مقاومتی منجر به افزایش قابل توجهی در بیان ژن ۱۵آت ب و پروتئین آیریزین در بافت قلب شده‌اند (۱۴).

اثرات آیریزین بر فاکتور رشد اندوتلیال عروقی در بافت‌های مختلف نظیر پوست (۱۵)، عضلات اسکلتی (۱۰) گزارش شده است (۹، ۸). همچنین تأثیرات ورزش بر مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با ب‌ب‌آج مانند پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (پ‌تپ) و عامل القایی هیپوکسی - ۱ آلفا (بی-۱-ب‌ب) نشان داده شده است (۱۷، ۱۶). با توجه به مطالب بیان شده، هدف از مطالعه حاضر، مقایسه‌ی اثرات ورزش مقاومتی و تزریق مستقیم آیریزین بر بیان ژن و پروتئین ب‌ب‌آج در بافت قلب همچنین هم‌ارتباطی آن‌ها با میزان غلظت سرمی آیریزین بوده است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک تحقیق تجربی است. نگهداری موش‌ها تحت چرخه‌ی روشنایی-تاریکی (۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی) و و رطوبت ۵۰ تا ۶۰ درصد و درجه حرارت ۲۱ درجه سانتیگراد بود. همچنین آن‌ها دسترسی آزادی در کل دوره مطالعه به آب و غذا داشتند. ۲۱ عدد موش نر سوری (NMRI، ۵ هفته‌ای با وزن حدود 18 ± 2) به‌طور تصادفی در سه گروه هفت‌تایی قرار گرفتند. گروه اول به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند و هیچ مداخله‌ای بر روی موش‌ها انجام نشد و پس از ۸ هفته متغیرهای مورد نظر در این گروه اندازه‌گیری شد. گروه دوم یا گروه تمرین مقاومتی، به مدت ۸ هفته و هر هفته ۳ جلسه در تمرینات شرکت کردند. در هفته اول، میزان وزنه‌های بسته شده به دم موش‌ها ۳۰ درصد از وزن بدن موش بود که به تدریج افزایش یافت و در هفته پایانی به ۲۰۰ درصد وزن بدن آن‌ها رسید. تمرینات روی یک نردبان به طول ۱.۲ متر و شیب ۸۰ درجه صورت گرفت. بعد از اتصال وزنه به دم موش‌ها، حیوان از نردبان بالا رفت و این کار سه نوبت با ۵ تکرار انجام شد. این شیوه تمرینی توسط پژوهش‌های قبلی تایید شده است (۱۸). گروه سوم، موش‌های دریافت‌کننده آیریزین بودند که به صورت داخل صفاقی سه روز در هفته به مدت ۸ هفته دوز ۱۰۰ میکروگرم/کیلوگرم/هفته را دریافت کردند (۱۹). پس از ۷۲ ساعت از انجام مداخلات نهایی، موش‌های تمامی گروه‌ها تحت بیهوش قرار گرفته و نمونه خونی آن‌ها با روش پانکچر قلبی^۳ گرفته شد و جهت انجام روش ایمونوسوربنت متصل به آنزیم (تست الایزا)^۴ آماده گردید. همچنین پس از کشتن موش‌ها،

1. Mitogen-Activated Protein Kinase
2. Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
3. Cardiac Puncture
4. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

بافت قلب به روش استریل خارج شده و جهت انجام تست ایمونوهیستوشیمی (IHC)^۱ در فرمالین ۱۰ درصد و جهت انجام تست Real-Time PCR و وسترن بلات^۲ بلافاصله به نیتروژن مایع منتقل گردید (۱۸، ۱۹).

برای انجام تست الایزا، نمونه‌های خونی در لوله‌های حاوی اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید جمع‌آوری و جهت جداسازی سرم به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس طبق پروتکل کیت الایزا (Aviscera Biosciences, Santa Clara, CA) نمونه‌ها از لحاظ سطح آیریزین بررسی شدند (۲۰).

بیان ژن VEGF با ریل تایم پی سی آر بررسی شد. RNA کل هر نمونه با استفاده از کیت Total RNA Prep (شرکت BIOFACT، کره) طبق پروتکل جداسازی شد. خلوص RNA جدا شده با استفاده از نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo Scientific-USA) ارزیابی و DNase I (Sinaclon) به منظور جلوگیری از آلودگی احتمالی اضافه گردید. سپس cDNA با استفاده از کیت (شرکت BIOFACT، کره) BioFact™ 5× RT Pre-Mix سنتز شد. در نهایت، Real-time PCR با استفاده از کیت (BIOFACT, Korea) BioFACT™ 2× Real-Time PCR Master Mix kit و سیستم StepOne Plus™ (Applied Biosystems) Real-time PCR detection System انجام شد. GAPDH به عنوان ژن رفرنس استفاده گردید (۲۰).

