Physiology and Pharmacology, 18 (4), 445-454

Winter 2015 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Downloaded from ppj.phypha.ir at 17:43 +0430 on Friday May 7th 2021

Effect of exercise training and L-arginine supplementation on oxidative stress and left ventricular function in rats with myocardial infarction

Kamal Ranjbar[1], Afshin Nazari[2], Farzad Nazem[1*]

1. Dept. of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. Dept. of Physiology, Razi Herbal Medicine Research Center, Lorestan University of Medical Sciences. Khoramabad, Iran

Received: 14 Jul 2014 **Accepted: 7 Sept 2014**

Abstract

Introduction: The aim of the present study was to evaluate the effect of exercise training and L-arginine supplementation on oxidative stress and systolic ventricular function in rats with myocardial infarction (MI).

Methods: Four weeks after the surgically-induced MI, 40 male Wistar rats were randomly assigned to the following 4 groups (n=10): MI-sedentary control (Sed); MI-exercise (Ex); MI-sedentary+L-arginine (Sed+LA); and MI-exercise+L-arginine (Ex+LA). The Ex and Ex+LA groups ran for 10 weeks on treadmill. Rats in the L-arginine-treated groups drank water containing 4% L-arginine. Before and after the training program, all subjects underwent resting echocardiography. Also catalase, glutathione peroxidase, malondialdehyde and myeloperoxidase were measured.

Results: cardiac output, stroke volume and fractional shortening in Ex and Ex+LA groups were significantly increased compared to the Sed group. Cardiac systolic function in Ex+LA group was significantly greater than in Ex group. Infarct size was insignificantly reduced in response to exercise. Also, glutathione peroxidase activity was increased while malondialdehyde showed a decrease in response to exercise training, but no effect on myeloperoxidase and catalase was noted. There was no difference in enzyme activity between the training groups.

Conclusion: Exercise training increased LV systolic function by decreasing oxidative stress and increasing antioxidant defense system in rats with myocardial infarction. It appears that L-arginine improves left ventricular function, but has no effect on oxidative stress indices.

Key words: Exercise training, L-arginine, Oxidative stress, Myocardial infarction

* Corresponding author e-mail: Farzadnazem1@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

Downloaded from ppj.phypha.ir at 17:43 +0430 on Friday May 7th 2021

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۸ (٤)، ٤٤٥ – ٤٥٤
زمستان ۱۳۹۳

فیزیولوژی و فارماکولوژی

تاثیر تمرینات ورزشی و مکمل ال- آرژنین بر استرس اکسیداتیو و عملکرد بطن چپ در موش‌های با انفارکتوس قلبی

کمال رنجبر[۱]، افشین نظری[۲]، فرزاد ناظم[۱*]
۱. گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه بو علی سینا، همدان
۲. گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد

دریافت: ۲۳ تیر ۹۳ پذیرش: ۱۶ شهریور ۹۳

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه تاثیر تمرینات ورزشی همراه با مصرف مکمل ال- آرژنین بر استرس اکسیداتیو و عملکرد سیستولیک در بافت قلبی موش‌های صحرایی با انفارکتوس قلبی می‌باشد.

روش ها: ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار، چهار هفته بعد از انفارکتوس قلبی به صورت کاملاً تصادفی در چهار گروه کنترل (Sed، n=۱۰)، گروه ال-آرژنین (Sed+LA، n=۱۰)، گروه تمرینی (Ex، n=۱۰) و گروه تمرینی همراه با مصرف مکمل ال-آرژنین (Ex+LA ، n=۱۰) تقسیم‌بندی شدند. گروه Ex و گروه Ex+LA به مدت ۱۰ هفته فعالیت هوازی دویدن بر روی تردمیل را انجام دادند. همچنین ال-آرژنین به صورت محلول در آب (۴٪) در اختیار آزمودنی‌ها قرار گرفت. قبل و بعد از دوره تمرینی اکوکاردیوگرافی از آزمودنی‌ها به عمل آمد. میزان آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز، مالون دی‌آلدهید و میلوپراکسیداز مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

یافته ها: میزان برون‌ده قلب، حجم ضربه‌ای و درصد کوتاه شدن لیف‌های عضلانی در گروه‌های تمرینی به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرد. عملکرد سیستولیک بطن در گروه تمرین با مصرف مکمل ال-آرژنین بیشتر از گروه تمرینی بود. اندازه ناحیه انفارکتوس در پاسخ به تمرین به صورت غیرمعناداری کاهش یافت. همچنین میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در پاسخ به فعالیت بدنی افزایش و میزان مالون دی‌آلدهید کاهش یافت، اما تأثیری بر کاتالاز و میلوپراکسیداز نداشت. تفاوتی در فعالیت آنزیم‌ها بین گروه‌های تمرینی مشاهده نشد.

نتیجه گیری: فعالیت بدنی عملکرد سیستولیک بطن چپ را به وسیله کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در موش‌های با انفارکتوس قلبی بهبود می‌دهد. همچنین به نظر می‌رسد که ال-آرژنین موجب بهبود عملکرد بطن چپ می‌شود اما تأثیری بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو ندارد.

واژه‌های کلیدی: تمرینات هوازی، ال-آرژنین، استرس اکسیداتیو، انفارکتوس قلبی

مقدمه

انفارکتوس قلبی عامل اصلی مرگ و میر در دنیا می‌باشد [۲۶]. مشخصه بارز انفارکتوس قلبی کاهش عملکرد سیستولیک بطن چپ می‌باشد. مطالعات قبلی نشان دادند که فشار اکسایش نقش مهمی را در پاتوژنز میوکارد و اختلالات عملکردی بطن چپ بعد از انفارکتوس قلبی ایفا می‌کند [۲۶].

