

The Effect of Isosorbide and Garlic Supplementation on Protein Levels and Gene Expression of PLA2 at the Heart Tissue in Female Rats with Hypertension After a Period of Endurance Training

Karimirad Kamarej M A ¹. *Phd*, Abbassi Dalooi A*. *Phd*, Barari A ². *Phd*, Ziaolhagh S. J ³. *Phd*

* Department of Exercise Physiology Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran.

¹ Department of Exercise Physiology Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

² Department of Exercise Physiology Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran.

³ Department of Exercise Physiology Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran.

Abstract

Aims: Hypertension is a polygenic disease that is associated with the interaction of genetic and environmental factors. The aim of this study was to investigate the effect of Isosorbide and Garlic supplementation on protein levels and gene expression of PLA2 at the heart tissue in female rats with hypertension after a period of aerobic training.

Materials & Methods: In this experimental study, 40 female Wistar rats weighing 180-220 g were randomly divided into 8 groups: healthy control, sham, blood pressure induction (Hyper), garlic, endurance training, endurance training -garlic, isosorbide and endurance training -isosorbide. The rats suffered from hypertension after dietary period and 10 mg/kg body weight L-NAME injection, 6 days a week for 8 weeks. Experimental groups received 40 mg/kg body weight of isosorbide and 50 mg/kg body weight garlic supplement for six weeks. The endurance training program was performed at speed of 20-30 m/min for 20 to 35 minutes, 5 sessions per week for 6 weeks. Protein levels and expression of PLA2 heart tissue were measured using ELISA kit and Real Time PCR.

Results: The results showed that the level of PLA2 Protein at the heart tissue in Isosorbide ($P=0.043$) and Isosorbide - training ($P=0.035$) groups was significantly lower than the blood pressure induction group. Also, the gene expression level of PLA2 at the heart tissue in the garlic, training, garlic - training, Isosorbide and Isosorbide - training significantly decreased that of the hypertension group ($P=0.0001$).

Conclusion: According to the findings of this research, it seems aerobic training, garlic and isosorbide and their combined intervention can help to improve the factors involved in hypertension.

Keywords:

Hypertension: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68006973>];

Exercise: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68015444>];

Isosorbide: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68007547>];

Garlic: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68005737>];

Phospholipase-A2: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68054467>];

*Corresponding Author

Tel: 09111274366

Fax: +98 11 43217126

Address: Department of Exercise Physiology Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran.

Received: 2018/ Nov /12

Accepted: 2019/ Mar /16

ePublished: 2019/ May /16

مقدمه

مطالعات نشان داده اند که فشار خون بالا منجر به آسیب اندام‌های هدف مانند رگ‌های خونی، قلب، مغز و کلیه‌ها می‌شود^[1,2]. پرفشاری خون کنترل نشده باعث آسیب به این اندام‌ها و ناتوانی و مرگ و میر قلبی می‌شود. علاوه بر این، عملکرد عروقی غیر طبیعی، که ممکن است دلیل آسیب اندام‌های مورد نظر مانند قلب باشد، یک ارتباط مهم در توسعه بیماری‌های قلبی عروقی می‌باشد به طوری که اختلال عملکرد عروقی با التهاب و سطوح استرس اکسایشی همراه است^[2]. همچنین مشخص شده است که فشار خون بالا یک بیماری پلی ژنیک است که با تعامل عوامل ژنتیکی و محیطی مرتبط می‌باشد. بنابراین، بررسی تغییرات پروتئین و بیان ژن‌های مرتبط و تجزیه و تحلیل تفاوت بین گروه‌ها می‌تواند مکانیسم تنظیم کننده پرفشاری خون را مشخص کند^[۳]. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ژن فسفولپياز A2 ممکن است یکی از ژن‌های هدف در پرفشاری خون باشد^[3,4]. فسفولپياز A2 (Phospholipases A2 (PLA2s) آنزیم ضد التهابی است که با بازسازی قلب ارتباط دارد، گزارش شده است که مهار PLA2 ممکن است در پیشگیری از فیبروز قلبی در فشار خون بالا اثرات درمانی داشته باشد^[4]. در همین راستا، کاناکوگلو و همکاران (۲۰۰۹) در تحقیقی به بررسی ارتباط بین مارکرهای التهابی در بیماران مبتلا به پرفشاری خون با یا بدون داروی درمان ضد فشار خون پرداختند. نتایج آنها نشان داد افراد مبتلا به فشار خون بالا دارای سطوح بالاتر PLA2 نسبت به گروه کنترل بودند^[5]. بنابراین تجویز روش‌های درمانی برای تنظیم سطوح PLA2 می‌تواند به تنظیم فشار خون در افراد دارای پرفشار خون کمک کند.

دهندگان نیتریک اکساید به عنوان گشاد کننده عروق حاوی نیتروزن در درمان بیماری‌های ایسکمیک و احتقانی قلب و اورژانس‌های فشار خون مورد استفاده قرار می‌گیرند^[6]. ایزوسوربايد دی نیترات یکی از این داروها است که در درمان بیماری پرفشار خون ایمن و موثر بوده است^[7]. ایزوسوربايد دی نیترات با ۱،۴:۳،۶- دی هیدرید-دی-گلوکیتول-۲،۵- دی نیترات یک عامل گشاد کننده عروق و ضد آنژین است. ایزوسوربايد دی نیترات یک نیترات است و نیترات‌ها، در داخل عضله صاف دینتراته شده و اکسید نیتریک (Nitric oxide (NO) آزاد می‌شود که گوانیلیل سیکلاز (گیرنده پروتئینی پپتیدهای ناتیوریטיک A) را تحریک نموده و cGMB آزاد می‌کند که cGMB عضله صاف را شل می‌کند. مکانیسم اصلی درمانی نیترات‌ها در درمان آنژین آرترواسکلووتیک، کاهش نیاز عضله قلبی به اکسیژن و همینطور از طریق واژودیلاتاسیون محیطی می‌باشد^[8]. افزایش جریان خون کرونر از راه عروق جانبی در ناحیه ایسکمیک، از سایر مکانیسم‌های احتمالی است. نیترات‌ها بر بافت‌های مختلف بدن از جمله کلیه‌ها، دستگاه عصبی مرکزی، عروق خونی و قلب اثر گذار هستند با این حال، هیچ گونه اثر مستقیمی بر میوکارد ندارند^[8]. با این حال، تعدد استفاده از داروهای شیمیایی و نگرانی از بروز عوارض جانبی توسط داروها موجب استفاده نابجا از داروها، عدم پذیرش بیماران و در نتیجه اختلال در کنترل دقیق بیماری می‌گردد. به همین دلیل امروزه نگرشی جدید درباره گیاهان دارویی به وجود آمده و بررسی‌های زیادی بر روی گیاهان دارویی در حال انجام است. در این میان سير از گیاهانی است که از قدیم به علت خواص مفید ضد میکروبی مصرف زیادی داشته و امروزه نیز در