توالی پرایمرهای پژوهش به شرح زیر است:

VEGF Forward: CTCAATGTGTCTCTTTGCGCT
VEGF Reverse: GGGGGCTCAGAATCACATCAT
GAPDH Forward: CAGAACATCATCCCAGCCTCC
GAPDH Reverse: TTGGCAGGTTTCTCAAGACGG

ایمونوهیستوشیمی برای تعیین سطح پروتئین VEGF به کار گرفته شد. نمونه‌های فیکس شده در فرمالین ۱۰ درصد، جهت آی‌گیری در غلظت‌های صعودی الکل (تا رسیدن به غلظت ۱۰۰ درصد) قرار گرفتند. سپس در پارافین قالب‌گیری شده و با استفاده از میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۴ میکرون زده شد.

بعد از دپارافینه کردن با استفاده از گزیلول و آبگیری، لام‌ها در (T5912-Sigma) 1X TBS^۳ غوطه‌ور و پس از آنتی‌ژن رتریوال^۴، تریتون^۵ ۳ درصد (Sigma-T8787) استفاده گردید. سرم ۱۰ درصد (Sigma-G9023) به مدت ۴۵ دقیقه اضافه شد تا واکنش آنتی‌بادی ثانویه با ایمنوگلوبولین‌های اندوژنوس موش بلاک شود. پس از اضافه کردن آنتی‌بادی اولیه (dilution: 1:100, Santa Cruz, sc-53462)، لام‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲-۸ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس آنتی‌بادی ثانویه (dilution: 1:150, Santa Cruz, sc-2010) اضافه و به مدت یک ساعت و سی دقیقه در دمای ۳۰ درجه در شرایط تاریکی نگهداری شدند. به منظور رنگ‌آمیزی هسته‌ها از رنگ DAPI (D9542 - Sigma)

-
1. Immunohistochemistry (IHC)
 2. Western Blot
 3. Tris-Buffered Saline
 4. Antigen retrieval
 5. Triton

استفاده شد. نهایتاً با به‌کارگیری میکروسکوپ فلورسنت (Olympus) تصاویر حاصل از رنگ‌آمیزی گرفته و جهت آنالیز آماده شدند (۲۱).

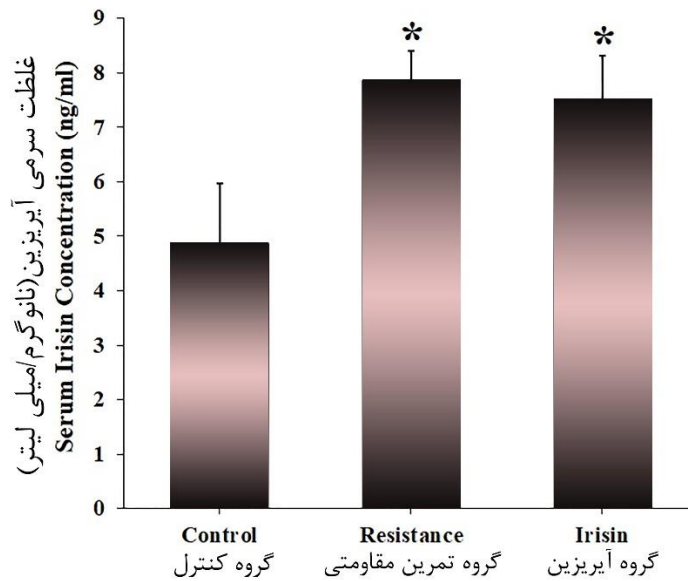
جهت تعیین سطح پروتئین VEGF در بافت قلب، علاوه بر تست ایمنوهیستوشیمی، از روش وسترن بلات نیز استفاده شد. در این روش از کیت (bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA) استفاده گردید. الکتروفورز جهت جداسازی پروتئین‌ها بر روی ژل اس دی اس پیج^۱ انجام و پروتئین‌ها به غشای پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید^۲ منتقل شدند. آنتی‌بادی اولیه بر ضد VEGF (Santa Cruz Biotechnology, orb11554) اضافه و در دمای ۴ درجه به مدت یک شب انکوبه شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه (BA1054-2) اضافه گردید. GAPDH به عنوان کنترل داخلی (آنتی‌بادی اولیه: GTX100118 و آنتی‌بادی ثانویه: BA1054-2)، برای نرمالایز کردن نتایج، به کار گرفته شد. نهایتاً باندهای حاصل با استفاده از ECL western blotting detection system (GE Amersham, UK) و نرم‌افزار ایمج جی^۳ (NIH, MD, USA) تشخیص و کمی شد (۲۱).

تمامی داده‌های حاصل با استفاده از تست‌های آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و همبستگی پیرسون آنالیز شدند. داده‌ها با نرم‌افزار اس پی اس^۴ نسخه ۲۹ در سطح معناداری $P \leq 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند. تمامی داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش شده‌اند.

نتایج

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، نتایج الایزا نشان داد که بیشترین سطح سرمی آیریزین مربوط به گروه تمرین مقاومتی بوده و در مقایسه با گروه کنترل، غلظت آیریزین در سرم خون موش‌هایی که تمرین داده شده بودند ($P=0.00011$)، و یا موش‌هایی که تحت تزریق آیریزین قرار گرفته بودند ($P=0.00011$)، افزایش معناداری داشت. تفاوت معناداری ما بین گروه تمرین مقاومتی و گروه تزریق آیریزین مشاهده نشد ($P=0.755$).