کم خونی نسبی در نواحی انفارکته شده موجب فعال شدن سیستم آنزیمی "اگزانتین اکسیداز" و NADPH اکسیداز می‌شود. NADPH اکسیداز که از $gp91^{phox}$ و $p22^{phox}$ تشکیل شده است منابع اصلی تولید کننده رادیکال آزاد در قلب انفارکته شده می‌باشد [۲۴]. فعالیت این سیستم‌ها در نهایت رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروژن پراکسیداز را تولید

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Farzadnazem1@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که انفارکتوس قلبی از طریق تولید رادیکال‌های آزاد منجر به آسیب رساندن به سلول‌های میوکارد می‌شود و در نهایت باعث اختلال در عملکرد سیستولیک بطن چپ می‌شود. عضله قلبی در پاسخ به رادیکال‌های آزاد به دلیل اکسیژن مصرفی بالا و سیستم آنتی اکسیدانی ضعیف آسیب پذیر می‌باشد[۳]. رادیکال‌های آزاد موجب اکسایش چربی، پروتئین، DNA (به ویژه در میتوکندری) و هم چنین غیر فعال شدن آنزیم و اختلال در غشا زیستی می‌شوند. رادیکال‌های آزاد می‌توانند از طریق آسیب به لیزوزم ها و دیواره آن‌ها باعث فعال شدن آنزیم‌های غیر فعال و تخریب سلول می‌شود و در نتیجه بسیاری از اعمال حیاتی سلول تحت تاثیر قرار می‌گیرد. ساختار غشای سلولی به نحوی است که حاوی لیپیدهای غیر اشباع با پیوندهای دوگانه بوده و این پیوندها از سوی رادیکال‌های آزاد مورد هجوم قرار می‌گیرند، که در نهایت منجر به سستی و گسست پیوندهای هیدروژنی می‌گردد [۷]. با گسستن پیوند بین مولکول‌های غشا، آنزیم‌های متصل به غشا نیز متعاقباً از کار افتاده و فعالیت سلول دچار اختلال می‌شود. همچنین آسیب به DNA منجر به مرگ سلول (هم از طریق آپوپتوسیس و هم نکروز) می‌شود و از این طریق منجر به ایجاد اختلال در عملکرد سیستولیک بطن چپ می‌شود [۲۳].

از طرفی سلول‌های قلب دارای دو مکانیسم دفاعی آنزیمی و غیر آنزیمی برای به تعادل کشاندن استرس اکسیداتیو می‌باشد. سوپر اکسید یکی از مهم‌ترین علل استرس اکسیداتیو می‌باشد و سه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز عمده‌ترین آنزیم‌های آنتی اکسیدانی برای از بین بردن سوپر اکسید و تبدیل آن به هیدروژن پر اکسید و در نهایت تبدیل به آب و مولکول اکسیژن می‌باشد. در همین راستا در سال ۲۰۱۴ نشان داده شده است که در پاسخ به انفارکتوس قلبی استرس اکسیداتیو همراه با افزایش میزان تولید مالون دی الدهید و کاهش مقدار گلوتاتیون پراکسیداز، افزایش می‌یابد[۶].

همچنین گزارش شده است که ال-آرژنین از تغییرات بطن چپ پس از انفارکتوس قلبی محافظت می‌کند. نیتریک اکساید (NO) و رادیکال‌های آزاد نقش مهمی را در تغییرات بطن چپ پس از انفارکتوس قلبی ایفا می‌کنند. NO که یک متسع کننده عروق است موجب کاهش مقاومت عروق و افزایش جریان خون در قلب می‌شود. در همین راستا پراتیما و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که ال-آرژنین از طریق افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و کاهش تولید رادیکال‌های آزاد موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود [۲۱]. شدت استرس اکسیداتیو و آسیب‌های ناشی از آن در قلب انفارکته شده بستگی به عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی قلب دارد [۱۸].

در همین راستا نشان داده شده است که تمرینات ورزشی موجب بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی و کاهش آسیب‌های بافتی ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شود. به علاوه نشان داده شده است که تمرینات ورزشی عملکرد بطن چپ را بهبود می‌بخشند. اما هنوز مشخص نیست که آیا بهبود عملکرد بطن چپ در پاسخ به فعالیت ورزشی ناشی از بازسازی سیستم جاذب رادیکال‌های آزاد توسط آنزیم‌های موضعی می‌باشد یا نه؟

بنابراین هدف از این مطالعه تاثیر تمرینات ورزشی همراه با مصرف مکمل ال آرژنین (به عنوان پیش‌ساز NO) بر شاخص‌های سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و شاخص‌های استرس اکسیداتیو میلوپراکسیداز (MPO) و مالون دی الدهید (MDA) و ارتباط آن‌ها، با عملکرد سیستولیک بطن چپ و اندازه ناحیه انفارکتوس در موش‌های با انفارکتوس قلبی می‌باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه از۴۰ سر موش صحرایی ۶ تا ۸ هفته ای (۲۰۰-۱۸۰ گرمی) نر ویستار که از مرکز تحقیقات انستیتو پاستور خریداری شده بودند، استفاده شد. موش‌ها در آزمایشگاه استاندارد جوندگان (چرخه ۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی و درجه حرارت۲±۲۲) دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. به منظور اطمینان از سازگاری موش‌ها با دویدن بر روی تردمیل، یک هفته قبل از آغاز جراحی موش‌ها سه جلسه (هر جلسه ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه) تمرین کردند. موش‌هایی که قادر به دویدن بر روی تردمیل نبودند از آزمون خارج شدند.

ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی تیوپنتال سدیم

Downloaded from ppj.phypha.ir at 17:43 +0430 on Friday May 7th 2021

Downloaded from ppj.phypha.ir at 17:43 +0430 on Friday May 7th 2021

جدول ۱- مشخصات موش‌ها در گروه‌های مختلف

	Sed	Sed+LA	Ex	Ex+LA
N	10	10	10	10
Age (Week)	6-8	6-8	6-8	6-8
Heart Rate (bpm)	370±35	392±31	364±41	357±19
Heart Weight (g)	1.06±0.14	1.35±0.17	1.28±0.21	1.03±0.20
Body Weight (g)	356±41	352±24	321±19	332±38
Heart Weight / Body Weight	0.003±0.002	0.003±0.01	0.003±0.001	0.003±0.001

داده‌ها به صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

(۵۰mg/kg ip) بیهوش شدند. ناحیه قفسه سینه آن کاملاً تراشیده شده و بر روی تخت جراحی قرار داده شد و ۲۰۰U/kg هپارین تزریق گردید. گردن حیوان طوری قرار داده می‌شد تا دست یابی به نای برای انتوبه کردن تسهیل شود. بعد از انتوبه کردن، حیوان به دستگاه ونتیلاتور (Small Animal Ventilator, Harvard Model 683-USA) متصل گردید. سپس برشی بر روی قفسه سینه در فضای بین دنده‌ای چهارم چپ ایجاد کرده تا قلب در معرض دید قرار بگیرد. لازم به ذکر است که در این مرحله باید با دقت برش اعمال می‌گردید تا به ریه چپ و یا قلب آسیبی نرسد. سپس پریکارد را به آرامی پاره کرده و نخ سیلک ۶/۰ با دقت از زیر شریان کرونری قدامی نزولی چپ[1] (LAD) عبور داده می‌شد. کشیدن و بستن نخ موجب ایسکمی دائمی می‌شد. جهت اطمینان از انفارکته شدن موش از ثبت لید II الکتروکاردیوگرام دستگاه پاورلب استفاده شد (HARVARD - USA). دمای بدن حیوان در حین عمل جراحی به وسیله پد حرارتی در دامنه ۱±۳۷ درجه سانتیگراد حفظ می‌شد. بعد از به هوش آمدن کامل حیوانات در قفس قرار گرفته و آب و غذا در اختیارشان قرار داده شد و به حیوانخانه منتقل می‌شدند. چهار هفته پس از انفارکتوس قلبی موش‌ها وارد پروتکل تمرینی می‌شدند.

چهار هفته بعد از عمل جراحی، موش‌هایی که زنده مانده بودند به صورت کاملاً تصادفی در چهار گروه کنترل (Sed، n=۱۰)، گروه ال-آرژنین (Sed+LA، n=۱۰)، گروه تمرینی (Ex، n=۱۰)، و گروه تمرینی همراه با مصرف مکمل ال-آرژنین (Ex+LA ، n=۱۰) تقسیم بندی شدند. مشخصات موش‌ها در گروه‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. موش‌هایی که در گروه تمرینی قرار گرفتند چهار هفته پس از انفارکتوس قلبی فعالیت خود را با دویدن بر روی تردمیل به مدت ۱۰ هفته، هر هفته ۵ جلسه و هر جلسه ۵۰ دقیقه با سرعت ۱۷ متر بر دقیقه شروع کردند. در حالی که گروه کنترل انفارکتوس و گروه ال-آرژنین در طول کل دوره آزمایش هیچ گونه فعالیت ورزشی نداشتند. برای سازگاری تدریجی با فعالیت ورزشی، جلسات هفته اول به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه بود. مدت و شدت تمرین به تدریج افزایش پیدا کرد تا به ۵۰ دقیقه در جلسه و سرعت ۱۷ متر بر دقیقه رسید (هفته پنجم). این شدت تا هفته دهم تمرین ثابت ماند [۱۵].

اندازه گیری‌های اکوکاردیوگرافی یک روز قبل از شروع تمرین و یک روز بعد از ده هفته تمرین به وسیله دستگاه اکوکاردیوگرافی M-Mode (GE-VIVID-7, Version-5, USA) مجهز به ترانس دیوسر ۱۰MHz و در نمای محور بلند قلب به دست آمد. اندازه‌گیری و محاسبه پارامترهای مختلف اکوکاردیوگرافی بر اساس پیشنهادات انجمن کاردیوگرافی امریکا انجام گرفت و تمام اندازه‌گیری‌ها توسط یک نفر متخصص صورت گرفت. اندازه پایان دیاستولی بطن چپ (LVEDd)، اندازه پایان سیستولی بطن چپ (LVESd)، حجم پایان دیاستولی بطن چپ (LVEDV)، حجم پایان سیستولی بطن چپ (LVESV)، حجم ضربه‌ای (SV=[LVEDV-LVESV])، درصد کوتاه شدن لیف‌های عضلانی (FS(%)=[(LVEDd−LVESd)/LVEDd]×100)، کسر تخلیه (EF=(LVEDV−LVESV)/LVEDV) و برون

1. Left Anterior Descending Coronary Artery

Downloaded from ppj.phypha.ir at 17:43 +0430 on Friday May 7th 2021

ده قلب (HR×SV[1]) مورد اندازه‌گیری قرار گرفته شد. لازم به ذکر است که مقادیر به دست آمده سه مرتبه اندازه‌گیری شدند و میانگین آنها ثبت گردید.

