www.mums.ac.ir
*Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences*
*Vol. 65, No.2, P: 712-729*
*May-Jul 2022*

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
*سال ۶۵*، شماره ۲
خرداد-تیر ۱۴۰۱، صفحه ۷۲۹-۷۱۲

**مقاله اصلی**

# بررسی اثر مصرف وارفارین با تمرینات تداومی و تناوبی بر بیان ژن استئوکلسین قلبی، ویتامین K2(MK-4) و کلسیم سرمی در موش‌های صحرایی مدل انفارکتوس قلبی

**تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۲۸- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۹**

توران عباسی [۱]
عبدالعلی بنائی فر [۲*]
سجاد ارشدی [۳]
یاسر کاظم زاده [۴]

[۱] *دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران*
[۲] *دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب، تهران، ایران.*
[۳] *استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران جنوب، تهران، ایران.*
[۴] *گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، تهران، ایران*

Email: alibanaeifar@yahoo.com

## خلاصه

**مقدمه:** تمرینات ورزشی با تنظیم سیگنالینگ سلولی در قلب و عروق می‌تواند آسیب‌های ناشی از انفارکتوس قلبی(MI) را به حداقل برساند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر مصرف وارفارین با تمرینات تداومی و تناوبی بر بیان ژن استئوکلسین قلبی، ویتامین MK-4 و کلسیم سرمی در موش‌های مدل انفارکتوس قلبی می‌باشد.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگو-دوالی (۲۲۰-۱۸۰ گرم) به طور تصادفی به ۷ گروه کنترل سالم، انفارکتوس قلبی یا ایسکمی(ISC)، ISC+تمرین تناوبی، ISC+تمرین تداومی، ISC+وارفارین، ISC+تمرین تناوبی+وارفارین و ISC+تمرین تداومی+وارفارین تقسیم شدند. القاء با تزریق زیرپوستی ایزوپروترنول ایجاد شد. مدت تمرینات هشت هفته، پنج جلسه در هفته و دوز مصرفی وارفارین ۰/۵ mg/kg در روز بود. مقادیر ژنی، تغییرات ویتامین K2 و کلسیم به ترتیب به روش Real time-PCR، الایزا، فتومتریک و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون‌های t مستقل، واریانس یک طرفه و واریانس دو عاملی بررسی شد (P<۰/۵۰).

**نتایج:** القای بیماری سبب افزایش بیان ژن استئوکلسین (p=۰/۰۰۳)، ویتامین K2 (p=۰/۰۲۷) و کلسیم (p=۰/۰۰۱) نسبت به کنترل سالم شد. در بررسی بیان ژن استئوکلسین، گروه ایسکمی+وارفارین با ایسکمی+EIT (p=۰/۰۱۴) و ایسکمی+ECT (p=۰/۰۰۷) و در بررسی سطوح کلسیم گروه ایسکمی با ایسکمی+EIT (p=۰/۰۱۴)، ایسکمی+ECT (p=۰/۰۰۱) و ایسکمی+وارفارین+ECT (P= ۰/۰۱۳) اختلاف معنی‌داری داشتند. همچنین تعامل تمرین و دارو بر هیچ یک از متغیرها تایید نشد.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرینات تناوبی و تداومی با کاهش استئوکلسین قلبی و کلسیم سرمی، در کاهش تخریب و کلسیفه شدن عروقی بعد از MI موثر باشند و تاثیرات مضر برخی داروها نظیر وارفارین را به حداقل برسانند.

**کلمات کلیدی:** وارفارین، تمرینات تداومی و تناوبی، بیان ژن استئوکلسین قلبی، ویتامین K2(MK-4)، انفارکتوس قلبی

**پی نوشت:** این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

**مقدمه**

بیماری قلبی‌عروقی[1] (CVD) یکی از مهمترین دلایل مرگ و میر در سراسر جهان محسوب می‌شود (۱). از جمله بیماری‌های قلبی عروقی، انفارکتوس میوکاردی[2] (MI) می باشد که با مرگ سلولی (نکروز) بخشی از عضله قلب به دلیل محدودیت جریان خون مشخص می‌شود. MI در بیشتر موارد، نتیجه تشکیل ترومبوز در پلاک آترواسکلروتیک پاره شده است. پارگی پلاک عمدتا در ناحیه و رگ‌های خونی با استرس بالا رخ می‌دهد و اغلب با کلسیفیکاسیون همراه است. کلسیفیکاسیون کرونر، در بیماران بدون علامت شناخته شده است که این عامل خود خطر سایر بیماری‌های کرونر قلب را نیز افزایش می‌دهد (۲). رسوبات معدنی در بیش از ۹۰٪ بیماران قلبی ثبت شده است (۳). تعدادی از مطالعات وجود پروتئین‌های مرتبط با استخوان نظیر استئوپونتین[3]، استئوکلسین[4]، پروتئین مورفوژنیک استخوان a۲، استئونکتین[5] و پروتئین Gla ماتریکس[6] (MGP) را در بیماری‌های قلبی و تصلب شرایین انسانی نشان داده‌اند (۴). استئوکلسین همچنین به عنوان پروتئین گاما کربوکسی گلوتامیک اسید (Gla)[7] شناخته می‌شود، یک اسید آمینه ۵۰-۴۶ دامنه و پروتئین ترشح شده ۵/۶ کیلو دالتونی است و اساساً توسط استئوبلاست‌ها تولید می‌شود (۵). بیان شده در بافت‌های قلبی عروقی گسترش کلسیم با استئوکلسین می‌تواند تاثیرات منفی بر جای گذارد. کلسیفیکاسیون عروقی به معنی استخوانی شدن پلاک ها روی دیواره رگ‌های خونی می‌باشد. بر اساس تحقیقات، به نظر می‌رسد استئوکلسین در شرایط کلسیفیکاسیون عروقی نیز درگیر باشد. بیان شده چندین عامل استخوانی از جمله فاکتور رونویسی Runx2[8] استئوبلاستیک "تنظیم کننده اصلی" توسط سلول‌های عضله‌ای صاف واقع در محل پلاک‌های کلسیفه شده عروقی گسترش می‌یابد (۶). بیان چنین عواملی ممکن است در پتانسیل استخوانی شدن این سلول‌های عضله‌ای نقش داشته باشد. علاوه بر این، استئوکلسین که از نظر بالینی به عنوان نشانگر تشکیل استخوان استفاده می‌شود، نیز در این مکان‌ها یافت شده است (۷). بنابراین تصور می‌شود که استئوکلسین ممکن است در کلسیفیکاسیون پلاک‌ها نقش مهمی داشته باشد. در کنار استئوکلسین حضور مقادیر زیاد برخی فاکتورها نظیر کلسیم در این شرایط می‌تواند فرایند کلسیفه شدن را تسریع بخشد.

نقش کلسیم در سلامت عروق کمتر مشخص است. گیرنده‌های حس کننده کلسیم در سلول‌های عضلانی صاف عروقی و پلاک‌ها وجود دارند، کلسیم در انقباض عضله صاف نقش دارد و نقش آن در الکتروفیزیولوژی قلب و عملکرد میوکارد نیز شناسایی شده است. رسوب کلسیم در عروق یک ویژگی ثابت بیماری عروقی و پیش بینی کننده حوادث قلبی عروقی نامطلوب است. در حقیقت، رسوب کلسیم در سایر بافت‌های نرم (مانند کلیه‌ها یا ماهیچه‌ها) اثرات سوئی بر عملکرد بافت دارد و برای جلوگیری از این امر یک سیستم پیچیده از مهار کننده‌های مواد معدنی (مانند پیرو فسفات، فتوئین-A، پروتئین Gla ماتریکس و غیره) وجود دارد. بدیهی است که نقش کلسیم در هدف‌گیری خاص بافت برای تنظیم مواد معدنی بسیار مهم است، به طوری که کانی سازی استخوان تقویت شود اما از نفوذ آن درسایر بافت‌ها باید جلوگیری شود. با افزایش سن و بیماری، به نظر می‌رسد که تأثیر این مکانیسم‌ها (مکانیسم مهار نفوذ کلسیم در بافت های نرم)، به ویژه در سیستم عروقی کاهش می‌یابد. علاوه بر این، به نظر می‌رسد سطح کلسیم خون در ایجاد بیماری عروقی تأثیر می گذارد (۸). لذا تغییرات کاهشی این فاکتور بعد از MI نیز می‌تواند مفید باشد.

در شرایط آسیب‌های قلبی نظیر انفارکتوس قلبی برای کنترل و تنظیم سیستم انعقاد خون معمولا از برخی داروها نظیر وارفارین استفاده می شود. این در حالی است که مصرف طولانی مدت وارفارین می‌تواند عوارض متعددی از خود بر

1. Cardiovascular Disease (CVD)
2. Myocardial Infarction (MI)
3. Osteopontin (OPN)
4. Osteocalcin (OCN)
5. Osteonectin
6. Matrix Gla protein (MGP)
7. γ-carboxyglutamic acid (Gla)
8. Runt-related transcription factor 2

جای گذارد. وارفارین یک آنتاگونیست ویتامین K2 یا K2(MK-4) است. استفاده از آن نشان دهنده مدلی از کمبود MK-4 می باشد. ارتباط وارفارین و MK-4 را نیز می‌توان در کلسیفیکاسیون عروقی جست و جو کرد. در مطالعات ذکر شده مصرف طولانی مدت وارفارین در القای کلسیفیکاسیون عروقی نیز نقش دارد (۹). بنابراین یکی از مکانیزم‌های وارفارین در القای آسیب‌های عروقی می‌تواند به کمبود MK-4 نسبت داده شود؛ زیرا K2(MK-4) نقش مهمی در اصلاح مکانیسم‌های مرتبط با حساسیت عروق به کلسیفیه شدن در مدل‌های آسیب‌های کلیوی و قلبی عروقی دارد. در خود بافت قلب نیز کمبود MK-4، رسوب کلسیم و کلسیفیکاسیون عروق کرونر را گسترش و بیماری‌های قلبی را به دنبال دارد. نتایج مطالعات نشان داده است که مصرف زیاد MK-4 در رژیم غذایی با کاهش خطر ابتلا به CVD مرتبط است. بیان شده مصرف ویتامین K1 به طور معکوس با کاهش خطر مرگ و میر ناشی از بیماری قلبی عروقی مرتبط می‌باشد و افرادی که مصرف ویتامین K1 یا K2(MK-4) خود را در طول روز افزایش دادند، پنج سال خطر مرگ و میر ناشی از تمام علل را تقلیل دادند نسبت به افرادی که میزان مصرف خود را کاهش داده یا تغییر نداده‌اند (۱۰). با این وجود، افزایش سرمی بیش از حد این فاکتور در شرایط پاتولوژیک می‌تواند تاثیرات مضر نیز بر جای گذارد.

