Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

The effect of anaerobic exercise with melatonin consumption on the expression of Bax and Bcl-2 markers in rat myocardium after ischemic-reperfusion

Hamed Alizadeh Pahlavani[1*], Hamid Rajabi[2], Mohammad Nabiuni[3], Pezhman Motamedi[2], Neda Khaledi[2]

[1]Department of Physical Education and Sport Sciences, Behbahan University of Medical Sciences, Behbahan, Iran
[2]Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
[3]Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
*Corresponding author; E-mail: Alizadehh76@yahoo.com

Received: 12 August 2017 Accepted: 4 November 2017 First Published online: 4 July 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):68-77

Abstract

Background: The present research aims to examine the effect of anaerobic exercise with melatonin consumption on the expression of Bax and Bcl-2 markers in rat myocardium after ischemic-reperfusion by isoprenaline.

Methods: In the present experimental study, 28 male Wistar rats weighing approximately 200-250 g with two to three months old were divided into five groups: pilot (n=14), control (n=4), melatonin (n=4), anaerobic (n=4) and melatonin anaerobic (n=4). Pilot group were divided into two groups, isoperalin (n=7) and normal (n=7): isoperalin group injected isoprenaline with dose of 150 and 125 mg/kg BW with 24 hours in two consecutive days; and normal group has no injection. Then more fibros level was confirmed in isopernalin into normal groups used Masson-trichrom tanique. In the following Rats in melatonin group were gavaged every day for one month using a dose of 10 mg/kg BW. Meanwhile, rats in anaerobic group and melatonin anaerobic group were exposed training course with frequency of three times weekly for one month. But control group were injected only with isopernalin in the end of one month. Finally, rats were sacrificed after confirmation of infarct and expressions of bax and bcl2 gene were studied by real-time method.

Results: Melatonin treatment and anaerobic training have negligible effect on Bax and Bcl-2 gene expression. In the other hand, anaerobic exercise with consuming melatonin can decrease and increase Bax and Bcl-2 gene expression respectively and show significant effect, compared to treatment with melatonin alone.

Conclusion: The anaerobic exercise with consuming melatonin into consuming melatonin alone can reduce inactive induced-Infarction level.

Keyword: Apoptosis, Anaerobic Exercise, Melatonin, Reperfusion, Bax, Bcl2.

How to cite this article: Alizadeh Pahlavani H, Rajabi H, Nabiuni M, Motamedi P, Khaledi N. [The effect of anaerobic exercise with melatonin consumption on the expression of Bax and Bcl-2 markers in rat myocardium after ischemic-reperfusion]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):68-77. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

تأثیر تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین بر بیان نشانگرهای BAX و BCL2 میوکارد رت پس از ایسکمی ریپرفیوژن

حامد علی‌زاده پهلوانی[1*]، حمید رجبی[2]، محمد نبیونی[3]، پژمان معتمدی[2]، ندا خالدی[2]

[1]گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه علوم پزشکی بهبهان، بهبهان، ایران
[2]گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
[3]گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
[*] نویسنده مسوول؛ ایمیل: Alizadehh76@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۳ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳):۶۸-۷۷

چکیده

زمینه: هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین بر بیان نشانگرهای BAX و BCL2 میوکارد رت پس از ایسکمی ریپرفیوژن می‌باشد.

روش کار: ۲۸ رت صحرایی نر ویستار دو تا سه ماهه با وزن تقریبی ۲۰۰-۲۵۰ گرم به پنج گروه، پایلوت (n=۱۴)، کنترل (n=۴)، ملاتونین (n=۴)، تمرین بی‌هوازی (n=۴) و تمرین بی‌هوازی و ملاتونین (n=۴) تقسیم شدند. گروه پایلوت به دو گروه ایزوپرنالین (ایسکمی ریپرفیوژن) و سالم تقسیم گردیدند. گروه ایزوپرنالین در دو روز متوالی با فاصله ۲۴ ساعت با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تحت تزریق ایزوپرنالین قرار گرفتند؛ و گروه سالم هیچگونه تیماری نداشتند. سپس با رنگ‌آمیزی تری کروماسون میزان فیبروز بیشتر در گروه ایزوپرنالین نسبت به گروه سالم تأیید شد. گروه‌های ملاتونین یک ماه هر روز با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند؛ و گروه‌های تمرین بی‌هوازی و تمرین بی‌هوازی ملاتونین تحت تمرین یک ماهه با تواتر سه جلسه در هفته روی تردمیل قرار گرفتند. اما گروه کنترل در پایان یک ماه فقط تحت تزریق ایزوپرنالین قرار گرفتند. در نهایت رت‌ها تشریح شدند و اندازه‌گیری بیان ژن bax و bcl2 به روش ریل تایم انجام شد. نتایج تحقیق با فرمول $۲^{-\Delta\Delta ct}$ و روش آماری تی مستقل، تحلیل واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی با نرم افزار spss تحلیل شد.

یافته‌ها: تیمار ملاتونین و تمرین بی‌هوازی به تنهایی بر بیان ژن bax و bcl2 تأثیر ناچیزی دارد. اما تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین نیز می‌تواند بیان ژن BAX و BCL2 را به‌ترتیب کاهش و افزایش دهند؛ و نسبت به تیمار ملاتونین به‌تنهایی تأثیر معنی‌داری نشان دهند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین نسبت به مصرف ملاتونین به تنهایی می‌تواند از میزان حجم سکته میوکارد احتمالی ناشی از بی‌تحرکی بکاهد.

کلید واژه‌ها: آپوپتوز، تمرین بی‌هوازی، ملاتونین، ریپرفیوژن، BAX، BCL2.