در گروه‌هایی که ال-آرژنین مصرف می‌کردند، به میزان ۴ گرم ال-آرژنین (L-Arginine, A5006, Sigma-Aldrich-USA) در هر ۱۰۰ میلی لیتر آب مصرفی موش‌ها که به صورت آزادانه در دسترس آن‌ها قرار داشت، حل شد [۲۰].

بلافاصله پس از اندازه گیری اکوکاردیوگرافی متعاقب تمرینات ورزش هوازی (هفته ۱۴ بعد از انفارکتوس قلبی) آزمودنی‌ها با تزریق دوز بیشتر تیوپنتال سدیم به صورت داخل صفاقی به طور عمیق بیهوش شدند، سپس ۲/۵ میلی لیتر از محلول اوانس بلو ٪ ۲ از ورید فمورال تزریق شد تا ناحیه ایسکمی (قرمزرنگ) از ناحیه سالم (آبی رنگ) متمایز گردد. در نهایت تحت بیهوشی عمیق، قلب حیوان جدا شد. پس از شستشو با آب مقطر و جدا کردن دهلیزها، ریشه عروق و ضمائم اضافی قلب، در داخل فویل آلومینیومی پیچیده و تا روز بعد آنالیز، داخل فریزر قرار گرفت. پس از خارج کردن قلب از دستگاه فریزر با کمک قالبهای مدرج، اندازه برش‌های ۲ میلی متری از بطن چپ (از قاعده به طرف آپکس) تهیه شد.

ابتدا ظرف محتوی محلول تترازولیوم داخل ظرف بن ماری تحت دمای ۳۷ درجه سیلویوس قرار داده شد. سپس ناحیه ایسکمی به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه داخل بن ماری غوطه‌ور گردید. برای رنگ آمیزی مناسب و یکنواخت، محلول محتوی بافت قلبی بطور متناوب بهم زده شد. تترازولیوم با عبور از دیواره سلولی و واکنش با آنزیم‌های دهیدروژناز درون سلولی در بافت ایسکمی (زنده) سبب می شد که این نواحی به رنگ قرمز تیره ایسکمیک متمایل شود. اما نواحی انفارکته به دلیل نکروزه شدن و از دست دادن آنزیم‌های دهیدروژناز درون سلولی نمی‌توانستند با تترازولیوم واکنش نشان دهند و به همین دلیل این نواحی به رنگ زرد متمایل به سفید در می‌آیند. برای افزایش کنتراست ناحیه قرمز تیره و زرد متمایل به سفید، برش‌ها به مدت ۴۸ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند. پس از این مدت، از بافت‌ها اسکن تهیه شد .آنگاه با کمک نرم افزار فتوشاپ، سطوح ناحیه نکروزه یا انفارکته (رنگ پریده) بصورت درصدی از بطن چپ انفارکته شده (IS/LV %) محاسبه گردید. سپس نمونه های بافت قلب ناحیه غیر انفارکته شده در داخل نیتروژن مایع قرار داده شد. در روز آزمایش، بافت‌های منجمد شده به دقت توزین، و به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنیزه شده، سپس نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰ گرم و ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند.

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از کیت راندوکس و به روش برادفورد اندازه‌گیری شد [۴]. در این روش گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) موجود در مایع رویی هموژنای بافت قلب اکسیداسیون گلوتاتیون (GSH) را به وسیله، کومن هیدروپراکسید (ROOH) کاتالیز می‌کند. در حضور گلوتاتیون ردکتاز (GR) و NADPH، گلوتاتیون اکسید شده (GSSH) همزمان با اکسایش NADPH به $NADP^+$ به شکل احیا شده آن بر می‌گردد. در طی این واکنش کاهش میزان جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. میزان فعالیت GPx بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین بافتی (U/mgProtein) ثبت شد.

میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز در بافت میوکارد غیر انفارکتوس شده بطن چپ بر اساس توانایی آن در تجزیه H_2O_2 به روش Aebi مورد اندازه‌گیری قرار گرفت [۲]. در این روش از پراکسید هیدروژن ۳۰ mM به عنوان سوبسترا و از بافر فسفات ۵۰ mM با (pH= ۷) به عنوان جایگزین سوبسترا در محلول بانک استفاده شد. محلول سنجش محتوی ۲ میلی لیتر محلول هموژنای بافتی و ۱ میلی لیتر محلول پراکسید هیدروژن بود. واکنش با افزودن H_2O_2 شروع شده و کاهش جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰nm در ثانیه‌های صفر، ۳۰ و ۶۰ یادداشت گردید. ۰/۰۱ واحد کاهش جذب نوری به عنوان یک واحد آنزیمی در شرایط فوق تعریف شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

تعیین پراکسیداسیون لیپید برای ارزیابی آسیب‌های اکسایشی ضروری به نظر می‌رسد. پراکسیداسیون لیپید منجر به تولید مالون دی الدهید (MDA) می‌شود. MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در بافت میوکارد مورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان MDA در بافت میوکارد غیر انفارکتوس