در کنار درمان‌های دارویی عوامل متعددی بر تنظیم استئوکلسین، کلسیم و ویتامین K2(MK-4) تاثیرگذار هستند که از جمله آنها به انجام منظم تمرین ورزشی هوازی می‌توان اشاره کرد. تاکنون مطالعه‌ای تغییرات این فاکتورها را با تمرین ورزشی تناوبی، تداومی (هوازی) و مصرف وارفارین در شرایط آسیب‌های قلبی و MI بررسی نکرده است. در رابطه با تاثیر ورزش بر این مارکرها معمولاً در بافت استخوانی ارزیابی‌ها صورت گرفته است. سینگولانی[1] و همکاران (۲۰۱۷) تاثیر تمرین مقاومتی را بر تمایز استئوژنیک در رت‌های مسن ماده ارزیابی کردند. نتایج آنها نشان داد که تمرینات قدرتی پاسخ‌های فیزیولوژیکی را ایجاد می‌کند که منجر به تغییر در محیط ریز استخوانی می‌شود (افزایش OCN و کاهش OPN) و از پارامترهای بیومکانیکی بافت استخوان سود می‌برد که می‌تواند خطر شکستگی در دوران پیری را کاهش دهد (۱۱). بیان شده که افزایش فاکتور استئوکلسین با تمرینات هوازی یا تداومی نیز رخ می‌دهد که می‌تواند فاکتور مهمی در پیشگیری از عوارض چاقی باشد (۱۲). کیخسروی و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که تمرینات تناوبی (HIIT) نیز قادر به افزایش سطح استئوکلسین در رت‌های ماده مسن بود (۱۳). عبدی و همکاران (۲۰۲۱) به بررسی تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید بر سطوح سرمی ویتامینD، تغییر پذیری ضربان قلب و عملکرد ریوی مردان سیگاری پرداختند. این محققان در نهایت بیان کردند که شش هفته تمرین تناوبی شدید احتمالاً منجر به بهبودی هموستاز ویتامین D، بهبود عملکرد دستگاه عصبی اتونوم[2] قلبی و عملکرد ریوی در مردان سیگاری می‌شود (۱۴). علاوه بر تغییرات کارکردی، تمرینات ورزشی بر مسیرهای سلولی مولکولی قلبی نیز تاثیرات مثبت بر جای می‌گذارد. فعالیت ورزشی، تحریک سکرتوم‌ها (ترشح پروتئین‌ها) از سلول‌های مختلف عضلانی به ویژه مایوفیبریل‌ها و مایوسیت‌ها را افزایش می‌دهد و می‌تواند تخریب و آسیب‌های عضله قلبی ناشی از بیماری‌های متابولیکی را به حداقل برساند. سکرتوم‌هایی که در قلب ایجاد می‌شوند به عنوان کاردیوکاین‌ها شناخته می‌شوند (۱۵, ۱۶). بیان شده که تمرین ورزشی سبب بهبود ظرفیت عملکردی، کاهش فیبروزیس در قلب MI و بیان FSTL-1، سیگنالینگ TGFβ-Smad2/3 و آنژیوژنزیس در مایوکاردیوم می‌شود (۱۷). در اکثر تحقیقات تاثیر فعالیت ورزشی استقامتی بر بافت عضلانی و بهبود مقاومت انسولینی و تاثیرات مفید متابولیسمی به اثبات رسیده است. از جمله بافت‌های هدف بیماری‌های متابولیکی بافت قلبی می‌باشد

[1]. Singulani

[2]. Autonome

که می‌تواند منجر به کاردیومیوپاتی شود. با این وجود، مطالعات در مورد مسیرهای سیگنالینگ ناشی از فعالیت ورزشی در قلب بیماران محدود می‌باشد. Xi و همکاران بیان داشتند که فعالیت ورزشی تناوبی هوازی در افزایش کاردیوکاین‌های مثبت بعد از MI و محافظت قلبی تاثیرگذار می‌باشد (۱۷). نتایج حاصل از برخی مطالعات نشان دادند که انجام فعالیت های بدنی منظم باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی و کاهش مرگ و میر در بین بیماران مصرف کننده داروهایی خاص برای شرایط مزمن می‌گردد (۱۸). علاوه بر این، بیان شده که انجام فعالیت‌های بدنی باعث کاهش خونریزی‌های ناشی از مصرف وارفارین در بیماران تحت درمان می‌شوند (۱۹). نتایج مطالعات اتین و همکاران نشان داد که با انجام تمرینات ورزشی حاد، INR در بیماران کاهش و دوز مصرفی وارفارین افزایش می‌یابد (۲۰). با توجه به نتایج ضد و نقیض و محدودیت‌های موجود در برخی مطالعات، تغییرات این فاکتورها در شرایط پاتولوژیک MI باید بررسی شود. متاسفانه بیماران مبتلا به انفارکتوس میوکاردیوم، ایسکمی و دیگر شرایط حاد قلبی به ناچار بایستی تحت انواع روش‌های درمانی دارویی و غیر دارویی جهت جلوگیری از آسیب‌های بیشتر در بافت قلب و عروق خود قرار گیرند. وارفارین، به عنوان یک داروی ضد انعقادی خون، یکی از پرکاربردترین داروهای تجویزی برای بیماران مبتلا به انفارکتوس میوکاردیوم یا بیمارانی که خطر تشکیل لخته خونی در آنان بالاست، محسوب می شود که مصرف آن علیرغم اثرات درمانی مفید، عوارض جانبی قابل توجهی را در بیماران تحت درمان با این دارو به دنبال دارد. لذا با توجه به عوارض جانبی شدید این دارو بر سیستم قلب و عروق، کلیه‌ها و استخوان‌ها نظیر تجمع کلسیم در عروق، واسکولار کلسیفیکاسیون، نفروپاتی، خونریزی‌های کلیوی و پوکی استخوان، ارائه راهکارهایی جهت تعدیل این عوارض جانبی مشکل ساز ضروری می‌باشد. یکی از راهکارهای مفید برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و افزایش سطح سلامت هم افراد سالم و هم افراد بیمار، انجام ورزش و فعالیت‌های بدنی منظم می‌باشد که تاکنون مطالعات کاملی در مورد نقش تمرینات ورزشی بر متعادل شدن میزان کلسیم در عروق و کاهش فرآیندهایی نظیر واسکولار کلسیفیکاسیون و پوکی استخوان صورت نگرفته است. بنابراین، در مطالعه حاضر، به بررسی اثر مصرف وارفارین با تمرینات تداومی و تناوبی بر بیان ژن استئوکلسین قلبی، ویتامین K2(MK-4) و کلسیم سرمی در مدل موش‌های صحرایی مبتلا به انفارکتوس میوکاردیوم پرداخته می‌شود.

## روش کار

پژوهش حاضر بنیادی است و با توجه به نوع آزمودنی‌ها (موش صحرایی) و کنترل عوامل دخالت کننده از نوع تجربی می‌باشد. در این مطالعه، ۴۲ سر موش‌صحرایی نر نژاد اسپراگو-دوالی (سن ۸ هفته، با دامنه وزنی ۱۸۰-۲۲۰ گرم) از انستیتو پاستور ایران تهیه و به آزمایشگاه هیستوژنوتک (تهران، ایران، ۱۳۹۹) انتقال داده شدند. حیوانات در شرایط کنترل شده با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر)، دما (۳±۲۲ سانتی‌گراد) و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) در قفس‌های پلی کربنات به ابعاد ۴۷×۲۷×۲۰ سانتی‌متر نگه‌داری شدند به گونه‌ای که به آب و غذای استاندارد دسترسی آزاد داشتند. مطالعه حاضر 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 سالم (بدون گاواژ وارفارین، بدون تمرین)، ۲) انفارکتوس قلبی (بدون گاواژ وارفارین، بدون تمرین)، ۳) انفارکتوس قلبی+ تمرین تناوبی (بدون گاواژ وارفارین، با تمرین EIT)، ۴) انفارکتوس قلبی+ تمرین تداومی (بدون گاواژ وارفارین، با تمرین ECT)، ۵) انفارکتوس قلبی+ وارفارین (با گاواژ وارفارین، بدون تمرین)، ۶) انفارکتوس قلبی+ تمرین تناوبی+ وارفارین (با گاواژ وارفارین، با تمرین EIT)، ۷) انفارکتوس قلبی+ تمرین تداومی+ وارفارین (با

گاواژ وارفارین، با تمرین ECT) تقسیم شدند. هر گروه شامل ۶ سر حیوان بود. معیارهای ورود به مطالعه شامل نر بودن موش‌ها، قرار گرفتن در محدوده وزنی مورد نظر، سلامت کامل موش‌ها و عدم استفاده پیشین از هر گونه دارویی بود. معیارهای خروج از مطالعه نیز شامل استفاده از داروهای ضد درد و ضد مسمومیت، داشتن هرگونه بیماری (به غیر از MI) یا التهاب و عدم تناسب وزنی موش‌ها با مطالعه حاضر بود. همچنین بی حالی پس از القاء MI و ناتوانی در انجام تمرین ورزشی در ابتدای پژوهش، سبب خروج حیوان از پروژه می‌شد که حیوانات جدید جایگزین می‌شدند.