-
1. SDS-PAGE
 2. polyvinylidene difluoride (PVDF)
 3. Image J
 4. SPSS



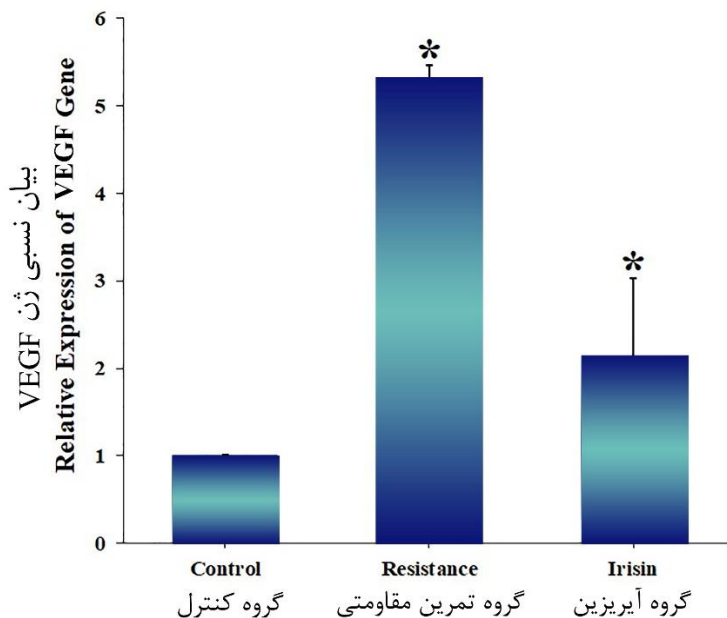
شکل ۱- غلظت سرمی آیریزین

Figure 1- Serum Irisin Concentration

غلظت آیریزین در گروه تمرین و گروه آیریزین در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری داشت ($*P < 0.001$). بین دو گروه تمرین و آیریزین تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P=0.755$). داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش شده است.

Irisin concentration increased in exercise and irisin groups compared to the control group ($*P < 0.001$). No significant difference was observed between the exercise and irisin groups ($P=0.755$). All data were presented as mean \pm SD.

نتایج حاصل از real-time PCR در خصوص بیان ژن VEGF، نشان داد که گروه تمرین داده شده در مقایسه با سایر گروه‌های مطالعه دارای سطح بالاتری از بیان بوده که این اختلاف تنها بین گروه تمرین مقاومتی و گروه کنترل از لحاظ آماری معنادار بود ($P < 0.001$). در حالی که تفاوت معناداری بین گروه تمرین مقاومتی و گروه تزریق آیریزین مشاهده نشد ($P=0.439$). بیان ژن VEGF در گروه تزریق آیریزین نیز در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد ($P=0.18$). این نتایج در شکل ۲ خلاصه شده است.



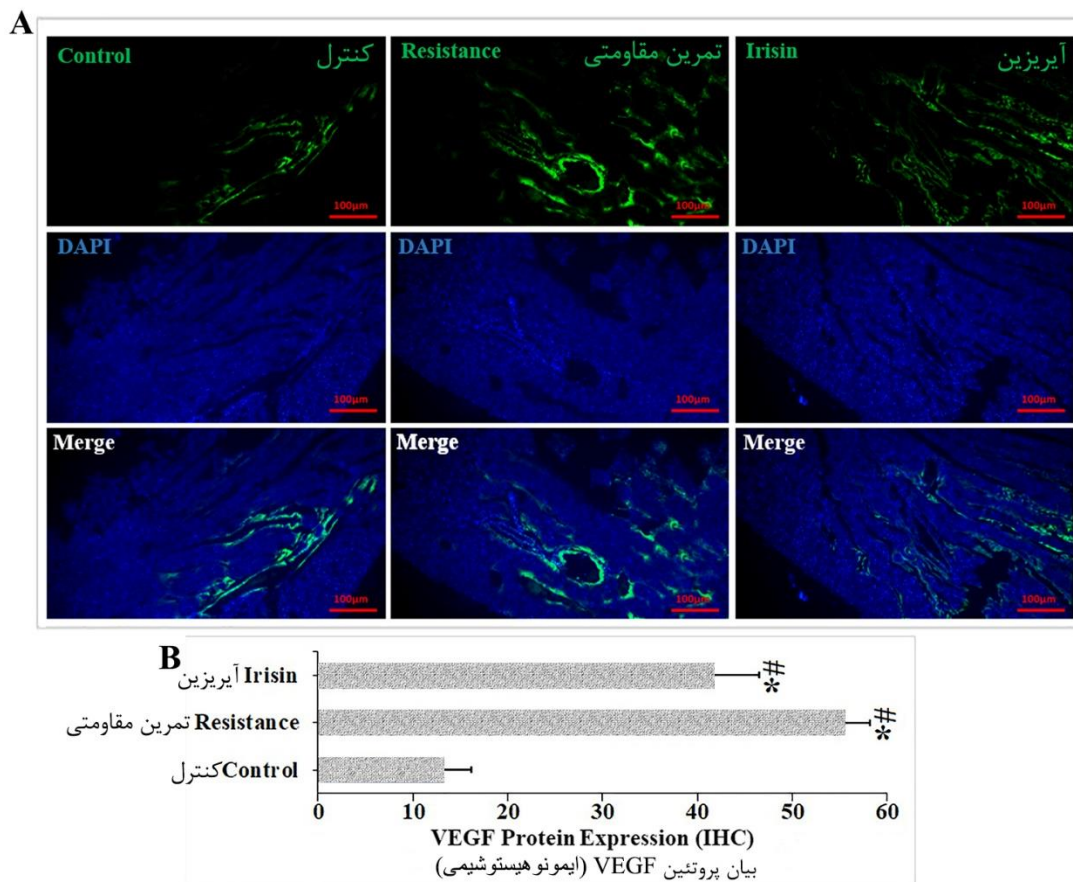
شکل ۲- بیان ژن VEGF در بافت قلب.