نحوه استناد به این مقاله: علی‌زاده پهلوانی ح، رجبی ح، نبیونی م، معتمدی پ، خالدی ن. تأثیر تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین بر بیان نشانگرهای BAX و BCL2 میوکارد رت پس از ایسکمی ریپرفیوژن. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳):۶۸-۷۷

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

قبل از سال ۱۹۰۰ بیماری‌های عفونی و سوء تغذیه شایعترین علل مرگ در جهان محسوب می‌شدند؛ اما در حال حاضر بیماری-های قلبی عروقی شایعترین علت مرگ در بسیاری از نقاط جهان هستند. این تغییر که به آن گذار اپیدمیولوژیک اطلاق می‌شود ناشی از صنعتی شدن، شهرنشینی و تغییر سبک زندگی است که در همه نقاط جهان و در میان همه نژادها، گروه‌های قومی و فرهنگ‌ها در حال رخ دادن است. اگر چنین وضعیتی به همین طریق ادامه یابد، میزان مرگ و میر با توجه به سن در سال‌های آینده می‌تواند افزایش یابد. طبق گزارش‌های پژوهشی تجمع لیپوپروتئین‌ها، آسیب اندوتلیوم و التهاب از جمله فرآیندهای متعددی هستند که در شروع و پیشرفت یکی از مهمترین عوارض قلبی عروقی یعنی آترواسکلروز سهیم می‌باشند (۱).

از طرفی هیپوکسی یا کمبود اکسیژن یکی از علل آسیب‌های سلول عضله قلب، و در نهایت مرگ برنامه ریزی شده سلول قلبی به نام آپوپتوز است؛ به طوری که سلول‌ها و نیز میتوکندری‌های یک ناحیه یکپارچگی غشاء خود را از دست می‌دهند و در نتیجه مواد داخل سلولی مانند پروتئین‌های پیش آپوپتوزی آزاد می‌شوند که سبب بروز واکنش‌های التهابی و تشدید آسیب اولیه می‌گردند. در مقابل پروتئین‌های آنتی آپوپتوزی می‌توانند از طریق فعالیت آنتی آپوپتوزی و تأثیر بر مرحله آبشار کاسپازی از مرگ سلولی ایجاد شده توسط محرک‌ها بکاهند. از این رو پروتئین پیش-آپوپتوزی Bax و پروتئین آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 از جمله مهمترین پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز هستند و به همین سبب از نسبت آنها به عنوان شاخصی برای کاهش یا افزایش مرگ سلولی استفاده می‌شود. از این رو هر عاملی که بتواند نسبت Bcl-2 به Bax را افزایش دهد، می‌تواند در کاهش آپوپتوز مؤثر واقع شود (۲).

به هر حال عوامل متعددی می‌توانند از شدت ضایعه عروق کرونری و سپس آپوپتوز میوکارد بکاهند که مهمترین آنها فعالیت بدنی و مصرف دارو می‌باشد. برای مثال خطر گسترش بیماری شریان کرونری در بزرگسالان آماده یا فعال در مقایسه به افراد غیرفعال ۳۰ تا ۴۰٪ کمتر است (۲). همچنین مطالعه‌ای دیگر نشان داد تمرین هوازی سبب افزایش فاکتورهای آنتی آپوپتوزی نظیر Bcl2 و کاهش فاکتورهای آپوپتوزی نظیر Bad در میوکارد می‌شود (۳).[۳] بنابراین به نظر می‌رسد یکی از دلایل احتمالی فواید ورزشی جهت محافظت قلبی، کاهش مارکرهای آپوپتوزی نظیر Bax و Bad و همچنین افزایش مارکرهای آنتی آپوپتوزی نظیر Bcl2 در سلول‌های میوکاردی است. در این راستا مطالعه‌ای نشان داد فعالیت ورزشی افزایش نسبت Bax به Bcl2، آپوپتوز و تغییر ساختار قلبی رت‌های ناشی از پیری را کاهش می‌دهد (۴). مطالعه دیگر نشان داد نسبت Bcl2 به Bax در گروه تمرین استقامتی در مقایسه با گروه کنترل و تمرین حاد بیشتر است (۵). در نهایت تحقیقی ذکر کرد تمرین ورزشی بیان پروتئین‌های حفاظتی قلب نظیر Bcl2 و HSP_{72} را در رت‌های فشار خونی افزایش می‌دهد (۶). از طرف دیگر درمان دارویی بلند مدت شامل داروهای مسدود کننده بتا، ملاتونین، آسپرین، پلاویکس، وارفارین با استاتین مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷). مصرف این مواد بیشتر به علت نقش گشادکنندگی عروق توسط آنها می‌باشد؛ همچنین وقوع سکته در ابتدای صبح به دلیل کاهش ترشح ملاتونین در بدن گزارش شده است. در تأیید این مطلب انسان‌ها با دریافت خوراکی ملاتونین سبب کاهش فشار خون در نمونه‌های دارای فشار طبیعی می‌شوند. همچنین گزارش شده است سطوح ملاتونین در افراد مبتلا به سکته و بیماری‌های قلبی و عروقی کاهش می‌یابد. در نهایت این یافته که گیرنده‌های ملاتونین در شریان انسان‌ها وجود دارد، بیانگر نقش مستقیم این هورمون در کنترل موضعی قطر عروق خونی است (۸). ضمناً مطالعات جدید به ویژگی‌های آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدآپوپتوزی ملاتونین اشاره کرده‌اند. در این راستا مطالعه‌ایی نشان داد ملاتونین نسبت مصرف اکسیژن میتوکندری، فعالیت کمپلکس I و II میتوکندری، تولید پراکسید هیدروژن، سطح لیپید پراکسیداز، مقدار کاردیولیپین و اکسیداسیون کاردیولیپین را کاهش می‌دهد (۹). تحقیق دیگر ذکر کرد ملاتونین دارای ویژگی محافظتی قلبی از طریق پاک‌کنندگی رادیکال‌های آزاد به طور مستقیم و از طریق فعالیت آنتی اکسیدانی خود به طور غیرمستقیم است. تحقیقی در این راستا نشان داد که تجویز ۱۰ میلی گرم ملاتونین اثرات معنی‌دار محافظتی بر انفارکتوس ناشی از ایزوپروترنول با تنظیم فعالیت آنتی اکسیدانی اگزوژنیک دارد (۱۰).[۱۰] این تحقیق در نهایت ذکر کرد ملاتونین نشانگرهای آپوپتوزی نظیر Bax را کاهش و Bcl2 را افزایش می‌دهد (۱۱). در مجموع به نظر می‌رسد برنامه ورزشی منظم و مصرف ملاتونین، می‌توانند ظرفیت بی‌هوازی و آنتی اکسیدانی بیماران کرونری را بهبود بخشند و همچنین بر کاهش مارکرهای آپوپتوزی تأثیرگذار باشند. حال با توجه به اینکه برخی افراد مستعد به انفارکتوس میوکارد هستند و وقت کافی برای تمرین منظم ندارند آیا این افراد می‌توانند با افزایش شدت تمرین و کاهش زمان از طریق تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین از وقوع انفارکتوس احتمالی بکاهند. از این رو پژوهش حاضر سعی دارد تا تأثیر تمرین ورزشی بی‌هوازی با مصرف ملاتونین را بر نشانگرهای بیان ژن bax و bcl2 به منظور کاهش میزان آپوپتوز در رت‌های تحت ایسکمی ریپرفیوژن بررسی کند.

