

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۲۱، اردیبهشت ۱۴۰۱، ۱۸۶-۱۶۵

بررسی اثر تعاملی مصرف وارفارین با تمرینات تداومی و تناوبی بر مقادیر پروتئین MGP قلبی و شاخص‌های عملکرد کلیوی در موش‌های صحرایی مدل انفارکتوس قلبی: یک مطالعه تجربی

نوران عباسی^۱، عبدالعلی بنائی فر^۲، سجاد ارشدی^۳، یاسر کاظم‌زاده^۴

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۹/۰۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۰/۰۹/۱۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۰/۱۱/۰۲ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۰۴

چکیده

زمینه و هدف: اختلالات قلبی-کلیوی بر یکدیگر تأثیر می‌گذارند. تمرینات ورزشی قادر به کنترل آسیب‌های سلولی قلب و کلیه هستند. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر تعاملی مصرف وارفارین با تمرینات تداومی و تناوبی بر پروتئین MGP قلبی و شاخص‌های کلیوی در موش‌های مدل انفارکتوس قلبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگو-دوالی به طور تصادفی به ۷ گروه کنترل، انفارکتوس قلبی یا ایسکمی (ISC)، ISC+تمرین تناوبی، ISC+تمرین تداومی، ISC+وارفارین، ISC+تمرین تناوبی+وارفارین و ISC+تمرین تداومی+وارفارین تقسیم شدند. مدت تمرینات تناوبی و تداومی ۸ هفته، پنج جلسه در هفته بود. القاء انفارکتوس قلبی با تزریق زیرپوستی ایزوپروترونول ایجاد شد. MGP قلبی با روش وسترن بلات، کراتینین و نیتروژن اوره سرم (BUN) با روش فتومتریک و سیستماتین C با روش توربیدومتری اندازه‌گیری شدند. میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR) مطابق با بررسی سیستماتین C محاسبه گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها نیز از آزمون‌های t مستقل و آنالیز واریانس دو عاملی استفاده شد.

یافته‌ها: انفارکتوس قلبی سبب کاهش پروتئین MGP ($p=0/001$)، افزایش کراتینین ($p=0/001$)، BUN ($p=0/002$)، سیستماتین C ($p=0/001$) و کاهش GFR ($p=0/001$) نسبت به گروه کنترل سالم شد. اثر اصلی نوع تمرین بر تمام متغیرها، اثر اصلی وارفارین بر MGP و BUN، همچنین تعامل وارفارین و نوع تمرین نیز در MGP معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: تمرینات ورزشی نسبت به وارفارین، تأثیر بهتری بر MGP قلبی و کنترل شاخص‌های آسیب کلیوی داشت. لذا در بیماری‌های قلبی و کلیوی با تجویز وارفارین، تمرینات ورزشی با دقت برنامه‌ریزی شود.

واژه‌های کلیدی: تمرین، وارفارین، کلیه، انفارکتوس قلبی

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

۲- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران
تلفن: ۰۲۱-۵۵۵۴۵۰۴۰، دورنگار: ۰۲۱-۵۵۵۴۵۰۵۴، پست الکترونیکی: alibanaeifar@yahoo.com

۳- استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

۴- استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، تهران، ایران

مقدمه

افزایش مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی عروقی در جوامع امروزی، نگرانی‌هایی را نه تنها از نقطه نظر سلامتی فرد بیمار بلکه از لحاظ اجتماعی و اقتصادی نیز افزایش داده است [۱]. یکی از این بیماری‌های قلبی، انفارکتوس قلبی می‌باشد. در واقع به دنبال مسدود شدن عروق کرونری، بافت قلبی دچار قطع جریان خون گردیده و آسیب ایسکمی و انفارکتوس قلبی ایجاد می‌شود. انفارکتوس میوکاردی (Myocardial infarction, MI) در بافت قلب می‌تواند زمینه بروز کلسیفیکاسیون بافتی و فیبروز را فراهم کند [۲]. از جمله فاکتورهایی که می‌تواند از نفوذ کلسیم به بافت جلوگیری کند پروتئین ماتریکس گلا (Matrix Gla protein, MGP) می‌باشد [۳] که در بافت قلب بعد از MI تأثیرات حفاظتی نیز می‌تواند داشته باشد.

MGP عضوی از خانواده پروتئین‌های حاوی Gla وابسته به MGP دارای میل Vitk2 (Menaquinone-4, MK-4) است. ترکیبی زیادی به یون‌های کلسیم می‌باشد، مشابه سایر پروتئین‌های حاوی Gla، این پروتئین به عنوان یک بازدارنده از کانی سازی عروقی عمل می‌کند و در هموستاز استخوان نقش دارد [۴]. ترشح MGP ممکن است توسط سایتوکاین‌های التهابی، مولکول‌های چسبان سلولی و پروتئین‌های فاز حاد، که در MI آزاد می‌شوند، تحریک شود. این پروتئین که برای فعالیت خود به ویتامین K نیاز دارد، با کلات کردن کلسیم و یون‌های فسفات مانع فرآیند کلسیفیکاسیون می‌گردد [۳]. تحقیقات نشان دادند که مصرف وارفارین (که از جمله داروهای تجویزی بعد از MI

است) باعث کاهش بیان پروتئین‌های مهار کننده فرآیند کلسیفیکاسیون در عروق از جمله MGP می‌گردد [۵]. گروه دیگری از مطالعات نشان دادند که مصرف وارفارین علاوه بر القاء کلسیفیکاسیون عروق قلب منجر به کاهش ذخیره کلسیم در استخوان‌ها و در نتیجه پوکی استخوان می‌گردد [۶]. وارفارین می‌تواند کلسیفیکاسیون عروق را در شرایط برون تنی (In vitro) از طریق فعال سازی سیگنالینگ - beta catenin یا مهار کربوکسیلاسیون پروتئین ماتریکس MGP تحریک کند. همچنین وارفارین بیان مارکرهای پوکی استخوان استئوکلسین و استئوپونین را القاء می‌کند [۵].

علاوه بر این، گزارشات بالینی اخیر نشان دادند که عوارض کلیوی ناشی از مصرف وارفارین (نفروپاتی مرتبط با وارفارین) در بیماران قلبی مبتلا به بیماری‌های کلیوی مزمن (Chronic kidney disease, CKD) و همچنین افراد دارای کلیه‌های سالم مشاهده می‌گردد که در اثر مصرف این دارو، نشت گلبول‌های قرمز از گلومرول، خونریزی و آسیب سیستم توبولار کلیه رخ می‌دهد [۷]. مصرف وارفارین با مهار ویتامین K طبق مکانیسم‌هایی که در بالا شرح داده شد علاوه بر القاء کلسیفیکاسیون در عروق قلب، منجر به کلسیفیکاسیون شریان کلیه نیز می‌گردد؛ لذا عوارض ناشی از وارفارین به ویژه کلسیفیکاسیون، در افراد دیالیزی و یا مبتلا به CKD نسبت به افراد دارای کلیه سالم بیش‌تر هستند [۸]. سایر فاکتورها نیز با بیماری‌های قلبی و کلیوی تحت تأثیر قرار می‌گیرند. همچنین مطالعات ارتباط قوی بین سیستماتین C گردش خون، میزان فیلتراسیون گلومرولی و

خطر ابتلاء به بیماری عروق کرونر قلب، انفارکتوس و نارسایی قلبی را نشان داده‌اند [۹].

در برخی مطالعات ذکر شده که تمرینات ورزشی با بهبود عملکرد و هموستاز کلیه و تنظیمات یونی بر بیماری‌های قلبی، به ویژه در سنین بالا تأثیر گذار است [۱۰]. همچنین نشان داده شده که ۱۲ هفته ورزش هوازی (تداومی) باعث بهبود عملکرد عروقی و حفظ عملکرد شریان‌های قلبی می‌شود و باید به عنوان یک درمان کمکی برای کاهش خطر بیماری قلبی عروقی (Cardiovascular disease; CVD) در CKD در نظر گرفته شود [۱۱]. با توجه به این مطالعات، مدل‌های مختلف تمرینی می‌توانند بر تقویت مسیرهای سلولی عضله قلبی نیز تأثیر گذار بوده و با بهبود عملکرد سایر بافت‌ها نظیر کلیه در کنترل تخریبات قلبی عروقی نیز مؤثر باشند. چه بسا اینکه استفاده از فعالیت بدنی منظم چه (تناوبی، تداومی) بتواند با مداخله خاص خود، برخی از سایید افکت‌های داروهای مصرفی را نیز کنترل کند. لذا هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر تعاملی وارفارین با تمرینات تداومی و تناوبی بر مقادیر پروتئین MGP قلبی و شاخص‌های عملکرد کلیوی در موش‌های صحرایی نر مدل انفارکتوس قلبی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بود و در آزمایشگاه هیستوپاتولوژی (تهران، ایران، ۱۳۹۹) انجام پذیرفت. در این مطالعه، چهل و دو سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگو-دوالی (سن ۸ هفته، با دامنه وزنی ۱۸۰-۲۲۰ گرم) انتخاب شدند. موش‌های صحرایی در شرایط کنترل شده به لحاظ روشنایی

(۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی)، دمایی (۲۲±۳ سانتی‌گراد) و رطوبتی (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. قفس پلی کربنات به ابعاد ۴۷×۲۷×۲۰ سانتی‌متر برای نگهداری موش‌ها استفاده شد. حیوانات به آب و غذای استاندارد دسترسی آزاد داشتند. این مطالعه تجربی در کمیته اخلاق در پژوهش پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی با کد اخلاق (IR.SSRC.REC.1399.103) تصویب شد و بر اساس راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. حیوانات به مدت ۱ هفته با محیط آزمایشگاه آشنا شده و سپس به صورت تصادفی به ۷ گروه مساوی شامل: ۱) کنترل (بدون گاوژ وارفارین، بدون تمرین)، ۲) انفارکتوس قلبی (بدون گاوژ وارفارین، بدون تمرین)، ۳) انفارکتوس قلبی + تمرین تناوبی (بدون گاوژ وارفارین، با تمرین EIT)، ۴) انفارکتوس قلبی + تمرین تداومی (بدون گاوژ وارفارین، با تمرین ECT)، ۵) انفارکتوس قلبی + وارفارین (با گاوژ وارفارین، بدون تمرین)، ۶) انفارکتوس قلبی + تمرین تناوبی + وارفارین (با گاوژ وارفارین، با تمرین EIT)، ۷) انفارکتوس قلبی + تمرین تداومی + وارفارین (با گاوژ وارفارین، با تمرین ECT) تقسیم شدند. هر گروه شامل ۶ سر حیوان بود.

یک هفته بعد از انتقال اولیه حیوانات و آشنایی با محیط آزمایشگاه جهت رفع استرس، موش‌های صحرایی برای تزریق ایزوپروترونول هیدروکلراید (Sigma-Aldrich, Germany) آماده شدند. ایزوپروترونول به میزان ۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نرمال سالین (۱۰ میلی لیتر/کیلوگرم) حل و به صورت زیر جلدی (ناحیه کتف) در ۲ روز متوالی به فاصله

۲۴ ساعت به موش‌ها تزریق شد (با سرنگ انسولینی ۵ سی‌سی) تا MI تجربی ایجاد شود [۱۲]. لازم به ذکر است که تعداد ۶ سر حیوان به دلیل استرس ناشی از تزریق ایزوپروترونول از مطالعه خارج شدند که به سرعت جایگزینی صورت گرفت. همچنین قابل ذکر است که مطالعات گذشته با استفاده از ارزیابی هیستوشیمیایی بافت قلب نشان دادند دوزهای ۸۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند باعث ایجاد ناحیه نکرز در بافت قلب شود [۱۲]. بنابراین، دوز ۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای القاء MI در موش‌ها انتخاب شد. تمرین تناوبی: پس از القاء انفارکتوس قلبی با استفاده از داروی ایزوپروترونول، موش‌های صحرایی به مدت دو هفته دوره توانبخشی را طی کردند. سپس موش‌های مورد

تمرین به مدت یک هفته با نحوه فعالیت روی نوارگردان و نیز اجرای پروتکل تمرینی آشنا شدند. برنامه آشنایی شامل ۵ جلسه دویدن روی نوارگردان با سرعت ۶ تا ۱۰ متر بر دقیقه با شیب صفر درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. در ادامه، برنامه تمرین تناوبی طبق جدول ۱ انجام شد. این برنامه تمرینی به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته و به مدت ۳۰ دقیقه در هر جلسه و در قالب دویدن بر روی تردمیل (Tajhiz Gostar Omid Iranian, Tehran, Iran) با تکرارهای یک دقیقه‌ای و استراحت فعال ۲ دقیقه‌ای بین هر تکرار، با ۲۰ تناوب انجام گرفت [۱۳]. همچنین برای هر جلسه تمرین، ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن با سرعت ۵-۸ متر بر دقیقه در نظر گرفته شد.

جدول ۱- الگوی توزیع شدت و حجم تمرین تناوبی در طول مطالعه

هفته	مرحله تمرین (زمان ۱ دقیقه)	مرحله استراحت فعال (زمان ۲ دقیقه)
	سرعت: متر/دقیقه	سرعت: متر/دقیقه
اول	۱۶	۱۰
دوم - سوم	۲۰	۱۰
چهارم - پنجم	۲۵	۱۲
ششم - هفتم	۳۰	۱۲
هشتم	۳۳	۱۴

تمرین تداومی: در این مطالعه سرعت ۲۴ متر در دقیقه برای فعالیت هوازی متوسط انتخاب شده بود. موش‌های مورد تمرین به مدت یک هفته با نحوه فعالیت روی نوارگردان و نیز اجرای پروتکل تمرینی آشنا شدند. برنامه آشنایی شامل ۵ جلسه دویدن روی نوارگردان با سرعت ۶ تا ۱۰ متر بر دقیقه با شیب صفر درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. برنامه تمرین تداومی نیز طبق جدول ۲ انجام شد. به این صورت که شدت تمرین در هفته اول از سرعت ۱۰ متر بر

دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه به سرعت ۱۴ متر بر دقیقه و مدت ۳۰ دقیقه رسید. میزان شیب در طول برنامه تمرینی ۶ درجه بود. از هفته اول تا پایان هفته دوم هر جلسه ۱ متر بر دقیقه بر سرعت تردمیل اضافه شده و از ابتدای هفته سوم هر هفته ۱ متر بر دقیقه بر سرعت تردمیل اضافه شد [۱۴]. لازم به ذکر است که هر دو مدل تمرینی بر روی نوارگردان مدل ۲۰۱۶ (Tajhiz Gostar Omid Iranian, Tehran, Iran) انجام شد.

جدول ۲- الگوی توزیع شدت و حجم تمرین تداومی در طول مطالعه

هفته	سرعت (متر / دقیقه)	مدت (دقیقه)	شیب (درجه)
اول	۱۴-۱۰	۳۰-۱۰	۶
دوم	۱۹-۱۵	۵۵-۳۵	۶
سوم	۲۰	۶۰	۶
چهارم	۲۱	۶۰	۶
پنجم	۲۲	۶۰	۶
ششم	۲۳	۶۰	۶
هفتم	۲۴	۶۰	۶
هشتم	۲۴	۶۰	۶

وارفارین از شرکت سیناژن (Tehran, Iran) خریداری شد. در طول دوره تمرین ورزشی حیوانات تحت گاوآژ وارفارین نیز قرار گرفتند. بدین صورت که هر روز یک تا ۲ ساعت پس از تمرینات ورزشی (جهت عدم مداخله دارو در حین تمرین) حیوانات میزان ۰/۵ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن وارفارین (حل شده در نرمال سالین) را دریافت می کردند (با سرنگ ۵ سی سی) تا اثرات مزمن مصرف این داروها مورد بررسی قرار گیرد [۱۵].

۴۸ ساعت پس از آخرین مداخله تمرینی تمامی موش های صحرایی به مدت ۱۰-۸ ساعت ناشتا شده و برای قربانی شدن آماده شدند. بی هوشی با ترکیب کتامین (Ketamine) (۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلازین (Xylazine) (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) (زیست فن آوران طب آزما، تهران، ایران) انجام شد [۱۶]، پس از بی هوشی کامل و تست درد و مطمئن شدن از عدم هوشیاری، خون گیری از بطن چپ قلب انجام گردید. نمونه های خون پس از سانتریفیوژ (Hettich,

Germany) (۱۵ دقیقه، ۳۰۰۰ دور در دقیقه) و جداسازی سرم تا زمان آزمایش، در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس به سرعت بافت قلب از قفسه سینه خارج شده و با شستشوی بافر فسفات سالین، خون و مواد اضافی تمیز شد و بافت داخل میکروتیوب ۲ میلی لیتری کدگذاری شده قرار گرفت. میکروتیوب ها داخل تانک ازت انتقال داده شد، سپس تا زمان آنالیزهای سلولی داخل فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۱۷].

شاخص های کلیوی پژوهش حاضر با دستگاه بیوشیمی اتوآنالایزر (Auto classic AT Plus, Tehran, Iran) (Analyzer) اندازه گیری شدند. تمام مراحل اندازه گیری بر اساس دستورالعمل کاتالوگ هر شاخص انجام شد. برای بررسی کراتینین از کیت تشخیص کمی کراتینین (Pars Azmoon, Tehran, Iran) محدوده ۰/۲-۱۵ میلی گرم در دسی لیتر با روش فتومتریک استفاده شد.

برای بررسی نیتروژن اوره سرم (Blood urea nitrogen, BUN) نیز از کیت تشخیص کمی BUN (Pars Azmoon, Tehran, Iran) محدوده ۲-۲۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر با روش فتومتریک استفاده شد.

هم‌چنین برای بررسی سیستاتین C از کیت تشخیص کمی سیستاتین C (Diazyme, Shanghai, China) محدوده ۰/۲-۸/۰ میلی‌گرم/لیتر با روش توربیدومتری انجام شد (شماره کاتالوگ: DZ133C).