1. Heart Rate

Downloaded from ppj.phypha.ir at 17:43 +0430 on Friday May 7th 2021

شده بطن چپ مورد اندازه گیری قرار گرفت. ابتدا نمونه های بافتی به طور دقیق وزن و هموژن شدند سپس بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر[1] میزان میوکاردی MDA به روش اوچیاما مورد اندازه گیری قرار گرفت [۲۲]. مالون دی الدهید با اسید تیوباربیتوریک[2] (TBA) کمپلکس رنگی تولید می‌کند که در طول موج ۵۳۲ نانومتر جذب نوری دارد. از تترامتوکسی پروپان به عنوان ماده استاندارد استفاده شد. برای این منظور در لوله‌های در پیچ دار مقدار ۱۲۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های استاندارد و نمونه ریخته به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سدیم دودسیل سولفات (SDS)، ۶۰۰ میکرولیتر محلول TBA اضافه شد. پس از یک ساعت نگهداری در حمام آب جوش، لوله‌ها را خنک کرده و به هر یک ۱ میلی لیتر مخلوط بوتانل-پیریدین (به نسبت ۱ به ۱۵) اضافه کرده ، پس از هم زدن فاز رویی حاوی کمپلکس صورتی رنگ را با سانتریفیوژ کردن جدا کرده و جذب نوری آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه گرفته شد [۲۲]. مقادیر مالون دی الدهید بر حسب نانومول در میلی گرم پروتئین (nm/mg protein) ثبت و بیان شد.

میلوپراکسیداز به روش تعدیل شده O-dianisidine صورت گرفت. در این روش مخلوط شامل ۰/۳ میلی لیتر بافر سدیم فسفات، ۰/۳ میلی لیتر H_2O_2 ، ۰/۲ میلی لیتر O-dianisidine با آب مقطر به حجم نهایی ۰/۳ میلی لیتر می‌رسد. واکنش با اضافه کردن ۰/۰۲۵ میلی لیتر نمونه‌ها به مخلوط شروع می‌شود و تغییر در جذب نوری در طول موج ۴۶۰ نانومتر ثبت شد [۱۳]. مقادیر میلوپراکسیداز بر حسب نانومول در میلی‌گرم پروتئین (nm/mg protein) ثبت و بیان شد.

بعد از اثبات نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Shapiro-wilk، برای نشان دادن اختلاف بین گروهی از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و پست تست توکی با سطح معناداری P< ۰/۰۵ استفاده شد. داده‌ها به صورت Mean ± SD گزارش شد.

1. spectrophotometer
2. Thiobarbitoric Acid

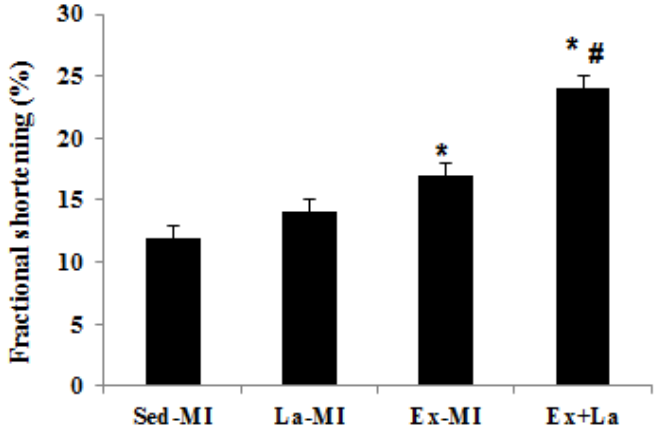
یافته ها

آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که مصرف مکمل ال-آرژنین همراه با تمرینات ورزشی میزان حجم پایان سیستولی را نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کاهش می‌دهد (P=۰/۰۴). همچنین میزان کسر تخلیه در گروه مصرف مکمل همراه با تمرینات ورزشی نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش پیدا کرد (P= ۰/۰۰۱). در همین راستا نتایج نشان داد که مقادیر برون ده قلب، حجم ضربه ای و درصد کوتاه شدن لیف‌های عضلانی در گروه مصرف مکمل ال-آرژنین همراه با تمرینات ورزشی به طور معناداری نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش پیدا کرد (شکل ۱و۲) (P<۰/۰۵). لازم به ذکر است که میزان افزایش حجم ضربه‌ای، برون ده قلب و درصد کوتاه شدن لیف‌های عضلانی نسبت به گروه تمرینی بیشتر بود. همچنین اندازه ناحیه انفارکتوس در پاسخ به تمرینات ورزشی با و بدون مصرف ال-آرژنین نسبت به گروه کنترل به طور نامعناداری کاهش پیدا کرد (P= ۰/۰۷) (جدول ۲).