اثر مصرف ایزوسوربايد و مکمل سير بر سطوح پروتئين و بيان ژن فسفولپياز بافت - A2 (PLA2) قلب در رت های ماده مبتلا به پرفشاری خون پس از یک دوره تمرین استقامتی

محبوبه کریمی زاد کمارج Phd

گروه فیزیولوژی ورزشی واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

* آسبه عباسی دلویی Phd

گروه فیزیولوژی ورزشی واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

علیرضا براری Phd

گروه فیزیولوژی ورزشی واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

سید جواد ضیاءالحق Phd

گروه فیزیولوژی ورزشی واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران.

چکیده

اهداف: فشار خون بالا یک بیماری پلی ژنیک است که با تعامل عوامل ژنتیکی و محیطی مرتبط می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی اثر مصرف ایزوسوربايد و مکمل سير بر سطوح پروتئین و بیان ژن فسفولپياز - A2 (PLA2) بافت قلب در رت های ماده مبتلا به پرفشاری خون پس از یک دوره تمرین استقامتی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۰ سر موش ماده ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم به طور تصادفی در ۸ گروه شامل کنترل سالم، شم، القاء فشار خون (هایپر)، سير، تمرین استقامتی، تمرین استقامتی-سير، ایزوسوربايد و تمرین استقامتی-ایزوسوربايد تقسیم شدند. رت‌ها پس از یک دوره رژیم غذایی و تزریق ماده NAME_L به میزان ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن، ۶ روز در هفته به مدت ۸ هفته به پرفشاری خون مبتلا شدند. سپس گروه‌های تجربی به مدت شش هفته ۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ایزوسوربايد و ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مکمل سير دریافت کردند. برنامه تمرین استقامتی نیز با سرعت ۲۰ تا ۳۰ متر در دقیقه و مدت ۲۰ الی ۳۵ دقیقه، پنج جلسه در هفته و به مدت شش هفته اجرا شد. سطوح پروتئین و بیان ژن PLA2 بافت قلب با استفاده از کیت الایزا و روش Real Time PCR اندازه گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد سطح پروتئین فسفولپياز-A2 بافت قلب در گروه‌های سوربايد ($P=0/043$) و سوربايد-تمرین ($P=0/035$) نسبت به گروه هایپر به طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین میزان بیان ژن فسفولپياز-A2 بافت قلب در گروه‌های سير، تمرین، سير-تمرین، سوربايد و سوربايد-تمرین نسبت به گروه هایپر به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P=0/0001$).

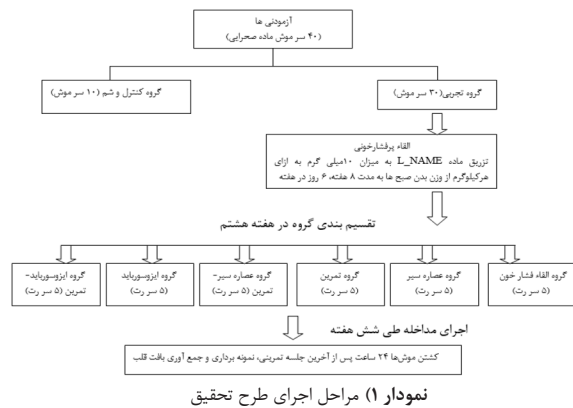
نتیجه گیری: با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد تمرین هوازی، سير و ایزوسوربايد و مداخله ترکیبی آن‌ها می‌تواند به بهبود عوامل درگیر در پرفشاری خون کمک کند. **واژگان کلیدی:** فشار خون بالا، تمرین، ایزوسوربايد، سير، فسفولپياز-A2.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۱

هدفدار با توجه به شرایط وزنی و سنی انجام شد. پس از تعیین حجم نمونه، گروه‌ها بر این اساس به ۸ گروه بصورت تصادفی تقسیم بندی شدند (نمودار ۱).

- ۱) گروه کنترل و شام (۵ سر رت)
- ۲) گروه شام (۵ سر رت)
- ۳) گروه القاء فشار خون (هایپر) بدون مداخله (۵ سر رت)
- ۴) گروه القاء فشار خون + عصاره سیر (۵ سر رت)
- ۵) گروه القاء فشار خون + تمرین استقامتی (۵ سر رت)
- ۶) گروه القاء فشار خون + عصاره سیر + تمرین استقامتی (۵ سر رت)
- ۷) گروه القاء فشار خون + قرص ایزوسوربايد (۵ سر رت)
- ۸) گروه القاء فشار خون + قرص ایزوسوربايد + تمرین استقامتی (۵ سر رت).

حیوانات در شرایط تغذیه ای، دمایی و نوری یکسانی قرار گرفتند. بدین منظور حیوان در یک قفس ویژه مقید کردن (Restraint cage) قرار گرفت و برای کم کردن اثر محرک‌های خارجی روی قفس حیوان با یک پارچه پوشانده شد. جهت بررسی فشار خون از اندازه گیری میزان نیترواکساید (NO) و آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۱ (ACE) استفاده شد. پروتکل اجرا شده در این مطالعه بر مبنای دستورالعمل کمیته تحقیقات و اخلاق دانشکده فناوری های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و بر اساس راهنمای مؤسسه ملی بهداشت، مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (NIH publications No. 80-23) در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی صورت گرفت.



نحوه القاء پرفشارخونی

رت‌ها پس از یک دوره رژیم غذایی و تزریق ماده L_NAME به میزان ۱۰ میلی گرم به ازای هرکیلوگرم از وزن بدن صبح‌ها به مدت ۸ هفته، ۶ روز در هفته به پرفشاری خون مبتلا شدند [24].

نحوه مصرف ایزوسوربايد

گروه‌های تجربی طی دوره مداخله مقدار ایزوسوربايد را به میزان ۴۰ میلی گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن به صورت گاوژ دریافت کردند [25].

