Physiology and Pharmacology, 15 (3), 330-340
Autumn 2011 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Downloaded from ppj.phypha.ir at 19:19 +0430 on Sunday May 9th 2021

Decreased Uncoupling Protein 2 and 3 (UCP2 and UCP3) mRNA expression by endurance exercise training with and without chronic administration of nandrolone in rat heart

Gholamreza Bayat[1], Sohrab Hajizadeh[1]*, Mohammad Javan[1], Mahdi Forouzandeh Moghadam[2], Fatemeh Safari[3], Hossein Azizi[1], Roham mazloom[1]

Dept. Physiology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Dept. Biotechnology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Dept. Physiology, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Received: 17 Apr 2011 **Accepted: 26 Jun 2011**

Abstract

Introduction: The effect of regular exercise in decreasing the incidence of heart diseases is well known. The abuse of anabolic androgenic steroids (AAS) has been associated with cardiovascular disorders. Uncoupling proteins (UCPs) transport protons across the inner mitochondrial membrane; thereby proton gradient can be diminished by the action of UCPs. This process will result in the uncoupling of mitochondrial respiration from ATP production. The goal of this study was to investigate whether UCP2 and UCP3 are involved in the mechanisms of AAS-induced cardiac damage in the rat heart.

Methods: In the current study, adult male Wistar rats were divided into five groups (n=8): Control, vehicle, nandrolone, exercise, exercise- nandrolone. Rats in the exercise groups were submitted to a progressive running program on a treadmill, 5 days a week for 10 weeks. Rats in the nandrolone and exercise- nandrolone groups received a weekly intramuscular injection of nandrolone decanoate (10 mg/kg), while those in the vehicle group received Arachiz oil as vehicle. Relative mRNA expression of UCP2 and UCP3 were determined with real-time RT- PCR.

Results: The data showed that chronic administration of nandrolone significantly up-regulated UCP2 and UCP3 mRNA in rat heart and endurance training induced a decrease in the expression of UCP2 and UCP3 mRNA with or without presence of nandrolone.

Conclusion: It may be concluded that chronic nandrolone treatment causes an increase in the expression of UCP2 and UCP3 mRNA. Thus, it might decrease energy metabolism efficiency by impairment of ATP production. Physical activity may decrease the adverse effects of nandrolone by down-regulation of the UCP2 and UCP3 mRNA expression.

Key words: nandrolone, exercise, UCP2, UCP3

* Corresponding author e-mail: Hajizads@modares.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

Downloaded from ppj.phypha.ir at 19:19 +0430 on Sunday May 9th 2021

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۵ (۳)، ۳۳۰ – ۳۴۰
پاییز ۱۳۹۰

IRANIAN SOCIETY OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY
انجمن فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران
تاسیس ۱۳۴۷

کاهش نسخه برداری ژن‌های UCP2 و UCP3 قلب موش سفید آزمایشگاهی بر اثر ورزش استقامتی در حضور و عدم حضور تجویز مزمن ناندرولون

غلامرضا بیات[۱]، سهراب حاجی‌زاده[۱*]، محمد جوان[۱]، مهدی فروزنده مقدم[۲]، فاطمه صفری[۳]، حسین عزیزی[۱]، رهام مظلوم[۱]

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی، یزد

دریافت: ۲۸ فروردین ۹۰ پذیرش: ۵ تیر ۹۰

چکیده

مقدمه: اثرات سودمند ورزش منظم در کاهش شیوع بیماری‌های قلبی عروقی به خوبی شناخته شده و سوء استفاده از استروئیدهای آندروژنیک آنابولیک (AAS) همراه با بروز بیماری‌های قلبی عروقی بوده است. UCPها پروتون‌ها را از عرض غشای داخلی میتوکندری منتقل می‌کنند و بدین وسیله گرادیان پروتون را کاهش می‌دهند و بنابراین اکسیداسیون را از تولید ATP جدا می‌کنند. این فرایند باعث کاهش تولید ATP می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی دخالت پروتئین‌های UCP2 وUCP3 در مکانیسم آسیب قلبی ناشی از مصرف AAS می‌باشد.

روش ها: در این مطالعه موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به پنج گروه آزمایشی (n=۸) تقسیم شدند: کنترل، حامل دارو، ناندرولون، ورزش و ورزش-ناندرولون. در گروه-های ورزش حیوانات برای ۵ روز در هفته به مدت ده هفته تحت تعلیم ورزشی قرار گرفتند. همچنین ناندرولون دکانوئیت با دوز 10mg/kg و روغن آراشید بعنوان حامل ناندرولون هفته‌ای یکبار برای مدت ده هفته در گروه‌های دریافت‌کننده در عضله رانی به صورت عمیق تزریق می‌شد. از روش Real time RT- PCR جهت بررسی میزان بیان ژن پروتئین‌های UCP2 وUCP3 استفاده شد.

یافته ها: نتایج نشان داد تجویز ناندرولون دکانوئیت باعث افزایش نسخه‌برداری پروتئین‌های UCP2 وUCP3 در قلب می‌شود و ورزش باعث جلوگیری از این اثر می‌شود.