میزان فیلتراسیون گلومرولی (Glomerular filtration rate, GFR)، مطابق با بررسی سیستاتین C و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۱۸]:

$$GFR = 76/6 * C^{-1/16} \text{ سیستاتین}$$

به منظور مطالعه بیان پروتئین MGP قلبی، از روش وسترن بلات استفاده شد. برای استخراج پروتئین، نمونه‌های قلبی را از فریزر خارج کرده و براساس وزن با بافر RIPA ترکیب و هموژن شدند. در ادامه بافت هموژن شده را داخل دستگاه سانتریفیوژ (Hettich, Germany) با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و در نهایت مایع شفاف رویی که حاوی نمونه‌های پروتئین تام بود، استخراج و بر اساس روش برادفورد (Bradford) میزان پروتئین هر نمونه تعیین غلظت شد. برای رسم نمودار استاندارد برادفورد از آلبومین سرم گاوی BSA (bovine serum albumin) شرکت سیناژن (تهران، ایران) به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. پروتئین سرم آلبومین گاوی (BSA) به دلیل شباهت ساختاری پروتئین سرم

آلبومین انسانی در تحقیقات آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به نحوی که در ابتدا ۲ میلی‌گرم BSA در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس از این استوک، محلول‌های پروتئینی با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۴۰۰، ۱۸۰۰ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با آب مقطر تهیه شدند. پس از آماده‌سازی استانداردهای BSA در لوله‌های آزمایش ۲ میلی‌لیتری معرف برادفورد (۰/۱ درصد کوماسی برلیانت بلو G-250، ۵ درصد اتانول ۹۵٪، ۱۰ درصد اسید فسفوریک ۸۵٪ در آب مقطر) ریخته شد. به هر لوله، ۴۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد BSA تهیه شده اضافه گردید. به نمونه Blank، آب مقطر اضافه شد. نمونه‌ها را ورتکس کرده و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نوری به وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و منحنی استاندارد رسم گردید.

به منظور تعیین غلظت نمونه‌های پروتئینی جهت برداشتن مقادیر یکسان از آنها برای انجام الکتروفورز SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)، ۴۰ میکرولیتر از هر عصاره پروتئینی که قبلاً از سلول‌ها استخراج شده بود، به ۲ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه و به نمونه Blank آب مقطر اضافه شد. سپس با استفاده از نمودار استاندارد و هم‌چنین جذب‌های به دست آمده از عصاره‌های سلولی، غلظت نمونه‌های پروتئینی برحسب میلی‌گرم/میلی‌لیتر محاسبه گردید. غلظت پروتئین در تمام نمونه‌ها با یک نسبت مشخص رقیق‌سازی شد. حدود ۲۵ میکروگرم از هر نمونه پروتئینی جهت الکتروفورز (Bi0-

Rad, USA) استفاده شد. ضمن آنکه الکتروفورز نمونه‌ها با ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲/۵ درصد با ولتاژ ۹۰-۱۰۰ به مدت ۲-۳ ساعت انجام شد. سپس نمونه‌های الکتروفورز شده به غشاء PVDF (Polyvinylidene Fluoride) منتقل شده و پس از انتقال، کاغذ با استفاده از بافر TBS-T به مدت ۱۰-۵ دقیقه شستشو داده شد و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در بافر TBS (Blocking) آنکوبه گردید. شستشوی غشاء، ۳ بار و هر بار ۵ دقیقه با بافر TBS-T انجام شد. در مرحله بعدی غشای PVDF به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای اتاق با آنتی بادی اولیه (MGP: Cat No: 642281, Biorbyt, Cambridge, United Kingdom Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: GTX100118) رقیق شده در بافر TBS آنکوبه گردید (رقت آنتی بادی ۱/۱۰۰۰). در ادامه شستشو ۳ بار و هر بار ۵ دقیقه با بافر TBS-T، انجام شد. سپس به مدت ۱-۲ ساعت در دمای اتاق در آنتی بادی ثانویه (Cat No: BA1054, Boster Bio, San Francisco, USA Goat Anti-Rabbit IgG) رقیق شده در بافر TBS آنکوبه گردید (رقت آنتی‌بادی-۱/۳۰۰۰). در نهایت غشاء در معرض محلول سوبسترای کمی لومینسانس ECL (Electrochemiluminescence) قرار گرفته و باندهای حاصل بر روی فیلم رادیولوژی مخصوص ثبت شدند. در انتها عمل شستشو تکرار شد پس از اینکه باندهای پروتئینی مورد نظر روی نوارهای فیلمی ظهور کردند، از فیلم‌ها عکس تهیه شده و با استفاده از نرم افزار Image J اندازه هر باند محاسبه شد [۱۹].

در این پژوهش، از میانگین و انحراف معیار برای توصیف آماری متغیرها استفاده شد. همچنین، از آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk) برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها به تفکیک گروه‌ها و آزمون لوین (Levene Test) برای بررسی همگنی واریانس‌ها در بین گروه‌ها استفاده شد. برای بررسی تأثیر القاء MI در حیوانات با ایزوپروترونول بر متغیرهای مورد مطالعه از آزمون t مستقل استفاده شد. به‌علاوه، برای بررسی تأثیر برنامه‌های تمرینی و وارفارین بر متغیرها، از آزمون آنالیز واریانس دو عاملی (۳: برنامه تمرینی $\times$ ۲: وارفارین) در سطح معنی‌داری $\alpha=0/05$ استفاده شد. در شرایطی که عامل برنامه تمرینی معنی‌دار بود، از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سرانجام، در شرایط معنی‌داری تعامل بین برنامه تمرینی و وارفارین، از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و t مستقل به عنوان آزمون تعقیبی با تعدیل آلفا ($\alpha=0/01$ -تعدیل‌شده) استفاده شد. آنالیزهای آماری و طراحی نمودارها به ترتیب با استفاده از نسخه ۲۵ نرم‌افزار SPSS و نرم‌افزار Excel (مایکروسافت آفیس ۲۰۱۶) انجام شد.

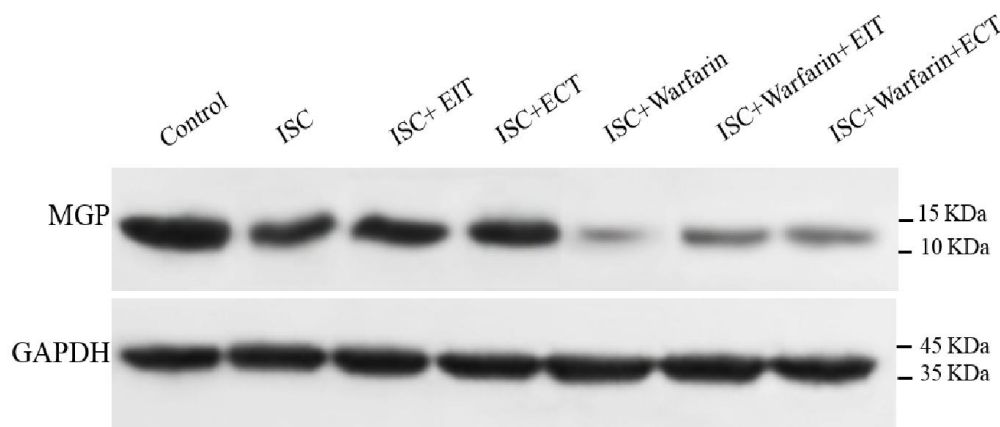
نتایج

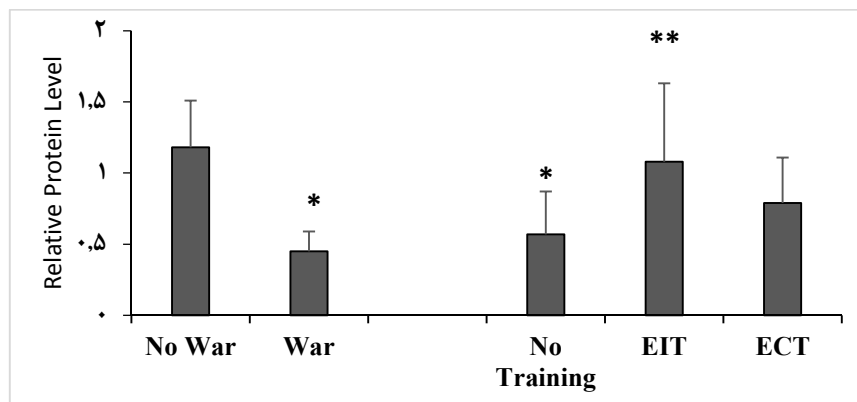
نتایج آزمون شاپیرو-ویلک نشان داد از آن‌جا که در تمام متغیرهای تحقیق و به تفکیک گروه‌ها، $p>0/05$ بود، پیش‌فرض نرمال بودن توزیع داده‌ها تأیید شد. همچنین، آزمون لوین نشان داد که در تمام متغیرها بیان پروتئین MGP ($F=0/30$, $p=0/91$)، کراتینین ($F=0/52$, $p=0/76$)، نیتروژن اوره خون ($F=0/91$, $p=0/49$)، سیستماتین C

($F=1/15$, $p=0/36$)، و فیلتراسیون گلومرولی ($F=0/77$)، پیش‌فرض همگنی واریانس‌ها رعایت شده است. ($p=0/58$) مقایسه گروه‌های کنترل سالم و انفارکتوس قلبی با استفاده از آزمون t مستقل نشان داد که القاء انفارکتوس قلبی منجر به کاهش بیان پروتئین MGP ($t=22/05$, $df=10$)، افزایش مقادیر کراتینین ($t=-6/19$, $df=10$)، ($p=0/001$)، افزایش BUN ($t=-4/14$, $df=10$)، ($p=0/001$)، افزایش سیستاتین C ($t=-5/03$, $df=10$)، و در نهایت کاهش مقادیر GFR ($t=7/42$, $df=10$)، ($p=0/001$) شد.