نحوه مصرف مکمل سیر

گروه‌های تجربی طی دوره مداخله مقدار مکمل سیر را به میزان ۵۰ میلی گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن به صورت گاوژ دریافت کردند [26]. عصاره سیر طبق روش استفاده شده توسط [27] سیر تازه (سیر معروف همدان) خریداری شد. ابتدا پوست سیر گرفته شده و با آب مقطر شستشو داده شد. سپس به قطعات کوچکی برش داده و به ازای هر ۱۰۰ گرم سیر خرد شده ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و با استفاده از مخلوط کن به خوبی مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل

تحقیقات مختلف، خواص مفید آن به اثبات رسیده است [9]. سیر حاوی ترکیباتی از قبیل نشاسته، موسیلاژ، پروتئین و قند میباشد. این گیاه خواص درمانی فراوانی نظیر تقویت کننده سیستم ایمنی، ضد آلرژی و ضد تشنج، کاهش دهنده کلسترول، ضد سرطان، درمان عفونت گلو، آنفوانزا، سرماخوردگی، هیپاتیت، یبوست، کنترل عفونت‌های باکتریایی، قارچی و مخمرها، سلامت پوست و مو دارد [10]. سیر به دلیل دارا بودن منابع فیتوکمیکال‌ها می‌تواند در درمان بیماری قلبی عروقی، کاهش فشارخون، کاهش کلسترول خون و تری گلیسیرید و کاهش تجمع پلاکت نقش به‌سزایی داشته باشد [11]. برخی مطالعات مؤثر بودن سیر بر روی کاهش فشار خون را بررسی کرده‌اند [12،13]. گزارش شده که سیر از طریق عملکرد متیل آلایل تری سولفید که یک جزء از گروه آلایل تری سولفید است، فشار خون را پایین می‌آورد و این عمل را از طریق گشاد کردن دیواره عروق انجام می‌دهد [14].

فعالیت ورزشی در طولانی مدت به عنوان یک روش غیر دارویی برای کاهش فشار خون در طی استراحت یا حین انجام فعالیت‌های بدنی روزانه است [15-17]. با ورزش و فعالیت بدنی، اثرات زیانبار فیزیولوژیکی ناشی از افزایش فشار خون رخ می‌دهد، را می‌توان کاهش داد و کیفیت زندگی را بهبود بخشید [18]. همچنین، تحقیقات نشان داده‌اند که فعالیت فسفولیپاز A2 در اثر فعالیت ورزشی در آزمودنی‌های انسانی و حیوانی تغییر می‌کند [19،20]. با این حال، اطلاعات محدودی راجع به اثرات فعالیت ورزشی بر فسفولیپاز A2 موجود است، و اینکه این موضوع در افراد مبتلا به فشارخونی به دنبال فعالیت ورزشی مورد بررسی قرار نگرفته است. فشارخون بالا یکی از عوامل تهدیدکننده سلامت عمومی و از شایع‌ترین علت‌های اصلی ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی است. فشار خون بالا در سگته‌های قلبی، مغزی، نارسایی احتقانی قلب، و بیماری‌های عروقی محیطی نیز دخیل می‌باشد [21،22]. در نتیجه درمان فشار خون بالا در کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی بسیار مهم است. مطالعات محدودی برای بررسی رابطه بین فشار خون / داروهای فشار خون بالا و وضعیت فسفولیپاز A2 انجام شده است. لذا با توجه به اثرات منفی و کنترل نشده داروهای صنعتی برای بدن و به ویژه تأثیر آنها بر دستگاه قلبی عروقی می‌توان با بررسی مواد طبیعی از قبیل عصاره سیر بر سطوح فاکتورهای التهابی و اکسایشی در بافت قلبی یاری رساند. عواملی همچون عوارض جانبی کمتر، گوناگونی ترکیبات مؤثره موجود در گیاهان، هزینه‌های اقتصادی پایین تر، توسعه صنایع وابسته به کشت گیاهان دارویی، جلوگیری از خروج ارز از کشور، ایجاد کار مفید و به ویژه پیشنهاد استفاده از گیاهان دارویی توسط سازمان جهانی بهداشت، دلایل رویکرد جهانی به طب گیاهی است [23]. از طرفی، تأثیر فعالیت ورزشی بر سطوح PLA2 در بیماران مبتلا به فشار خون بالا با یا بدون درمان مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر مصرف ایزوسوربايد و مکمل سیر بر سطوح پروتئین و بیان ژن PLA2 بافت قلب در رت‌های ماده مبتلا به پرفشاری خون پس از یک دوره تمرین استقامتی می‌باشد.

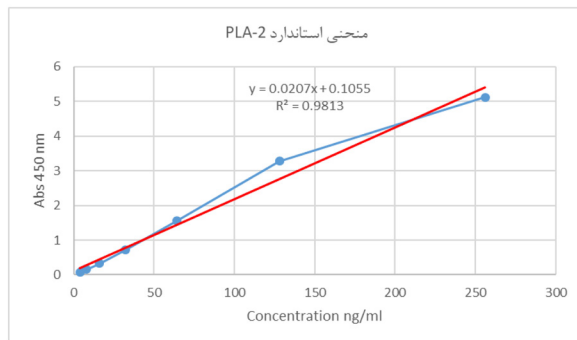
روش بررسی

تحقیق حاضر از نوع تجربی می‌باشد. جامعه آماری این پژوهش رت‌های ماده نژاد ویستار می‌باشد. برای انجام این تحقیق، تعداد ۴۰ سر رت ماده ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود انتخاب شدند. نمونه آماری این تحقیق، به روش نمونه گیری انتخابی

توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۲ آورده شده است. پس از کسب اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده‌های وزنی از آزمون شاپیرو - ویلک استفاده شد. بعد از این که طبیعی بودن توزیع داده‌ها مشخص گردید، جهت بررسی مقایسه میانگین تغییرات سطح پروتئین و بیان ژن گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تمام عملیات آماری پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد و سطح معناداری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۲) توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	پرایرها	توالی
PLA-2	Forward	5'-GGGGACCTTTGGCGATATGC-3'
	Reverse	5'-CCAAAACATTTTCCTGATTAGG-3'
Beta actin	Forward	5'-TCCTCTGAGCGCAAGTAC-3'
	Reverse	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCT-3'



شکل ۱) منحنی استاندارد بیان ژن فسفولپياز A2 (PLA2)

یافته‌ها

در جدول ۳ میانگین و انحراف معیار متغیرهای تحقیق در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تفاوت معناداری بین میانگین وزن رت‌های ماده در گروه‌های مختلف پژوهش وجود ندارد ($P < 0.05$).