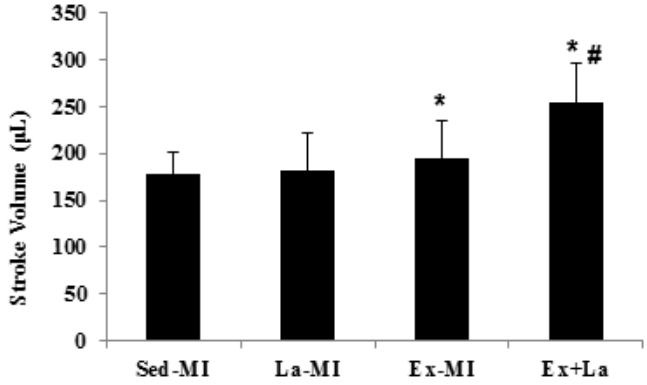
در همین راستا نتایج نشان داد که مقادیر شاخص‌های آنتی اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز در بین گروه‌ها به طور معناداری متفاوت بود (P=۰/۰۳، F= ۴/۱۶). میزان GPx در گروه‌های تمرینی با مصرف و بدون مصرف مکمل به طور معناداری افزایش پیدا کرده بود (P= ۰/۰۲). اختلاف معناداری بین گروه تمرینی و گروه تمرینی با مصرف مکمل وجود نداشت. این در حالی بود که در گروه مصرف مکمل ال-آرژنین نسبت به گروه کنترل تغییر نکرده بود (P= ۰/۳). برخلاف GPx، مقادیر کاتالاز در بین گروه‌های مختلف، تفاوت معناداری نداشت (P= ۰/۸، F= ۰/۳۳).

از طرفی میزان شاخص استرس اکسیداتیو مالون دی الدهید در بین گروه‌ها مورد مطالعه متفاوت بود (P=۰/۰۴، F= ۵/۲۷). میزان MDA در گروه‌های تمرینی (Ex , Ex+LA) به طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت (P=۰/۰۰۱). میزان MDA بین گروه‌های تمرینی اختلاف معناداری نداشت. در همین راستا ال- آرژنین تأثیری بر میزان MDA نداشت. اما دیگر شاخص استرس اکسیداتیو یعنی میزان میلوپراکسیداز بین گروه های مختلف

Downloaded from ppj.phypha.ir at 17:43 +0430 on Friday May 7th 2021



شکل ۱- * نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه Sed، # نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه Ex، داده‌ها به صورت Mean ± SD گزارش شده است.



شکل ۲- * نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه Sed، # نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه Ex، داده‌ها به صورت Mean ± SD گزارش شده است.

جدول ۲- تغییرات بطن چپ در ۱۴ هفته بعد از انفارکتوس شدید قلبی

	Sed	Sed+LA	Ex	Ex+LA
LVEDd(mm)	10.74±0.8	11.36±0.3	10.08±0.23	10.36±0.41
LVESd(mm)	9.35±0.13	9.76±0.21	8.25±0.17	8.01±0.18
LVEDV(µL)	650±68	745±43	564±48	609±61
LVESV(µL)	463±51	529±83	370±61*	348±44*
EF (%)	30±3	28±5	36±4*	38±7*
CO(ml/min)	62±09	66±18	71±11*	84±21*#
Infarct Size (%)	33	31	30	27

* نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه Sed، # نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه Ex ، داده‌ها به صورت Mean ± SD گزارش شده است.

تفاوت معناداری نداشت (P= ۰/۰۷، F= ۳/۳) (جدول ۳).

بحث

در این پژوهش نشان داده شد که مصرف مکمل ال-آرژنین همراه با تمرینات ورزشی بعد از انفارکتوس قلبی میزان کسر تخلیه، میزان درصد کوتاه شدن لیف‌های عضلانی، حجم ضربه‌ای و برون ده قلب را به طور معناداری بهبود می‌بخشد. همچنین میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در گروه‌های تمرینی افزایش و میزان مالون دی آلدهید کاهش می‌یابد. این تغییرات نشان می‌دهد که تمرینات ورزشی همراه با مصرف مکمل-ال آرژنین تأثیرات مفیدی را بر عملکرد سیستولیک بطن چپ به وسیله افزایش مقادیر فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش مالون دی الدهید موجب می‌شود. داده‌های این

Downloaded from ppj.phypha.ir at 17:43 +0430 on Friday May 7th 2021

جدول ۳- تغییرات شاخص های انتی اکسیدانی و استرس اکسیداتیو در ۱۴ هفته بعد از انفارکتوس قلبی

	Sed	Sed+LA	Ex	Ex+LA
Antioxidant defense systems				
GPx (U/mg protein)	214±84	210±77	233±15*	250±27*
CAT (U/mg protein)	8.2±2.4	7.4±2.0	5.5±4.1	7.4±0.2
Oxidative stress indices				
MDA (nmol/mg protein)	85.19±9.06	76.64±15.89	52.2±11.5*	46.47±12.3*
MPO (nmol/mg protein)	7.7±2.6	6.9±4	11.2±1.5	19±11.3

* نشانه اختلاف معنادار نسبت به گروه Sed، داده ها به صورت Mean ± SD گزارش شده است.

پژوهش بینش بیشتری را در مورد مکانیسم اساسی بهبود میزان مرگ و میر بعد از انفارکتوس قلبی در پاسخ به تمرینات ورزشی ارائه می‌دهد.

چهار یافته اصلی در این پژوهش وجود دارد. اول اینکه عملکرد سیستولیک بطن چپ در پاسخ به مصرف مکمل همراه با تمرینات ورزشی بهبود می‌یابد. دوم اینکه میزان فعالیت آنزیم انتی اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز در پاسخ به تمرینات ورزشی همزمان با مصرف و بدون مصرف مکمل ال-آرژنین افزایش می‌یابد. سوم، میزان مالون دی الدهید در پاسخ به ورزش همزمان با مصرف و بدون مصرف مکمل ال-آرژنین کاهش می‌یابد. چهارم اینکه ال-آرژنین تأثیری بر شاخص‌های استرس اکسایشی نداشت.