بیان پروتئین MPG: نتایج آنالیز واریانس دو عاملی نشان داد که اثر اصلی وارفارین ($F_{1,30}=1173/44$, $p=0/001$) و نوع تمرین ($F_{2,30}=191/71$, $p=0/001$) و تعامل وارفارین و نوع تمرین ($F_{2,30}=49/78$, $p=0/001$) و تعامل وارفارین و نوع تمرین ($F_{2,30}=49/78$, $p=0/001$) با توجه به معنی‌داری تعامل، نتایج آنالیز واریانس یک‌سویه برای بررسی تأثیر نوع تمرین به تفکیک گروه‌ها نشان داد که در آزمودنی‌های بدون

گلوکز وارفارین، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد ($F_{2,15}=228/02$, $p=0/001$)، که نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که میزان بیان پروتئین گروه تمرین EIT به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه‌های بدون تمرین و تمرین ECT بود. همچنین، میزان بیان پروتئین در گروه ECT به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه بدون تمرین بود. همچنین، در آزمودنی‌های با گلوکز وارفارین، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده شد ($F_{2,15}=27/69$)، که نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که میزان بیان پروتئین گروه تمرین EIT و ECT به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه بدون تمرین بود ($p=0/001$)، اما بین میزان بیان پروتئین گروه‌های EIT و ECT تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/17$)، همچنین، نتایج آزمون t -مستقل نشان داد که در تمام گروه‌ها، وارفارین باعث کاهش معنی‌دار میزان بیان پروتئین MPG شد ($p=0/001$) نمودار (۱).

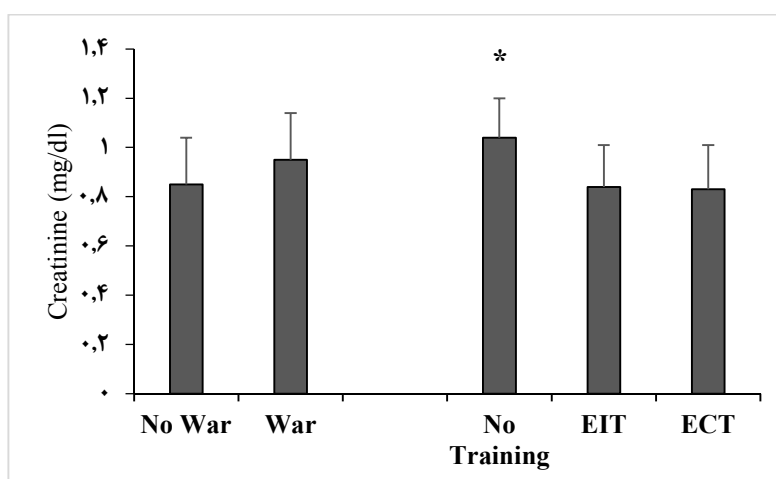




نمودار ۱- تأثیر وارفارین و نوع برنامه تمرینی بر میزان بیان پروتئین MGP * تفاوت معنی‌دار بین گاواژ و عدم گاواژ وارفارین ($p=0/001$). ** تفاوت معنی‌دار گروه‌های تمرین EIT و ECT با گروه بدون تمرین ($p=0/001$). *** تفاوت معنی‌دار بین گروه EIT و ECT در آزمودنی‌های بدون گاواژ وارفارین ($p=0/001$). لازم به ذکر است که در آزمودنی‌های با گاواژ وارفارین، بین گروه EIT و ECT تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/17$). مخفف: ISC: گروه ایسکمی یا انفارکتوس قلبی، Control: گروه کنترل، No War: بدون وارفارین، War: وارفارین، No Training: بدون تمرین، EIT: تمرین تناوبی، ECT: تمرین تداومی، War: وارفارین. (آزمون آماری آنالیز واریانس دو عاملی).

میزان کراتینین گروه‌های EIT و ECT تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/99$). با وجود این، اثر اصلی وارفارین ($F_{1,3}=3/17$, $p=0/09$, $\eta^2=0/10$) و تعامل وارفارین و نوع تمرین ($F_{2,3}=0/20$, $p=0/82$, $\eta^2=0/01$) معنی‌دار نبود (نمودار ۲).

کراتینین: بر اساس نتایج آنالیز واریانس دو عاملی، اثر اصلی نوع تمرین معنی‌دار بود ($F_{2,3}=5/50$, $p=0/009$ ، $\eta^2=0/27$) که نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که در گروه‌های EIT ($p=0/02$) و ECT ($p=0/02$)، میزان کراتینین به طور معنی‌داری کمتر از گروه بدون تمرین بود، اما بین

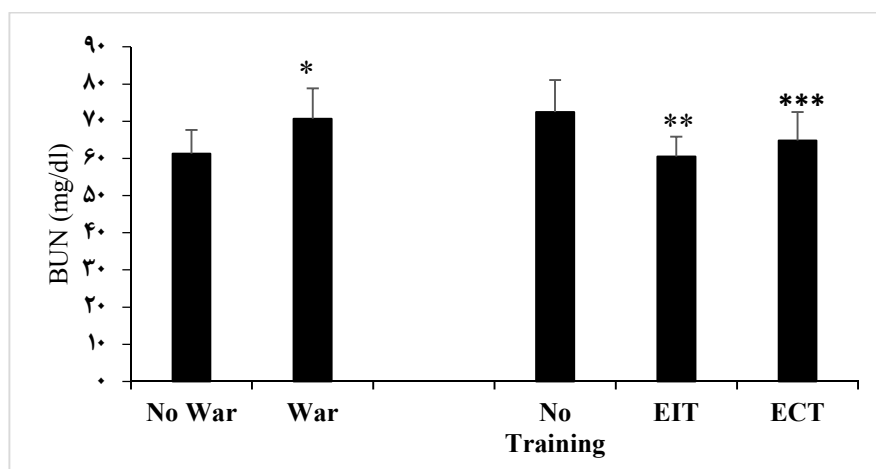


نمودار ۲- تأثیر وارفارین و نوع برنامه تمرینی بر میزان کراتینین. * تمرینات EIT و ECT باعث کاهش معنی‌دار میزان کراتینین شد ($p=0/02$).

وارفارین تأثیر معنی‌داری بر میزان کراتینین موش‌های صحرایی دارای انفارکتوس قلبی نداشت. مخفف: No War: بدون وارفارین، War: وارفارین، No Training: بدون تمرین، EIT: تمرین تناوبی، ECT: تمرین تداومی، War: وارفارین. (آزمون آماری آنالیز واریانس دو عاملی)

داد که تمرینات EIT ($p=0/001$) و ECT ($p=0/005$)، باعث کاهش معنی‌دار میزان BUN در موش‌های صحرایی دارای انفارکتوس قلبی شد، اما بین تأثیر تمرینات EIT و ECT تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/14$). با وجود این، تعامل وارفارین و نوع تمرین ($F_{2,30}=1/49$ ، $p=0/24$) معنی‌دار نبود (نمودار ۳).

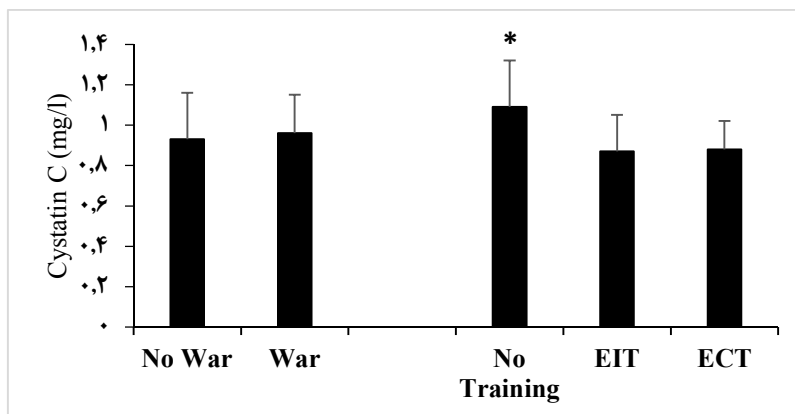
نیتروژن اوره خون: نتایج آنالیز واریانس دو عاملی نشان داد که اثر اصلی وارفارین ($F_{1,30}=26/88$ ، $p=0/001$) معنی‌دار بود. به این صورت که وارفارین باعث افزایش معنی‌دار BUN در موش‌های با انفارکتوس قلبی شد. همچنین، اثر اصلی نوع تمرین معنی‌دار بود ($F_{2,30}=15/12$ ، $p=0/001$) که نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان



نمودار ۳- تأثیر وارفارین و نوع برنامه تمرینی بر میزان نیتروژن اوره خون. * وارفارین باعث افزایش معنی‌دار ($p=0/001$)، ** تمرینات EIT باعث کاهش معنی‌دار ($p=0/001$)، *** تمرینات ECT باعث کاهش معنی‌دار ($p=0/005$) میزان نیتروژن اوره خون شد. مخفف: No War: بدون وارفارین، War: وارفارین، No Training: بدون تمرین، EIT: تمرین تناوبی، ECT: تمرین تداومی، War: وارفارین. (آزمون آماری آنالیز واریانس دو عاملی)