جدول ۳) میانگین و انحراف معیار تغییرات وزن در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	گروه	هفته اول	هفته ششم
وزن موش‌ها (گرم)	کنترل سالم	۱۸۰/۰ ± ۱۴/۱	۱۸۲/۰ ± ۱۵/۵
	شم	۱۸۴/۲ ± ۳/۲	۱۸۵/۶ ± ۴/۹
	هایپر	۱۹۶/۰ ± ۲۵/۸	۱۹۱/۷ ± ۲۱/۷
	سير	۱۹۲/۷ ± ۲۲/۴	۲۰۰/۲ ± ۲۳/۳
	تمرین	۲۰۱/۰ ± ۱۰/۲	۲۳۱/۲ ± ۴۸/۹
	سير-تمرین	۱۹۷/۴ ± ۸/۱	۲۰۶/۴ ± ۸/۰
	سوربايد	۱۹۱/۰ ± ۱۵/۰	۱۸۵/۲ ± ۱۸/۰
	سوربايد-تمرین	۱۹۲/۷ ± ۰۸۲۹	۱۹۱/۲ ± ۳۰/۳

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بین میانگین میزان فسفولپياز A2 (PLA2) بافت قلبی رت‌های ماده مبتلا به پرفشاری خون در گروه‌های مختلف تحقیق، تفاوت وجود دارد ($P = 0.012$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد تغییرات فسفولپياز A2 (PLA2) بافت قلب در گروه سوربايد ($P = 0.043$) و سوربايد-تمرین ($P = 0.025$) نسبت به گروه هایپر به طور معنی داری کمتر بود اما بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P < 0.05$) (نمودار ۲).

با استفاده از کاغذ صافی صاف گردیده و عصاره ی سير به لوله های آزمایش انتقال داده شد و تا زمان استفاده در فریزر نگهداری شد. عصاره مورد نظر از طریق گاوژ به موش‌های صحرایی خورانده شد.

پروتکل تمرین هوازی

در پژوهش حاضر ترمیمیل مورد استفاده ۵ باند می‌باشد. برنامه تمرینی رت‌ها برای مدت ۴۹ روز به تمرین دویدن پرداختند. بار تمرینی برای گروه‌های تمرین پس از آشناسازی ۵ روزه در هفته اول و دوم ۲۰ متر بر دقیقه، هفته سوم و چهارم ۲۵ متر بر دقیقه و هفته پنجم تا ششم ۳۰ متر بر دقیقه بود (جدول ۱) [28].

جدول ۱) برنامه تمرین استقامتی

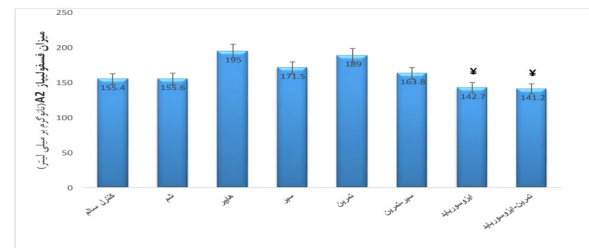
زمان	آشناسازی	هفته ۱	هفته ۲	هفته ۳	هفته ۴	هفته ۵	هفته ۶
سرعت (متر در دقیقه)	۱۵	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰
مدت (دقیقه)	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۵

مراحل نمونه‌گیری بافت قلب و اندازه‌گیری پروتئین و بیان ژن

در پایان مطالعه، حیوانات به مدت ۱۲ ساعت ناشتا نگه داشته شدند. سپس رت‌های مورد مطالعه در هر گروه با تزریق درون صفاقی کتامین (۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. پس از بیهوشی با ثابت کردن حیوان روی تخته جراحی جوندگان، کالبد شکافی انجام شده و بلافاصله بافت قلب برداشته شد. نمونه‌گیری بافت قلب از ۸ گروه پس از مداخله متغیرهای مستقل انجام و تغییرات پروتئین و بیان ژن PLA2 بافت قلب آنها مطالعه، سپس مورد مقایسه قرار گرفت. در شروع و پایان دوره قبل از کشتن و نمونه برداری، حیوانات به طور دقیق توسط ترازوی دیجیتال با حساسیت دو رقم اعشار وزن شده و اعداد به دست آمده بر حسب گرم ثبت شدند. در این تحقیق اصول اخلاقی در مورد نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی از جمله در دسترس بودن آب و غذا، شرایط نگهداری مناسب و عدم اجبار در تمرینات مد نظر قرار گرفت. همه آزمایشات بر اساس خط مشی‌های قرارداد هلسینکی اجرا شد و توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی بررسی و تأیید گردید. سطح پروتئین PLA-2 با استفاده از کیت الیزا کمپانی biocompare محصول کشور آمریکا با دامنه ۲۰-۳۱۲ نانوگرم بر میلی لیتر و حساسیت ۰/۱۳ نانوگرم بر میلی لیتر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری بیان ژن PLA-2 بافت قلب بوسیله تکنیک Real time PCR سنجش و پس از کمی‌سازی مقادیر بیان ژن با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تجزیه و تحلیل شد. واکنش PCR با استفاده از SYBR Green (Applied Biosystems) و master mix (Applied Biosystems, Sequence ABI Step One Detection Systems, Foster City, CA) شرکت سازنده انجام گرفت [29]. منحنی استاندارد بیان ژن فسفولپياز A2 (PLA2) در شکل ۱ نشان داده شده است. به منظور طراحی پرایمرها، توالی‌های مربوطه از سایت NCBI گرفته شده است. پرایمر ژن‌های مدنظر و بتا اکتین توسط نرم افزارهای Allele ID و MEGA 6 طراحی و بررسی شد. اختصاصی بودن پرایمرها برای ژن‌های هدف به وسیله برنامه BLAST بررسی شد. در این مطالعه از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است.

