مطالعه اثرات محافظتی ورزش منظم هوازی بر آسیب ایسکمی ـ بازخونرسانی قلب در موش صحرایی

یوسف دوستار*

چکیده

آسیب ایسکمی-بازخونرسانی (I/R) قلب یکی از مهم‌ترین مشکلات قلبی-عروقی می‌باشد. هدف این مطالعه ارزیابی اثرات محافظتی ورزش هوازی کوتاه-مدت و منظم فزاینده درازمدت در برابر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی قلب در موش صحرایی می‌باشد. بدین منظور، ٤٠ سر موش صحرایی نر ویستار به‌طور تصادفی به چهار گروه برابر شامل گروه‌های شاهد، I/R، I/R با دو هفته ورزش هوازی و I/R با هشت هفته ورزش منظم و فزاینده هوازی، تقسیم شدند. تمرین هوازی، هفته‌ای پنج جلسه دویدن روی تریدمیل با سرعت ۲۵-۱۰ متر/دقیقه به مدت ۳۰-۱۰ دقیقه با شیب ۵ درجه انجام شد. برای ایجاد I/R، رگ کرونری چپ پائین‌رو توسط کلمپ مسدود و بعد از ۳۰ دقیقه کلمپ‌ها باز و به مدت ۲ ساعت خونرسانی مجدداً برقرار گردید. نمونه خون جهت اندازه‌گیری بیومارکرهای قلب شامل کراتین کیناز-MB و لاکتات دهیدروژناز اخذ شد. در نهایت موش‌ها جهت آسیب‌شناسی بافتی و تعیین وضعیت آنتی‌اکسیدانی عضله قلب آسان‌کُشی شدند. در آسیب شناسی بافتی، عضله قلب گروه I/R دچار تغییرات شدید دژنراتیو و نکروز شده بود. ورزش هوازی کوتاه مدت آسیب بافتی ناشی از ایسکمی-بازخونرسانی را تغییر نداد، در حالی‌که ورزش هوازی منظم و فزاینده درازمدت آسیب نکروتیک قلب را کاهش داد. ورزش منظم هوازی درازمدت مقادیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز قلب را که در اثر I/R کاهش یافته بود، به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش و مقدار مالون‌دی‌آلدئید را به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش داد. نتایج نشان داد ورزش منظم و فزاینده هوازی درازمدت، قلب موش‌های صحرایی را از آسیب ایسکمی-خونرسانی مجدد محافظت می‌کند.

واژگان کلیدی: *قلب، ایسکمی-خونرسانی مجدد، ورزش هوازی، موش صحرایی.*

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲٤

مقدمه

ایسکمی ـ بازخونرسانی، سندروم بالینی پیچیده‌ای است که در شرایط خاص ممکن است اندام‌های مختلف بدن را تحت تأثیر قرار دهد و همانگونه که از نام آن پیداست شامل یک مرحله کاهش یا توقف خونرسانی به بافت و بعد از مدتی بازگشت جریان خون به آن بافت یا اندام می‌باشد. در صورتی-که سلول‌ها دچار آسیب قابل برگشت شوند، برقراری مجدد جریان خون می‌تواند سبب بهبود سلول‌ها شود. با این حال، در شرایط خاصی برقراری مجدد جریان خون به بافت‌های دچار ایسکمی که از سایر جهات سالم هستند، به شکل متناقضی سبب تشدید و وخامت آسیب در آنها می‌گردد. در نتیجه، علاوه بر سلول‌هایی که تا انتهای دوره ایسکمی دچار آسیب غیرقابل برگشت شده بودند، سلول‌های دیگری نیز در بافت از بین می‌روند. به‌عبارتی دیگر، این موضوع زمانی بغرنج‌تر می‌شود که بدانیم خونرسانی مجدد، اگرچه برای زنده ماندن بافت ایسکمیک لازم است، در ایجاد آسیب بیشتر بافت سهیم خواهد بود. یکی از رویدادهای اصلی در این میان تولید گونه‌های فعال اکسیژن است که طی خونرسانی مجدد باعث اثرات سیتوتوکسیک متعددی از قبیل آسیب DNA، اکسیداسیون پروتئین‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها و القاء آپوپتوز می‌شوند. از دیگر رویدادهایی که در این بین رخ می‌دهد، القاء پاسخ التهابی و افزایش ورود نوتروفیل‌ها به بافت ایسکمیک است که نقش مهمی در گسترش آسیب ناشی از ایسکمی دارند. این حالت که اصطلاحاً آسیب ناشی از ایسکمی/ برقراری مجدد جریان خون خوانده می‌شود، روند بالینی با اهمیتی است که نقش قابل ملاحظه‌ای در تخریب بافتی دارد، ولی با مداخلات درمانی می‌توان آن را کنترل کرد (١٦)

با اینکه مکانیسم‌های دقیق این آسیب معلوم نشده‌اند، ولی یکی از دلایل ایجاد آسیب ایسکمی ـ بازخونرسانی این است

*دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
vetdoustar@yahoo.com

که پرفیوژن مجدد سبب تشدید جذب موضعی سلول‌های التهابی می‌گردد که این سلول‌ها مقادیر زیادی از ریشه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) مانند آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن، سیتوکائین‌های التهابی و آنزیم‌هایی مانند میلوپراکسیداز، الاستاز و پروتئازها را رها می‌کنند و سبب پیشبرد روند تخریب غشاء و آزاد شدن اجزاء داخل سلولی و نفوذپذیری میتوکندریایی می‌شوند. افزایش نفوذپذیری میتوکندری‌ها و تشکیل سوراخ‌هایی در غشاء میتوکندری سبب کاهش پتانسیل غشاء و همچنین کاهش تولید ATP و تورم میتوکندری می‌گردد. افزایش نفوذپذیری غشاهای خارجی میتوکندری سبب آغاز آسیب سلولی می‌گردد (۱۰).