روش کار

در این مطالعه تجربی ۲۸ رت صحرایی نر ویستار دو تا سه ماهه با وزن تقریبی ۲۰۰-۲۵۰ گرم به پنج گروه، پایلوت (n=۱۴)، کنترل (n=۴)، ملاتونین (n=۴)، تمرین بی‌هوازی (n=۴) و تمرین

بی‌هوازی و ملاتونین (n=۴) تقسیم شدند. گروه پایلوت به دو گروه ایزوپرنالین (ایسکمی ریپرفیوژن) و سالم تقسیم شد. گروه ایزوپرنالین (از شرکت سیگما با کد I5627) در دو روز متوالی با فاصله ۲۴ ساعت با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تحت تزریق ایزوپرنالین قرار گرفتند؛[۱۲] (۱۲) و گروه سالم هیچگونه تیماری نداشتند. در ادامه با رنگ‌آمیزی تری کروماسون میزان فیبروز بیشتر در گروه ایزوپرنالین نسبت به گروه سالم تأیید شد. گروه‌های ملاتونین (شرکت سیگما با کد M5250) یک ماه هر روز با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند؛ و گروه‌های تمرین بی‌هوازی و تمرین بی‌هوازی ملاتونین پس از آشنایی یک هفته‌ایی تحت تمرین یک ماهه با تواتر سه جلسه در هفته روی تردمیل قرار گرفتند (جدول ۱). (۱۳) اما گروه کنترل در پایان یک ماه فقط تحت تزریق ایزوپرنالین قرار گرفت. در این پژوهش رت‌ها دو روز تحت تزریق ایزوپرنالین قرار گرفتند تزریق اول با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن انجام شد و تزریق دوم ایزوپرنالین در روز بعد با دوز ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بود. در نهایت پس از دو روز از تزریق دوم ایزوپرنالین رت‌ها با استنشاق کلروفرم بی‌هوش و سپس تشریح شدند و اندازه‌گیری بیان ژن bax و bcl2 به روش ریل‌تایم انجام شد. نتایج تحقیق با فرمول $۲^{-\Delta\Delta ct}$ و همچنین تحلیل واریانس یک طرفه و توکی تحلیل شد؛ اما برای بررسی میزان فیبروز در گروه پایلوت روش آماری تی مستقل مورد استفاده قرار گرفت. ضمناً از نرم افزار spss نسخه ۱۸ به منظور محاسبه روش‌های آماری استفاده شد.

تکنیک رنگ‌آمیزی تری کروماسون مشخص کرد این مقدار تزریق دارو باعث سکته در گروه پایلوت می‌گردد. زیرا آزمون تی مستقل نشان داد میزان فیبروز بدست آمده از نرم افزار image j در بین گروه رت‌های تحت القای ایزوپرنالین و سالم تفاوت معنی-داری وجود دارد. به طوری که فیبروز (واحد پیکسل) گروه ایسکمی ریپرفیوژن (۱۰۷/۸۵) نسبت به گروه سالم (۲۴/۵۷) از میانگین بیشتری برخوردار بود (sig = ۰/۰۰)؛ لذا این یافته نشان می‌دهد که تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در دو روز متوالی توانایی ایجاد فیبروز در قلب رت‌ها را دارد؛ که نشان دهنده سکته قلبی است (شکل ۱).

استخراج RNA، سنتز cDNA و طراحی پرایمرها

RNA نمونه‌های بطن چپ بوسیله ازت مایع و هاون سنگی با روش استخراج دستی و پروتکل استاندارد ترایزول با کد ET101 متعلق به شرکت کانادایی Civic Bio science استخراج شد. به طوری که به ازای هر ۳۰ تا ۶۰ میلی‌گرم بافت، یک میلی لیتر محلول ترایزول به میکروتیوب حاوی بافت اضافه شد. در ادامه نمونه‌ها پس از یک روز از فریز خارج شدند و به اندازه ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (از شرکت مرک آلمان با کد ۱۰۲۴۴۵) به محلول مایع اضافه گردید. سپس محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. در ادامه محلول رویی پس از سانتریفیوژ برداشته شد و به همان اندازه ایزوپروپانول (از شرکت مرک آلمان با کد ۱۰۹۶۳۴) به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها پس از یک شب در فریزر منفی ۸۰ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب ایجاد شده در ته میکروتیوب بوسیله الکل ۷۵٪ به مقدار یک میلی لیتر به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در نهایت ۳۳ میکرولیتر آب تثبیت کننده RNA به رسوب در دمای ۵۵ تا ۶۰ اضافه شد تا RNA در آب حل شود. تهیه cDNA با استفاده از پروتکل کیت ویوانتیس با کد RTPL12 از کشور مالزی انجام گردید؛ ضمناً پرایمرهای بتا اکتین (فوروارد CTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG و ریورز TGGTACGACCAGAGGCATACAG)، bax (فوروارد AATTGGCGATGAACTGGACAAC و ریورز AGCAAAGTAGAAAAGGGCAACC) و bcl2 (فوروارد GAGGATTGTGGCCTTCTTTG و ریورز CATGCTGGGGCCATATAGTT) با نرم افزار Primer3 طراحی و مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده سازی Real-time

به منظور آماده‌سازی مواد ریل تایم، ۴ لاندا cDNA از هر گروه تحقیق به چاهک‌های دستگاه ریل تایم ریخته شد؛ سپس ۶ لاندا از محلول مستر میکس (یک لاندا پرایمر فوروارد و ریورز و ۵ لاندا سایبر گرین شرکت یکتا تجهیز با کد YT2551) به آن اضافه گردید. در ادامه دستگاه ریل تایم به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشته شدن اولیه)، ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشته شدن ثانویه)، ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (اتصال پرایمرها) و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (تکثیر) راه‌اندازی شد. واکنش از مرحله دوم به بعد برای ۴۰ سیکل تکرار شد. ct های مربوط به واکنش توسط نرم افزار دستگاه استخراج و ثبت شد.