Figure 2- VEGF Gene Expression in Heart Tissue

در گروه تمرین مقاومتی و گروه آیریزین بیان ژن VEGF به طور معناداری در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت ($P < 0.001$) و بین دو گروه تمرین و آیریزین تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P = 0.439$). داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش شده است.

In resistance exercise group and irisin group, the VEGF gene expression was significantly increased when compared to the control group ($*P < 0.001$). No significant difference was observed between the exercise and irisin groups ($P = 0.439$). All data were presented as mean \pm SD.

بیان پروتئین VEGF در تست IHC افزایش معناداری را در گروه‌های تمرین مقاومتی ($P < 0.001$) و تزریق آیریزین ($P < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. بیشترین بیان پروتئین متعلق به گروه تمرین داده شده بود و مابین دو گروه تمرین و تزریق آیریزین از لحاظ آماری اختلاف معناداری وجود داشت ($P = 0.02$). تست وسترن بلات نتایج حاصل از IHC را تایید کرد با این تفاوت که طبق یافته‌های حاصل از تست وسترن بلات تفاوت موجود بین بیان پروتئین در دو گروه تمرین و تزریق آیریزین از لحاظ آماری معنادار نبود ($P = 0.51$), شکل ۳ و شکل ۴.

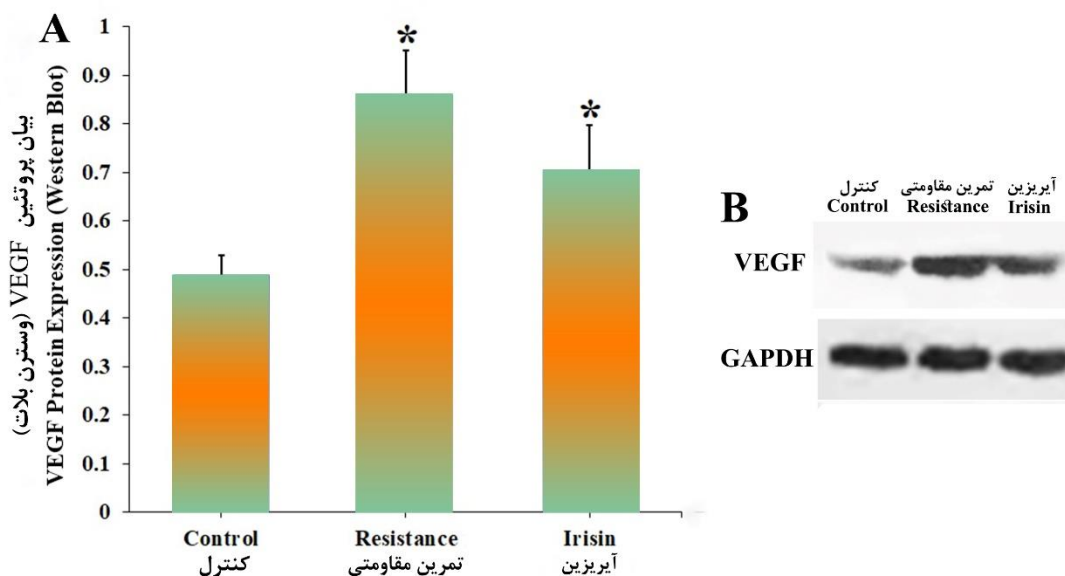


شکل ۳- سنجش بیان پروتئین VEGF در قلب با استفاده از تست ایمونوهیستوشیمی

Figure 3- The Expression of VEGF Protein in Heart Assessed Through IHC

(A) تصاویر IHC (B) آنالیز داده‌ها نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، سایر گروه‌های مورد مطالعه دارای سطوح بالاتری از پروتئین بوده که از لحاظ آماری معنادار بود ($*P < 0.001$). بیان پروتئین VEGF در گروه تمرین مقاومتی در مقایسه با گروه آیریزین به طور معناداری بالاتر بود ($\#P = 0.02$). داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش شده است.

A) IHC images. B) data analysis indicated that compared to the control group, all other experimental groups had higher VEGF protein expression ($*P < 0.001$). level of VEGF protein in resistance training group had statistically significant higher in comparison to irisin group ($\#P = 0.02$). All data were presented as mean \pm SD.