بیماری عروق کرونر (CAD) به عنوان یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان مطرح است. انفارکتوس میوکارد پدیده پیچیده‌ای است که خصوصیات مکانیکی، الکتریکی، ساختاری و بیوشیمیایی سیستم قلب را تحت تاثیر قرار می‌دهد. انفارکتوس میوکارد موقعی رخ می‌دهد که نکروز عضله قلب به دلیل عدم تعادل طولانی مدت بین اکسیژن‌رسانی و میزان تقاضای عضله قلب برای اکسیژن رخ دهد. در میان مکانیسم‌های مختلف، تجمع رادیکال‌های آزاد در پاتوفیزیولوژی انفارکتوس حاد میوکارد موثر قلمداد شده است. از درمان‌های رایج برای انفارکتوس میوکارد، برقراری مجدد جریان خون به بافت ایسکمیک می‌باشد که تظاهر پاتولوژیکی اصلی آن آسیب شدید اکسیداتیو بافت قلب به‌دلیل بازخونرسانی می‌باشد (۲۵). میزان آسیب ناشی از خونرسانی مجدد متغیر بوده و آسیب‌های شدید، می‌توانند به ناتوانی‌های دائمی و حتی مرگ منجر شوند (۲). با توجه به شیوع جهانی CAD و آسیب قلبی ناشی از ایسکمی ـ بازخونرسانی، یافتن یک رویکرد مناسب جهت محافظت قلب در برابر آسیب القا شده با آن اهمیت دارد.

به هر حال، با توجه به میزان مرگ و میر بالا در پی انفارکتوس قلب، عوامل موجود و در دسترس برای درمان این عارضه و کنترل تلفات ناشی از آن کافی به نظر نمی‌رسد. از سوی دیگر، اگر چه عوامل دارویی متنوعی برای درمان انواع بیماری‌ها وجود دارد، لکن اغلب بیماران قادر به تحمل اثرات جانبی داروهای شیمیایی نیستند. بنابراین، استفاده از روش‌های جدید و تکمیلی برای به‌حداقل رساندن آسیب‌های ایسکمیک قلب و کنترل عوارض آن به خصوص در کشورهای پیشرفته مورد بحث می‌باشد (۱۸).

یکی از روش‌های مناسب و شناخته شده که قابلیت فراهم کردن چنین محافظتی را دارا است، انجام ورزش‌های هوازی می‌باشد (٦). مطالعات اپیدمیولوژی در انسان نشان داده‌است که انجام ورزش‌های منظم، خطر مرگ را طی آسیب قلبی ناشی از ایسکمی ـ خونرسانی مجدد کاهش می‌دهد (٤). به‌علاوه مطالعات بر روی حیوانات آزمایشگاهی نیز تائید می‌کنند که ورزش هوازی (یعنی دویدن و شنا کردن) قلب را در برابر آسیب ناشی از ایسکمی-بازخونرسانی محافظت می‌کند (۲۰). به خوبی مشخص شده است که ورزش هوازی تحمل قلب در برابر آسیب ناشی از ایسکمی ـ بازخونرسانی را در حیوانات نر و ماده و نیز حیوانات پیر و جوان افزایش می‌دهد (٢٦). ورزش هوازی سلول‌های قلبی را در برابر استرس اکسیداتیو (۳) و نیز میتوکندری این سلول‌ها را (۸) در برابر آسیب ناشی از ایسکمی-بازخونرسانی محافظت می‌کند. در مجموع، مطالعات نشان می‌دهند که ورزش‌های هوازی قلب را در برابر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی حفاظت می‌کنند (٦).

با وجود اینکه مدارک متقاعدکننده نشان می‌دهند که ورزش‌های منظم هوازی اثرات محافظتی بر قلب دارند، لکن اثرات ورزش های وابسته به زمان هوازی یه‌صورت منظم و فزاینده بر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی قلب معلوم نیست و تاکنون مطالعه‌ای راجع به تاثیر محافظتی ورزش منظم هوازی کوتاه مدت و بلند مدت منظم و فزاینده بر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی قلب به‌طور مقایسه‌ای منتشر نشده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی مقایسه‌ای تاثیر ورزش منظم هوازی کوتاه مدت و بلند مدت منظم و فزاینده بر آسیب ناشی از ایسکمی ـ بازخونرسانی در قلب می‌باشد.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و در سال ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و اصول کار روی حیوانات آزمایشگاهی، مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی بود.

طرح آزمایش: برای انجام این مطالعه، از تعداد ٤٠ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵±۲۰۰ گرم و در محدوده سنی ۱۰ هفته استفاده شد. شرایط تغذیه و نگه‌داری برای تمام گروه‌ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای ۲±۲۱ درجه سانتی‌گراد بود. جیره غذایی یکسان و آب نیز به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفته و پس از یک هفته سازگاری به شرایط جدید، آزمایش شروع شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه برابر شامل: ۱- گروه شاهد که در مورد موش‌های این گروه هیچ‌گونه مداخله ورزشی و دستکاری قلب انجام نشد، ۲- گروه I/R که موش‌های این گروه در پایان دوره هشت هفته‌ای مطالعه، مورد عمل جراحی و تحمل ۳۰ دقیقه ایسکمی و در پی آن ۲ ساعت خونرسانی مجدد قلب قرار گرفتند، ۳- گروه I/R دو هفته ورزش هوازی‌کرده، که موش‌های این گروه دو هفته آخر از هشت هفته طول مدت مطالعه را متحمل ورزش هوازی شدند و در نهایت همانند گروه I/R تحت ۳۰ دقیقه ایسکمی و در پی آن ۲ ساعت خونرسانی مجدد قلب قرار گرفتند و ٤- گروه I/R هشت هفته ورزش هوازی‌کرده، که موش‌های این گروه هشت هفته طول مدت مطالعه را متحمل ورزش هوازی منظم و فزاینده شدند و در نهایت همانند گروه I/R تحت ۳۰ دقیقه ایسکمی و در پی آن ۲ ساعت خونرسانی مجدد قلب قرار گرفتند.