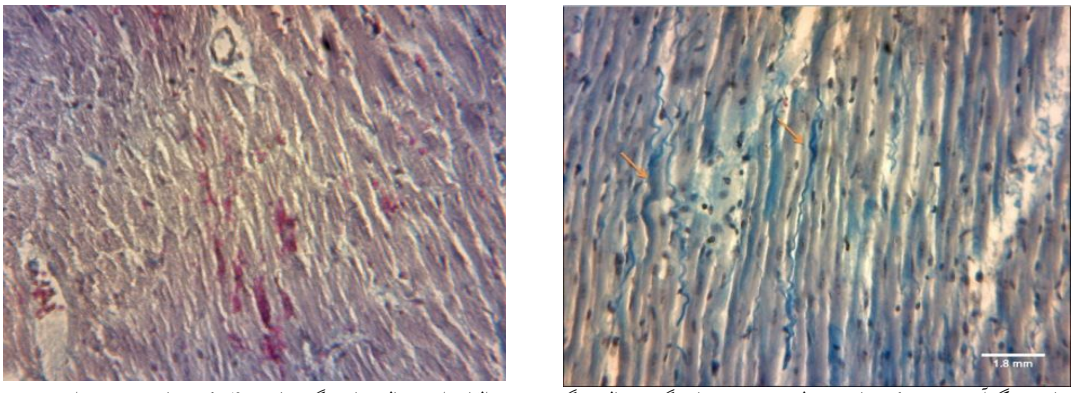
یافته‌ها

نتایج چند برابری ژن‌های bax و bcl2 نشان داد که میزان بیان ژن bax در گروه ملاتونین، بی‌هوازی و بی‌هوازی ملاتونین نسبت به ایسکمی به ترتیب ۱/۳۵، ۰/۹ و ۰/۴۱ برابر شده است؛ در حالی که بیان ژن bcl2 در گروه ملاتونین، بی‌هوازی و بی‌هوازی ملاتونین به ترتیب ۱/۳۲، ۲/۶۵ و ۳/۹۶ برابر شده است (شکل ۲). این یافته‌ها نشان دادند که مصرف ملاتونین در طول ۴ هفته چندان تغییری در بیان ژن‌های bax و bcl2 ایجاد نکرده است، اما تمرین بی‌هوازی میزان بیان bax و bcl2 را کاهش و افزایش داده است که

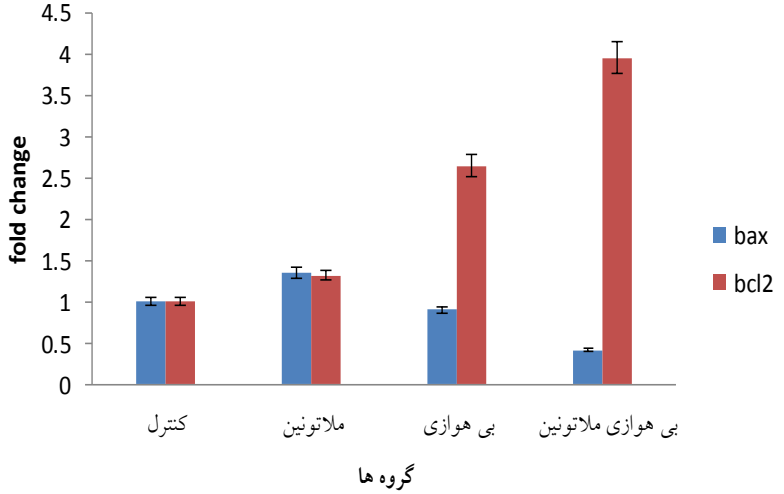
این تغییرات در گروه بی‌هوازی ملاتونین چشمگیرتر بوده است. در ادامه به منظور بررسی سطح معنی‌داری از مقادیر $۲^{-\Delta\Delta CT}$ ژن-های bax و bcl2 استفاده شد؛ در ادامه آزمون آنووا و تعقیبی توکی برای ژن bax و bcl2 به منظور مقایسه گروه‌های تحقیق استفاده گردید (جدول ۲). برای رعایت پیش فرض آزمون تحلیل واریانس، آزمون لون برای هر دو متغییر استفاده شد که به ترتیب برای فاکتور BAX و BCL2 مقدار ۰/۱۸۷ و ۰/۰۵۸ گزارش شد. همچنین مقدار F برای هر دو متغییر BAX و BCL2 به ترتیب مقدار ۹/۶۱۰ و ۰/۶۸۷ بود. با توجه به یافته جدول ۲، میزان بیان ژن BAX در بین گروه‌های تجربی تغییر معنی‌داری داشته است. در ادامه آزمون تعقیبی توکی در جدول ۳ نشان داد که بین گروه ملاتونین و گروه بی‌هوازی ملاتونین با آماره ۰/۰۰۱ و بین گروه کنترل و گروه ملاتونین بی‌هوازی با آماره ۰/۰۲۷ تأثیر معنی‌داری وجود دارد؛ اما بین گروه کنترل و گروه بی‌هوازی با آماره ۰/۹۴۷ تأثیر معنی‌داری گزارش نشد.

جدول ۱ : پروتکل تمرین بی‌هوازی

مراحل تمرین / مؤلفه تمرین	گرم کردن	بدنه اصلی تمرین بی‌هوازی	سرد کردن
زمان تمرین (دقیقه)	۶ دقیقه	۲۳-۱۵ دقیقه	۶ دقیقه
سرعت (m/ min)	۱۵ تا ۲۰	۳۰ تا ۳۷	۱۵ تا ۲۰
مسافت	۹۰ تا ۱۲۰ متر	۶۹۰ تا ۷۵۰ متر	۹۰ تا ۱۲۰ متر
شیب تردمیل (درجه)	صفر	۵ تا ۲۰ درجه	صفر



شکل ۱ : تصاویر رنگ‌آمیزی تری کروماسون بطن چپ رت‌های گروه سالم و گروه تحت القای ایزوپرنالین با بزرگ نمایی x۴۰ که نشان دهنده میزان رسوب کلاژن بیشتر در گروه تحت القای ایزوپرنالین نسبت به گروه سالم می‌باشد که این موضوع وقوع سکته را در گروه ایزوپرنالین نشان می‌دهد.