شکل ۴- سنجش بیان پروتئین VEGF در قلب با استفاده از تست وسترن بلات

Figure 4- Cardiac Expression of VEGF Protein Assessed Through Western Blot Analysis

(A) آنالیز داده‌ها نشان داد گروه تمرین مقاومتی و گروه تزریق آیریزین دارای سطوح بالاتری از بیان پروتئین در مقایسه با گروه کنترل بودند، که از لحاظ آماری معنادار بود ($P < 0.05$). تفاوت معناداری از لحاظ بیان پروتئین VEGF در گروه تمرین مقاومتی در مقایسه با گروه آیریزین مشاهده نشد ($P = 0.51$). (B) باندهای حاصل از انجام تست وسترن بلات. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش شده است.

A) data analysis indicated that resistance training and irisin groups had higher level of VEGF protein expression in comparison with the control group, that was statistically significant ($*P < 0.001$). No significant difference was observed between the exercise and irisin groups ($P = 0.51$). B) protein bands in western blot analysis. All data were presented as mean \pm SD

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، یافته‌های حاصل از آزمون همبستگی پیرسون مشخص کرد که یک همبستگی مثبت بین بیان ژن VEGF و سطح آیریزین خون موش‌ها در گروه تمرین مقاومتی ($r = 0.788, P = 0.035$) و گروه تزریق آیریزین ($r = 0.870, P = 0.011$) وجود دارد. علاوه بر این، غلظت آیریزین در گروه تمرین و گروه آیریزین با غلظت پروتئین VEGF در هر دو تست ایمونوهیستوشیمی (به ترتیب $r = 0.836, P = 0.19$ و $r = 0.894, P = 0.007$) و وسترن بلات (به ترتیب $r = 0.871, P = 0.011$ و $r = 0.917, P = 0.004$) مرتبط بود.

جدول ۱- نتایج تست همبستگی

Table 1- Correlation results

غلظت سرمی آیریزین (الایزا) Serum Irisin Concentration (ELISA)						
تزریق آیریزین Irisin Injection		ورزش مقاومتی Resistance Exercise		کنترل Control		
r	P	r	p	r	p	
0.870	< 0.05 (0.011)	0.788	< 0.05 (0.035)	0.851	< 0.05 (0.015)	بیان ژن VEGF VEGF gene Expression (Real Time PCR)
0.894	< 0.01 (0.007)	0.836	< 0.05 (0.019)	0.766	< 0.05 (0.045)	بیان پروتئین VEGF (ایمونوهیستوشیمی) VEGF Protein Expression (Immunohistochemistry)
0.871	< 0.05 (0.011)	0.917	< 0.01 (0.004)	0.817	< 0.05 (0.025)	بیان پروتئین VEGF (وسترن بلات) VEGF Protein Expression (Western Blot)

بحث

تمرینات ورزشی می‌توانند به افزایش غلظت مایوکاین‌هایی مانند آیریزین در بدن کمک کنند و از طریق این مایوکاین‌ها بر روی بافت‌های مختلف بدن، از جمله قلب، تأثیرگذار باشند (۸، ۷، ۱). فاکتورهای مرتبط با آنژیوژنز نظیر VEGF به عنوان یکی از اهداف درمانی مهم در بیماری‌های سیستم قلبی عروقی نظیر ایسکمی قلب مطالعه شده‌اند (۴، ۳). یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تمرین مقاومتی منجر به افزایش بیان ژن و پروتئین VEGF در بافت قلب می‌شود. که این افزایش در مقایسه با گروه کنترل از لحاظ آماری معنادار بود. این نشان می‌دهد که تمرین مقاومتی می‌تواند منجر به تغییرات قابل توجهی در پروفایل مولکولی مرتبط با آنژیوژنز در بافت قلب شود، چرا که VEGF یکی از عوامل کلیدی در تنظیم آنژیوژنز می‌باشد (۳). اثرات مثبت تمرین مقاومتی بر بازسازی، استرس اکسیداتیو و متابولیسم در قلب در مدل انفارکتوس^۱ مشاهده شده است (۲۲). علاوه بر این، در افراد دچار انفارکتوس میوکارد، ورزش مقاومتی منجر به بهبود آنژیوژنز از طریق اثرگذاری بر Follistatin-like 1 (FSTL1) شده است (۲۳). مطالعه‌ی عملکرد عروقی و غلظت VEGF در زنان مسن به دنبال ورزش‌های مقاومتی و استقامتی نشان داده است که به دنبال انجام تمرینات مقاومتی غلظت VEGF در سرم افراد افزایش می‌یابد (۲۴).