سیستاتین C: بر اساس نتایج آنالیز واریانس دو عاملی، اثر اصلی نوع تمرین معنی‌دار بود ($F_{2,30}=5/14$ ، $p=0/01$)، بنابراین، نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که تمرینات EIT ($p=0/02$) و ECT ($p=0/03$) باعث کاهش معنی‌دار میزان سیتاتین C در موش‌های صحرایی دارای

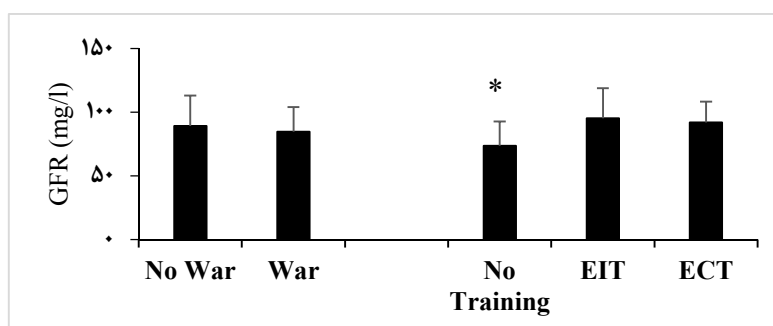
انفارکتوس قلبی شد اما بین تأثیر تمرینات EIT و ECT تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/99$). با وجود این، اثر اصلی وارفارین ($F_{1,30}=0/16$ ، $p=0/70$) و تعامل وارفارین و نوع تمرین ($F_{2,30}=1/53$ ، $p=0/23$) معنی‌دار نبود (نمودار ۴).



نمودار ۴. تأثیر وارفارین و نوع برنامه تمرینی بر میزان سیستاتین C. * تمرینات EIT ($p=0/02$) و ECT ($p=0/03$) باعث کاهش معنی‌دار میزان سیستاتین C شد ($p=0/02$). وارفارین تأثیر معنی‌داری بر میزان سیستاتین C موش‌های صحرایی دارای انفارکتوس قلبی نداشت. مخفف: No War: بدون وارفارین، War: وارفارین، No Training: بدون تمرین، EIT: تمرین تناوبی، ECT: تمرین مداومی، War: وارفارین. (آزمون آماری آنالیز واریانس دو عاملی)

این افزایش معنی‌داری نبود ($p=0/07$). ضمناً، بین تأثیر تمرینات EIT و ECT بر میزان GFR تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/90$). به‌علاوه، اثر اصلی وارفارین ($F_{1,33}=0/46$, $p=0/50$, $\eta^2=0/02$) و تعامل وارفارین و نوع تمرین ($F_{2,33}=1/70$, $p=0/20$, $\eta^2=0/10$) معنی‌دار نبود (نمودار ۵).

فیلتراسیون گلومرولی: با توجه به نتایج آنالیز واریانس دو عاملی، اثر اصلی نوع تمرین معنی‌دار بود ($F_{2,33}=4/24$, $p=0/02$, $\eta^2=0/22$)، لذا بر اساس نتایج آزمون تعقیبی توکی مشاهده شد که تمرینات EIT باعث افزایش معنی‌دار میزان GFR در موش‌های دارای انفارکتوس قلبی شد ($p=0/03$) اما با وجود این که تمرینات ECT باعث افزایش میزان GFR شد،



نمودار ۵. تأثیر وارفارین و نوع برنامه تمرینی بر میزان فیلتراسیون گلومرولی. * تمرینات EIT باعث افزایش معنی‌دار میزان فیلتراسیون گلومرولی نسبت به موش‌های صحرایی بدون تمرین شد ($p=0/03$). وارفارین تأثیر معنی‌داری بر میزان فیلتراسیون گلومرولی موش‌های صحرایی دارای انفارکتوس قلبی نداشت. مخفف: No War: بدون وارفارین، War: وارفارین، No Training: بدون تمرین، EIT: تمرین تناوبی، ECT: تمرین مداومی، War: وارفارین. (آزمون آماری آنالیز واریانس دو عاملی)

بحث

با گذشت چندین سال، دانش ما در مورد تعامل بین قلب و کلیه افزایش یافته است. عملکرد قلب و کلیه ارتباط تنگاتنگی با یکدیگر دارند، زیرا نارسایی قلبی و بیماری‌های کلیوی در عوامل خطر مشترک هستند و شروع هر کدام بر دیگری نیز تأثیر می‌گذارد. لذا در مطالعه حاضر به بررسی شاخص محافظتی قلبی عروقی MGP و شاخص‌های آسیب کلیوی موش‌های صحرایی MI شده بعد از تمرین تناوبی و تداومی با داروی وارفارین پرداخته می‌شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با القاء MI توسط ایزوپروترونول میزان MGP کاهش معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم داشت. MGP یک مهار کننده قوی کلسیفیکاسیون عروقی می‌باشد. لذا کاهش آن در شرایط MI می‌تواند زمینه کلسیفه شدن عروقی را فراهم آورد. در نتیجه افزایش آن مفید به نظر می‌رسد زیرا که در شرایط MI می‌تواند سفتی عروق را کاهش دهد. در مطالعه حاضر انجام تمرینات ورزشی تناوبی و تداومی بعد از MI به تنهایی افزایش معنی‌داری را در این فاکتور ایجاد کردند که این تغییرات را می‌توان به تأثیرات مثبت تمرین ورزشی نسبت داد. نتایج مطالعه حاضر با تحقیق Jesoersen و همکاران همسو بود [۲۰]. به نظر می‌رسد تمرین ورزشی با تأثیر بر ویتامین K می‌تواند در فعال سازی MGP مؤثر باشد (محققان این مطالعه نیز در بررسی تغییرات ویتامین K و کلسیم هستند). همان‌طور که بیان شد MGP یک مهار کننده قوی کلسیفیکاسیون بافت نرم از طریق جذب هیدروکسی آپاتیت بوده و لذا ممکن است به طور بالقوه در برابر کلسیفیکاسیون شریانی محافظت نماید. در مطالعات

متعدد نیز ذکر شده که فعالیت‌های ورزشی طولانی مدت قادر به محافظت شریانی و مهار کلسیفیکاسیون از مکانیسم‌های مجزای MGP هستند. به نظر می‌رسد، تمرینات اینتروال و طولانی مدت با کاهش سطح لیپوپروتئین، کنترل هایپرتری گلاسریدمی و همچنین تغییر مارکرهای کلسیمی و التهابی به ویژه در بیماران با آسیب قلبی و کلیوی، کلسیفیکاسیون عروقی را کنترل نماید [۲۱]. با توجه به مطالعه حاضر نیز می‌توان بیان کرد تمرین ورزشی تداومی به ویژه تناوبی بعد از MI با افزایش MGP نیز می‌تواند در کنترل کلسیفیکاسیون عروقی مؤثر باشند. بر خلاف نتایج مطالعه حاضر Zho و همکاران در یک مطالعه کنترل شده تصادفی نشان دادند که دوازده ماه تمرین ورزشی تعادلی قدرتی و استقامتی در آزمودنی انسانی (۶۷ سال) کلسیفیکاسیون آئورت شکمی را در بیماران مبتلا به CKD متوقف نکرد [۲۲]. هر چند در این مطالعه تغییرات MGP ارزیابی نشد اما متفاوت بودن آزمودنی، نوع تمرین و سن می‌تواند از جمله دلایل نتایج متفاوت مطالعه Zho با مطالعه حاضر باشد. نتایج مطالعه حاضر همچنین اثر اصلی تمرین و تعامل تمرین تناوبی + وارفارین و تمرین تداومی + وارفارین را تأیید کرد. به بیان دیگر گواژ وارفارین سبب کاهش مقادیر MGP در بافت قلب شد. در رابطه با این تغییرات کاهشی با وارفارین که می‌تواند مضر به نظر برسد می‌توان به تأثیرات وارفارین بر مسیر ویتامین K و MGP اشاره کرد. همان‌طور که بیان شد MGP منحصراً در سلول‌های عضله صاف لایه داخلی عروق بیان می‌شود. MGP یک پروتئین وابسته به ویتامین K است که با کلات شدن

(Chelating) یون‌های کلسیم و فسفات از کلسیفیکاسیون ماتریکس سلولی جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، می‌تواند بلورها و اجزای ماتریکس خارج سلولی را مستقیماً از طریق Gla یا غیر مستقیم از طریق پروتئین مورفوژنیک استخوانی (Bone Morphogenic protein, BMP) کلات کند. MGP هم‌چنین می‌تواند با تنظیم آپوپتوز سلول‌های عضلات صاف، کلسیفیکاسیون را مهار کند، اگرچه مکانیسم‌های دیگری نیز فرض شده است [۲۳]. بنابراین، MGP یک عامل مهم در مهار تمایز سلول‌های عضله صاف عروقی به سمت ویژگی استخوانی شدن است. هنگامی که وارفارین فرایندهای کربوکسیلاسیون وابسته به ویتامین K را مهار می‌کند، میزان و فعالیت MGP کاهش می‌یابد. لذا در مطالعه حاضر نیز مصرف وارفارین می‌تواند با مهار MGP در القاء کلسیفیکاسیون عروقی و خنثی سازی تأثیرات مفید تمرین ورزشی مؤثر باشد که مکانیزم مهاري آن ذکر شد.