شکل ۲ : میزان Fold change بیان ژن BAX و BCL2 در گروه ملاتونین، بی‌هوازی و بی‌هوازی ملاتونین

جدول ۲ : آزمون تحلیل واریانس برای مقایسه ژن‌های bax و bcl2 در گروه‌های کنترل، ملاتونین، بی‌هوازی، بی‌هوازی ملاتونین

گروه‌های تحقیق	$-\Delta\Delta CTBax^{۲}$	$-\Delta\Delta CTBcl2^{۲}$	Fold change BAX	Fold change BCL2	انحراف استاندارد BAX	انحراف استاندارد BCL2	Sig BAX	Sig BCL2
کنترل	۱/۰۶۳۴	۲/۹۳	۱	۱	۰/۱۶	۱/۲۹	۰/۰۰۲	۰/۵۷۷
	۰/۸۵۱۹	۰/۵۲						
	۰/۸۸۸۱	۰/۲۵						
	۱/۱۹۶۴	۰/۳						
ملاتونین	۱/۴۰	۱/۶۸	۱/۳۵	۱/۳۲	۰/۲۵	۱/۱۱		
	۱/۰۵	۰/۴۱						
	۱/۳	۲/۷۵						
	۱/۶۶	۰/۴۶						
بی‌هوازی	۰/۹۲	۰/۴۹	۰/۹۰	۲/۶۵	۰/۱۳	۲/۲۶		
	۱/۰۱	۵/۷۸						
	۰/۷۱	۲/۶۲						
	۰/۹۸	۱/۷۲						
بی‌هوازی ملاتونین	۰/۹۰	۰/۲۴	۰/۴۱	۳/۹۶	۰/۳۷	۵/۸۹		
	۰/۵۱	۳/۰۱						
	۰/۰۶	۱۲/۵۷						
	۰/۲۰	۰/۰۳						

جدول ۳ : آزمون تعقیبی توکی در گروه‌های تحقیق

متغییر وابسته	گروه	گروه‌ها	تفاوت میانگین	Sig
Bax	کنترل	بی‌هوازی	۰/۰۹۵۵۸	۰/۹۴۷
		ملاتونین	-۰/۳۵۲۴۱	۰/۲۴۱
		بی‌هوازی ملاتونین	۰/۵۸۳۸۰	۰/۰۲۷
	بی‌هوازی	کنترل	-۰/۰۹۵۵۸	۰/۹۴۷
		ملاتونین	-۰/۴۴۷۹۹	۰/۱۰۳
		بی‌هوازی ملاتونین	۰/۴۸۸۲۱	۰/۰۷۰
	ملاتونین	کنترل	۰/۳۵۲۴۱	۰/۲۴۱
		بی‌هوازی	۰/۴۴۷۹۹	۰/۱۰۳
		بی‌هوازی ملاتونین	۰/۹۳۶۲۱	۰/۰۰۱
	ملاتونین بی‌هوازی	کنترل	-۰/۵۸۳۸۰	۰/۰۲۷
		بی‌هوازی	-۰/۴۸۸۲۱	۰/۰۷۰
		ملاتونین	-۰/۹۳۶۲۱	۰/۰۰۱
Bcl2	کنترل	بی‌هوازی	-۱/۶۵۰۵۸	۰/۸۹۰
		ملاتونین	۰/۳۲۶۱۳	۰/۹۹۹
		بی‌هوازی ملاتونین	-۲/۹۶۳۸۴	۰/۵۹۱
	بی‌هوازی	کنترل	۱/۶۵۰۵۸	۰/۸۹۰
		ملاتونین	۱/۳۲۴۴۵	۰/۹۳۸
		بی‌هوازی ملاتونین	-۱/۳۱۳۲۵	۰/۹۴۰
	ملاتونین	کنترل	۰/۳۲۶۱۳	۰/۹۹۹
		بی‌هوازی	-۱/۳۲۴۴۵	۰/۹۳۸
		بی‌هوازی ملاتونین	-۲/۶۳۷۷۱	۰/۶۷۳
	ملاتونین بی‌هوازی	کنترل	۲/۹۶۳۸۴	۰/۵۹۱
		بی‌هوازی	۱/۳۱۳۲۵	۰/۹۴۰
		بی‌هوازی	۲/۶۳۷۷۱	۰/۶۷۳

بحث

یافته تحقیق حاضر نشان داد که مصرف ملاتونین میزان بیان ژن آپوپتوزی bax و bcl2 را افزایش می‌دهد؛ که این یافته با یافته‌های تحقیق Forman و همکاران (۲۰۱۰) غیرهمسو است (۱۱). زیرا این محققان اثرات مفید ملاتونین را بر تغییرات قلب رت‌های پیر بررسی کردند؛ در حالی که تحقیق حاضر از رت‌های ۲ تا ۳ ماهه استفاده کرده است؛ و به نظر می‌رسد که در تحقیق Forman و همکاران ملاتونین بیشتر نقش آنتی اکسیدانی خود را اعمال کرده است زیرا آنتی اکسیدان‌ها در رت‌های پیر کاهش می‌یابد و متعاقباً با تیمار ملاتونین تا حدودی این کاهش جبران می‌شود و می‌تواند از حجم آپوپتوز و نشانگرهای آن مانند bax و bad بکاهد. در حالی که در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد ملاتونین بیشتر نقش خواب‌آوری و رگ‌گشایی خود را در رت‌های ۲ تا ۳ ماهه اعمال کرده است؛ به طوری که با خواب آوری و عدم تحرک و عمل رگ گشایی میزان نفوذ چربی در میوکارد افزایش یافته و در ادامه شاخص‌های التهابی مانند TNF-α و رادیکال‌های آزاد مانند ROS و RNS بیشتر می‌شوند و در نهایت میوکارد مستعد به آسیب ایسکمی می‌گردد. بنابراین به نظر می‌رسد ملاتونین با ویژگی‌های خود مانند خاصیت آنتی اکسیدانی، رگ گشایی و خواب‌آوری می‌تواند نقش دوگانه ایفا کند؛ به طوری که اگر خاصیت آنتی اکسیدانی آن غالب شود می‌تواند نقش مفیدی اعمال کند؛ اما در صورتی که نقش رگ‌گشایی و خواب‌آوری آن غالب گردد می‌تواند نقش زیان‌آوری ایفا کند.