1. Infarction

پیشنهاد شده است که میوکاین‌های رها شده از عضلات در طی فعالیت فیزیکی می‌توانند ارتباطات فیزیولوژیکی بین ارگان‌های مختلف بدن ایجاد نمایند (۲۵). در مطالعه‌ی حاضر موش‌های تمرین داده شده دارای میزان آیریزین بالاتری در خون در مقایسه با گروه کنترل بودند. مشخص شده است که عضلات در پاسخ به فعالیت بدنی مولکول‌های پیام‌رسانی را ترشح می‌کنند که منجر به فعال شدن پروتئین کیناز فعال شده با آدنوزین مونوفسفات (AMPK)^۱ می‌گردد. AMPK بیان مولکول‌های دخیل در متابولیسم انرژی نظیر peroxisome proliferator-activated receptor گیرنده فعال شده با تکثیرکننده پراکسی زوم، کوآکتیواتور گاما-۱-آلفا (PGC-1 α) را افزایش داده که محرک بیان FNDC5 می‌باشد. آیریزین رها شده در خون حاصل شکسته شدن پروتئین FNDC5 می‌باشد. گزارش شده است که ورزش باعث تحریک عضلات اسکلتی انسان و القای یک افزایش گذرا در نسخه‌برداری و محتوای mRNA ژن PGC-1 α می‌شود. تحریک عضلات به صورت الکتریکی و با فرکانس بالا برای تقلید تمرین مقاومتی استفاده شده که نتیجه‌ی آن افزایش ناگهانی فسفوریلاسیون پروتئین کیناز بی^۲ و به دنبال آن فسفوریلاسیون کمپلکس توبروس اسکلروزیس^۳، مولکول هدف را پاماسین پستانداران^۴ و گلیکوژن سنتاز کیناز-۳^۵ بتا^۶ می‌شود. در نتیجه، فعالیت بدنی می‌تواند منجر به فعال شدن مسیر سیگنالینگ AMPK-PGC-1 α شود (۲۶, ۲۷).

مطالعه‌ی ما نشان داد که سطح خونی آیریزین در موش‌هایی که تحت تزریق آیریزین اگزوزنوس قرار گرفته بودند، در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری داشت اما تفاوت معناداری بین دو گروه ورزش مقاومتی و تزریق آیریزین مشاهده نشد. مطالعات گذشته نیز نتایجی مشابه مطالعه‌ی حاضر گزارش کرده‌اند (۱۴). این نتایج نشان می‌دهد که موش‌هایی که آیریزین به آن‌ها تزریق می‌شود، در مقایسه با موش‌هایی که به مدت طولانی تحت تمرین مقاومتی بوده‌اند، ممکن است مزایای عوارض مشابهی را که احتمالاً مرتبط با افزایش سطح سرمی آیریزین است، تجربه کنند. در مطالعه‌ی حاضر تزریق آیریزین مشابه ورزش مقاومتی، به طور معناداری بیان ژن و پروتئین VEGF را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد بود ($P < 0.05$).

در مطالعه‌ی پیش رو بین سطوح سرمی آیریزین و بیان ژن و یا پروتئین VEGF در بافت قلب موش‌های تمامی گروه‌ها، چه تمرین داده شده و چه غیرتمرینی، یک همبستگی مثبت مشاهده شد. مطالعات گذشته نقش آیریزین و VEGF را در بازسازی بافت و عملکرد قلب نشان داده‌اند (۸, ۲۸) ولی همبستگی میان این دو فاکتور به ویژه به دنبال تمرین مقاومتی در موش‌های NMRI بررسی نشده است. افزایش سطح سرمی آیریزین همراه با افزایش VEGF به عنوان یکی از فاکتورهای مهم موثر در سلامتی قلب، بیانگر یک اثر هم‌افزایی بالقوه در رگ‌زایی و پاسخ قلب به مداخلات انجام شده از جمله تمرینات مقاومتی و یا مکانیسم احتمالی تاثیر آیریزین به عنوان یک میانجی بر رگ‌زایی و سلامت قلب می‌باشد.

ما پیشنهاد می‌کنیم که رابطه بین آیریزین و ژن یا پروتئین VEGF ممکن است به مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با MAPK و/یا HIF-1 α ارتباط داشته باشد، هرچند مطالعات بیشتری در آینده در این خصوص مورد نیاز است. MAPK یکی از مسیر سیگنالینگ داخل سلولی بسیار مهم برای تنظیم فرآیندهای مرتبط با تکثیر، تمایز و بقای سلول می‌باشد. در مطالعه‌ی مشخص شده است که VEGF ترشح شده از استئوسیت‌ها باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ گیرنده‌ی نوع ۲ فاکتور رشد

1. AMP-activated protein kinase (AMPK)
2. Protein kinase B (PKB)
3. Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2)
4. The mammalian target of rapamycin (mTOR)
5. Glycogen Synthase Kinase-3 beta (GSK-3 β)

اندوتلیال عروقی^۱-MAPK- کیناز تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی^۲ در سلول‌های اندوتلیال شده که نشان‌دهنده‌ی درگیری مسیر MAPK در آنژیوژنز القا شده توسط استئوسیت‌ها می‌باشد. همچنین مطالعه‌ای بر روی ایسکمی مغز نشان داد که مسیرهای اصلی MAPK شامل کیناز تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی، C-Jun N-ترمینال کیناز^۳ و p38 در طی ایسکمی فعال می‌شوند که قادرند رگ‌زایی در بستر سیستم عصبی را کنترل کنند (۲۹-۳۱). در سرطان‌های پستان (۳۲)، هپاتوسلولار کارسینوما (۳۳) و ملانوما دهانی (۳۴)، بیان VEGF به دنبال ایجاد هیپوکسی و از طریق مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با فاکتور HIF-1 α افزایش یافته است.