الگوی تمرین: تمرین هوازی، به‌صورت هفته‌ای پنج جلسه دویدن روی تریدمیل با سرعت ۱۰ تا ۲۵ متر در دقیقه و شیب ۵ درجه اجرا شد. در آغاز موش‌ها به مدت یک هفته به محیط و شرایط دستگاه تریدمیل عادت داده شدند. به این ترتیب که، در دو جلسه اول به مدت ۱۰ دقیقه فقط در داخل دستگاه تریدمیل قرار گرفتند و در سه جلسه بعدی شروع تدریجی فعالیت با سرعت ۵ تا ۱۰ متر در دقیقه انجام شد. در دو هفته اول تمرین، موش‌ها با سرعت ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه شروع به دویدن کردند. سپس در هر دوهفته به سرعت و مدت دویدن افزوده شد تا اینکه در دو هفته آخر سرعت فعالیت به ۲۵ متر در دقیقه و مدت آن به ۳۰ دقیقه رسید. شیب دستگاه تریدمیل از ابتدا تا انتهای دوره تمرین روی ۵ درجه ثابت ماند (جدول ۱). برای هرجلسه تمرین، ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۵ تا ۱۰ متر در دقیقه و به همان ترتیب سرد کردن در نظر گرفته شد. این الگو بر اساس اصول علمی انجمن ACSM (American College of Sport Medicine) تنظیم گردید (۲۳).

جدول ۱: الگوی تمرین منظم هوازی موش‌های صحرایی مورد مطالعه

شدت تمرین	هفته				
	عادت	اول و دوم	سوم و چهارم	پنجم و ششم	هفتم و هشتم
سرعت (متر در دقیقه)	۱۰-۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵
مدت (دقیقه)	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰
شیب (درصد)	۵	۵	۵	۵	۵

القاء آسیب ایسکمی ـ بازخونرسانی: جهت کنترل و جلوگیری از آثار حاد تمرین، ٤٨ ساعت پس از اجرای آخرین تمرین عملیات ایجاد آسیب ایسکمی ـ بازخونرسانی انجام شد. قبل از جراحی موش‌های تمامی گروه‌ها وزن‌کشی شدند. موش‌های تحت عمل به مدت ۲ ساعت پرهیز غذایی کامل داده شد. برای ایجاد بیهوشی از کتامین ۱۰٪ (Alfasan, Woerden,

Netherland) به میزان ۵۰mg/kg و زایلازین ۲٪ (Alfasan, Woerden, Netherland) به میزان ۵ mg/kg به صورت تزریق داخل صفاقی استفاده شد. حیوانات طبق روش Brown و همکاران (۲۰۰۳) جراحی شدند (۵). بعد از ۱۰ دقیقه تثبیت، برای ایجاد ایسکمی رگ کرونری چپ پائین رو با استفاده از گیره (clamp) مسدود گردید. بعد از ۳۰ دقیقه گیره‌ها برداشته شده و به مدت ۲ ساعت خونرسانی مجدد در ناحیه ایسکمیک برقرار گردید.

آزمایش‌های بیوشیمیایی: پس از انجام عملیات القاء ایسکمی ـ بازخونرسانی، نمونه خون جهت ارزیابی بیومارکرهای قلب شامل کراتین کیناز-MB (CK-MB) و لاکتات دهیدروژناز از سینوس پشت کره چشم (Retro-orbital plexus) موش‌ها اخذ گردید. نمونه‌های خون با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و اندازه‌گیری مارکرها به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از کیت‌های تجارتی (Randox Laboratories Ltd, UK) انجام شد.

سپس همه موش‌ها همزمان با ایجاد دررفتگی در مهره‌های گردن (Cervical dislocation) آسان‌کشی شدند. قلب موش‌ها جدا و وزن آنها اندازه گرفته شد. برای تعیین وضعیت آنتی-اکسیدانی، قسمتی از عضله قلب سریعاً جدا و در سالین بسیار سرد شستشو و هموژنات ۱۰٪ در ۱/۱۵٪ (w/v) کلرور پتاسیم تهیه شد. هموژنات با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول رویی جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی از طریق اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید (malondialdehyde; MDA) و همچنین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (superoxide dismutase; SOD)، کاتالاز (catalase; CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (glutathione peroxidase; GPX) مورد استفاده قرار گرفت.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه و میزان MDA با استفاده از کیت‌های تجاری موجود (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) و طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده کیت انجام شد. مقدار MDA بافتی به صورت نانومول مالون‌دی‌آلدئید (nmol) در میلی‌گرم پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت واحدهای قراردادی در میلی‌گرم پروتئین عنوان گردید.

پراکسیداسیون چربی در عضله قلب با روش رنگ سنجی (colorimetrically) به وسیله اندازه‌گیری TBARS (thiobarbituric acid reacting substances) طبق روش Fraga و همکاران (۱۹۸۸) انجام شد (۹).

به‌طور خلاصه: ۰/۱ میلی لیتر هموژنات بافتی با ۲ میلی‌لیتر معرف Thiobarbituric acid;TBA-trichloroacetic acid;TCA-Hcl (۳۷٪ TBA، ۰/۲۵ مول HCL و ۱۵٪ TCA، به نسبت ۱:۱:۱) مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری در بن ماری جوش، خنک گردید و در g ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. شدت جذب محلول رویی شفاف در ۵۳۵ nm در مقابل بلانک اندازه‌گیری گردید. مقادیر به صورت نانومول بر ۱۰۰ گرم بافت بیان شدند.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز توسط روش Nishikimi و همکاران (۱۹۷۲) تعیین گردید (۱۹). در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هر یک از هموژنات‌های قلب با بافر پیروفسفات سدیم، فنازین متوسولفات (phenazine methosulfate; PMT) و نیترو-بلو تترازولیوم (Nitro-blue Tertazolium; NBT) مخلوط گردید. واکنش با افزودن نیکوتین‌آمیدآدنین دی‌نوکلئوتید (Nicotinamide-adenine dinucleotide; NADH) آغاز شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگزای تشکیل شده در ٥٦۰nm اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰٪ در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید.