همچنین به نظر می‌رسد دلیل افزایش bcl2 این باشد که ترکیبات حساس به ردوکس در سیگنالینگ محافظت سلول ملاتونین درگیر می‌شوند و منجر به پاسخ رونویسی AP-1 و NrF2 می‌گردند. با این مسیرها، ملاتونین باعث تحریک ژن‌های آنتی اکسیدانی و دفع مسمومیت می‌شود و به نوبه خود به عنوان افزایش دهنده سیستم گلوتاتیون عمل می‌کند. در نهایت ملاتونین سبب کاهش تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی و فعالیت عوامل آنتی آپوپتوزی bcl2 و حساس به ردوکس می‌گردد (۱۴). از طرف دیگر Salari lak و همکاران (۱۳۹۰) بیان کردند که تولید زیاد رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدها، سبب اختلال در ساختمان غشای لیپیدی و دیگر ترکیبات سلولی می‌گردد. این محققین از یافته‌های خود نتیجه گرفتند که مصرف ملاتونین از تغییرات پروفایل‌های چربی و افزایش MDA ناشی از رژیم غذایی با فروکتوز بالا در بافت قلبی جلوگیری می‌کند (۱۵). زیرا این هورمون پس از عبور از غشای زیستی بیان ژن‌های آنتی اکسیدانی را تحریک و ژن‌های پرواکسیدان را مهار می‌کند، و به این ترتیب توان آنتی اکسیدانی سلول‌ها را بیشتر می‌نماید (۱۶). همچنین دیگر دلیل احتمالی افزایش ژن BCL2 کاهش آدرنالین و متعاقباً حفظ هموستاز کلسیم است که منجر به رگ گشایی عروق میوکارد می‌شود؛ در نتیجه منجر به حداقل اختلال و نفوذپذیری میتوکندری سلول می‌گردد؛ بنابراین خاصیت آنتی اکسیدانی ملاتونین سبب کاهش iNOS و اکسیدان‌ها و همچنین افزایش NRF2 و مسیر JAK2/STAT3 می‌گردد که هر دو باعث مهار التهاب و اکسیداسیون میوکارد می‌شوند؛ (۱۴) اما از طرف دیگر عدم تحرک گروه ملاتونین، ممکن است سبب افزایش آدیپوکاین‌ها مانند ویسفاتین در درون پلاسما گردند؛ که در نهایت التهاب و اکسیداتیو میوکارد را افزایش می‌دهند؛ و میوکارد را بیشتر مستعد به آسیب ایسکمی می‌گردانند. در عین حال وقتی که نفوذ لیپیدها و عوامل اکسیدانی بر اکسیداسیون لیپیدها و عوامل آنتی اکسیدانی غالب شوند می‌توانند نقش زیان‌آوری در میوکارد ایجاد کنند. لذا به نظر می‌رسد که ملاتونین می‌تواند دارای اثرات چند وجهی برای آسیب ایسکمی ریپرفیوژن قلب باشد.

یافته‌های دیگر تحقیق نشان داد که تمرین بی‌هوازی میزان بیان ژن bax و bcl2 را کاهش و افزایش داده است. اما این کاهش در مقایسه با گروه ایسکمی ریپرفیوژن معنی‌دار بیان نشد. این یافته‌ها از نظر اینکه میزان بیان ژن bax و bcl2 را کاهش و افزایش داده است با تحقیقات Santos و همکاران ، Santana و همکاران و Chengji و همکاران همسو است (۳، ۱۷و ۱۸)، اما از نظر معنی‌داری غیر همسو است. یک تفاوت اساسی در تحقیق حاضر و پژوهش Santos و همکاران این است که تحقیق حاضر رت‌های سالم را مورد بررسی قرار داده است در حالی که سانتوز و همکاران رت‌های دیابتی را بررسی کرده‌اند. حال به نظر می‌رسد رت‌های دیابتی تا حدودی نشانگرهای آپوپتوزی در آنها بارزتر است و به همین دلیل تمرین ورزشی توانسته است بر میزان بیان ژن آپوپتوزی تأثیر بیشتری بگذارد؛ در حالی که تحقیق حاضر رت‌های سالم را تحت تمرین بی‌هوازی قرار داده است. در تأیید این مطلب پژوهش santos و همکاران نشان دادند میزان پروتئین‌های آنتی آپوپتوزی BCL-XL در گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل کمتر بوده است. با این حال، رت‌های پژوهش سانتوز و همکاران ۱۰ هفته و هر هفته ۵ بار تمرین کرده‌اند؛ در حالی که رت‌های تحقیق حاضر ۴ هفته و در هر هفته ۳ بار تمرین داده شده‌اند. به نظر می‌رسد مدت تمرین به منظور سازگاری ویژگی‌های تمرین می‌تواند مفید باشد. همچنین، به نظر می‌رسد اگر مدت زمان جلسات تمرین بیشتر شود یا تواتر آن در هفته افزایش یابد ممکن است بر میزان بیان نشانگرهای آپوپتوزی bax تأثیر گذار باشد. زیرا با سازگاری تمرین عوامل اکسیدانی، پروفایل‌های چربی، التهاب و در نهایت عوامل آپوپتوزی مانند کاسپاز ۳ کاهش می‌یابند و در مقابل عوامل آنتی اکسیدانی، پیش بقای سلولی مانند مسیر IGF1-R/PI3K/AKT افزایش می‌یابند که در مجموع می‌توانند آپوپتوز قلبی را کاهش دهند. نتایج بالا همچنین با تحقیقات jafari