از طرف دیگر، ورزش توانسته است باعث القای فعالیت MAPK و همچنین افزایش بیان HIF-1 α گردد. یک مرور سیستماتیک در فعال شدن MAPK در پاسخ به ورزش مقاومتی بررسی و نشان داده است که ورزش مقاومتی بر فعالیت سیگنالینگ‌های مرتبط با MAPK مانند C-Jun N-ترمینال کیناز، کینازهای S6 ریبوزومی ۹۰ کیلو دالتون^۴، کیناز تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی ۱/۲ و p38 تاثیرگذار است. علاوه بر این، مطالعه‌ی افراد مبتلا به بیماری انسدادی مزمن ریه^۵، که در ارتفاعات زندگی می‌کردند، نشان داد که برنامه‌ی ۸ هفته‌ای تمرین مقاومتی و قدرت عضلانی بر بیان HIF-1 α تاثیرگذار می‌باشد (۳۷-۳۵). پژوهش حاضر با محدودیت‌های مالی در خصوص سنجش فاکتورهای موثر دیگر در مسیرهای مرتبط با رگ‌زایی مواجه بود. از این رو پیشنهاد می‌شود که مطالعات آینده با تمرکز بر سنجش مولکول‌های مربوط به مسیرهای سیگنالینگ، به ویژه MAPK و HIF-1 α همچنین بر روی مدل‌های حیوانی آسیب‌های قلبی طراحی و ابهامات موجود در این خصوص را برطرف نمایند.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که تأثیر پویایی بین تمرین مقاومتی و آنژیوژنز در قلب وجود دارد که ناشی از تغییرات مولکولی و سیگنالینگ پیچیده‌ای می‌باشد. در این مطالعه، نقش بالقوه آیریزین در بیان VEGF برجسته شد. با تمرکز مطالعات آینده بر کشف مکانیسم‌های مولکولی مرتبط، می‌توان در مداخلات مربوط به سلامت سیستم قلبی عروقی، با هدف قرار دادن مولکول‌ها یا مسیرهای سیگنالینگ خاص، به درمان‌های مؤثرتر و هدفمندتر دست یافت.

پیام مقاله

اگر آیریزین بتواند اثرات مثبت ورزش را در آزمودنی‌های انسانی هم تقلید کند، این احتمال وجود دارد که استفاده از مکمل‌های آیریزین بتوانند به عنوان یک مداخله درمانی مهم بر بهبود عملکرد و سلامت قلب، به ویژه در بیماران موثر واقع شود. هر چند مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

تعارض منافع

هیچ موردی وجود ندارد.

1. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2)
2. Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)
3. c-Jun N-terminal kinase (JNK)
4. 90 kDa ribosomal S6 kinase
5. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

تشکر و قدردانی

از تمامی عزیزانی که در اجرای پژوهش حاضر نقش داشتند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

1. Vaduganathan M, Mensah GA, Turco JV, Fuster V, Roth GA. The global burden of cardiovascular diseases and risk: a compass for future health. American College of Cardiology Foundation Washington DC; 2022. p. 2361-71.
2. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. 2003;9(6):653-60.
3. Buschmann I, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessel growth. *Physiology*. 1999.
4. 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.
5. 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.
6. Farhadi H, Siahkohian M, Lotfali B, Pouran K. Effects of aerobic training and hypoxia on expression angiogenic factors in cardiac male Wistar rats. *Journal of Sport in Biomotor Sciences*. 2016;2(16):70-9.
7. Chen H, Chen C, Spanos M, Li G, Lu R, Bei Y, et al. Exercise training maintains cardiovascular health: signaling pathways involved and potential therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1):306.
8. Zhou X, Xu M, Bryant JL, Ma J, Xu X. Exercise-induced myokine FNDC5/irisin functions in cardiovascular protection and intracerebral retrieval of synaptic plasticity. *Cell & bioscience*. 2019;9:1-4.
9. Ho M-Y, Wang C-Y. Role of irisin in myocardial infarction, heart failure, and cardiac hypertrophy. *Cells*. 2021;10(8):2103.
10. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Eren MN, Celik A, Yilmaz M, et al. Cardiac, skeletal muscle and serum irisin responses to with or without water exercise in young and old male rats: cardiac muscle produces more irisin than skeletal muscle. *Peptides*. 2014;52:68-73.
11. Liao Q, Qu S, Tang L-x, Li L-p, He D-f, Zeng C-y, et al. Irisin exerts a therapeutic effect against myocardial infarction via promoting angiogenesis. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2019;40(10):1314-21.
12. Pollock ML, Gaesser GA, Butcher J, Després JP, Dishman RK, Franklin BA, et al. ACSM position stand: the recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness, and flexibility in healthy adults. *Journals AZ> Medicine & Science*. 1998;30(6).
13. Kraemer WJ, Ratamess NA, French DN. Resistance training for health and performance. *Current sports medicine reports*. 2002;1:165-71.
14. Dehghan F, Zamani S, Barreiro C, Jami MS. Irisin injection mimics exercise effects on the brain proteome. *European Journal of Neuroscience*. 2021;54(10):7422-41.
15. Wang Y, Zhang X, Zhou M, Wu Y, Ma Y, Liu J, et al. Irisin pre-treatment promotes multi-territory perforator flap survival in rats: An experimental study. *Injury*. 2020;51(11):2442-8.
16. Berra E, Pagès G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. *Cancer and Metastasis reviews*. 2000;19:139-45.
17. Ramakrishnan S, Anand V, Roy S. Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. *Journal of neuroimmune pharmacology*. 2014;9:142-60.
18. Lee S, Farrar RP. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat. *Journal of Exercise physiology online*. 2003;6(2).
19. Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, Pignataro P, Buccoliero C, Liu P, et al. The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(39):12157-62.