فعالیت کاتالاز در ضله قلب توسط روش Claiborne (۱۹۸۵) و بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲٤۰nm، مورد سنجش قرار گرفت (۷). به طور خلاصه، مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی لیتر بافر فسفات (۷ =M, pH ۰/۰۵)، ۱ میلی لیتر پرکسید هیدروژن (۰/۰۱۹ M) و ۰/۰۵ میلی لیتر PMS (۱۰٪) در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر بود. تغییرات در جذب، در ۲٤۰nm اندازه‌گیری شد. در نهایت نتیجه به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه گردید.

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز عضله قلب با استفاده از روش Rotruck و همکاران (۱۹۷۳) و بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت (۲۱).

$H_2O_2 + 2GSH$ (گلوتاتیون احیاء) $\rightarrow 2H_2O + GSSG$ (گلوتاتیون اکسید)

گلوتاتیون پراکسیداز، در هموژنات بافتی، گلوتاتیون را اکسیده کرده که به طور هم زمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می‌گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری‌کلرواستیک اسید متوقف و گلوتاتیون باقیمانده توسط محلول دی‌تیوبیس نیتروبنزوئیک اسید (Dithiobis nitrobenzoic acid; DTNB) مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می‌گردد که با اسپکتروفتومتر در ٤۲۰nm اندازه‌گیری می‌شود. مخلوط واکنش‌گر متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر اتیلن دی‌آمین تترا-استیک اسید (ethylenediamine tetra-acetic acid; EDTA) ۰/۸mM، ۰/۱ میلی‌لیتر آزید سدیم (sodium azide) ۱۰mM، ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۲/۵mM و ۰/۲ میلی‌لیتر هموژنات بود که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ متوقف و لوله‌ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۳ میلی لیتر دی سدیم هیدروژن ۰/۸ mM و ۰/۱ میلی‌لیتر DTNB ۰/۰٤٪ به محلول شناور افزوده شد و بلافاصله رنگ حاصله در ٤۲۰nm اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به صورت میلی گرم پروتئین/دقیقه/میکرومول گلوتاتیون اکسید بیان گردید.

آسیب‌شناسی بافتی: برای تهیه مقاطع بافتی، قسمتی از بافت قلب موش‌ها در فرمالین بافری ۱۰٪ پایدار شد و از نمونه‌های پایدار شده در فرمالین با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع بافتی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و رنگ آمیزی معمول هماتوکسیلین- ائوزین تهیه شد. مشاهدات میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰× و در ۵ میدان میکروسکوپی از هر برش، به‌طور تصادفی با میکروسکوپ نوری مدل Nikon (ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) انجام شد. بررسی مقاطع آسیب‌شناسی توسط یک مقیاس نیمه کمّی (Semiquantitative scale) و به‌صورت دوسو کور طبق روش ارائه شده توسط Joukar و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد (۱۳). بر این اساس شدت آسیب از لحاظ فرایند التهابی، خونریزی، تغییرات دژنراتیو و نکروز، از صفر تا ٤ (صفر: عدم وجود آسیب، ۱: حداقل آسیب، ۲: آسیب ملایم، ۳: آسیب متوسط و ٤: آسیب شدید) رتبه‌بندی شد.

تحلیل آماری داده‌ها: برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS-17 استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده کمّی، به صورت میانگین ± انحراف معیار (mean±SD) ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (tukey) مورد بررسی قرار گرفت. در مورد داده‌های هیستوپاتولوژی برای مقایسه نتایج درجه‌بندی شده آسیب بافت قلب اختلاف معنی‌داری توسط آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (kruskal-wallis) و سپس آزمون یو من ـ ویتنی (mann-whitney u test) برای ارزیابی مقایسه‌ای دو به دو، مورد استفاده قرار گرفت. اختلافات در سطح $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شدند.

نتایج

تاثیر ورزش هوازی و آسیب ایسکمی ـ بازخونرسانی بر وزن بدن و قلب موش‌های صحرایی مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. کاهش معنی‌دار وزن بدن در موش‌های گروه I/R ورزش منظم و فزاینده هوازی کرده به مدت هشت هفته در مقایسه با سایر گروه‌ها مشاهده شد ($p<۰/۰۱$). اختلاف معنی‌داری از لحاظ وزن بدن بین سایر گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت.

در گروه I/R وزن قلب موش‌ها در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($p<۰/۰۱$). در گروه I/R ورزش‌کرده به مدت ۲ هفته، مقایسه وزن قلب موش‌ها با گروه I/R تفاوت معنی‌داری نداشت. در گروه I/R ورزش هوازی منظم و فزاینده‌کرده به مدت ۸ هفته کاهش معنی‌دار وزن قلب موش‌ها در مقایسه با گروه I/R ($p<۰/۰۵$) مشاهده شد، هر چند که نتوانست آنرا به اندازه طبیعی خود (گروه شاهد) برساند.

جدول ۲: تاثیر ورزش منظم و فزاینده هوازی بر وزن بدن و قلب موش‌های صحرایی مورد مطالعه

گروه‌ها	وزن بدن (gr)	وزن قلب (gr)
شاهد	۲۱۱/۸٤±۹/٦۱	۰/۳۰٦±۰/۰۲۸
I/R	۲۰۹/۵۳±۸/۲٤	۰/٤۲۱±۰/۰۵۱[a]
I/R + ورزش هوازی به مدت ۲ هفته	۲۰٦/۳٤±۷/۵۲	۰/٤۱۰±۰/۰٤۷[a]
I/R + ورزش منظم و فزاینده هوازی به مدت ۸ هفته	۱۸۹/۷۲±٦/٤۵[a]	۰/۳٤٦±۰/۰٤۱[b]

a: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ($p<۰/۰۱$).

b: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه I/R ($p<۰/۰۵$).