یک هفته بعد از انتقال اولیه حیوانات و آشنایی با محیط آزمایشگاه جهت رفع استرس، موش‌های صحرایی برای تزریق ایزوپروترنول هیدروکلراید ( Sigma-Aldrich, Germany) آماده شدند. ایزوپروترنول 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 سی سی) تا MI تجربی ایجاد شود (۲۱). لازم به ذکر است که تعداد ۶ سر حیوان به دلیل استرس ناشی از تزریق ایزوپروترنول 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 دوز های ۸۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌توانند باعث ایجاد ناحیه نکروز در بافت قلب شود (۲۱). بنابراین، دوز ۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای القاء MI در موش‌ها انتخاب شد.

تمرین تناوبی: پس از القای انفارکتوس قلبی با استفاده از داروی ایزوپروترنول، 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 و برنامه تمرین تداومی طبق جدول ۲ 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 با تکرارهای یک دقیقه‌ای و استراحت فعال دو دقیقه‌ای بین هر تکرار، با ۲۰ تناوب انجام گرفت (۲۲). 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

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

تمرین تداومی: برنامه تمرین تداومی نیز طبق جدول ۲ انجام شد. بدین صورت که شدت تمرین در هفته اول از سرعت ۱۰متر 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 (۲۳). لازم به ذکر است که هر دو مدل تمرینی بر روی نوارگردان مدل ۲۰۱۶ (شرکت تجهیز گستر امید ایرانیان، تهران، ایران) انجام شد.

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

| (جلسات تمرین) هفته | سرعت (متر / دقیقه) | مدت (دقیقه) | شیب (درجه) |
|---|---|---|---|
| اول | ۱۰-۱۴ | ۱۰-۳۰ | ۶ |
| دوم | ۱۵-۱۹ | ۳۵-۵۵ | 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 |

گاواژ وارفارین: وارفارین از شرکت سیناژن ( Tehran, Iran) خریداری شد. در طول دوره تمرین ورزشی حیوانات تحت گاواژ وارفارین نیز قرار گرفتند. بدین صورت که هر روز یک تا دو ساعت پس از تمرینات ورزشی (جهت عدم مداخله دارو در حین تمرین) حیوانات میزان ۰/۵میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن وارفارین (حل شده در نرمال سالین) را دریافت می‌کردند (با سرنگ ۵ سی‌سی) تا تاثیرات مزمن مصرف این داروها مورد بررسی قرار گیرد (۲۴).

جهت حذف اثر حاد تمرین، ۴۸ ساعت پس از آخرین مداخله تمرینی تمامی موش‌های صحرایی به مدت ۱۰-۸ ساعت ناشتا شده و برای قربانی شدن آماده شدند. بی‌هوشی با ترکیب کتامین (mg/kg100) و زایلازین (mg/kg10) (زیست فن آوران طب آزما، تهران، ایران) انجام شد (۲۵). پس از بی‌هوشی کامل و تست درد و مطمئن شدن از عدم هوشیاری، خونگیری از بطن چپ قلب انجام گردید. نمونه‌های خون پس از سانتریفیوژ (Hettich, Germany) (۱۵ دقیقه، ۳۰۰۰ دور در دقیقه) و جدا سازی سرم تا زمان آزمایش، در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد 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 میلی‌لیتری کد گذاری شده قرار گرفت. میکروتیوب‌ها داخل تانک ازت انتقال داده شد، سپس تا زمان آنالیزهای سلولی داخل فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (۲۶).

برای اندازه‌گیری بیان ژن استئوکلسین، استخراج RNA از نمونه‌ها مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده کیت Kiazol (Kiazist Kzol50، Iran)، انجام گرفت. جهت هموژن سازی، ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از بافت بطن چپ در نیتروژن مایع پودر شد و با یک میلی‌لیتر از محلول کیازول به یک میکروتیوب 1.5 ml RNase Free انتقال یافت. جهت جدا سازی فاز تخلیص، پس از اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میکروتیوپ و تکان دادن به مدت ۱۵ ثانیه، در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در ۱۲۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. با دقت فاز رویی به میکروتیوب RNase Free دیگری انتقال یافت و روی یخ قرار داده شد. با نسبت 1:1 به این فاز ایزوپروپانول یخ اضافه گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در ۱۲۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه Centrifuge(Hettich، Germany) شده و پس از آن سوپرناتانت دور ریخته شد. یک میلی‌لیتر از اتانول ۷۵ % در آب DEPC را به آن اضافه کرده و به مدت پنج دقیقه در ۷۵۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. در ادامه سوپرناتانت را دور ریخته و پس از خشک شدن رسوب، پلت باقیمانده در ۲۰ تا ۵۰ میکرولیتر آب DEPC یا بافر TE حل گردید. تمام مراحل استخراج، زیر هود با مواد و وسایل کاملاً استریل انجام گرفت.در پایان، غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه Spectrophotometry در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و غلظت آن براساس ضریب رقت برحسب ng/µl به دست آمد.

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا، مراحل سنتز cDNAمطابق پروتکل شرکت سازنده (Parstous, CN A101161, Iran) انجام شد. کیت سنتز Easy cDNA شامل تمام اجزای لازم برای تبدیل RNA کل یا mRNA به cDNA تک رشته ای بود. الگوی RNA (RNA کل یا پلی (A) mRNA) و سایر اجزای کیت در لوله بدون RNase مخلوط

و مخلوط فوق با گرداب سریع آماده شد. محلول در سه مرحله متوالی انکوبه شد: مرحله اول، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد؛ مرحله دوم، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد و مرحله سوم، به مدت پنج دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس روی یخ با دمای چهار درجه سانتی‌گراد سرد گردید.

برای کنترل cDNA واکنش PCR، مخلوط با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر آماده شد. برای بررسی تغییرات بیان ژن استئوکلسین (OCN) در گروه‌های تحت مطالعه، واکنش Real-time PCR به و سیله د ستگاه Real-time PCR ( ABI America– Stepone) و با استفاده از 2X Real-Time PCR master Mix (کمپانی BioFACT و کت نامبر: DQ385- 40h) به روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ انجام گرفت. پرایمرهای ژن‌های انتخابی با استفاده از نرم افزار gene runner (نسخه 6.5) طراحی شدند ( جدول ۳). ژن گلسیرآلدهید۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب گردید. برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR بدین صورت انجام شد: مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه و تعداد ۳۵ سیکل ؛ مرحله واسرشت (دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، مرحله اتصال (دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، مرحله تکثیر یا طویل‌شدن (دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) انجام شد و مرحله تکثیر نهایی در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه تنظیم شد. صحت و دقت نتایج PCR با استفاده از منحنی های تکثیر و ذوب مربوط به محصول PCR هر ژن ارزیابی شدند.

مقادیر سرمی ویتامین(K2(MK-4 با استفاده از کیت به روش الایزا اندازه‌گیری شد. مشخصات کیت:(MBS9302591 – USA). حساسیت این کیت معادل 0.1nmol/L و محدوده تشخیص آن 0.25nmol/L-8nmol/L بود.

نمونه‌برداری سرم و ذخیره‌سازی: سانتریفیوژ سرم به مدت تقریبی ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm ظرف ۳۰ دقیقه پس از جمع-آوری نمونه انجام شد. مایع رویی با دقت، بلافاصله آزمایش شد. از چرخه‌های مکرر انجماد/ذوب خودداری گردید. قبل از شروع روش‌های سنجش، همه‌ی نمونه‌ها بطور طبیعی به مدت ۳۰ دقیقه به دمای اتاق (۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند. در صورت لزوم، یک سانتریفیوژ با سرعت کم به مدت یک یا دو ثانیه انجام شد تا استانداردها در انتهای ویال‌ها متمرکز شوند. چاهک‌های استاندارد، چاهک‌های نمونه و چاهک‌های Blank/Control را تنظیم کرده ۵۰µl استاندارد به هر چاهک استاندارد، ۵۰µl نمونه به هر چاهک نمونه و µl ۵۰ نمونه رقیق کننده به هر چاهک Blank/Control اضافه شد. توصیه شد تمام استانداردها، نمونه‌ها و نمونه رقیق کننده به صورت تکراری به صفحه اضافه شوند. ۱۰۰µlمعرف HRP مزدوج را به هر چاهک اضافه، سپس چاهک را بسته و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پلیت‌ها، ۴ بار شسته شدند. مخلوط‌های داخل چاهک‌ها درون سینک یا ظرف مناسب ریخته شد و با استفاده از پیپت یا بطری مخصوص، هر چاه به طور کامل با محلول شستشو داده شد، پس از حدود یک دقیقه وارونه شدن، پلیت را روی کاغذهای جاذب یا حوله‌های کاغذی قرار داده تا رطوبت ظاهر نشود. این روش چهار بار تکرار شد. همه چاهک‌ها را آسپیره کرده، سپس پلیت‌ها چهار بار با استفاده از بافر شستشو داده شد. پس از شستشوی نهایی، پلیت را وارونه کرده و با زدن صفحه روی کاغذ جاذب یا حوله کاغذی محیط را خشک کرده تا رطوبت ظاهر نشود. محلول Chromogen A 50µl و محلول Chromogen B 50µl را به ترتیب به هر چاهک اضافه نموده و سپس به دور از نور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ۵۰µl محلول Stop به هر چاهک اضافه شد (رنگ چاه‌ها باید از آبی به زرد تغییر کند). تراکم نوری در ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش ELISA ( BioTek ELX800 ) ظرف ۱۵ دقیقه پس از افزودن محلول خوانش شد و با استفاده از نرم افزار سطح آنالیت محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری سطوح کلسیم نیز از کیت تشخیص (ARSENAZO) در محدوده ۰/۴–25 میلی‌گرم در دسی‌لیتر، پارس آزمون، کرج، ایران) با روش فتومتریک استفاده شد.