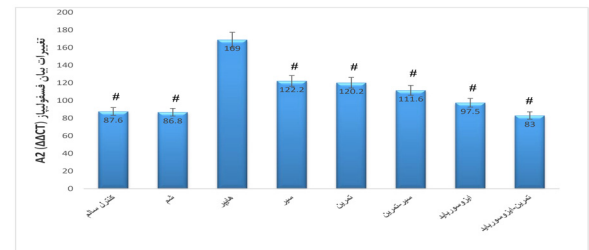
فیزیولوژیکی که در خصوص نیتریک اکساید ثابت شده است شامل نقش آن در سیستم ایمنی، سیستم عصبی، التهاب و جریان خون می‌شوند^[32]. علاوه بر این نیتریک اکساید در شل شدن عضلات صاف و دیواره شریان‌ها نقش دارد. سلول‌های اندوتلیال پیچیده که در رگ‌های خونی پوشش دارند موجب رهایی نیتریک اکساید در هر سیستم می‌شوند که به درون سلول‌های عضلانی صاف انتشار یافته و بنابراین اجازه می‌دهد خون بیشتری از این طریق به آسانی عبور کند^[33]. PLA2 گلیسروفوسفولیپیدها را به اسید آراشیدونیک و لیزوفوسفولیپیدها تجزیه می‌کند. لیزوفوسفولیپیدها می‌توانند به لیزوفسفاتی‌دیک اسید مکانیزه شود که این ترکیب، در چندین سلول به عنوان میتوژنیک مطرح است. همچنین، لیزوفوسفولیپید به عنوان گیرنده‌ای برای اسیدهای چرب عمل می‌کند و باعث ورود آنها به غشا می‌شود. آراشیدونیک اسید نیز بوسیله سیکلوکسیژناز و لپوکسیژناز یا سیتوکروم P450- مونوکسیژناز (CYP450) متابولیزه می‌شود. متابولیسم آراشیدونیک اسید بوسیله سیکلوکسیژناز باعث شکل گیری ترومبوکسان‌ها، پروستاگلین‌ها و پروستاگلاندین‌ها می‌گردد. این لیپیدها مرگ سلولی، التهاب، انقباض و اتساع عروق را در بافت‌های متعددی شامل عضلات صاف آندوتلیوم، میانجی‌گری می‌کند. علاوه بر این، نتایج تحقیق حاضر نشان داد مکمل سیر موجب کاهش میزان PLA2 بافت قلبی رت های ماده مبتلا به پرفشاری خون نسبت به گروه هایپر شد اگرچه این کاهش معنی داری نبود. تاکنون در هیچ مطالعه ای تاثیر مکمل سیر بر میزان PLA2 آزمودنی های مبتلا به پرفشاری خون بررسی نشده است با این وجود، مطالعات نشان می‌دهند که ممکن است سیر منجر به القا NO و سنتز سولفید هیدروژن گردد که می‌تواند اثرات غیر مستقیمی در گشاد کردن رگ‌ها داشته باشد. بنابراین سیر یک تعدیل کننده و تنظیم کننده فشار خون است^[14]. مکانیسم های مختلفی در خصوص تاثیر نیتریک اکساید بر روی زیست شناسی سلول های زنده شامل اکسیداسیون پروتئین های دارای آهن مانند ریبونوکلوئید ردوکتاز و اکونیتاز، فعال شدن گرانولیت سیکلاز، محلول، نیترولاسیون گروه سولفیدریل پروتئین و فعال شدن فاکتور تنظیم کننده آهن می‌شود^[34]. علاوه بر این مشخص شده است که نیتریک اکساید موجب فعال شدن فاکتور هسته ای بتا (NF-kβ) می‌شود، عامل رونویسی مهم در بیان ژن iNOS که در پاسخ به التهاب آزاد می‌شود. علاوه بر این، مشخص شده است که نیتریک اکساید از طریق تحریک گوانیلات سیکلاز محلول عمل می‌کند، آنزیم هترودایمیتری که با تشکیل متعاقب GMP حلقوی بوجود می‌آید. GMP حلقوی پیشتر نشان داده شده است که پروتئین کیناز (PKG) را فعال می‌کند که آن هم به نوبه خود موجب فسفوریلاسیون فسفاتاز زنجیره سبک میوزین (MLCP) می‌شود. غیر فعال شدن MLC کیناز سرانجام به فسفوریلاسیون زنجیره سبک میوزین منجر می‌شود که آن هم موجب ریلکسیشن یا شل شدن عضلات می‌گردد^[35]. نیتریک اکساید به طور بالقوه ای به صورت داروی آنتی آژینال در نظر گرفته می‌شود که موجب گشادی عروق می‌شود و در نهایت از طریق کاهش حجم کار قلب به درد ایسکمیک آژین کمک می‌کند. علاوه بر این داروهای نیتریک اکساید فشار شریانی و فشار پرشدگی بطن چپ را از طریق اتساع سیاهرگ‌ها کاهش می‌دهند. این گشاد کنندگی نیرویی را که عضله قلبی برای پمپ حجم معادلی از خون لازم است، کاهش می‌دهد. همچنین، گزارش شده است که نیترات نقش مفیدی برای درمان آژین از طریق کاهش اکسیژن مصرفی میوکارد و کاهش

همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بین میانگین بیان ژن فسفولیپاز A2 (PLA2) بافت قلبی رت های ماده مبتلا به پرفشاری خون در گروه‌های مختلف تحقیق، تفاوت وجود دارد ($P=0/000$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد تغییرات بیان ژن فسفولیپاز A2 (PLA2) بافت قلب در گروه هایپر نسبت به گروه سالم بیشتر بود ($P=0/000$). همچنین تغییرات بیان ژن فسفولیپاز (PLA2) A2 بافت قلب در گروه های سیر ($P=0/023$)، تمرین ($P=0/016$)، سیر-تمرین ($P=0/002$)، سورباید ($P=0/000$) و سورباید-تمرین ($P=0/000$) نسبت به گروه هایپر به طور معنی داری کمتر بود (نمودار ۳).