تاثیر ورزش هوازی و آسیب ایسکمی ـ بازخون‌رسانی بر مارکرهای سرمی قلب موش‌های صحرایی مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. در گروه I/R افزایش معنی‌داری در مقادیر سرمی کراتین کیناز–MB (creatine kinase-MB) و لاکتات دهیدروژناز (LDH) در مقایسه با گروه شاهد ایجاد شد ($p<۰/۰۱$). در گروه I/R ورزش‌کرده به مدت ۸ هفته، انجام ورزش هوازی منظم و فزاینده، مقادیر افزایش‌یافته مارکرهای سرمی مذکور را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($p<۰/۰۵$). انجام ورزش به مدت ۲ هفته تاثیر معنی‌داری بر هیچ کدام از مقادیر افزایش یافته مارکرهای سرمی قلب نداشت.

جدول ۳: تاثیر ورزش منظم و فزاینده هوازی بر آنزیم‌های مارکر سرمی قلب در موش‌های صحرایی مورد مطالعه

گروه‌ها	لاکتات دهیدروژناز (IU/L)	کراتین کیناز–MB (IU/L)
شاهد	۲٤۲/٦۵±۳۱/۷۸	۸٦/۷۱±۳/۲۹
I/R	٤۱۳/۷۲±۵۷/۱۲[a]	۱۸۲/۳۵±۹/۱٦[a]
I/R +ورزش هوازی به مدت ۲ هفته	۳۹٤/٦۵±٤۸/٦۳[a]	۱٦۷/۲۸±۸/۷٤[a]
I/R +ورزش منظم و فزاینده هوازی به مدت ۸ هفته	۳۰۵/۸۱±۲۲/۹۱[b]	۱۱۱/۳۵±۷/٤۲[b]

a: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ($p<۰/۰۱$).

b: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه I/R ($p<۰/۰۵$).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx و مقادیر MDA بافت قلب در موش‌های مورد مطالعه در جدول ٤ نشان داده شده است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx در بافت قلب موش‌های صحرایی گروه I/R کاهش

معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت ($p<۰/۰۱$). علاوه بر این، افزایش معنی‌داری در سطح MDA، به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو، در بافت قلب موش‌های صحرایی گروه I/R مشاهده شد ($p<۰/۰۱$). در گروه I/R و ورزش‌کرده به مدت ۸ هفته، انجام ورزش هوازی منظم و فزاینده، افزایش معنی‌داری را در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx در مقایسه با گروه I/R ایجاد کرد ($p<۰/۰۵$). همچنین در این گروه، انجام ورزش باعث کاهش معنی‌دار میزان MDA در بافت قلب موش‌های صحرایی در مقایسه با گروه I/R شد ($p<۰/۰۵$). در موش‌های صحرایی گروه I/R ورزش‌کرده به مدت ۲ هفته، تغییر قابل توجهی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی قلب و میزان MDA دیده نشد.

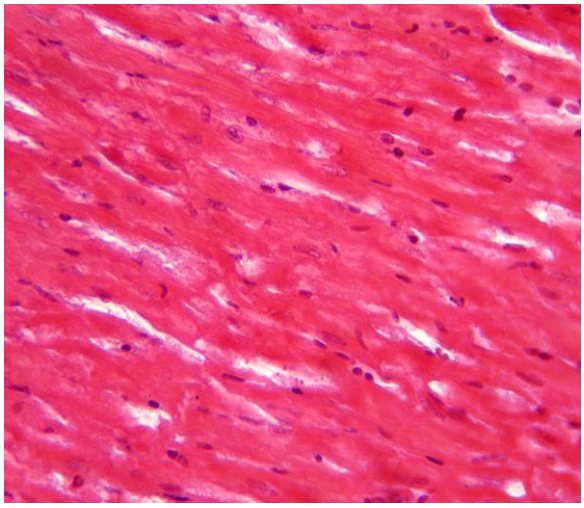
جدول ٤: تاثیر ورزش منظم و فزاینده هوازی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی قلب در موش‌های صحرایی مورد مطالعه

گروه‌ها	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/mg protein)	سوپراکسید دیسموتاز (U/mg protein)	کاتالاز (µmol of H_2O_2 consumed/mg protein)	گلوتاتیون پراکسیداز (µmol of glutathione oxidized/mg protein)
شاهد	۷/۸۷±۱/۳٦	۹/٥۲±۰/۷۱	۱۷/۱٦±۰/٦۷	۲/۳٦±۰/۱٤
I/R	۱۲/۰٦±۲/۱٥[a]	٦/۰۱±۰/٤۲[a]	۱۰/۹۳±۰/٤٥[a]	۱/۹۱±۰/۱۰[a]
I/R +ورزش هوازی به مدت ۲ هفته	۱۱/۳٦±۲/۱٤[a]	٦/۷۸±۰/٥۳[a]	۱۱/۸٥±۰/٤٤[a]	۱/۹۸±۰/۱۱[a]
I/R +ورزش منظم و فزاینده هوازی به مدت ۸ هفته	۹/۰۲±۱/۹۱[b]	۷/۹٤±۰/٥٦[b]	۱٤/٤۸±۰/٥۷[b]	۲/۲۰±۰/۱۱[b]

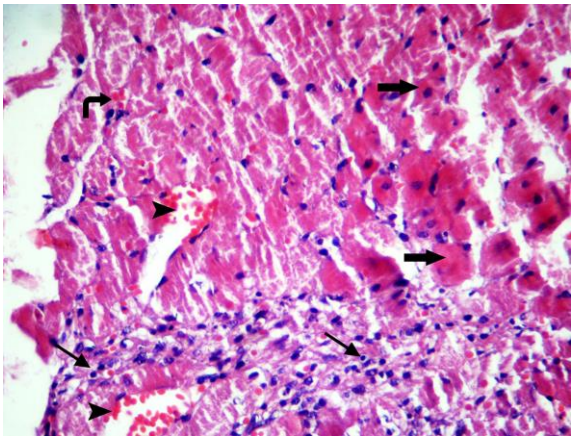
a: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ($p<۰/۰۱$).

b: دارای اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه I/R ($p<۰/۰٥$).