از طرفی میلوپراکسیداز که یک آنزیم التهابی مشتق از ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها می‌باشند در بین گروه‌های تمرینی متفاوت نبود. میلوپراکسیداز موجب تولید رادیکال‌های آزاد، کاهش NO در دسترس و اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال می‌شود. رادیکال‌های آزاد حاصل از میلوپراکسیداز منجر به تغییر چربی‌ها، لیپوپروتئین ها و پروتئین می‌شود [۱۰].

در ارتباط با میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و عملکرد سیستولیک بطن چپ در بافت قلبی انفارکتوس شده مطالعات محدودی صورت گرفته است به طوری که سطح این شاخص‌ها در بافت قلبی انفارکتوس شده به طور دقیق مشخص نشده است. در همین راستا نتایج این تحقیق در راستای یافته های Xiaohua Xu و همکاران در سال ۲۰۱۰ است که نشان دادند ۸ هفته تمرین هوازی همراه با مصرف مکمل ۲٪ ال-آرژنین در موش‌های انفارکته شده عملکرد سیستولیک بطن چپ را از طریق کاهش استرس اکسایشی ناشی از افزایش فعالیت کاتالاز و عدم تغییر گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز بهبود می‌بخشد. همچنین در این تحقیق نیز نشان داده شد که ال-آرژنین به تنهایی تأثیری بر عملکرد بطن چپ و شاخص‌های آنتی اکسیدانی ندارد [۲۴]. اما یافته‌های این تحقیق مخالف با نتایج Wan-teng و همکاران در سال ۲۰۰۵ است که نشان دادند مصرف مکمل ۲٪ ال-آرژنین مانع از تولید MPO ریه در پاسخ به فعالیت می‌شود [۱۶]. رادیکال‌های آزاد که شامل سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل می‌باشد در مقادیر پایین به عنوان مولکول‌های سیگنالی عمل می‌کند. اما زمانی که مقادیر رادیکال‌های آزاد افزایش پیدا می‌کنند تأثیرات زیانباری را از جمله مرگ سلول را موجب می‌شوند. هیل و سیگنال کاهش معناداری را در آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و افزایش NADPH اکسیداز را در میوکارد انفارکته شده گزارش کردند [۸، ۹].

مطالعات اخیر نشان دادند که مزایای آنتی اکسیدانی ناشی از تمرینات ورزشی در بیماران با نارسایی قلبی از طریق کاهش NADPH اکسیداز و تقویت آنزیم‌های جذب کننده رادیکال-های آزاد می‌باشد [۱، ۱۷] در همین راستا یاماشیتا و همکاران [۲۵] و براون و همکاران [۵] نشان دادند که تمرینات ورزشی میزان سوپراکسید دیسموتاز میوکارد و بهبودی میزان آسیب ناشی از ایسکمی-پرفیوژن را در موش‌های انفارکته شده افزایش می‌دهد.

به نظر می‌رسد که تمرینات ورزشی منجر به افزایش ۱۰ تا ۲۰ برابری اکسیژن مصرفی می‌شود که این منجر به تولید فاکتورهای درون‌زاد مانند سایتوکین‌ها، TNF-α،

کورتیکواستروتئیدها و آدنوزین می‌شود. این فاکتورها به عنوان تنظیم کننده سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شناخته شده‌اند [۱۲]. از طرفی تمرینات ورزشی از طریق افزایش NF-kB موجب افزایش نسخه بردای آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که فقط آنزیم‌های انتی‌اکسیدانی مشخصی در پاسخ به تمرینات ورزشی افزایش می‌یابد. این تغییرات آنزیم های آنتی اکسیدانی در پاسخ به ورزش ناشی از تفاوت در مدت و شدت ورزش می‌باشد [۱۲، ۲۴].

در این تحقیق نشان داده شد که ال-آرژنین تأثیری بر میزان شاخص‌های آنتی اکسیدانی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو ندارد. این در حالی بود که در گروه تمرین کرده همراه با مصرف مکمل ال-آرژنین میزان بهبود عملکرد بطن چپ بیشتر از گروه تمرینی بدون مصرف مکمل بود. این نتایج نشان می‌دهد که ال-آرژنین احتمالاً از طریق سایر مکانیسم‌های محتمل دیگر مانند توسعه سیستم خونرسانی و کاهش فیبروزی شدن بطن چپ ناشی از ایسکمی، در بهبود عملکرد سیستولیک نقش داشته باشد. مطالعات نشان می‌دهند که نقش حفاظتی ال-آرژنین ناشی از تولید NO می‌باشد [۱۶]. در همین راستا سوزا-کوستا و همکاران نشان دادند که ال-آرژنین از طریق NO به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند. NO موجب برداشت یون سوپراکسید و کاهش فعالیت گزانتین اکسیداز می‌شود [۱۹]. این در حالی است که در حضور L-NAME این نقش حفاظتی از بین رفت که این نتایج نشان می‌دهد که ال-آرژنین از طریق کاهش میزان اگزانتین اکسیداز مانع از آسیب سلولی می‌شود [۱۱، ۱۴].

به طور خلاصه در این مطالعه نشان داده شد که تمرینات ورزشی بعد از انفارکتوس قلبی به وسیله افزایش فعالیت آنزیم‌های انتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکال‌های آزاد نقش مهمی را در بازسازی بطن چپ و بهبود عملکرد سیستولیک بطن چپ بازی می‌کند.