20. Shahabi S, Esfarjani F, Reisi J, Momenzadeh S, Jami M-S, Zamani S. The effects of 8-week resistance and endurance trainings on bone strength compared to irisin injection protocol in mice. *Advanced Biomedical Research*. 2021;10.
21. Li Q, Guo H, Chou DW, Berndt A, Sundberg JP, Uitto J. Mouse models for pseudoxanthoma elasticum: genetic and dietary modulation of the ectopic mineralization phenotypes. *PLoS One*. 2014;9(2):e89268.
22. Rodrigues EA, Lima ARR, Gomes MJ, Souza LM, Pontes THD, Pagan LU, et al. Influence of Isolated Resistance Exercise on Cardiac Remodeling, Myocardial Oxidative Stress, and Metabolism in Infarcted Rats. *Antioxidants*. 2023;12(4):896.
23. Xi Y, Hao M, Liang Q, Li Y, Gong D-W, Tian Z. Dynamic resistance exercise increases skeletal muscle-derived FSTL1 inducing cardiac angiogenesis via DIP2A–Smad2/3 in rats following myocardial infarction. *Journal of sport and health science*. 2021;10(5):594-603.
24. Kim H-B, Seo M-W, Jung HC, editors. *Effects of Aerobic vs. Resistance Exercise on Vascular Function and Vascular Endothelial Growth Factor in Older Women*. Healthcare; 2023: MDPI.
25. Sabaratnam R, Wojtaszewski JF, Højlund K. Factors mediating exercise-induced organ crosstalk. *Acta Physiologica*. 2022;234(2):e13766.
26. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. *Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle*. Wiley Online Library; 2003.
27. Atherton PJ, Babraj JA, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *The FASEB journal*. 2005;19(7):1-23.
28. Rinaldi B, Donniacuo M, Sodano L, Gritti G, Signoriello S, Parretta E, et al. Effects of sildenafil on the gastrocnemius and cardiac muscles of rats in a model of prolonged moderate exercise training. *PLoS One*. 2013;8(7):e69954.
29. Lennmyr F. *Signal Transduction in Focal Cerebral Ischemia: Experimental Studies on VEGF, MAPK and Src family kinases*: Acta Universitatis Upsaliensis; 2002.
30. Quan J-H, Ismail HAHA, Cha G-H, Jo Y-J, Gao FF, Choi I-W, et al. VEGF production is regulated by the AKT/ERK1/2 signaling pathway and controls the proliferation of toxoplasma gondii in ARPE-19 cells. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2020;10:184.
31. Prasadam I, Zhou Y, Du Z, Chen J, Crawford R, Xiao Y. Osteocyte-induced angiogenesis via VEGF–MAPK-dependent pathways in endothelial cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;386:15-25.
32. Saponaro C, Malfettone A, Ranieri G, Danza K, Simone G, Paradiso A, et al. VEGF, HIF-1 α expression and MVD as an angiogenic network in familial breast cancer. *PloS one*. 2013;8(1):e53070.
33. Ren F, Wu K, Yang Y, Wang Y, Li J. Dandelion polysaccharide exerts anti-angiogenesis effect on hepatocellular carcinoma by regulating VEGF/HIF-1 α expression. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:460.
34. Simonetti O, Lucarini G, Rubini C, Goteri G, Zizzi A, Staibano S, et al. Microvessel density and VEGF, HIF-1 α expression in primary oral melanoma: correlation with prognosis. *Oral diseases*. 2013;19(6):620-7.
35. Lee CJ, Nicoll JX. Time Course Evaluation of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation to Resistance Exercise: A Systematic Review. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2023;37(3):710-25.
36. Villamil-Parra W, Crispancho-Mejia É, Ramon Torrella J, Mancera-Soto EM. Effects of a physical exercise program on HIF-1 α in people with Chronic Obstructive Pulmonary Disease living at high altitude: study protocol for a clinical trial. *Trials*. 2023;24(1):698.
37. Ji X, Xu Z, Liu D, Chen Y. Effects of exercise training on neurological recovery, TGF- β 1, HIF-1 α , and Nogo-NgR signaling pathways after spinal cord injury in rats. *Clinics*. 2023;78:100236.