در پژوهش حاضر برای تجزیه وتحلیل داده‌ها: از آمار توصیفی برای محاسبه شاخص‌های مرکزی و پراکندگی، آزمون شاپیروویلک برای توزیع طبیعی داده‌ها، آزمون t مستقل برای مقایسه گروه سالم با بیمار، برای بررسی اثرات ایسکمی بر متغیرهای وابسته، از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه با گروه‌های مستقل استفاده شد. در صورت معنی-دار شدن آزمون، از آزمون تعقیبی توکی جهت مشخص شدن محل اختلاف استفاده گردید. از طرف دیگر، از آنجا که مداخلات اعمال شده شامل تجویز دارو با دو سطح (مصرف کرده یا مصرف نکرده) و تجویز تمرین با سه سطح (تمرین نکرده، تمرین تناوبی (EIT) و تمرین تداومی (ECT)) بود، از یک طرح تحلیل واریانس دو راهه (دو عاملی) ۳×۲ استفاده شد. این طرح شامل اثر اصلی تمرین، اثر اصلی دارو و اثر تعاملی تمرین×دارو می‌شود. در صورت معنی‌دار شدن آزمون‌های تحلیل واریانس از مقایسه میانگین-ها با تصحیح بونفرونی استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی-های صورت گرفته با نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. سطح معناداری نیز برای تمام محاسبات (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شده است.

**جدول ۳.** الگوی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

| GENES | SEQUENCES (5´-3´) | Length | Tm (°C) | PCR product size |
|---|---|---|---|---|
| OCN | F:GAGGGCAGTAAGGTGGTGAATAG<br>R:AGAGAGAGGGAACAGGGAGGGT | 23<br>22 | 60<br>63 | 267 bp |
| GAPDH | F:AGGTCGGTGTGAACGGATTTG<br>R:TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA | 21<br>23 | 59<br>58 | 123 bp |

## نتایج

در ابتدا جهت بررسی اثر القا بیماری، گروه سالم با گروه ایسکمی مقایسه شدند. نتایج آزمون t مستقل نشان داد بین دو گروه سالم و بیمار تفاوت معنی‌داری وجود دارد و القای بیماری سبب افزایش بیان ژن استئوکلسین (p=۰/۰۰۳، ۳/۹- = t)، و یتامین K2(MK-4) (p=۰/۰۲۷، ۲/۶۹۵- = t) و کلسیم (p=۰/۰۰۱، ۶/۱۷۰- = t) در گروه بیمار شده است (جدول ۴، نمودار ۱).

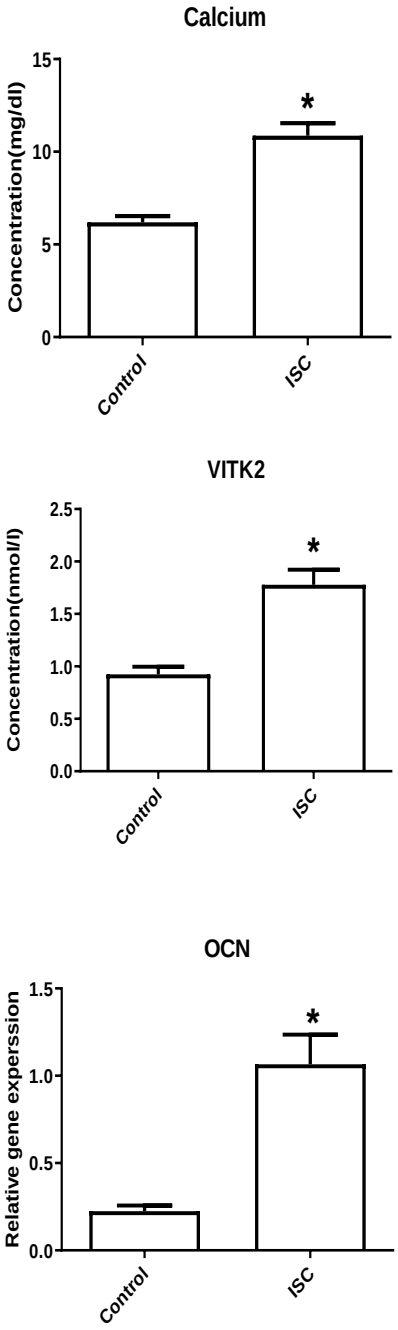
**جدول ٤.** نتایج آزمون t مستقل جهت بررسی تفاوت بین گروه سالم و بیمار مربوط به ژن استئوکلسین، ویتامین K2(MK-4) و کلسیم سرمی.

| متغیر | اختلاف میانگین | اختلاف خطای انحراف معیار | t | df | p |
|---|---|---|---|---|---|
| استئوکلسین | ۰/۷۰۱ - | ۰/۱۷۸ | ۳/۹۲۸ - | ۱۰ | ۰/۰۰۳ * |
| ویتامین K2 | ۰/۵۸۹ - | ۰/۲۱۸ | ۲/۶۹۵ - | ۸ | ۰/۰۲۷ * |
| کلسیم | ۴/۶۷۳ - | ۰/۷۵۷ | ۶/۱۷۰ - | ۱۰ | ۰/۰۰۱ * |

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵.

جهت بررسی تفاوت میان گروه های مختلف از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در متغیر استئوکلسین (p=۰/۰۰۸، F=۳/۸۷۱) وجود داشت. این در حالی بود که ویتامین K2(MK-4) تغییرات معنی‌داری بین گروه‌های پژوهش نشان نداد (p=۰/۲۹۵، F=۱/۲۹۱). نتایج کلسیم سرم نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه ها وجود دارد (F=۶/۴۵۰،p=۰/۰۰۱).

جهت مشخص شدن محل اختلاف گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. در بررسی بیان ژن استئوکلسین، گروهی که همراه با ایسکمی وارفارین دریافت کرده بودند، اختلاف معنی‌داری با گروه ایسکمی+ EIT (p=۰/۰۱۴)، و گروه ایسکمی+ ECT (p=۰/۰۰۷) داشت. این در حالی بود که در مقایسه ویتامین K2(MK-4) در گروه‌های مختلف مشخص شد، گروه‌های ایسکمی یا گروه ایسکمی که وارفارین دریافت کرده بودند با هیچ یک از گروه‌های مورد



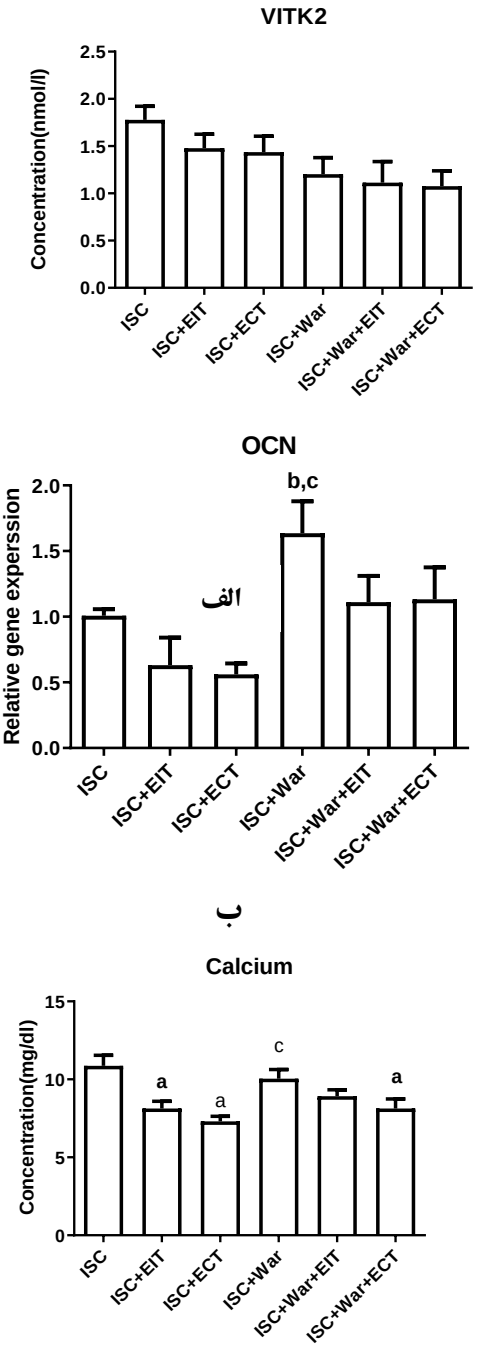

**نمودار ۱**. بیان ژن استئوکلسین (الف)، سطوح ویتامین K2 (ب) و کلسیم (ج) در گروه سالم و بیمار. نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۱. مخفف: ISC: گروه انفارکتوس قلبی، Control: گروه کنترل، OCN: استئوکلسین، VITK2: ویتامین K2

بررسی، تفاوت معنی‌داری نداشتند. در بررسی سطوح کلسیم مشخص شد که گروه ایسکمی با گروه ایسکمی+ EIT (p=۰/۰۱۴)، گروه ایسکمی+ ECT (p=۰/۰۰۱) و گروه ایسکمی+وارفارین+ ECT (p=۰/۰۱۳) اختلاف معنی‌داری داشت. نتایج این مقایسه‌ها در نمودار ۲ نشان داده شده است. جهت بررسی اثر تعاملی تمرین و دارو از طرح تحلیل واریانس دو عاملی ۳×۲ استفاده شد. نتایج نشان داد با صرفنظر از اثر دارو، اثر اصلی تمرین بر استئوکلسین معنی‌دار بود (F۲و۳۰=۴/۰۹۶، p=۰/۰۲۷، η۲=۰/۲۱۴) جهت بررسی محل اختلاف از مقایسه میانگین‌ها با تصحیح بونفرونی استفاده شد. بر اساس این آزمون، اختلاف میانگین گروه‌هایی که تمرین تداومی و تناوبی انجام داده بودند بیشتر از گروه‌هایی بود که تمرین نکرده بودند. همچنین با صرفنظر از اثر تمرین، اثر اصلی مصرف دارو بر استئوکلسین معنی‌دار بود (F۱و۳۰=۱۱/۰۹۲، p=۰/۰۰۲، η۲=۰/۲۷۰). از آنجا که مصرف دارو فقط دو سطح داشت، نیازی به آزمون تعقیبی نبود.