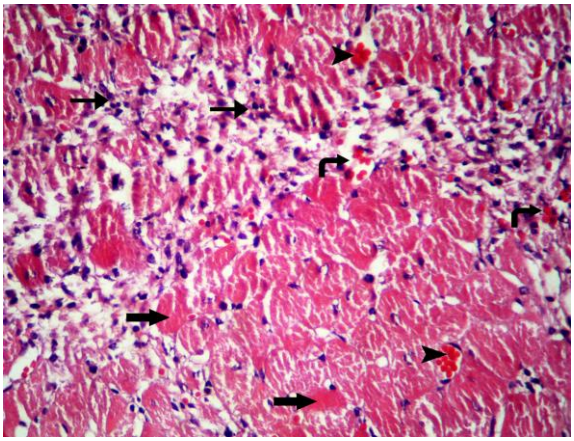
در آسیب‌شناسی بافتی، ساختار بافتی قلب در موش‌های صحرایی گروه شاهد طبیعی و سالم بود (نگاره ۱). در بافت قلب موش‌های صحرایی گروه I/R، تغییرات دژنراتیو و نکروز تارهای عضلانی قلب، ارتشاح سلول‌های آماسی، نشت گلبول‌های قرمز خون و ادم بینابینی مشاهده شد (نگاره ۲). در گروه I/R و ورزش‌کرده به مدت ۳ ماه، به‌طور قابل توجهی از جراحات آسیب شناسی به‌خصوص نکروز و ارتشاح لکوسیت‌ها در بافت عضله قلب موش‌های صحرایی کاسته شده بود و عمده آسیب قابل مشاهده، ادم بینابینی ملایم و واکوئولاسیون میوسیت‌ها به‌خصوص در نواحی اندوکارد بود (نگاره ۳). در گروه I/R و ورزش‌کرده به مدت ۱ ماه، انجام ورزش کوتاه مدت یک ماهه تاثیر قابل توجهی بر آسیب پاتولوژیک بافت قلب ناشی از ایسکمی ـ بازخونرسانی نداشت (نگاره ٤). تغییرات آسیب‌شناسی بافتی تمامی گروه‌ها در جدول ۵، درجه‌بندی و مقایسه گردیده است.



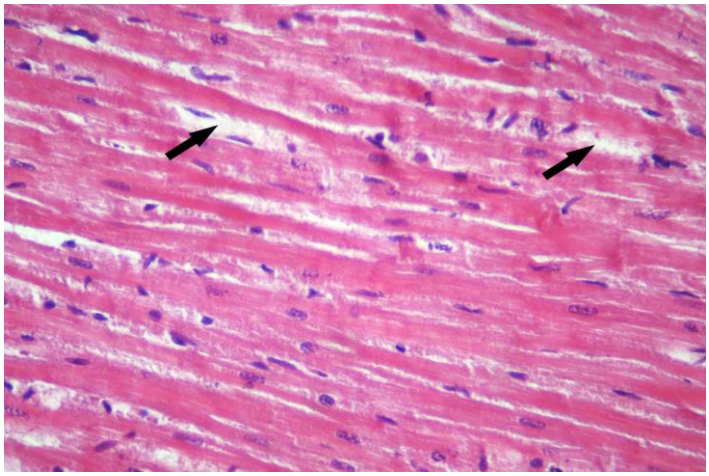
نگاره ۱: نمای ریزبینی از بافت قلب یک موش صحرایی از گروه شاهد: بافت قلب سالم و بدون تغییر پاتولوژیک است (H&E×٤۰).



نگاره ۲: نمای ریزبینی از بافت قلب یک موش صحرایی از گروه I/R: تغییرات دژنراتیو و نکروز وسیع و شدید تارهای عضلانی قلب (پیکان-های ضخیم)، نفوذ منتشر سلول‌های آماسی (پیکان‌های باریک)، پرخونی(نوک پیکان‌ها)، ادم بینابینی و خونریزی‌های کانونی (پیکان خمیده) در فضای بین عضلات مشاهده می‌شود (H&E×٤٠).



نگاره ۳: نمای ریزبینی از بافت قلب یک موش صحرایی از گروه I/R ورزش هوازی‌کرده به مدت ۲ هفته: تغییرات دژنراتیو و نکروز میوسیت‌ها (پیکان‌های ضخیم)، ارتشاح سلول‌های آماسی (پیکان‌های باریک)، پرخونی (نوک پیکان‌ها) و خونریزی‌های کانونی و ادم بینابینی (پیکان‌های خمیده) مشاهده می‌شود (H&E×٤٠).



نگاره ٤: نمای ریزبینی از بافت قلب یک موش صحرایی از گروه I/R ورزش هوازی منظم و فزاینده‌کرده به مدت ۸ هفته: ادم خفیف بینابینی (پیکان‌ها) و واکوئولاسیون ملایم میوسیت‌ها قابل مشاهده است (H&E×٤٠).

جدول ٥- تاثیر ورزش هوازی بر آسیب ایسکمی ـ بازخونرسانی قلب در موش‌های صحرایی مورد مطالعه

گروه	تیمار	درجه تغییرات دژنراتیو و نکروز	درجه التهاب	درجه خونریزی	نتیجه آزمون کروسکال والیس
۱	شاهد	۰/۰±۰/۰^{a}	۰/۰±۰/۰^{a}	۰/۰±۰/۰^{a}	p<۰/۰۰۱
۲	I/R	۳/۷۵±۰/۵۲^{b}	۳/۱٤±۰/۱۱^{b}	۲/۲٦±۰/۱۱^{b}	
۳	I/R +ورزش هوازی به مدت ۲ هفته	۳/۱۲±۰/۱٦^{b}	۲/۹٥±۰/۱۰^{b}	۲/۱۰±۰/۱٦^{b}	
٤	I/R +ورزش هوازی منظم و فزاینده به مدت ۸ هفته	۰/٤٥±۰/۱۲^{a}	۰/۳۳±۰/۰۸^{a}	۰/۲٤±۰/۰٥^{a}	

a و b: حروف غیر مشابه نشانگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰٥).