و همکاران scott و همکاران همسو است (۱۹، ۲۰)، اما از نظر سطح معنی‌داری غیر همسو است. اسکات و همکاران بیان کردند که تمرین ورزشی، اثر محافظتی در مقابل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن میوکارد دارد. زیرا تمرین هوازی مکانیزم‌های مورد نظر اثرات محافظت قلبی ناشی از ورزش را مانند افزایش گردش خون شریان کرونری، بیان پروتئین‌های استرس شبکه آندوپلاسمی، افزایش فعالیت سیکلواکسیژناز ۲، القای پروتئین‌های شوک گرمایی میوکارد، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی سیتوزولی میوکارد، افزایش سیگنالینگ نیتریک اکساید، تغییر فنوتیپ میتوکندریایی، تغییر و افزایش کانال‌های پتاسیم حساس به ATP سارکولمایی و غشای داخلی میتوکندریایی بهبود می‌دهد. در نهایت محققین نشان دادند که افزایش سطوح آنتی اکسیدانی میوکارد و افزایش بیان کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP به محافظت قلبی ناشی از ورزش در مقابل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن کمک می‌کند؛ چرا که عوامل ذکر شده سبب کاهش آسیب به میتوکندری می‌شود و استحکام غشای میتوکندری را افزایش می‌دهند که در نهایت سبب افزایش بیان ژن bcl2 در میتوکندری می‌گردد (۲۰). در عین حال به نظر می‌رسد با افزایش مدت زمان تمرین و همچنین تواتر تمرین در هفته بتوان این افزایش بیان ژن bcl2 را ارتقا بخشید؛ چرا که عوامل ذکر شده در بالا با سازگاری تمرین فرصت افزایش بیشتری می‌یابند و در نتیجه میوکارد آمادگی بیشتری برای مقابله به آسیب ایسکمی ریپرفیوژن خواهد داشت.

یافته‌های دیگر تحقیق نشان داد که تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین میزان بیان ژن bax و bcl2 میوکارد را کاهش و افزایش داده است. اما این کاهش در bax در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بیان نشد؛ اما در مقایسه با گروه ملاتونین معنی‌دار بیان شد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که تمرین هوازی با مصرف ملاتونین توانسته است میزان بیان bax را نسبت به سایر گروه‌ها به مقدار بیشتر کاهش دهد؛ زیرا به نظر می‌رسد مصرف ملاتونین با خاصیت آنتی اکسیدانی خود توانسته به عدم سازگاری تمرین در گروه تمرین بی‌هوازی کمک کند و کمبودهای آنتی اکسیدانی را جبران نماید؛ و از طرف دیگر تمرین ورزشی به طور احتمالی میزان نفوذ پروفایل‌های چربی مانند LDL و VLDL را در گروه ملاتونین به دلیل عدم تحرک و خواب‌آوری جبران کرده است و این عوامل اثر افزایشی بر هم گذاشته‌اند که در نهایت منجر به کاهش میزان bax در میوکارد شده‌اند. از طرف دیگر ورزش و ملاتونین به طور احتمالی هموستاز کلسیم، نفوذپذیری میتوکندری، رهایش سیتوکروم C و آدرنالین را بهبود می‌بخشند که همه این عوامل می‌توانند در کاهش آسیب ایسکمی ریپرفیوژن دخالت کنند. در نهایت پژوهشی نشان داد ورزش و ملاتونین با توجه به افزایش عوامل پیش بقا مانند مسیرهای سلولی IGF1-R/PI3K/AKT و JAK2/STAT3 می‌توانند میزان پیش بقای میوکارد را افزایش دهند؛ (۱۸) حال با توجه به موارد ذکر شده به نظر می‌رسدکه با افزایش مدت زمان تمرین و مصرف ملاتونین می‌توان به نتیجه بهتری امید داشت.

البته دلیل افزایش بیشتر بیان ژن BCL2 در گروه تمرین ورزشی با ملاتونین در مقابل تمرین ورزشی به تنهایی به نظر می‌رسد میزان التهاب کمتر در گروه ورزشی با مصرف ملاتونین باشد. زیرا Veneroso و همکاران بیان کردند هنگامی که عضله قلب تحت ورزش حاد قرار می‌گیرد باعث افزایش علائم آسیب سلولی می‌شود؛ چرا که ورزش همراه با افزایش معنی‌دار فعالیت مالوپراکسیدازها و سطوح TNF-α mRNA، IL-1 و IL-6 است. علاوه بر این، محققین نشان دادند غلظت mRNA و پروتئین مولکول چسبان درون سلولی ۱، نیتریک اکساید سنتتاز القایی و سیکلواکسیژناز ۲ افزایش یافت. همچنین فعالیت معنی‌دار NF-KB در رت‌های تمرین کرده مشاهده شد. در مقابل این اثرات به طور کلی و جزئی با تیمار ملاتونین مسدود شد. بنابراین می‌توان گفت ملاتونین از آسیب قلبی ناشی از ورزش محافظت می‌کند. در تأیید این مطلب kumar و همکاران نشان دادند در افراد پس از ورزش، محصولات پراکسیداسیون لیپید مانند مالونیل دی آلدئید به طور معنی‌داری افزایش داشت؛ در حالی که سوپر اکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز کاهش داشت. همچنین سطح پایه محصولات پراکسیداسیون لیپید در افراد تحت درمان با ملاتونین در مقایسه با مطالعه بدون ملاتونین به طور معنی‌داری کاهش داشت؛ در ادامه کاهش سوپراکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز ناشی از ورزش پس از درمان با ملاتونین جلوگیری شد (۲۲). در تأیید مطالب فوق santos و همکاران نشان دادند رت‌های تمرین کرده تحت استانزلول، افزایشی در فشار خون و وزن نسبی قلب را تجربه کردند؛ و آنها انحراف محور چپ قلب را افزایش دادند. البته اگرچه ملاتونین هایپرتروفی قلبی را در رت‌های تحت درمان با استانزلول جلوگیری نکرد؛ اما فشار خون و فعالیت کاتالاز قلبی را حفظ کرد؛ و از انحراف محور الکتریکی قلب ناشی از استانزلول جلوگیری کرد. این یافته نشان داد که تجویز مزمن استانزلول باعث اثرات جانبی قلبی عروقی می‌شود که تا حدی با تیمار ملاتونین کاهش می‌یابد. در پایان محققین ذکر کردند که ترکیب ملاتونین و ورزش می‌تواند اثرات جانبی استانزلول را در سیستم قلبی عروقی به حداقل برساند (۱۷).