۴ کاهش معنادار نسبت به گروه هایپر پس از دوره مداخله. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده اند ($P < 0/05$)

نمودار ۲) تغییرات میزان فسفولیپاز A2 (PLA2) بافت قلبی در گروه های مختلف



کاهش معنادار نسبت به گروه هایپر پس از دوره مداخله. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده اند ($P < 0/05$)

نمودار ۳) تغییرات میزان فسفولیپاز A2 (PLA2) بافت قلبی در گروه های مختلف

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پس از دوره مداخله تغییرات معناداری در میزان PLA2 بافت قلبی رتهای ماده مبتلا به پرفشاری خون در گروه های تجربی نسبت به گروه هایپر مشاهده شد، به طوری که تغییرات فسفولیپاز A2 (PLA2) بافت قلب در گروه سورباید و سورباید-تمرین نسبت به گروه هایپر به طور معنی داری کمتر بود. اطلاعات بسیار کمی درباره تغییرات PLA2 متعاقب تمرین موجود است، علاوه بر این، تاکنون اثر تمرین بر PLA2 در بافت قلب در آزمودنی های مبتلا به پرفشاری خون مورد بررسی قرار نگرفته است. این یافته تحقیق حاضر با نتایج موریلا و همکاران (۲۰۱۷) که نشان دادند سه جلسه تمرینی ۶۰ دقیقه ای در هفته به مدت ۵ ماه با عدم تغییر معنی دار سطوح پروتئین PLA2 در بیماران با انفارکتوس میوکاردی همراه بود^[30]، همخوان می‌باشد. مکانیسم اثرات آنزیم های فسفولیپاز A2 شامل افزایش ROS داخل و خارج سلولی در طول انقباض عضلات است. آنها اسید آراشیدونیک را از فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی، غشای شبکه آندوپلاسمی و یا غشای میتوکندری جدا می‌کنند. اسید آراشیدونیک یک چربی سیگنالیگ مهم و همچنین یک سوبسترا برای لپوکسیژناز برای تولید ROS است. علاوه بر این آنزیم PLA2 سیتوزولی با تحریک NO باعث افزایش ROS می‌شود^[31]. گزارش شده است که نیتریک اکساید نقش‌های مختلف فیزیولوژیکی را از طریق توانایی خود در گشاد کردن عروق اعمال می‌کند. نقش‌های دیگر

نوجوانان به طور معکوسی با فعاليت فسفولپياز A2 مرتبط می باشد^[20]. یافته تحقیق حاضر حاکی از عدم تغییر میزان PLA2 بافت قلبی رت های ماده مبتلا به پرفشاری خون پس از دوره فعاليت هوازی بود. با این حال نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مقادیر پروتئين PLA2 در گروه های ایزوسوربايد و تمرین- ایزوسوربايد کاهش معنی داری داشت احتمالاً عدم همخوانی نتایج این تحقیق با یافته های فوق، به دوز مکمل، دارو همچنین شدت و مدت تمرین و محل اندازه گیری مربوط باشد. از آنجایی که در پژوهش آنها سطح PLA2 در سرم موش های سالم یا آزمودنی های انسانی و در پژوهش حاضر سطح بافت قلبی در رت های ماده مبتلا به پرفشاری خون اندازه گیری شد، به هر حال مطالعات بیشتری برای شناسایی سازوکارهای تنظیم فشار خون به دنبال مصرف ایزوسوربايد مورد نیاز است.

همچنین، یافته های تحقیق حاضر نشان می دهد که تغییرات بیان ژن فسفولپياز A2 (PLA2) بافت قلب در گروه های سير، سير- تمرین، سوربايد و سوربايد-تمرین نسبت به گروه هایپر (پرفشاری خون) به طور معنی داری کمتر بود. گزارش شده است که PLA2G4A (فسفولپياز A2 سیتوزولی، cPLA2) نقش مهمی در واکنش های التهابی ایفا می کند. این فاکتور ارتباط نزدیکی با تکثیر سلولی و آپوپتوز پس از فعال شدن از طریق فسفولپياز دارد^[38]. اعتقاد بر این است که در وضعیت پرفشاری خون، cPLA2 میتواند تکثیر سلولی را تسریع کند و منجر به تکثیر و تجمع فیبر کلاژن بینابینی، بازسازی شریان های بزرگ و کاهش کشش و اتساع پذیری شود. پژوهش ها نشان می دهد که ژن PLA2G4A ممکن است یکی از ژن های هدف در پرفشاری خون باشد^[3]. آنزیم هایی که از اسید آراشیدونیک استفاده می کنند یک سوستر و همچنین محصولات اسید آراشیدونیک مانند لیپوکسیژناز-12، لیپواکسیژناز-5، سیستئین لوکوتترین و ترومبوکسان A2 دارای خواص پروفیبروتیک قوی هستند. مطالعات نشان می دهد که مهار PLA2 ممکن است در پیشگیری از فیبروز قلب در فشار خون بالا اثرات درمانی داشته باشد^[4]. متابولیسم اسید آراشیدونیک توسط لیپوکسیژناز، منجر به شکل گیری هیدروپروکسی آیکوساترانوئیک (HPETE) می گردد که نهایتاً منجر به شکل گیری لوکوتترین ها می شود که این ترکیبات اعمال عروقی را در طی آسیب و التهاب میانجی گری می کنند. متابولیسم اسید آراشیدونیک به وسیله CYP450 منجر به شکل گیری (HPETE) و واپوکسی آیکوساترانوئیک (EET) می گردد که این ترکیبات تون عروقی و انتقال یونی را در سلول های اپیتلیال میانجی گری می کنند^[39]. بنابراین احتمالاً ترکیب سير- تمرین و سوربايد-تمرین در تحقیق حاضر از طریق تاثیر بر عوامل فوق منجر به کاهش بیان ژن فسفولپياز (PLA2) A2 شده است. در مطالعه حاضر سطوح ROS و عوامل التهابی اندازه گیری نشده است علاوه بر این، عدم تحت کنترل قرار گرفتن دقیق رژیم غذایی (اندازه گیری انرژی دریافتی و مصرفی) و بررسی اثرات احتمالی استروژن بر روی متغیرهای مورد مطالعه از جمله محدودیت های تحقیق حاضر می باشد. در نهایت، با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می شود که در تحقیقی مشابه تاثیر مهارکننده ها و تحریک کننده های PLA2 نیز مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

به طور خلاصه، نتایج تحقیق حاضر نشان داد مصرف ایزوسوربايد و ایزوسوربايد به همراه تمرین موجب کاهش سطوح پروتئين PLA2 بافت قلب در رت های ماده مبتلا به پرفشاری خون شد. همچنین مصرف سير، مکمل سير به