بحث

در مطالعه حاضر، متعاقب القاء آسیب I/R، وزن قلب به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد، در حالی که تغییری در وزن بدن حاصل نشد. افزایش مشاهده شده در وزن قلب ممکن است مربوط به تغییرات ادماتوز و آماسی در فضاهای میان‌بافتی عضله قلب باشد (۲٤). مشخص شده است که یک درصد افزایش در محتوای مایعات میان‌بافتی قلب می‌تواند منجر به کاهش ده درصدی عملکرد عضله قلب شود (۱۵). تحقیقات نشان داده است که ایسکمی قلب در حیوانات آزمایشگاهی نیز همانند انسان می‌تواند به اختلالات متابولیک و مورفولوژیک متعددی منجر شود (۱٤). انجام ورزش هوازی منظم و فزاینده به مدت ۸ هفته مانع از افزایش وزن قلب ناشی از آسیب I/R شد که این امر می‌تواند به‌دلیل کاهش تغییرات آماسی و ادم در بافت قلب باشد و حاکی از آن است که انجام این نوع ورزش عضله قلب را در برابر آسیب I/R محافظت می‌کند. البته نرسیدن وزن قلب موش‌های ورزش کرده به مدت ۸ هفته تا حد طبیعی خود می‌تواند تا حدودی به افزایش اندازه تارهای عضله قلب در اثر ورزش در این گروه باشد.

تارهای عضلانی قلب دارای آنزیم‌های شاخصی همچون لاکتات دهیدروژناز و کراتین کیناز-MB هستند (۱۲). در مطالعه حاضر آسیب I/R باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های مذکور شد. در هر صورت، انجام ورزش هوازی منظم و فزاینده به مدت ۸ هفته به‌طور معنی‌داری مانع از افزایش این آنزیم‌ها در اثر آسیب I/R شد که نشان می‌دهد انجام این نوع ورزش آسیب عضله قلب ناشی از آسیب I/R را کاهش می‌دهد.

مطالعات قبلی نشان داده است که، بازخونرسانی متعاقب ایسکمی باعث آسیب اکسیداتیو شدید در عضله قلب موش‌های صحرایی می‌شود (۱۷). در این راستا، افزایش گونه‌های فعال اکسیژن یا تخلیه آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است باعث القاء استرس اکسیداتیو و به موجب آن آسیب میوکارد گردد (۲۲). آنزیم‌های پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز با پاکسازی رادیکال‌های اکسیژن مانند یون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و ممانعت از تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل، سیستم تدافعی اصلی علیه استرس اکسیداتیو هستند (۲۲). در بررسی حاضر، مشخص شد که کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در موش‌های تحت آسیب I/R به‌طور معنی‌داری توسط انجام ورزش منظم و فزاینده هوازی طولانی-مدت، افزایش یافت. در مطالعات انجام شده توسط توفیقی و همکاران (۱۳۹٤) نیز اثرات محافظتی ورزش طولانی‌مدت بر آسیب ایسکمی-بازخونرسانی قلب از طریق تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به اثبات رسیده است (۱). این نتایج نشان می‌دهد که ورزش منظم هوازی طولانی‌مدت می‌تواند سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی میوکارد را علیه استرس اکسیداتیو تقویت کند. همچنین، نشان داده شده است که میزان پراکسیداسیون لیپیدی با شدت آسیب غشاهای سلولی تارهای عضلانی قلب و غیرفعال شدن آنزیم‌ها در ارتباط می‌باشد (۱۱). در مطالعات پیشین، ادعا شده است که آسیب بافت‌ها در پی بازخونرسانی متعاقب ایسکمی، در اثر پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از رادیکال‌ها اتفاق می‌فتد. مالون‌دی‌آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون چربی بوده و افزایش آن ممکن است در اثر تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها باشد (۲۵).

در این مطالعه، انجام ورزش هوازی منظم و فزاینده طولانی مدت، مقادیر افزایش یافته مالون‌دی‌آلدئید ناشی از بازخونرسانی متعاقب ایسکمی را کاهش داد. کاهش مقادیر مالون‌دی‌آلدئید در قلب با انجام ورزش منظم هوازی طولانی‌مدت ممکن است در اثر افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز باشد. امکان دارد که رادیکال‌های آزاد القاء شده توسط بازخونرسانی متعاقب ایسکمی، به‌طور موثر توسط این آنزیم‌ها پاکسازی شده باشد که این خود اثرات محافظتی

ورزش منظم هوازی طولانی‌مدت را در آسیب میوکارد ناشی از خونرسانی مجدد متعاقب ایسکمی را می‌رساند.

در بررسی حاضر، بافت عضله قلب موش‌های تحت I/R تغییرات پاتولوژیک گسترده‌ای از جمله نکروز کادیومیوسیت‌ها، ادم بینابینی، خونریزی و ارتشاح لکوسیت‌ها را نشان داد که حاکی از آسیب شدید میوکارد می‌باشد. در هر صورت، انجام ورزش منظم و فزاینده هوازی طولانی‌مدت به‌طور قابل توجهی از آسیب عضله قلب ناشی از خونرسانی مجدد متعاقب ایسکمی جلوگیری کرد. این یافته‌ها اثرات محافظتی انجام ورزش منظم هوازی طولانی‌مدت را در موارد آسیب I/R قلب، بیشتر مورد تایید قرار می‌دهد.