در بررسی سطح کراتینین خون مشخص شد که القاء MI سبب افزایش معنی‌دار کراتینین نسبت به گروه کنترل سالم می‌شود. پس از تیمارهای صورت گرفته، نتایج آماری نشان داد که تنها اثر اصلی تمرین ورزشی تأیید شد. این در حالی بود که مصرف وارفارین به تنهایی یا در تعامل با تمرینات تداومی و تناوبی تغییر معنی‌داری را در سطح کراتینین سرم موش‌های صحرایی MI شده نشان نداد. تغییرات سطح کراتینین سرم می‌تواند با آسیب‌های کلیوی مرتبط باشد [۲۴]. همسو با نتایج گروه انفارکتوس قلبی مطالعه حاضر نشان داده شده که در بیماری قلبی با افزایش کراتینین و نیتروژن اوره خون میزان مرگ و میر نیز افزایش می‌یابد، که

نشان می‌دهد کراتینین دارای ارزش پیش‌بینی کننده در بیماران مبتلا به انفارکتوس میوکاردی حاد است [۲۵]. در بررسی تأثیرات تمرین ورزشی با این شاخص مطالعات ضد و نقیضی وجود دارد. کراتینین که متابولیت کراتین و کراتین فسفات است، در عضله اسکلتی با سرعت نسبتاً ثابت تولید می‌شود. سطح کراتینین، مقدار مطلق عضله اسکلتی را منعکس می‌کند و بنابراین شاخص مفیدی برای عضله اسکلتی است. متابولیسم پروتئین در ورزش‌های طولانی مدت می‌تواند در گسترش کراتینین سرم نقش داشته باشد. با این وجود در مطالعه حاضر میزان کراتینین با تمرین کاهش یافت که شدت و مدت پایین‌تر می‌تواند در تغییرات کاهشی این مارکر در هر دو مدل تمرینی به تنهایی دخیل باشد. زیرا که با شدت تمرینی کم‌تر معمولاً عضلات برای استفاده از سوخت به متابولیسم چربی مراجعه می‌کنند. تمرینات تناوبی نیز از جمله تمریناتی است که برای چربی سوزی بسیار توصیه می‌شود [۲۶] لذا عدم و یا کاهش متابولیسم پروتئین می‌تواند در کاهش کراتینین سرمی نقش داشته باشد که در مطالعه حاضر با دو مدل تمرین به تنهایی کاهش کراتینین قابل توجیه است. از طرفی افزایش کراتینین سرم و تغییرات غیر معنی‌دار تمرین ورزشی با وارفارین می‌تواند به آسیب کلیوی ناشی از این دارو نسبت داده شود [۲۷]. با این وجود از آن جایی که مطالعات در رابطه با تأثیر تمرین بر وارفارین ضد و نقیض می‌باشد، برای بررسی دقیق‌تر تأثیر تعاملی تمرین تداومی و وارفارین و هم‌چنین تمرین تناوبی و وارفارین باید به شاخص‌های دقیق‌تر نظیر BUN، سیستاتین C و GFR مراجعه کرد.

در این مطالعه هم‌چنین القاء MI سبب افزایش معنی‌دار BUN نسبت به گروه کنترل سالم شد. نسبت بالای BUN به کراتینین با مشکلات کلیوی ناگهانی (حاد) رخ می‌دهد که ممکن است در اثر شوک یا کم‌آبی شدید ایجاد شود. در هر حال سطح بالای مداوم نیتروژن اوره خون با افزایش خطر بروز حوادث قلبی عروقی در بیماران مبتلا به نارسایی حاد قلبی همراه است. مطالعات اخیر در بیماران مبتلا به نارسایی قلبی نشان داده که نسبت به کراتینین، BUN با مرگ و میر، ارتباط بیش‌تری دارد [۲۸]. با این وجود در مطالعه حاضر افزایش BUN گروه انفارکتوس قلبی نیز می‌تواند نشان دهنده تخریب بیش‌تر قلبی کلیوی و یا حتی مرگ و میر باشد. افزایش سطح BUN ممکن است نشان دهنده کاهش میزان فیلتراسیون گلوبولینی نیز باشد [۲۹]. در بررسی مدل‌های درمانی مطالعه حاضر نتایج نشان داد که اثرات اصلی تمرین (کاهش) و هم‌چنین دارو (افزایش) بر BUN معنی‌دار بود در حالی که اثر تعاملی تمرین دارو تأیید نشد. به نظر می‌رسد کنترل و کاهش BUN ناشی از تمرین در مطالعه حاضر قسمتی به بهبود عملکرد قلبی ناشی از تمرین نسبت داده شود زیرا که بهبود ساختار و عملکرد قلبی ناشی از تمرین ورزشی تناوبی و تداومی، می‌تواند برون ده قلبی را تنظیم و با کنترل فشار خون، عملکرد کلیه را نیز تنظیم نماید که به دفع بهتر اوره در گلوبولین‌ها ختم می‌شود. در بررسی تأثیر وارفارین بر نتایج BUN مشخص شد که وارفارین به تنهایی قادر به افزایش این شاخص می‌باشد. همسو با نتایج مطالعه حاضر بیان شده که نیتروژن اوره خون و کراتینین سرم با دوزهای مختلف وارفارین ارتباط منفی

دارد [۳۰]. بیان شده که بیماران با کاهش عملکرد کلیه به دوزهای کم‌تر وارفارین نیاز دارند، زیرا که آنها کنترل ضدانعقادی ضعیف‌تری دارند و در معرض خطر بیش‌تری برای خونریزی عمده قرار دارند. این تحقیقات نشان می‌دهد که احتمالاً لازم باشد وارفارین با دوز کم‌تری به برخی بیماران کلیوی تجویز شود، با این وجود، افزایش دوره مصرف این دارو، عملکرد کلیوی را کاهش داده و پیامدهای بیش‌تری بر خود بافت کلیه ممکن است داشته باشد [۳۱] که در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد ۸ هفته تجویز این دارو می‌تواند مقادیر BUN، به عنوان شاخص آسیب کلیوی را افزایش دهد.

نتایج مطالعه حاضر هم‌چنین نشان داد که القاء MI سبب افزایش معنی‌دار سیستماتین C نسبت به گروه کنترل سالم شد. نتایج تحلیل واریانس دو عاملی نشان داد که اثر اصلی تمرین بر سیستماتین C معنی‌دار بود در حالی که اثر تعاملی تمرین دارو تأیید نشد. سیستماتین C نیز شاخص معتبرتری برای ارزیابی عملکرد قلب و کلیه محسوب می‌شود. عملکرد قلب و کلیه به شدت با هم مرتبط هستند و مشخص شده که اختلال عملکرد یکی از این اندام‌ها لزوماً به دیگری آسیب می‌رساند [۳۲]. بنابراین، حتی اختلال خفیف کلیه با خطر بالای قلبی عروقی همراه است. بر اساس تحقیقات، افزایش سرمی سیستماتین C می‌تواند نشان‌گر شروع آسیب کلیوی باشد. از مزایای استفاده از سیستماتین C به عنوان نشان‌گر فیلتراسیون تأثیر کم‌تر سن، جنس، وزن و توده عضلانی بر این شاخص نسبت به کراتینین سرم است. لذا افزایش سیستماتین C گروه انفارکتوس را می‌توان جدی تلقی کرد.

همسو با نتایج مطالعه حاضر بیان شده که در بیماران قلبی، غلظت سیستاتین C به طور خطی با ظرفیت ورزشی بدتر و ضربان قلب ذخیره (Heart Rate Reserve, HRR) ضعیفتر مرتبط است [۳۳]. افزایش این فاکتور با انفارکتوس قلبی، مکانیزم‌های متعدد دارد. بیان شده که ایسکمی و هیپوکسی ناشی از یک انفارکتوس قلبی، تولید سیستاتین C توسط کاردیومیوسیت‌ها را افزایش می‌دهد. افزایش این فاکتور می‌تواند به مسیرهای سیگنالینگ تخریب مایوسیتی ختم شود، زیرا که سیستاتین C با فعالیت پروتئاز سیستئین، پاسخ التهابی، فعالیت فاگوسیتی را تنظیم و در تخریب ماتریکس خارج سلولی شرکت می‌کند [۳۴]. تصور می‌شود که یکی از مکانیسم‌ها این است که سیستاتین C با تنظیم التهاب، پیشرفت آترواسکلروز را تسهیل می‌کند. بنابراین، این نشانگر می‌تواند با ایجاد و پیشرفت پلاک های آترواسکلروتیک مرتبط باشد [۳۵] و ممکن است یک نشانگر بیولوژیکی خوب در بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی باشد. در مطالعه حاضر تنها اثر اصلی تمرین مورد تأیید قرار گرفت. زیرا که هر دو مدل تمرینی در شرایط MI قادر به کاهش سیستاتین C بودند. به نظر می‌رسد یکی از مکانیسم‌های تأثیرات مثبت تمرین ورزشی در بیماری‌های قلبی عروقی نظیر آترواسکلروزیس از طریق تنظیم منفی سیستاتین C باشد. در اکثر مطالعات بیان شده که تمرین ورزشی با کاهش چربی‌های مضر خونی و کنترل التهاب می‌تواند مانع تشکیل و پیشرفته پلاک شود [۳۶]. این در حالی است که با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد تمرین ورزشی با کنترل سیستاتین C نیز می‌تواند مانع گسترش پلاک شود. در

گروه‌های وارفارین نیز تغییرات غیر معنی‌داری در سیستاتین C مشاهده شد. بیان شده که انعقاد بیش از حد ناشی از مصرف وارفارین باعث تجمع گلومرولی و آسیب ساختاری بافت کلیه می‌شود [۳۷]. لذا به نظر می‌رسد تأثیرات مضر وارفارین بر بافت کلیه مجزا از تغییرات سیستاتین C باشد که نیاز به مطالعات بیش‌تر دارد.