پیش بار و پس بار رگ های کرونری دارد. همچنین، پیش سازه ای مختلف نیتریک اکساید مانند آرژنین، سیترویلین و ... معرفی شده است. نقش اصلی ال-آرژنین به عنوان پیش ساز مهم برای تولید نیتریک اکساید عمل می کند که افزایش منبع مکمل ال-آرژنین به افزایش تولید نیتریک اکساید منتهی می شود^[36]. همان گونه که ذکر شد مکمل سير به روش وابسته به دوز و مدت موجب بهبود اثرات بر فشار خون در بیماران مبتلا به فشارخون می شود. بنابراین احتمال دارد با تغییر دوز مصرفی مکمل سير و همچنین افزایش مدت مداخله حاضر بتوان به نتایج روشن تری درباره تاثیر مکمل گیری سير بر میزان PLA2 طی پرفشاری خون دست یافت. در مجموع، مطالعات بیشتری برای شناسایی سازوکارهای تاثیر مکمل گیری سير بر میزان PLA2 طی پرفشاری خون به دنبال مصرف سير مورد نیاز است. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد ایزوسوربايد و مداخله ترکیبی تمرین- ایزوسوربايد موجب کاهش میزان PLA2 بافت قلبی رت های ماده مبتلا به پرفشاری خون شد. گزارش شده است که افزایش فعاليت PLA2 ممکن است در افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب دخیل باشد و درمان با مهارکننده ACE ممکن است به کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو در فشارخون بالا کمک کند^[5]. مکانیسم اصلی درمانی نیترات ها و مهارکننده ها در درمان آنزیم آرترواسکلروتیک، کاهش نیاز به اکسیژن می باشد^[8]. بنابراین به نظر می رسد که اثر ایزوسوربايد بر میزان PLA2 به علت نیتریک اکسایدی باشد که توسط این دارو در اختیار سلول های اندوتلیوم قرار گرفته و باعث تحریک شدن آنزیم گوانیلات سیکلاز و تجمع گوانیدین مونوفسفات حلقوی در سلول های عضله صاف و به دنبال آن گشاد شدن عروق و تنظیم فشار خون می شود^[36]. همخوان با این یافته تحقیق حاضر، نشان داده شده است که مهارکننده های عمومی PLA2 شامل مانوآلید و مهارکننده های غیراختصاصی فعاليت همه ایزوفرم های PLA2 را کاهش می دهند، در همین راستا، کاناکوگلو و همکاران (۲۰۰۹) در تحقیقی به بررسی ارتباط بین مارکرهای اکسایشی و التهابی در بیماران مبتلا به پرفشاری خون با یا بدون داروی درمان ضد فشار خون پرداختند. بیماران مبتلا تازه تشخیص داده شده مبتلا به فشار خون بالا و بیماران مبتلا به فشار خون بالا که از مهارکننده های آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) به عنوان درمان ضد فشار خون بالا استفاده می کردند و افراد دارای فشار خون طبیعی همسان شدند. نتایج نشان داد افراد مبتلا به فشار خون بالا دارای سطوح بالاتر PLA2 نسبت به گروه کنترل بودند. افراد با پرفشار خون درمان شده دارای سطوح پایین تر PLA2 نسبت به افراد مبتلا به فشار خون بالا نشان دادند^[5]. نتایج برخی مطالعات در آزمودنی های انسانی و حیوانی حاکی از تاثیر فعاليت ورزشی بر فعاليت فسفولپياز A2 می باشد. در همین راستا، در تحقیقی نشان داده شده است که فعاليت فسفولپياز A2 به دنبال دویدن اختیاری در موش ها افزایش می یابد^[19]. مانیکانیمی و همکاران (۲۰۱۲) نیز در تحقیقی به بررسی ارتباط بین فعاليت بدنی و طیف وسیعی از نشانگرهای خطر بیماری های قلبی عروقی در آزمودنی های جوان پرداختند. نتایج آن ها نشان داد پس از کنترل جنس، سن و دور کمر، فعاليت بدنی به طور مستقیم با LDL اکسید شده، اپولیپوپروتئین B و فعاليت فسفولپياز A2 مرتبط بود. ارتباط این عوامل، اثرات مثبت بر سلامت قلب و عروق هر دو جنس را نشان می دهد و ممکن است بینش مکانیکی برای ارتباط معکوس بین فعاليت بدنی و CHD ارائه کند^[37]. با این حال، یافته های برخی پژوهش ها نشان می دهد که فعاليت بدنی در کودکان و

Angiology 2001;52(2):131-5.

7- Abad-Pérez D, Novella-Arribas B, Rodríguez Salvanés FJ -, Sánchez Gómez L M, García-Polo I, Verge-González C, Suárez-Fernández C. Effect of oral nitrates on pulse pressure and arterial elasticity in patients aged over 65 years with refractory isolated systolic hypertension: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2013; 14: 388- 94.

8- Tripathi KD. *Essentials of Medical Pharmacology*, 6th Edition, Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, 2008; 501- 504.

9- Ried K, Fakler P. Potential of garlic (*Allium sativum*) in lowering high blood pressure: mechanisms of action and clinical relevance *Integr Blood Press Control*. 2014; 7: 71–82.

10- Goncagul G, Ayaz E. Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*) and traditional medicine. *J Anim Vet Adv* 2010; 9(1): 1- 4.

11- Cardelle-Cobas A, Soria AC, Corzo N, Villamiel M. A comprehensive survey of garlic functionality. Madrid: Nova Science Publisher; 2010; 1(6):12-15.

12- Bayan L, Koulivand PH, Gorji A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna J Phytomed* 2014; 4(1): 1- 14.

13- Chan JYY, Yuen ACY, Chan RYK, Chan SW. A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin. *Phytother Res* 2013; 27(5): 637- 46.

14- Liu L, Yeh Y-Y. S-alk(en)yl cysteines of garlic inhibit cholesterol synthesis by deactivating HMG-CoA reductase in cultured rat hepatocytes. *J Nutr* 2002; 132(6): 1129- 34.

15- Jørgensen MG, Ryg J, Danielsen MB, Madeleine P, Andersen S. Twenty weeks of isometric handgrip home training to lower blood pressure in hypertensive older adults: a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2018; 19(1):97- 106.

16- Belozo FL, Katashima CK, Cordeiro AV, Lenhare L, Alves JF, Silva VRR. Effects of ninety minutes per week of continuous aerobic exercise on blood pressure in hypertensive obese humans. *J Exerc Rehabil*. 2018; 14(1):126- 32.

17- Wen H, Wang L. Reducing effect of aerobic exercise on blood pressure of essential hypertensive patients: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(11): 6150- 78.

18- Getty AK, Wisdo TR, Chavis LN, Derella CC, McLaughlin KC, Perez AN, et al. Effects of circuit exercise training on vascular health and blood pressure. *Preventive Medicine Reports*. 2018; 10: 106- 12.