با توجه به مجموعه فوق‌الذکر، انجام ورزش منظم و فزاینده هوازی طولانی‌مدت با تحریک سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی، عضله قلب موش‌های صحرایی را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از خونرسانی مجدد متعاقب ایسکمی محافظت می‌کند. بنابراین، پس از انجام کارآزمایی‌های شاهدار اتفاقی و حصول نتایج مثبت، انجام ورزش‌های منظم و فزاینده هوازی طولانی‌مدت می‌تواند در پیشگیری از آسیب‌های اکسیداتیو میوکارد ناشی از ایسکمی–بازخونرسانی توصیه گردد.

تشکر و سپاسگزاری

این مقاله از طرح تحقیقاتی که با بودجه پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده است، استخراج شده است. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز تشکر و قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع

۱. توفیقی، ا.، ابراهیمی کلان، ع.، جمالی قراخانلو، ب. (۱۳۹٤): اثر مکمل‌یاری رزوراترول و تمرین هوازی بر تغییرات بافت قلب در موش‌های صحرایی مبتلا به انفارکتوس حاد، مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران، ۱(٤): ۱٤٥-۱۳٥.

2. Allen, D.G., Orchard, C.H. (1987): Myocardial contractile function during Ischemia and Hypoxia. Circ. Res. 60: 153-168.
3. Becker, B.F., Mobert, J. (1999): Low-dose calcium antagonists reduce energy demand and cellular damage of isolated hearts during both ischemia and reperfusion. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 360: 287-294.
4. Brown, D.A., Chicco, A.J., Jew, K.N., Johnson, M.S., LynchJatson, P.A., Moore, R.L. (2005): Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. J. Physiol. 569: 913-924.
5. Brown, D.A., Jew, K.N., Spaagana, G.C., Musch, T.I., Moore, R.L. (2003): Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. J. Appl. Physiol. 95(6): 2510-2518.
6. Brown, D.A., Lynch, J.M., Armstrong, C.J., Caruso, N.M., Ehlers, L.B., Johnson, M.S., Moore, R.L. (2005): Stusceptibility of the heart to ischaemia-reperdusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. J. Physiol. 564(Pt 2): 619-30.
7. Claiborne, A. (1985): Catalase activity. In: CRC Handbook of methods for oxygen radical research. (ed. Boca Raton FL). CRC Press, Boca Raton: Florida; 283-284.
8. Downey, H.M. (1990): Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. Annu. Rev. Physiol. 52: 487-504.
9. Fraga, C.G., Leibovitz, B.E., Tappel, A.L. (1988): Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. Free Radic. Biol. Med. 4(3): 155-161.
10. Gottlieb, R.A. (2003): Mitochondrial signaling in apoptosis: Mitochondrial daggers to the breaking heart. Basic. Res. Cardiol. 98: 242-249.
11. Gupta, P., Kanwal, A., Putcha, U.K., Bulani, Y., Sojitra, B., Khatua, T.N., Kuncha, M., Banerjee, S.K. (2013): Cardioprotective effect of ritonavir, an antiviral drug, in isoproterenol induced myocardial necrosis: a new therapeutic implication. J. Transl. Med. 11: 80.

12. Haleagrahara, N., Varkkey, J., Chakravarthi, S. (2011): cardioprotective effects of glycyrrhizic acid against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. Int. J. Mol. Sci. 12: 7100-7113.
13. Joukar, S., Bashiri, H., Dabiri, S., Ghotbi, P., Sarveazad, A., Divsalar, K., Joukar, F., Abbaszadeh, M. (2012): Cardiovascular effects of black tea and nicotine alone or in combination against experimental induced heart injury. J. Physiol. Biochem. 68(2): 271-279.
14. Karthick, M., Stanely Mainzen Prince, P. (2006): Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. J. Pharm. Pharmacol. 58:701-707.
15. Laine, G.A., Allen, S.J. (1991): Left ventricular myocardial edema. Lymph flow, interstitial fibrosis, and cardiac function. Circ. Res. 68: 1713-1721.
16. Moens, A.L., Chaeys, M.J., Timmermans, J.P., Vrints, C.J. (2005): Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysioligical process. Int. J. Cardiol. 100: 179-190.
17. Mokni, M., Hamlaoui, S., Karkouch, I., Amri, M., Marzouki, L., Limam, F., Aouani, E. (2013): Resveratrol provides cardioprotection after ischemia/reperfusion injury via modulation of antioxidant enzyme activities. Iran J. Pharm. Res., 12(4): 867-875.
18. Nandave, M., Ojha, S.K., Joshi, S., Kurnari, S., Arya D.S. (2007): Cardioprotective effect of Bacopa monneira against isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats. Int. J. Pharmacol. 3(5): 385-392.
19. Nishikimi, M., Appaji, N., Yagi, K. (1972): The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46(2): 849-854.
20. Powers, S.K., Quindry, J.C., Kavazis, A.N. (2008): Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. Free Radic. Biol. Med. 44: 193-201.
21. Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G. (1973): Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science, 179(73): 588-590.
22. Sawyer, D.B., Siwik, D.A., Xiao, L., Pimentel, D.R., Singh, K., Colucci, W.S. (2002): Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. J Mol. Cell. Cardiol. 34: 379-388.
23. Thompson, W.R. (2010): American College of Sports Medicine. In: ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription, 8th edition (ed. Gordon NF, Pescatello LS). Lippincott, Williams & Wilkings: Philadelphia; 580-640.
24. Upaganlawar, A., Gandhi, C., Balaraman, R. (2009): Effect of green tea and vitamin E combination in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. Plant Foods Hum. Nutr. 64: 75-80.
25. Zhou, B., Wu, L.J., Li, L.H., Tashiro, S., Onodera, S., Uchiumi, F., Ikejima, T. (2006): Silibinin protects against isoproterenol-induced rat cardiac myocyte injury through mitochondrial pathway after up-regulation of SIRT1. J. Pharmacol. Sci. 102: 387-395.
26. Zweier, J.L., Talukder, M.H. (2006): The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. Cardiocasc Res. 70, 181-190.