بر خلاف سایر شاخص‌های آسیب کلیوی مشخص شد که GFR در مدل بیمار ایسکمی نسبت به کنترل سالم به میزان معناداری کاهش می‌یابد. کاهش این فاکتور با مرگ و میر قلبی عروقی ارتباط دارد [۳۸]، لذا تغییرات کاهش GFR گروه ISC را باید منفی تلقی کرد. در بررسی روش‌های درمانی در مطالعه حاضر مشخص شد که هر چند تمرینات ورزشی تناوبی و تداومی به تنهایی سبب افزایش GFR شدند، اما تنها افزایش GFR تمرین تناوبی معنی‌دار شد. با توجه به تأثیرات مفید تمرین ورزشی به ویژه تمرین تناوبی بر سیستم قلبی عروقی و تنظیم فشار خون از طریق بهبود عملکرد سلول‌های اندوتلیال، کاهش فشارخون کلیوی و تنظیم GFR معقول به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر تأثیر وارفارین به تنهایی و تعامل بین تمرین و وارفارین نیز تأیید نشد و گروه‌های تمرین+وارفارین کاهش بیش‌تری را در GFR نسبت به تمرین تنها نشان دادند. لذا از جهتی نیز می‌توان بیان کرد که وارفارین مانع از افزایش معنی‌دار فیلتراسیون گلومرولی حتی با انجام تمرین تداومی و تناوبی شد. وارفارین می‌تواند با چندین مکانیسم، یعنی نفريت حاد بینابینی، آتروآمبولیسم (Atheroembolism)، آسیب مستقیم مزانشیم، بافت کلیه را تخریب و هموستاز سلول‌های آن را بر

هم زند. همسو با این یافته‌ها Brodsky و همکاران بیان کردند که وارفارین باعث نفروپاتی می‌شود و مصرف آن، با افزایش حاد کراتینین سرمی بیش از ۰/۳ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و INR کم‌تر از ۳ در عرض ۱ هفته همراه بود [۳۷]. علت آسیب کلیه ناشی از مصرف ضد انعقادها معمولاً تخریب ساختار سلول‌های خونی و آسیب این سلول‌ها به بافت کلیه هنگام تصفیه خون می‌باشد که می‌تواند استرس اکسایشی را در پایه اپی‌تلیال مجاری و فیلترها ایجاد کنند [۷]. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و سایر تحقیقات باید ذکر کرد که آگاهی از مصرف صحیح وارفارین از آن جهت نیز مهم است که با نقص هموستاز کلیوی منجر به کاهش GFR و آسیب کلیوی طولانی مدت شود.

در این مطالعه، محدودیت‌هایی از جمله تعداد کم موش‌ها در گروه‌ها وجود داشت و با توجه به این‌که هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیرات وارفارین و تمرینات ورزشی تناوبی و تداومی در کنترل تخریبات ایزوپروترونول در بافت قلب و کلیه بوده است، برای تأیید تأثیر تخریب دارو فقط به رفرنس بسنده شد [۱۲]، همچنین همان‌طور که در بخش روش پژوهش توضیح داده شد مطالعات گذشته با استفاده از ارزیابی هیستوشیمیایی بافت قلب نشان دادند دوزهای ۸۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند باعث ایجاد ناحیه نکروز در بافت قلب شود [۱۲]. بنابراین، دوز ۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای القاء انفارکتوس قلبی در موش‌های مطالعه حاضر انتخاب شد. با این وجود برای اطمینان بیش‌تر

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی نیز از روش‌های مختلف القاء انفارکتوس قلبی و تأیید آن توسط تصاویر هیستوپاتولوژی استفاده شود.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، القاء انفارکتوس قلبی سبب کاهش مقادیر پروتئینی MGP قلبی و تخریب هموستاز بافت کلیوی با افزایش کراتینین، BUN، سیستاتین C و کاهش GFR می‌شود. در بررسی مداخلات درمانی مشخص شد که انجام تمرین به تنهایی (به ویژه تمرین اینتروال) سبب تنظیم مثبت MGP قلبی می‌شود، با این وجود مصرف وارفارین به تنهایی یا همراه با تمرینات تناوبی و تداومی مقادیر این پروتئین در بافت قلب را کاهش می‌دهد. مصرف وارفارین به تنهایی یا در تعامل با تمرینات ورزشی تغییرات قابل توجهی را در شاخص‌های آسیب کلیوی (به جز BUN) نسبت به گروه انفارکتوس قلبی ایجاد نکرد. لذا پیشنهاد می‌شود در شرایط بیماری قلبی یا آسیب‌های کلیوی که داروهای ضدانعقاد نظیر وارفارین مصرف می‌کنند، تجویز تمرین ورزشی تناوبی و تداومی با احتیاط انجام شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر، حاصل یافته‌های رساله دکتری، مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب در سال ۱۳۹۹ می‌باشد. بدین وسیله پژوهشگر از راهنمایی‌های اساتید محترم دانشکده تربیت بدنی و مسئولان محترم آزمایشگاه تقدیر و تشکر می‌نماید.

References

- [1] Lisowska A, Makarewicz-Wujec M, Dworakowska AM, Kozłowska-Wojciechowska M. Adherence to guidelines for pharmacological treatment of young adults with myocardial infarction in Poland: Data from Polish Registry of Acute Coronary Syndromes (PL-ACS). *J Clin Pharm Ther* 2019; 44(3): 471-8.
- [2] Yao M, Li Y, Cui W. The Prognosis of Myocardial Calcification and Some Other Issues. *Am J Med* 2021; 134(8): 475-482.
- [3] Roumeliotis S, Dounousi E, Salmas M, Eleftheriadis T, Liakopoulos V. Vascular calcification in chronic kidney disease: the role of vitamin K-dependent matrix Gla protein. *Front Med* 2020; 7(154): 1-8.
- [4] Barrett H, O'Keeffe M, Kavanagh E, Walsh M, O'Connor EM. Is matrix Gla protein associated with vascular calcification? A systematic review. *Nutrients* 2018; 10(4): 415: 1-18.
- [5] Siltari A, Vapaatalo H. Vascular calcification, vitamin K and warfarin therapy—possible or plausible connection? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018; 122(1): 19-24.
- [6] Huan g HK, Liu PPS, Hsu JY, Lin SM, Peng CCH, Wang JH, et al. Risk of osteoporosis in patients with atrial fibrillation using non-vitamin k antagonist oral anticoagulants or warfarin. *J Am. Heart J* 2020; 9(2): 1-10.
- [7] Mendonca S, Gupta D, Valsan A, Tewari R. Warfarin related acute kidney injury: A case report. *Indian J Nephrol* 2017; 27(1): 78-80.
- [8] Tsai M-T, Chen Y-Y, Chang W-J, Li S-Y. Warfarin accelerated vascular calcification and worsened cardiac dysfunction in remnant kidney mice. *J Chin Med Assoc* 2018; 81(4): 324-30.
- [9] Ceglarek U, Schellong P, Rosolowski M, Scholz M, Willenberg A, Kratzsch J, et al. The novel cystatin C, lactate, interleukin-6, and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (CLIP)-based

- mortality risk score in cardiogenic shock after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2021; 42(24): 2344-52.
- [10] Morcos R, Lazar I, Kucharik M, Lavin A, Fahmy A, Chandrasekhar S, et al. The Healthy, Aging, and Diseased Kidney: Relationship with Cardiovascular Disease. *J Am Geriatr Soc* 2021; 69(2): 539-46.
- [11] Kirkman DL, Ramick MG, Muth BJ, Stock JM, Pohlig RT, Townsend RR, et al. Effects of aerobic exercise on vascular function in nondialysis chronic kidney disease: a randomized controlled trial. *Am J Physiol Renal Physiol* 2019; 316(7): F898-F905.
- [12] Hosseini M, Bambaiechi E, Sarir H, Kargarfard M. Effect of training with or without Ziziphus jujuba extract on cardiokines in heart tissue of myocardial infarcted rats. *Int J Prev Med* 2019; 10(103): 1-5.
- [13] Eizadi M, Soory R, Ravasi A, Baesy K, Choobineh S. Relationship between TCF7L2 Relative Expression in Pancreas Tissue with Changes in Insulin by High Intensity Interval Training (HIIT) in Type 2 Diabetes Rats. *SSU_Journals* 2017; 24(12): 981-93. [Farsi]
- [14] Hadi H, Gaeini A, Mo'tamedi P, Rajabi H. The effect of aerobic training on cardiac expression of mir-126 in diabetic rats. *J Police Med* 2016; 5(1): 69-78. [Farsi]
- [15] Zhang X, Zhang X, Wang X, Zhao M. Influence of andrographolide on the pharmacokinetics of warfarin in rats. *J pharm biol* 2018; 56(1): 351-6.
- [16] Mohebbi H, Rahmani-Nia F, yar Arabmomeni A, Riasi A, Marandi M. The effects of interval training and age on blood lactate (La) levels and lactate dehydrogenase (LDH) activity in male Wistar rats. *Par J Med Sci* 2015; 12(4): 37-45.
- [17] Santoso DIS, Yunita S, Paramita N, Andraini T, Kartinah NT, El Bayani GF, et al. Effect of Hibiscus sabdariffa Linn on IL-6 and TNF- α levels in overtrained rat heart. *Int J Appl Pharm* 2019; 11 (6): 42-5.