با صرف نظر از اثر دارو، اثر اصلی تمرین بر ویتامین K2(MK-4) معنی‌دار نبود (F۲و۳۰=۰/۱۹۵، p=۰/۸۲۴، η۲=۰/۰۱۳). جهت بررسی محل اختلاف از مقایسه میانگین‌ها با تصحیح بونفرونی استفاده شد. اختلاف بین گروه‌هایی که تمرین انجام نداده بودند و گروه‌هایی که تمرین تداومی و تناوبی انجام داده بودند مشاهده نشد. در واقع اختلاف میانگین گروه‌هایی که تمرین تداومی و تناوبی انجام داده بودند بیشتر از گروه‌هایی بود که تمرین نکرده بودند. با صرف نظر از اثر تمرین، اثر اصلی مصرف دارو بر ویتامین K2 معنی‌دار بود (F۱و۳۰=۵/۶۸۹، p=۰/۰۲۴، η۲=۰/۱۶۴). از آنجا که مصرف دارو فقط دو سطح داشت، نیازی به آزمون تعقیبی نیست.

با صرفنظر از اثر دارو، اثر اصلی تمرین بر کلسیم معنی‌دار بود (F۲و۳۰=۱۴/۳۴۹، p=۰/۰۰۱، η۲=۰/۴۸۹). جهت بررسی محل اختلاف از مقایسه میانگین‌ها از تصحیح

بونفرونی استفاده شد. بر اساس این آزمون این اختلاف بین گروه‌هایی که تمرین انجام نداده بودند و گروه‌هایی که



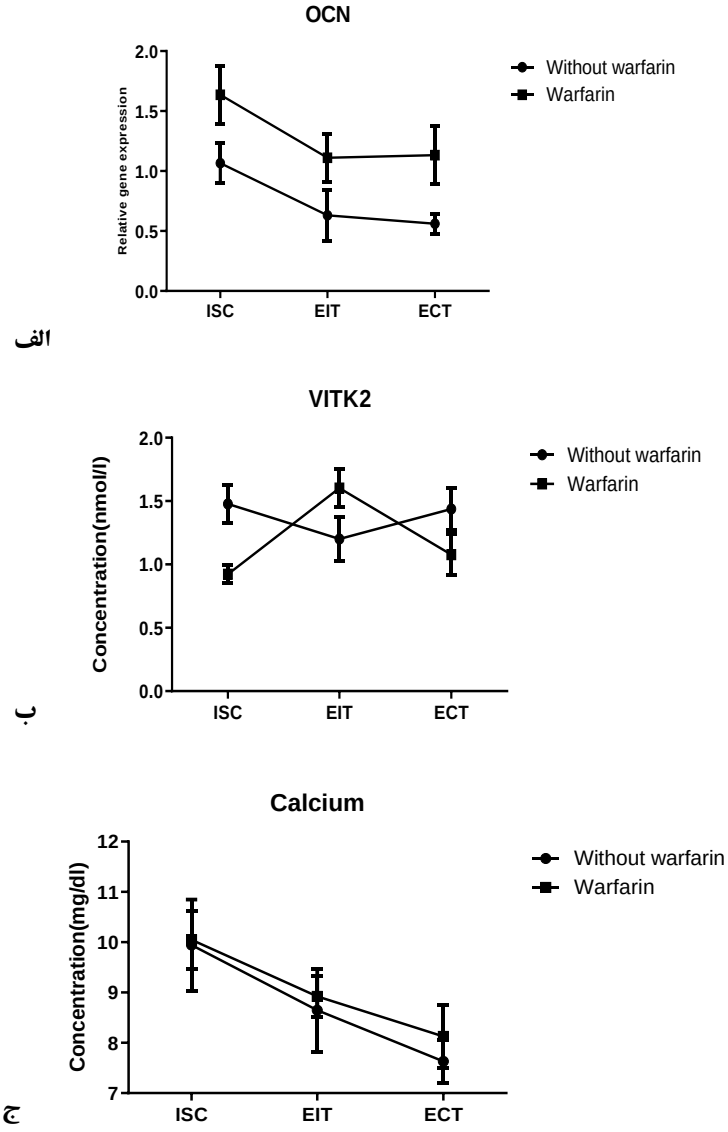

**شکل ۲.** مقایسه میانگین‌های گروه‌های مختلف فاکتورهای بیان ژن استئوکلسین (الف)، ویتامین K2 (ب) و کلسیم (ج). نتایج به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. a: نشانه اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه ISC، b: نشانه اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه ISC+EIT، c: نشانه اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه ISC+ECT، d: نشانه اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه ISC+War، e: نشانه اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه ISC+War+EIT، مخفف: ISC: انفارکتوس قلبی، EIT: تمرین تناوبی،ECT : تمرین تداومی، War: وارفارین، OCN: استئوکلسین، VITK2: ویتامین K2.

تمرین تداومی و تناوبی انجام داده بودند مشاهده شد. در واقع اختلاف میانگین گروهی که تمرین تداومی و تناوبی انجام داده بودند به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه‌هایی بود که تمرین نکرده بود ند. همچنین، با صرفنظر از اثر تمرین، اثر اصلی مصرف دارو بر کلسیم معنی‌دار نبود (η۲=۰/۰۱۲ ،p=۰/۵۴۷ ،F۱و۳۰=۰/۳۷۱). از آنجا که مصرف دارو فقط دو سطح داشت، نیازی به آزمون تعقیبی نبود.

همچنین نتایج نشان داد که تعامل معنی‌داری بین تمرین و دارو در مورد تغییرات بیان ژن استئوکلسین وجود ندارد (η۲=۰/۰۰۲ ،p=۰/۹۹۶ ،F۲و۳۰=۰/۰۳۵). در واقع با وجود اینکه اثر اصلی برخی مداخلات معنی‌دار بود، تعاملی بین این اثرهای اصلی وجود نداشت. این موضوع در نمودار ۳ الف نشان داده شده است.

تعامل معنی‌داری بین تمرین و دارو در مورد تغییرات میزان ویتامین K2(MK-4) وجود نداشت (F۲و۳۰=۰/۲۳۰، p=۰/۷۹۶، η۲=۰/۰۱۶). در واقع با وجود اینکه اثر اصلی دارو معنی‌دار بود، تعامل بین اثرهای اصلی معنی‌دار نشد. این موضوع در نمودار ۳ ب نشان داده شده است.

تعامل معنی‌داری بین تمرین و دارو در مورد تغییرات مقدار کلسیم وجود نداشت (F۲و۳۰=۱/۵۹۰، p=۰/۲۲۱، η۲=۰/۰۹۶). در واقع با توجه به اینکه اثر اصلی تمرین معنی‌دار بود، تعامل بین اثرهای اصلی معنی‌دار نشد. این موضوع در نمودار ۳ ج نشان داده شده است.




**نمودار ۳.** تعامل بین مصرف دارو و انجام تمرین در متغیرهای استئوکلسین (الف)، ویتامین K2 (ب) و کلسیم سرمی (ج). بیان ژن استئوکلسین، ویتامین K2 و کلسیم در گروه کنترل بیشترین مقدار بوده و در اثر انجام تمرین این مقدار کاهش پیدا می‌کند. این تغییرات بستگی به مصرف دارو یا عدم مصرف آن ندارد. دیتاها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. مخفف: ISC: انفارکتوس قلبی، EIT: تمرین تناوبی،ECT : تمرین تداومی، War: وارفارین، OCN: استئوکلسین، VITK2: ویتامین K2

## بحث و نتیجه‌گیری

از جمله آسیب‌های بعد از MI تخریب هموستاز عروقی و گسترش کلسیفیکاسیون می‌باشد(۲۷). تمرینات ورزشی مختلف با تنظیم سیگنالینگ سلولی در قلب و عروق می‌تواند آسیب‌های ناشی از MI را به حداقل برساند. لذا پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر مصرف وارفارین با تمرینات تداومی و تناوبی بر تغییرات بیان ژن استئوکلسین، فاکتورهای ویتامین K2(MK-4) خون و سطوح کلسیم موش‌های صحرایی نر اسپراگو-دوالی MI شده با ایزوپروترنول انجام شد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ژن استئوکلسین در مدل بیمار ایسکمی نسبت به کنترل سالم به میزان