سپاسگزاری

انجام این پروژه در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی خرم آباد صورت گرفت. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از ریاست و همکاران محترم این مرکز اعلام می‌دارند.

References

[1] Adams V, Linke A, Kränkel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R, Impact of regular physical activity on the nad (p) h oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. ***Circulation*** 111 (2005) 555-562.

[2] Aebi H, Catalase in vitro. ***Methods Enzymol*** 105 (1984) 121-126.

[3] Ahmadiasl N, Soufi FG, Alipour M, Bonyadi M, Sheikhzadeh F, Vatankhah A, Salehi I, Mesgari M, Effects of age increment and 36-week exercise training on antioxidant enzymes and apoptosis in rat heart tissue. ***J Sports Sci Med*** 6 (2007) 243.

[4] Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal Biochem*** 72 (1976) 248-254.

[5] Brown DA, Jew KN, Sparagna GC, Musch TI,Moore RL, Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. ***J Appl Physiol*** 95 (2003) 2510-2518.

[6] Evran B, Karpuzoğlu H, Develi S, Kalaz EB, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S,Uysal M, Effects of carnosine on prooxidant–antioxidant status in heart tissue, plasma and erythrocytes of rats with isoproterenol-induced myocardial infarction. ***Pharmacol Rep*** 66 (2014) 81-86.

[7] Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S,Floyd RA, Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. ***Free Radical Biol Med*** 28 (2000) 1456-1462.

[8] Hill MF,Singal PK, Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. ***Am J Pathol*** 148 (1996) 291-300.

Downloaded from ppj.phypha.ir at 17:43 +0430 on Friday May 7th 2021

Downloaded from ppj.phypha.ir at 17:43 +0430 on Friday May 7th 2021

[9] Hill MF,Singal PK, Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. ***Circulation*** 96 (1997) 2414-2420.

[10] Ho E, Karimi Galougahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA, Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. ***Redox Biol*** 1 (2013) 483-491.

[11] Huang CC, Lin TJ, , Lu YF, Chen CC, Protective effects of l-arginine supplementation against exhaustive exercise-induced oxidative stress in young rat tissues. ***Chin J Physiol*** 52 (2009) 306-315.

[12] Husain K,Hazelrigg SR, Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: Effect of regular exercise on the heart. ***BBA Mol* Basis *Dis*** 1587 (2002) 75-82.

[13] Kurutas EB, Arican O,Sasmaz S, Superoxide dismutase and myeloperoxidase activities in polymorphonuclear leukocytes in acne vulgaris. ***Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*** 14 (2005) 39-42.

[14] Lass A, Suessenbacher A, Wölkart G, Mayer B, Brunner F, Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by l-arginine. ***Mol Pharmacol*** 61 (2002) 1081-1088.

[15] Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, Zincarelli C, Sanzari E, Ciccarelli M, Galasso G, Exercise promotes angiogenesis and improves β-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. ***Cardiovasc Res*** 78 (2007) 385-394.

[16] Lin WT, Yang SC, Chen KT, Huang CC, Lee NY, Protective effects of l-arginine on pulmonary oxidative stress and anti-oxidant defenses during exhaustive exercise in rats. ***Acta Pharmacol Sin*** 26 (2005) 992-999.

[17] Linke A, Adams V, Schulze PC, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, Möbius-Winkler S, Schubert A, Schuler G,Hambrecht R, Antioxidative effects of exercise training in patients with chronic heart failure increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. ***Circulation*** 111 (2005) 1763-1770.

[18] Sadowska-Krępa E, Kłapcińska B, Jagsz S, Sobczak A, Chrapusta SJ, Chalimoniuk M, Grieb P, Poprzęcki S, Langfort J, High-dose testosterone propionate treatment reverses the effects of endurance training on myocardial antioxidant defenses in adolescent male rats. ***Cardiovasc Toxicol*** 11 (2011) 118-127.

[19] Souza-Costa DC, Zerbini T, Metzger IF, Rocha JBT, Gerlach RF,Tanus-Santos JE, L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. ***Nitric Oxide*** 12 (2005) 9-14.

[20] Suzuki J, Microvascular angioadaptation after endurance training with l-arginine supplementation in rat heart and hindleg muscles. ***Exp Physiol*** 90 (2005) 763-771.

[21] Tripathi P, Pandey S, L-arginine attenuates oxidative stress condition during cardiomyopathy. ***Indian J Biochem Biophys*** 50 (2013) 99-104.

[22] Uchiyama M, Mihara M, Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. ***Anal Biochem*** 86 (1978) 271-278.

[23] Van Dijk A, Krijnen PAJ, Vermond RA, Pronk A, Spreeuwenberg M, Visser FC, Berney R, Paulus WJ, Hack CE,Van Milligen FJ, Inhibition of type 2a secretory phospholipase a2 reduces death of cardiomyocytes in acute myocardial infarction. ***Apoptosis*** 14 (2006) 753-759.

[24] Xu X, Zhao W, Lao S, Wilson BS, Erikson JM,Zhang JQ, Effects of exercise and l-arginine on ventricular remodeling and oxidative stress. ***Med Sci Sports Exerc*** 42 (2010) 346-354.

[25] Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M ,Kuzuya T,Hori M, Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. ***J ExpMed*** 189 (1999) 1699-1706.

[26] Zhang M, Shah AM, Role of reactive oxygen species in myocardial remodeling. ***Curr Heart Fail Rep*** 4 (2007) 26-30.