- [18] Khalesi N, Seirafianpour F, Hoseini R, Otukesh H, Rahimzadeh N, Nakhaie S, et al. Glomerular Filtration Rate Estimation Based on Cystatin C Formulas among Neonates. *Iran J Neonatol* 2021; 12(2): 21-6.
- [19] Ghosh K, Indra N. Cadmium treatment induces echinocytosis, DNA damage, inflammation, and apoptosis in cardiac tissue of albino Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2018; 59(1): 43-52.
- [20] Jespersen T, Møllehave L, Thuesen B, Skaaby T, Rossing P, Toft U, et al. Uncarboxylated matrix Gla-protein: a biomarker of vitamin K status and cardiovascular risk. *Clin. Biochem* 2020; 83(1): 49-56.
- [21] Sangha GS, Goergen CJ, Prior SJ, Ranadive SM, Clyne AM. Preclinical techniques to investigate exercise training in vascular pathophysiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2021; 320(4): H1566-H600.
- [22] Zhou Y, Hellberg M, Hellmark T, Höglund P, Clyne N. Twelve months of exercise training did not halt abdominal aortic calcification in patients with CKD—a sub-study of RENEXC-a randomized controlled trial. *BMC Nephrology* 2020; 21(233): 1-10.
- [23] Zhang Y-T, Tang Z-Y. Research progress of warfarin-associated vascular calcification and its possible therapy. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 2014; 63(1): 76-82.
- [24] Xu X, Nie S, Zhang A, Jianhua M, Liu H-P, Xia H, et al. A new criterion for pediatric AKI based on the reference change value of serum creatinine. *JASN* 2018; 29(9): 2432-42.
- [25] Qian H, Tang C, Yan G. Predictive value of blood urea nitrogen/creatinine ratio in the long-term prognosis of patients with acute myocardial infarction complicated with acute heart failure. *J Med* 2019; 98(11): 1-7.
- [26] Martínez R, Kapravelou G, López-Chaves C, Cáceres E, Coll-Risco I, Sánchez-González C, et al. Aerobic interval exercise improves renal functionality and affects mineral metabolism in obese Zucker rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2019; 316(1): F90-F100.

- [27] Golla A, Goli R, Nagalla V, Kiran B, Raju D, Uppin M. Warfarin-related nephropathy. *Indian J. Nephrol* 2018; 28(5): 378-81.
- [28] Horiuchi Y, Aoki J, Tanabe K, Nakao K, Ozaki Y, Kimura K, et al. A high level of blood urea nitrogen is a significant predictor for in-hospital mortality in patients with acute myocardial infarction. *Int. Heart J* 2018; 59(2): 263-71.
- [29] Xie Y, Bowe B, Li T, Xian H, Yan Y, Al-Aly Z. Higher blood urea nitrogen is associated with increased risk of incident diabetes mellitus. *Kidney Int* 2018; 93(3): 741-52.
- [30] Ichihara N, Ishigami T, Umemura S. Effect of impaired renal function on the maintenance dose of warfarin in Japanese patients. *J. Cardiol* 2015; 65(3): 178-84.
- [31] Scicchitano P, Tucci M, Bellino MC, Cortese F, Cecere A, De Palo M, et al. The impairment in kidney function in the oral anticoagulation era. A pathophysiological insight. *Cardiovasc Drugs Ther* 2021; 35(3): 505-19.
- [32] Tuegel C, Bansal N. Heart failure in patients with kidney disease. *Heart* 2017; 103(23): 1848-53.
- [33] Hama T, Oikawa K, Ushijima A, Morita N, Matsukage T, Ikari Y-j, et al. Effect of cardiac rehabilitation on the renal function in chronic kidney disease-Analysis using serum cystatin-C based glomerular filtration rate. *IJC heart & vasculature* 2018; 19(1): 27-33.
- [34] Li R, Hao P, Chen Y, Zhang Y. Association of cystatin C level and cardiovascular prognosis for patients with preexisting coronary heart disease: a meta-analysis. *Chin. sci. bull* 2014; 59(5): 539-45.
- [35] Ren J, Dong X, Nao J. Serum cystatin C is associated with carotid atherosclerosis in patients with acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2020; 41(10): 2793-800.
- [36] Pérez FJR, Bonafonte LF, Guerediaga DI, Belaza MPO, Peyron PU. Effect of an individualised physical exercise program on lipid profile in sedentary patients with

- cardiovascular risk factors. *Clin Investig Arterioscler* 2017; 29(5): 201-8.
- [37] Brodsky SV, Nadasdy T, Rovin BH, Satoskar AA, Nadasdy GM, Wu HM, et al. Warfarin-related nephropathy occurs in patients with and without chronic kidney disease and is associated with an increased mortality rate. *Kidney Int* 2011; 80(2): 181-9.
- [38] Grams ME, Sang Y, Ballew SH, Carrero JJ, Djurdjev O, Heerspink HJ, et al. Predicting timing of clinical outcomes in patients with chronic kidney disease and severely decreased glomerular filtration rate. *Kidney int* 2018; 93(6): 1442-51..

Evaluation of the Interactive Effect of Warfarin Administration with Continuous and Interval Training on Levels of Cardiac MGP Protein and Renal Function Indexes in Rats of Myocardial Infarction Model: An Experimental Study

Tooran Abbasi¹, Abdolali Banaeifar², Sajad Arshadi³, Yaser Kazemzadeh⁴

Received: 24/11/21 Sent for Revision: 08/12/21 Received Revised Manuscript: 22/01/22 Accepted: 24/01/22

Background and Objectives: Heart-kidney disorders affect on each other. Exercise training can control heart and kidney cell damages. The aim of this study is to determine the effect of exercise training and warfarin administration on cardiac matrix Gla protein (MGP) and indices of renal injury in rats of myocardial infarction model.

Materials and Methods: In this experimental study, 42 male Sprague-Dawley rats (180-220 grams) were randomly divided into 7 groups of healthy control, myocardial infarction or ischemia (ISC), ISC+interval training, ISC+continuous training, ISC+warfarin, ISC+interval training+warfarin, and ISC+continuous training+warfarin. The duration of interval and continuous training was eight weeks, five sessions per week. Induction of myocardial infarction was performed with subcutaneous injection of isoproterenol. Cardiac MGP was measured by western blotting, creatinine and blood urea nitrogen (BUN) by photometric method, and cystatin C by Turbidimetry. Glomerular filtration rate (GFR) was calculated according to cystatin C consideration. Independent t-test and two-factor analysis of variance were used to analyze the data.

Results: Myocardial infarction decreased MGP protein ($p=0.001$), increased creatinine ($p=0.001$), BUN ($p=0.002$), and cystatin C ($p=0.001$), and decreased GFR ($p=0.001$) compared to the control group. The main effect of exercise type on all variables, the main effect of warfarin on MGP and BUN, and also interaction of warfarin and exercise type on MGP were significant.

Conclusion: Exercise training had a better effect on cardiac MGP and control of renal injury markers compared to warfarin. Therefore, in heart and kidney diseases with warfarin therapy, exercise training should be carefully planned.

Key words: Exercise, Warfarin, Kidney, Myocardial Infarction

Funding: This study did not have any funds.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of the Faculty of Physical Education, Islamic Azad University, South Tehran Branch approved the study (IR.SSRC.REC.1399.103).

How to cite this article: Abbasi Tooran, Banaeifar Abdolali, Arshadi Sajad, Kazemzadeh Yaser. Evaluation of the Interactive Effect of Warfarin Administration with Continuous and Interval Training on Levels of Cardiac MGP Protein and Renal Function Indexes in Rats of Myocardial Infarction Model: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2022; 21 (02): 165-86. [Farsi]

1- PhD Student in Sports Physiology, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran

2- Associate Prof., Dept. of Sports Physiology, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran, ORCID: 0000-0003-1749-6383

(Corresponding Author) Tel: (021) 55545040, Fax: (021) 55545054, E-mail: alibanaeifar@yahoo.com

3- Assistant Prof., Dept. of Sports Physiology, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran

4- Assistant Prof., Dept. of Sports Physiology, Islamic Azad University, Islamshahr Branch, Tehran, Iran