معناداری افزایش یافت. استئوکلسین گردش خون با حضور در عروق کلسیفیه، یک عامل فعال در القای کلسیفیکاسیون عروق بوده و مسیرهای سیگنال دهی جدید کانی‌سازی را فعال می‌کند. کانی‌سازی پاتولوژیک عروقی دارای اثرات مضر بر عملکرد قلب و عروق است و در سن بالا با افزایش مرگ و میر در بیماران مبتلا به تصلب شرایین، دیابت نوع ۲ و بیماری مزمن کلیه همراه است (۲۸). لذا کنترل کاهش استئوکلسین در این بیماران به طور قابل توجهی می‌تواند با کنترل کلسیفیکاسیون عروقی، میزان مرگ و میر را تقلیل دهد که در مطالعه حاضر اثر تمرین بر استئوکلسین معنی‌دار شد. زیرا که هر دو مدل تمرینی در شرایط MI قادر به کاهش بیان ژن OCN بودند. از آنجایی که تمرینات ورزشی طولانی مدت (تداومی و تناوبی) با افزایش میزان بار بر بافت استخوانی، متابولیسم سلول های استخوانی از جمله استئوبلاست‌ها را بهبود می‌بخشند (۱۳, ۲۹) لذا مانع از تحلیل استخوانی و خروج OCN از این بافت می‌شوند. همچنین به نظر می‌رسد تمرین ورزشی به صورت غیر مستقیم در کنترل و کاهش کلسیفیکاسیون عروقی نا شی از OCN نقش دا شته با شد. در تحقیقات مختلف بیان شده که هر دو نوع تمرین تناوبی و تدامی به طور معنی‌داری می‌توانند میزان گلوکز جر یان خون را کاهش و از بروز د یا بت و آ سیب‌های آن نیز پیشگیری کنند (۳۱, ۳۰). تمرین ورز شی طولانی مدت می‌تواند حسا سیت انسولینی را در سلول‌های عضلانی بهبود و ورود گلوکز به بافت عضلانی را با افزایش بیان انتقال دهنده‌های گلوکز (GLUT)[1] نیز بهبود بخشد (۳۲). تغییرات کاهشی در قند خون ناشی از ورزش تناوبی و تداومی می‌تواند د سترسی ا ستئوکلسین به گلوکز را کاهش و به صورت غیر مستقیم در کاهش کلسیفیکا سیون عروقی نیز نقش دا شته با شد. همچنین دان و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که تمرین تناوبی با بهبود سندرم متابولیک و ترکیب بدن در توانبخشی قلبی بیماران سرپایی مبتلا به انفارکتوس قلبی موثر می‌باشد (۳۳). در مطالعه حاضر هر چند از مدل القای MI با ایزوپروترنول استفاده شد، اما به نظر می‌رسد تمرین ورزشی با کنترل عوامل التهابی، پروفایل لیپیدی و بهبود متابولیسم ا ستخوان با کاهش ا ستئوکلسین در کاهش کلسیفه شدن عروقی و یا کاهش فیبروزی شدن قلب پس از MI موثر با شد که در این زمینه نیاز به مطالعات دقیق‌تر با این فاکتورها می‌باشد. وارفارین به عنوان داروی ضد انعقادی در بیماران با سابقه عوامل خطر شدید برای ترومبوآمبولیسم[2] وریدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. عوارض جانبی اثبات شده با مصرف زیاد این دارو شامل خونریزی، نکروز، تراتوژنیک[3] در دوران بارداری، آمبولیزاسیون[4] کلسترول و نفروپاتی است. یکی از عوارض جانبی طولانی مدت وارفارین که کمتر شناخته شده، افزایش کلسیفیکاسیون شریانی سیستمیک است که در مطالعه حاضر نیز افزایش ا ستئوکلسین گروه وارفارین موید این مطلب بود. این امر به دلیل ارتباط بین کلسیفیکاسیون عروقی و مرگ و میر قلبی عروقی قابل توجه است. موریشیما و همکاران[5] (۲۰۱۳) در بررسی داروی وارفارین با سایر داروها تاثیرات مضر وارفارین را مورد تایید قرار دادند. این محققان بیان کردند که وارفارین کربوکسیلاسیون استئوکلسین را در موش‌ها مختل می‌کند. در مقابل، ادوکسابان[6] در دوزهای بالاتر از مقدار مورد نیاز یک اثر ضد ترومبوتیک را ایجاد کرد. این یافته‌ها حاکی از آن است که ادوکسابان هیچ تاثیری در تولید Gla-osteocalcin ندارد و بنابراین ممکن است خطر کمتری برای سلامت استخوان، قلب و عروق داشته باشد (۳۴). این در حالی بود که در مطالعه حاضر فقط از داروی وارفارین استفاده شد و افزایش بیش از حد آن می‌تواند به اختلالات ناشی از وارفارین بر کربوکسیلاسیون استئوکلسین برگردد که تاثیرات تمرین تناوبی و تداومی را بر کاهش این فاکتور نیز خنثی می‌کند. در رابطه با تغییرات ا ستئوکلسین با مصرف وارفارین در شرایط MI مطالعات محدود می‌باشد. با

1. Glucose Transporter
2. Thromboembolism
3. Teratogenic
4. Embolisation
5. Morishima et al
6. Edoxaban

این وجود از جمله دلایل نتایج غیر معنی‌دار مطالعه حاضر عدم بررسی این فاکتور در چندین عروق می‌باشد که ممکن است بررسی و اندازه‌گیری استئوکلسین در سایر عروق سیستماتیک اطلاعات بیشتری به ما دهد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد سطح ویتامین K2(MK-4) خون در مدل بیمار ایسکمی نسبت به کنترل سالم به میزان معناداری افزایش یافت. افزایش بیش از حد طبیعی سطوح MK-4 می‌تواند در گسترش عوارض قلبی عروقی بعد از MI موثر باشد و در مرگ و میر بیماران کلیوی نیز تاثیر گذار است (۳۵) که در مطالعه حاضر نیز گروه انفارکتوس افزایش معنی‌دار این فاکتور را نشان داد. با این وجود تمرینات تناوبی و تداومی تغییری را در K2(MK-4) ایجاد نکردند این در حالی است که مطالعات متعدد فواید قلبی عروقی ناشی از مدل‌های تمرینی را به اثبات رسانده‌اند که به نظر می‌رسد این تاثیر مجزا از تغییرات K2(MK-4) باشد. بر اساس مطالعات، تجویز مصرف K2(MK-4)، یک عامل درمانی پوکی استخوان بوده و تغییرات آن با مصرف وارفارین و ورزش به ویژه در مدل MI کمتر بررسی شده است. در رابطه با تغییرات ویتامین K2(MK-4) و تاثیرات قلبی عروقی آن مطالعات ضد و نقیضی وجود دارد. یک مطالعه کنترل شده تصادفی نشان داد که ویتامین K باعث کاهش کلسیفیکاسیون عروق کرونر می‌شود (۳۶)، اما در مطالعات دیگر این نتیجه مورد تایید قرار نگرفت (۳۷). ویتامین K برای سنتز فاکتورهای انعقادی II[1]، VII[2]، IX[3] و X[4] ضروری است که در تشکیل لخته فیبرین و همچنین سنتز بازدارنده‌های سیستم پیش انعقاد، پروتئین‌های C، S و Z نقش دارند (۳۸). داروی ضد انعقاد وارفارین، یک آنتاگونیست ویتامین K، برای پیشگیری ثانویه از حوادث ترومبوتیک است که دارای عوامل خطر مشترک با تصلب شرایین می‌باشد. لذا تغییرات کاهشی ویتامین K مطالعه حاضر با مصرف وارفارین معقول به نظر می‌رسد. این در حالی بود که تمرینات تداومی و تناوبی با وارفارین تغییرات معنی‌داری را در ویتامین K2(MK-4) ایجاد نکردند. این عدم تغییر می‌تواند تحت تاثیر دوز دارو یا شدت و مدت تمرینات قرار گرفته باشد. مطالعات در زمینه تاثیر تمرین ورزشی تناوبی و تداومی بر غلظت ویتامین K2(MK-4) محدود می‌باشد. در این زمینه فارلین و همکاران[5] (۲۰۱۷) به بررسی تاثیر تمرین هوازی (تداومی) بر روی دوچرخه کارسنج (با شدت بالا) و مصرف مکمل ویتامین K2(MK-4) بر برون ده قلبی پرداخته و بیان کردند که مصرف مکمل ویتامین K2(MK-4) با تمرین هوازی با افزایش ۱۲ درصدی در حداکثر برون ده قلبی همراه بود همچنین سبب تغییرات افزایشی در ضربان قلب شد (۳۹). اما در این مطالعه تغییرات غلظت گردش خون ویتامین MK-4 مد نظر نبود. این در حالی بود که در مطالعه حاضر نیز شاخص‌های عملکردی قلبی اندازه‌گیری نشد. همچنین مطالعه حاضر از نمونه حیوانی با بیماری MI استفاده کرده و شدت تمرینات به حدی نبوده که بر K2(MK-4) درون زا تاثیر معنی‌داری بگذارد. با توجه به این تحقیقات می‌توان نتیجه گرفت که به نظر می‌رسد تفاوت در نوع آزمودنی (انسانی در برابر حیوانی)، نوع مدل (بیمار در مقابل سالم) و نحوه بررسی مکمل (مصرف خوراکی مکمل ویتامین K در مقابل بررسی مقادیر سرمی بدون مصرف مکمل) و در نهایت مدل متفاوت تمرینی (هوازی تریدمیل در مقابل هوازی دوچرخه کارسنج) دلیل نتایج متفاوت مطالعه فارلین با مطالعه حاضر باشد.