19- Santos-Soto IJ, Chorna N, Carballeira NM, Ve'lez-Bartolomei JG, Me'ndez-Merced AT, et al. Voluntary Running in Young Adult Mice Reduces Anxiety-Like Behavior and Increases the Accumulation of Bioactive Lipids in the Cerebral Cortex. *PLoS ONE* 2013; 8(12): 81459- 67.

همراه تمرین استقامتی، ایزوسورباید و ایزوسورباید به همراه تمرین موجب کاهش سطوح بیان ژن PLA2 در رت های ماده مبتلا به پرفشاری خون شد. با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد تمرین هوازی، سیر و ایزوسورباید و مداخله ترکیبی آنها می‌تواند به بهبود عوامل درگیر در پرفشاری خون کمک کند. با توجه مطالعات اندک انجام شده در این رابطه، تحقیق روی اثر فعالیت ورزشی، مصرف ایزوسورباید و مکمل سیر بر عوامل درگیر در پرفشار خونی نیاز به مطالعات بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از کلیه افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: این تحقیق با تأیید کمیته اخلاق در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی با شماره (۲۳-۸۰) NIH publications انجام شد.

تعارض منافع: نویسندگان مقاله اعلام می‌کنند که هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع مالی: این تحقیق مستخرج از رساله دکتری می‌باشد که با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی انجام شده است.

سهام نویسندگان: محبوبه کریمی زاد کمارج (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی / اجرای پروتکل (۳۰٪)، آسیه عباسی دلویی (نویسنده دوم)، نگارنده روش شناسی (۳۰٪)، سید جواد ضیاءالحق (نویسنده سوم)، نگارنده بحث/تفسیر نتایج (۲۰٪)، علیرضا براری (نویسنده چهارم)، نگارنده بحث/تفسیر نتایج (۲۰٪).

منابع

1- Weil BR, Stauffer BL, Greiner JJ, DeSouza CA. Prehypertension is associated with impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent vasodilation in sedentary adults. *Am J Hypertens* 2011; 24(9): 976- 81.

2- Bajpai JK, A P S, A K A, A K D, Garg B, Goel A. Impact of prehypertension on left ventricular structure, function and geometry. *J Clin Diagn Res* 2014; 8(4): 7- 10.

3- Yan G, Xie X, Guo C, Wang Z, Liu Q. Effect of electro-acupuncture on gene expression in heart of rats with stress-induced pre-hypertension based on gene chip technology. *J Tradit Chin Med* 2015; 35(3): 285- 94.

4- Wen Y, Gu J, Peng X, Zang G, Nadler J. Overexpression of 12- lipoxygenase and cardiac fibroblast hypertrophy. *Trends Cardiovasc. Med*. 2003; 13(4): 129–36.

5- Konukoglu D, Firtina S, Serin O, Cavusoglu C. Relationship among plasma secretory phospholipase A2, oxidized low density lipoprotein & paraoxonase activities in hypertensive subjects treated with angiotensin converting enzyme inhibitors. *Indian J Med Res* 2009; 129(4): 390-4.

6- Rubio-Guerra AF, Vargas-Ayala G, Narváez-Rivera JL, Rodríguez-López L, Lozano-Nuevo JJ, Trejo-Orozco N. Comparison between isosorbide dinitrate in aerosol and in tablets for the treatment of hypertensive emergencies.

blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol Rev.* 2009; 61(1): 62- 97.

34- Patel S, Kumar S, Jyoti A, Srinag BS, Keshari RS, Saluja R, et al. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide.* 2010; 22(3): 226-34.

35- Ball KA, Nelson AW, Foster DG, Poyton RO. Nitric oxide produced by cytochrome c oxidase helps stabilize HIF-1 α in hypoxic mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 420(4): 727- 32.

20- Verona J, Gilligan LE, Giménez C, Verona MF, Lombardo SM, Baenz A, Divita V, González CD, Gómez Rosso L, Brites F. Physical activity and cardiometabolic risk in male children and adolescents: the Balcarce study. *Life Sci.* 2013; 93(2):64- 8.

21- Kjeldsen SE. Hypertension and cardiovascular risk: General aspects. *Pharmacol Res.* 2018; 129:95- 99.

22- Messerli FH, Fischer UR, Stefano F, Bangalore S. Hypertension control and cardiovascular disease. 2017; 153: 389- 96.

23- Asadbegy M, Mirazi N, Vatanchnian M. Comparative study of lotus corniculatus. Hydroethanolic extract and phenytoin ointment effects on rat skin wound healing: morphometrical and histopathological studies. *Journal of Cell & Tissue.* 2011; 2(3):213- 23.

24- Altoama K, Mallem MY, Thorin C, Betti E, Desfontis JC. Effect of nebigolol treatment during pregnancy on the intrauterine fetal growth, mortality and pup postnatal development in the L-NAME-induced hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 2016; 15(791): 465- 72.

25- Sharifi AM, Akbarloo N, Sasani F. Nephrotoxicity of Isosorbide Dinitrate and Cholestasis in Rat: The Possible Role of Nitric Oxide. *IJMS* 2004; 29(2): 75- 80.

26- Ghaforian Borojerdnia M. A Histopathological Study of Effects of Intraperitoneal Garlic Extract on Liver in Rats. *Avicenna J Clin Med.* 2001; 8(3): 18- 27.

27- Alnaqeeb MA, Thomson M, Bordia T, Ali M. Histopathological effects of garlic on liver and lung of rats. *Toxicol Lett.* 1996; 85(3):157- 64.

28- Monazzami AA, Rajabi H, Gharakhanlou R. The effect of endurance training on the protein content of sodium bicarbonate and sodium-hydrogen exchanger in skeletal muscle of rat. *Olympic-journal.* 2013; 20(4):61- 74.

29- Saunders NA, Lee MA, Real time PCR: Advanced Technologies and Applications, Caister Academic Press, 2013; 142-6

30- Moreira HG, Martinez DG, Lage RL, Ferreira-Santos L, Negrao CE, Rondon MUP, Nicolau BJC. Role of exercise training on autonomic and inflammatory profile after acute coronary syndromes. *European Heart Journal,* 2017; 38(1):3422- 9.

31- Steinbacher P, Eckl P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules.* 2015;5(2):356- 77.

32- Shirasawa Y, Ikomi F, Ohhashi T. Physiological roles of endogenous nitric oxide in lymphatic pump activity of rat mesentery in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 278: 551- 6.

33- Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Cerebral