نتیجه‌گیری

حال با توجه به یافته تحقیق حاضر و تحقیقات پیشین به نظر می‌رسد ملاتونین همراه با ورزش می‌تواند از اختلالات سیستم قلبی عروقی مانند افزایش رادیکال‌های آزاد، ROS، RNS، اکسیدان‌ها و عوامل آپوپتوزی مانند BAX جلوگیری کند و از طرف دیگر عوامل آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دسموتازها و گلوتاتیون و همچنین

عوامل آنتی آپوپتوزی مانند BCL2 و پروتئین‌های شوک گرمایی مانند HSP72 و HSP70 و پروتئین‌های کانال‌های یونی مانند کلسیم و پتاسیم را افزایش دهد. از این رو توصیه می‌گردد با افزایش مدت زمان، شدت و تواتر تمرین در هفته همراه با مصرف ملاتونین بتوان از میزان حجم آپوپتوز ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن کاست.

قدردانی

این مقاله، حاصل یک کار پژوهشی در آزمایشگاه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه خوارزمی است؛ و از خانم تایانلو و کریم‌زاده برای زحمات بی‌دریغشان تقدیر و تشکر می‌نمایم.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه بهداشت و درمان بهبهان استان خوزستان به شماره مرجع ۹۴/پ/۷۲/۲۵ به تأیید رسیده است و دارای کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1394.462 می‌باشد.

منافع متقابلی

مولف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از انتشار و تالیف این مقاله ندارد.

مشارکت مولفان

ضمنا ح.ع و ح. ر در طراحی، اجرا و تحلیل مطالعه همکاری داشته‌اند؛ اما سایر همکاران در مشاوره، پیش نویس و ویرایش مطالعه سهیم بوده‌اند و همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تأیید کرده‌اند.

منابع مالی

این مقاله منابع مالی نداشته است.

References

1. *Longo* F, *Kasper* H, *Loscalzo* J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. New York, McGraw-Hill Professional, 2012.
2. Sheryatzadeh M, Apoptosis programmed cell death. 1st ed. *Arak, arak Univ Press*, 2009.
3. Santana E, Serra A, Junior J, Bocalini D, Barauna V, Krieger J, Tucci P. Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. *Motriz, Rio Claro* 2014; **20**(2): 233-238. doi: 10.1590/S1980-65742014000200015.
4. Bum Kwak H, Song W, Lawler J M. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *FASEB Journal* 2006; **20**(6): 791-793. doi: 10.1096/fj.05-5116fje.
5. Delchev S, Georgieva K, Koeva Y, Atanassova P. Bcl-2 and Bax expression in rat myocardium after acute exercise and endurance training. *Bulgaria* 2005; **19**(21): 269-276.
6. Lajoie C, Calderone A, Béliveau L. Exercise training enhanced the expression of myocardial proteins related to cell protection in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch* 2004; **449**(1): 26-32. doi: 10.1007/s00424-004-1307-0.
7. Ehrman J, Gordon P, Visich P, Keteyian S. *Clinical Exercise Physiology*. 3rd ed. New York, Human Kinetics, 2013.
8. Farhud D, Yazdanpanah L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Deficiency. *Iranian J Publ Health* 2008; **37**(4): 1-18.
9. Petrosillo G, Venosa N, Pistolese M, Casanova G, Tiravanti E, Colantuono G, et al. Protective effect of melatonin against mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemiareperfusion: role of cardiolipin. *The FASEB Journal* 2006; **20**(2): 269-276. doi: 10.1016/j.bbabio.2007.07.011.
10. Patel V, Upaganlawar A, Zalawadia R, Balaraman R. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: A biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. *Eur J Pharmacol* 2010; **644**(1-3): 160-168. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.06.065
11. Forman K, Vara E, Garcıa C, Kireev R, Cuesta S, Acuna-Castroviejo D, et al. Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in a murine model of accelerated aging. *J Pineal Res* 2010; **49**(3): 312-320. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00800.x.
12. Azamianjazi A, Hafezi M, Cheraghi J, Abdi H. The Combined Effect of Endurance Training and Atorvastatin on the Extent of Necrosis Damageand Fibrosis Tissue in Male Wistar Rats Heart after Experimental Myocardial Infarction. *SJIMU* 2016; **23**(7): 28-38.
13. Høydal M A, Wisløff U, Kemi O J, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovascular Prev Rehabil* 2007; **14**(6): 753-760. doi: 10.1097/HJR.0b013e3281eacef1.
14. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, et al. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J* 2010; **24**(10): 3603-3624. doi: 10.1096/fj.10-154450.
15. Salari lak L, Heidari R, Nejati V. Protective Effects of Melatonin on Lipid Profile in Fructose Induced Dyslipidemia. *IJEM* 2011; **13**(4): 406-411.

16. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin; multiplicity of mechanism from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; **27**(2): 119-130. doi: doi.org/10.1385/endo:27:2:119
17. Santos G, Rodrigues M, Goncalves E, Marcondes M. Areas M. *Melatonin Reduces Oxidative Stress and Cardiovascular Changes Induced by Stanozolol in Rats Exposed to Swimming Exercise. Eurasian J Med* 2013; **45**(3): 155-162. doi: 10.5152/eajm.2013.33.
18. Chengji W, Shoujun H. Aerobic exercise can ameliorate heart function in patients with myocardial infarction through up-regulating m3 receptor. *IJC Metabolic & Endocrine* 2016; **13**: 1-5. doi: 10.1016/ j.ijcme.2016.08.001.
19. Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. Effect of Exercise Training on Bcl-2 and Bax Gene Expression in the Rat Heart. *Gene Cell Tissue* 2015; **2**(4): e32833. doi: 10.17795/gct-32833.
20. Scott K, John C, Quindry Andreas N, Kavazis. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2008; **44**(2): 193-201. doi: 10.1152/physiol.00030. 2013. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.006
21. Veneroso C, Tuno M, Javier Gallego J, Collado P. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res* 2009; **47**(2): 184-191. doi: 10.1111/j.1600-079x.2009.00699.x
22. Kumar K, Naidu M. Effect of oral melatonin on exercise-induced oxidant stress in healthy subjects. *Indian Journal of Pharmacology* 2002; **34**: 256-259.