علاوه بر متغیرهای مذکور، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطح کلسیم خون در مدل بیمار ایسکمی نسبت به کنترل سالم به میزان معناداری افزایش یافته است. همسو با نتایج مطالعه حاضر ریاد و همکاران[6] (۲۰۱۶) نشان دادند که سطح

1. II (Protherombin)
2. VII (Proconvertin)
3. IX (Cheristmas factor)
4. X (Stuart-power factor)
5. Farlin et al
6. Reid et al

کلسیم سرم با خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی از جمله انفارکتوس قلبی ارتباط مثبت دارد (۴۰). علاوه بر این، شواهد حاصل از آزمایشات بالینی تصادفی نشان می‌دهد که مکمل کلسیم، که منجر به افزایش حاد و پایدار کلسیم سرم می‌شود (۴۱) ممکن است به میزان متوسطی خطر وقایع قلبی عروقی، به ویژه انفارکتوس قلبی را افزایش دهد (۴۲). افزایش کلسیم در محیط قلبی باعث نفوذ بالای کلسیم به میوسیت‌ها می شود که می‌تواند هموستاز سلول‌های قلبی را تخریب و مسیرهای سیگنالینگ متعدد مرگ میوسیت را راه اندازی کند. تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS)[1] و تجمع کلسیم سیتوزولی نقش عمده‌ای در شروع مرگ برنامه ریزی شده سلولی در طول انفارکتوس حاد میوکارد ایفا می‌کند. مرگ سلولی ممکن است شامل نکروز، آپوپتوز و اتوفاژی و ترکیب آنها باشد. در طول یک انفارکتوس قلبی، انتقال کلسیم بین شبکه سارکوپلاسمی و میوفیلامنت مختل می‌شود، کلسیم به میتوکندری هدایت و باعث تورم میتوکندری می‌شود. بیان شده در طول ایسکمیک رپرفیوژن (که یک آسیب قلبی محسوب می‌شود)، تخریب تعادل یونی و افزایش ROS شایع می‌باشد. در طی ایسکمی- ریپرفیوژن مجدد حاد، مسیرهای اصلی مرگ، نکروز و آپوپتوز برنامه ریزی شده از طریق مسیر داخلی، به ترتیب با باز شدن منافذ انتقال نفوذ پذیری میتوکندری و نفوذپذیری غشای میتوکندری خارجی، شروع می‌شود. لذا مهار تخریب تعادلات یونی به ویژه کلسیم می‌تواند یک هدف درمانی برای MI یا ایسکمیک رپرفیوژن باشد. یکی از مدل‌های درمانی در شرایط MI معمولا انجام منظم تمرینات ورزشی به ویژه تمرینات هوازی می‌باشد. باتوجه به نتایج مطالعه حاضر (کاهش یون کلسیم گروه‌های تمرین تداومی و تناوبی هوازی) نیز یکی از دلایل اهمیت این نوع تمرینات، کنترل هموستاز کلسیم می‌باشد که تخریبات بعد از انفارکتوس قلبی را می‌تواند به حداقل برساند. به همین دلایل سلطانا و همکاران[2] (۲۰۱۹) برای توانبخشی و آمادگی قلبی عروقی تنفسی معمولا تمرینات ورزشی با حجم کمتر و مدت بیشتر را پیشنهاد می‌دهند (۴۳). تخریب ترشح کلسیم و افزایش سطوح سرمی آن می‌تواند به تخریب هموستاز کلسیم در بافت‌های استخوان، عضله اسکلتی، عضله قلبی و... برگردد. همانطور که بیان شده انجام منظم تمرین ورزشی به ویژه هوازی می‌تواند با تاثیر بر منابع سلولی کلسیم موثر واقع شود. به بیان دیگر تمرین ورزشی می‌تواند میزان خروج کلسیم از شبکه سارکوپلاسمی را تنظیم کند (۴۴). در مدل‌های حیوانی، اثرات محافظت قلبی تمرین ورزشی پس از MI شامل کاهش کل کلاژن (۴۵) و احیا و تنظیم رهایی $Ca^{+2}$ داخل سلولی، تنظیم حساسیت $Ca^{+2}$ و عملکرد انقباضی درکاردیومیوسیت‌ها است. تغییرات کاهشی کلسیم در برخی شرایط قلبی عروقی از نظر درمانی نیز مفید به نظر می‌رسد زیرا که افزایش آن می‌تواند در گسترش و توسعه کلسیفه شدن عروقی موثر باشد که از این جنبه نیز تمرین ورزشی با کنترل کلسیم می تواند نقش پیشگیری کننده در آترواسکلروزیس نیز داشته باشد. اما وارفارین با گسترش کلسیم می‌تواند نقش تخریبی بعد از MI داشته باشد. با گسترش میزان چربی خون و تجمع بالای کلسیم در رگ‌های مستعد نظیر عروق کرونر این دو عامل می‌تواند با هم سبب کلسیفه شدن دیواره رگ شده و زمینه بروز ترومبوز را فراهم کند. یکی از یافته‌های قابل توجه مطالعه حاضر عدم تاثیر وارفارین بر سطح کلسیم در شرایط MI می‌باشد. همچنین با وجودی که تمرین ورزشی تناوبی به تنهایی سطح کلسیم را کاهش داد اما در ترکیب با وارفارین تغییرات قابل توجهی را نشان نداد. این نتایج می‌تواند تحت تاثیر مصرف وارفارین قرار گرفته باشد. استفاده از وارفارین با هدف مهار تشکیل لخته در برخی آسیب‌های قلبی عروقی استفاده می شود. در رابطه با تاثیر وارفارین بر سطوح سرمی کلسیم مطالعات محدودی وجود دارد. از آنجایی که در بخش‌های قبلی نیز ذکر شد کلسیفه شدن عروقی یکی از

[1]. Reactive oxygene spice

[2]. Soltana et al

هدف‌های وارفارین می‌باشد به نظر می‌رسد وارفارین بر سطح کلسیم نیز موثر باشد. با این وجود در مطالعه حاضر اثر اصلی دارو مورد تایید قرار نگرفت. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش سطح کلسیم سرم می‌تواند به کلسیفیکاسیون عروق در موش‌های صحرایی سکته‌ای کمک کند اما اثر هم‌افزایی وارفارین بر کلسیفیکاسیون شریان را نمی‌توان با تأثیر وارفارین بر میزان کلسیم سرم توضیح داد. همچنین به نظر می‌رسد کلسیفیکاسیون شریان ناشی از وارفارین می‌تواند با افزایش کلسیم- فسفات افزایش یابد (۴۶). با این وجود، در مطالعه حاضر تغییرات فسفات همراه کلسیم ارزیابی نشد.

## محدودیت پژوهش

با توجه به اینکه هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیرات وارفارین و تمرینات ورزشی تناوبی و تداومی در کنترل تخریبات ایزوپروترنول در بافت قلب و کلیه بوده است، برای تایید تاثیر تخریب دارو فقط به رفرنس بسنده شد (۲۱)، همچنین همان‌طور که در بخش روش پژوهش توضیح داده شد مطالعات گذشته با استفاده از ارزیابی هیستوشیمیایی بافت قلب نشان دادند دوز های ۸۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند باعث ایجاد ناحیه نکروز در بافت قلب شود (۲۱). بنابراین، دوز ۸۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم برای القاء انفارکتوس قلبی در موش‌های مطالعه حاضر انتخاب شد. با این وجود، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی نیز از روش های مختلف القاء انفارکتوس قلبی و تایید آن توسط تصاویر هیستوپاتولوژی استفاده شود.

## نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در شرایط MI ترشح فاکتور قلبی استئوکلسین، کلسیم و ویتامین K2(MK-4) به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد که می‌تواند فراهم کننده کلسیفیکاسیون عروقی و ترومبوز باشد و مصرف داروی وارفارین در این دوران می‌تواند این تاثیرات منفی را تقویت کند. این در حالی بود که به نظر می‌رسد تمرینات ورزشی تناوبی و به ویژه تداومی طولانی مدت با تنظیم عملکرد سلول‌های قلبی عروقی، تنظیم ترشح استئوکلسین و کلسیم می‌تواند تاثیرات حفاظتی قلبی عروقی داشته باشد و مانع گسترش ترومبوز شود. با این وجود در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتر به ویژه بر نمونه انسانی می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر حاصل یافته‌های رساله دکتری، مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب در سال ۱۳۹۹ می‌باشد. پژوهشگر مراتب قدردانی و تشکر خود را از اساتید محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب و مسئولان محترم آزمایشگاه که دراجرای این طرح یاری فرمودند، اعلام می‌دارد.

## References

1. Wang C, Yuan Y, Zheng M, Pan A, Wang M, Zhao M, et al. Association of age of onset of hypertension with cardiovascular diseases and mortality. Journal of the American College of Cardiology. 2020;75(23):2921-30.
2. Pesaro AE, Katz M, Liberman M, Pereira C, Mangueira CL, de Carvalho AE, et al. Circulating osteogenic proteins are associated with coronary artery calcification and increase after myocardial infarction. Plos one. 2018;13(8):1-14.
3. Raggi P. Coronary artery calcification predicts risk of CVD in patients with CKD. Nature Reviews Nephrology. 2017;13(6):324-6.
4. Gustafsson N, Ahlqvist JB, Näslund U, Wester P, Buhlin K, Gustafsson A, et al. Calcified carotid artery atheromas in panoramic radiographs are associated with a first myocardial infarction: a case-control study. Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology. 2018;125(2):199-204.
5. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. Bone. 2016;82:42-9.

6. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, et al. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. Journal of Biological Chemistry. 2008;283(22):15319-27.
7. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2003;23(3):489-94.
8. Guessous I, Bochud M, Bonny O, Burnier M. Calcium, vitamin D and cardiovascular disease. Kidney and Blood Pressure Research. 2011;34(6):404-17.
9. Tantisattamo E, Han KH, O'Neill WC. Increased vascular calcification in patients receiving warfarin. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2015;35(1):237-42.
10. Hartley L, Clar C, Ghannam O, Flowers N, Stranges S, Rees K. Vitamin K for the primary prevention of cardiovascular disease. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2015;(9): CD011148:1-23.
11. Singulani MP, Stringhetta-Garcia CT, Santos LF, Morais SRL, Louzada MJQ, Oliveira SHP, et al. Effects of strength training on osteogenic differentiation and bone strength in aging female Wistar rats. Scientific reports. 2017;7(42878):1-11.
12. Rostamizadeh M, Elmieh A, Rahmani Nia F. Effects of Aerobic and Resistance Exercises on Anthropometric Indices and Osteocalcin, Leptin, Adiponectin Levels in Overweight Men. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2019;22(1):85-95.
13. Keikhosravi F, Daryanoosh F, Koushkie Jahromi M, Nemati J. High-Intensity Interval Training Effects with Genistein on Serum Osteocalcin and Bone Alkaline Phosphatase in Female Elderly Rats. Journal of Nutrition, Fasting and Health. 2021;9(2):125-30.
14. Abdi H, Bolboli L, Afroundeh R, Siahkohian M, Khajehlandi M. The Effect of One Course of Intense Interval Training on Serum Levels of Vitamin D, Heart Rate Variability and Lung Function in Male Smokers: A Quasi-Experimental Study. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2021;20(3):277-96.
15. Doroudgar, S. and C.C. Glembotski, The cardiokine story unfolds: ischemic stress-induced protein secretion in the heart. Trends in molecular medicine, 2011;17(4):207-214.
16. Chiba, A., et al., Cardiomyokines from the heart. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018: 75, 1349–1362.
17. Xi, Y., D.-W. Gong, and Z. Tian, FSTL1 as a potential mediator of exercise-induced cardioprotection in post-myocardial infarction rats. Scientific reports, 2016;6: 32424.
18. Rebholz, C.M., et al., Physical activity reduces salt sensitivity of blood pressure: the Genetic Epidemiology Network of Salt Sensitivity Study. American journal of epidemiology, 2012;176 (S 7): S106-S113.
19. Shendre, A., et al., Influence of regular physical activity on warfarin dose and risk of hemorrhagic complications. Pharmacotherapy, 2014;34(6): 545-554
20. E´tienne Rouleau-Mailloux, Payman Shahabi, Ste´phanie Dumas. Impact of regular physical activity on weekly warfarin dose Requirement. DOI 10.1007/s11239-015-1248-9. J Thromb Thrombolysis (2016) 41:328–335.
21. Hosseini M, Bambaeichi 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.
22. 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]
23. 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]
24. Zhang X, Zhang X, Wang X, Zhao M. Influence of andrographolide on the pharmacokinetics of warfarin in rats. Pharmaceutical biology. 2018;56(1):351-6.
25. 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.
26. 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.
27. Johansson S, Rosengren A, Young K, Jennings E. Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review. BMC Cardiovascular Disorders. 2017;17(53):1-8.
28. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. Nature Reviews Cardiology. 2010;7(9):528-36.
29. Ghasemalipour H, Eizadi M. The effect of aerobic training on some bone formation markers (osteocalcin, alkaline phosphatase) in asthma treated with inhaled corticosteroids. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2018;20(1):1-9.
30. Yardley JE. Fasting may alter blood glucose responses to high-intensity interval exercise in adults with type 1 diabetes: a randomized, acute crossover study. Canadian Journal of Diabetes. 2020;44(8):727-33.

31. Jiang Y, Tan S, Wang Z, Guo Z, Li Q, Wang J. Aerobic exercise training at maximal fat oxidation intensity improves body composition, glycemic control, and physical capacity in older people with type 2 diabetes. Journal of exercise science & fitness. 2020;18(1):7-13.
32. Bowman PR, Smith GL, Gould GW. Run for your life: can exercise be used to effectively target GLUT4 in diabetic cardiac disease? PeerJ. 2021;9:e11485:1-35.
33. Dun Y, Thomas RJ, Smith JR, Medina-Inojosa JR, Squires RW, Bonikowske AR, et al. High-intensity interval training improves metabolic syndrome and body composition in outpatient cardiac rehabilitation patients with myocardial infarction. Cardiovascular diabetology. 2019;18(104):1-11.
34. Morishima Y, Kamisato C, Honda Y, Furugohri T, Shibano T. The effects of warfarin and edoxaban, an oral direct factor Xa inhibitor, on gammacarboxylated (Gla-osteocalcin) and undercarboxylated osteocalcin (uc-osteocalcin) in rats. Thrombosis research. 2013;131(1):59-63.
35. Radulescu D, Stroescu A, Pricop C, Geavlete B, Negrei C, Bratu O, et al. Vitamin K influence on cardiovascular mortality in chronic hemodialysed patients. Rev Chim (Bucharest). 2017;68(1):52-4.
36. Sabrina-Wong-Peixin Haroon B-C, Tai L-HL, Lynette Teo AD, Leon Schurgers B-WT, Priyanka Khatri C-CO, Sanmay Low X-EY, et al. Treatment to reduce vascular calcification in hemodialysis patients using vitamin K (Trevasc-HDK): a study protocol for a randomized controlled trial. Medicine. 2020;99(36): 1-8.
37. Kurnatowska I, Grzelak P, Masajtis-Zagajewska A, Kaczmarska M, Stefańczyk L, Vermeer C, et al. Effect of vitamin K. Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej. 2015;125(9):631-40.
38. Girolami A, Ferrari S, Cosi E, Santarossa C, Randi ML. Vitamin K-dependent coagulation factors that may be responsible for both bleeding and thrombosis (FII, FVII, and FIX). Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 2018;24(9S):42S-7S.
39. McFarlin BK, Henning AL, Venable AS. Oral Consumption of Vitamin K2 for 8 Weeks Associated With Increased Maximal Cardiac Output During Exercise. Alternative Therapies in Health & Medicine. 2017;23(4):26-32.
40. Reid I, Gamble G, Bolland M. Circulating calcium concentrations, vascular disease and mortality: a systematic review. Journal of internal medicine. 2016;279(6):524-40.
41. Barry EL, Mott LA, Melamed ML, Rees JR, Ivanova A, Sandler RS, et al. Calcium supplementation increases blood creatinine concentration in a randomized controlled trial. PloS one. 2014;9(10):e108094.1-9.
42. Bolland MJ, Grey A, Avenell A, Gamble GD, Reid IR. Calcium supplements with or without vitamin D and risk of cardiovascular events: reanalysis of the Women's Health Initiative limited access dataset and meta-analysis. Bmj. 2011;342:1-9.
43. Sultana RN, Sabag A, Keating SE, Johnson NA. The effect of low-volume high-intensity interval training on body composition and cardiorespiratory fitness: a systematic review and meta-analysis. Sports Medicine. 2019;49(11):1687-721.
44. Zhang S-S, Zhou S, Crowley-McHattan ZJ, Wang R-Y, Li J-P. A Review of the Role of Endo/Sarcoplasmic Reticulum-Mitochondria Ca2+ Transport in Diseases and Skeletal Muscle Function. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021;18(8):3874:1-12.
45. Yengo CM, Zimmerman SD, McCormick RJ, Thomas DP. Exercise training post-MI favorably modifies heart extracellular matrix in the rat. Medicine and science in sports and exercise. 2012;44(6):1005-12.
46. Elango K, Javaid A, Khetarpal BK, Ramalingam S, Kolandaivel KP, Gunasekaran K, et al. The Effects of Warfarin and Direct Oral Anticoagulants on Systemic Vascular Calcification: A Review. Cells. 2021;10(4):773: 1-14.

*Original Article*

# Evaluation of the Effect of Warfarin Consumption with Continuous and Interval Training on The Expression of Cardiac Osteocalcin, Vitamin K2 (MK-4) and Serum Calcium in a Model Of Rats With Myocardial Infarction

Received: 20/10/2021 - Accepted: 30/05/2022

Tooran Abbasi[1]
Abdolali Banaeifar[2*]
Sajad Arshadi[3]
Yaser Kazemzadeh[4]

[1] *Ph.D Student in Sports Physiology, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran*
[2] *Associate of Exercise Physiology, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran.*
[3] *Assistant Professor of Exercise Physiology, Islamic Azad University, South Tehran Branch, Tehran, Iran*
[4] *Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Education, Islamic Azad University, Islamshahr Branch, Tehran, Iran.*

Email: alibanaeifar@yahoo.com

**Abstract**

**Introduction:** Exercise can minimize the risk of myocardial infarction (MI) by regulating cellular signaling in the heart and arteries. The aim of this study is to evaluate the effect of warfarin consumption with continuous and interval training on the expression of cardiac osteocalcin gene, vitamin MK-4 and serum calcium in myocardial infarction mice.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 42 male Sprago-Dovali rats (180-120g) were randomly divided into 7 groups: healthy control, myocardial infarction or ischemia (ISC), ISC+interval training, ISC+continuous exercise, ISC+warfarin, ISC+interval training+warfarin and ISC+continuous exercise+warfarin. Induction was induced by subcutaneous isoproterenol. The duration of training was eight weeks, five sessions per week and the dose of warfarin was 0.5 mg/kg per day. Gene values, changes in vitamin K2 and calcium were analyzed by Real time-PCR, ELISA, photometric and data analysis using independent t-test, one-way variance and two-factor variance ($P<0.05$).

**Results:** Disease induction increased the expression of osteocalcin ($p=0.003$), vitamin K2 ($p=0.027$) and calcium ($p=0.001$) genes compared to healthy controls. In the study of osteocalcin gene expression, ischemia+warfarin group with ischemia+EIT ($p=0.014$) and ischemia+ECT ($p=0.007$) and in the study of calcium levels of ischemia group with ischemia+EIT ($p=0.014$), Ischemia+ECT ($p=0.001$) and ischemia+warfarin+ECT ($P=0.013$) were significantly different. Also, the interaction between exercise and drug was not confirmed on any of the variables.

**Conclusion:** It seems that interval and continuous exercise be effective in reducing vascular degradation and calcification after MI by reducing the cardiac osteocalcin and serum calcium and minimizing the side effects of some drugs such as warfarin.

**Key words:** Warfarin, Continuous and interval training, Cardiac osteocalcin gene expression, Vitamin K2(MK-4), Myocardial infarction

**Acknowledgement:** There is no conflict of interest