نتیجه گیری: ناندرولون با افزایش نسخه‌برداری پروتئین‌های UCP2 وUCP3 می‌تواند کارآیی متابولیسم انرژی را از طریق اختلال تولید ATP کاهش دهد، بنابراین می‌تواند قلب را به آسیب‌های استرس اکسیداتیو مستعدتر نماید. از طرف دیگر ورزش با کاهش بیان UCP2 وUCP3 می‌تواند کارآیی انرژی مکانیکی در قلب را بهبود ببخشد.

واژه‌های کلیدی: ناندرولون، ورزش، UCP2، UCP3

مقدمه

استروئیدهای آندروژنیک آنابولیک (AAS) مشتقات سنتتیک تستوسترون می‌باشند که در مقایسه با تستوسترون دارای اثرات آنابولیک بیشتر و اثرات آندروژنیک کمتر هستند و در ابتدا با هدف درمان تعداد زیادی از بیماری‌های انسان از جمله بیماری‌هایی که همراه با وضعیت‌های کاتابولیک می‌باشند مانند استئوپوروز، گرسنگی شدید، سوختگی‌ها و لاغری شدید ناشی از سرطان‌ها و غیره سنتز شدند. اولین مورد سوء استفاده از AAS در سال ۱۹۵۰ در وزنه برداران و سایر ورزشکاران قدرتی و بعدها درافراد غیر ورزشکار با هدف افزایش در عملکرد

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Hajizads@modares.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

Downloaded from ppj.phypha.ir at 19:19 +0430 on Sunday May 9th 2021

فیزیکی و افزایش توده و قدرت عضله اسکلتی گزارش شده است [۳۱]. تستوسترون و AAS سنتز پروتئین و بزرگی عضله را تحریک می‌کند [۲۱]. علی رغم اثرات مثبت AAS در بهبود عملکرد فیزیکی ممکن است استفاده از دوزهای بالای AAS دارای طیف وسیعی از عوارض جانبی در بدن به ویژه بر عضله قلب و گردش خون باشد به طوریکه دوزهای بالای AAS خطر بیماری‌های قلبی عروقی ناشی از افزایش سطوح کلسترول، تری گلیسیرید و لیپو پروتئین با دانسیته پایین (LDL)، کاهش سطوح لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL)، افزایش فشار خون، ترومبوز، آریتمی‌های شدید، انفارکتوس میوکارد و نارسایی قلبی را افزایش دهد [۱۶،۳۱].

ورزش فیزیکی منظم با کاهش دادن کلسترول پلاسما, پرفشاری خون, وزن و عدم تحمل گلوکز، میزان شیوع و مرگ و میر بیماری‌های قلبی را کاهش داده است. در میان سازش-های مرتبط با ورزش حاد و مزمن بهبود تحمل قلب به وقایع ایسکمیک یکی از مهمترین اثرات ورزش منظم می‌باشد. مطالعات مختلف نشان داده اند که ورزش اندازه انفارکتوس میوکارد را کاهش داده و عملکرد انقباضی قلب در دوره بعد از ایسکمی-جریان مجدد را بهتر کرده است [۶،۱۸]. مکانیسم‌های مولکولی درگیر در پاسخ‌های سازشی شامل افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی [۱۱،۲۷]، القای نیتریک-اکساید سنتتاز [۳۰]، فعال شدن پروتئین کیناز-C [۳۶] و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد [۶،۷،۲۵،۲۹].

Uncoupling Protein (UCP) ها پروتئین‌هایی در غشای داخلی میتوکندری هستند که به عنوان ناقل پروتونی معروفند.UCP1 که از سال‌ها پیش شناخته شده است انحصاراً در بافت چربی قهوه ای وجود دارد و به واسطه القای نشت هیدروژن گرادیان الکترو شیمیایی هیدروژن را در دو سوی غشای داخلی میتوکندری کاهش داده و بدین ترتیب فسفریلاسیون-اکسیداتیو را جدا کرده و باعث تولید گرما می-شود، بنابراین نقش مهمی در ترموژنز غیر لرزشی (nonshivering thermogenesis) در جوندگان دارد [۳،۹،۱۳،۱۷،۱۹].

UCP2 در سال ۱۹۹۷ [۱۰] و UCP3 بلافاصله بعد از آن [۲] کلون شد. UCP2 و UCP3 به ترتیب ۵۹٪ و ۵۷٪ شباهت به UCP1 یا همان UCP کلاسیک دارند. توزیع UCP2 وUCP3 بسیار متفاوت از توزیع UCP1 می‌باشد که بطور اختصاصی در بافت چربی قهوه ای وجود دارد [۳،۱۹،۲۲]. UCP2 توزیع وسیعی در بافت‌های بدن و از جمله قلب را دارد اما UCP3 گستردگی محدودتری دارد به طوریکه عمده آن در عضله اسکلتی و در سطح کمتری در قلب تجمع یافته است [۱۹،۲۲]. امروز مشخص شده است که این پروتئین‌ها بر خلاف UCP1 اهمیت زیادی در ترموژنز ندارند. هر چند اعمال دقیق آنها همچنان ناشناخته است اما آنچه که به خوبی شناخته شده این است که این پروتئین‌ها فعالیت پایه ناچیزی برای انتقال یون هیدروژن در غشاء میتوکندری دارند، اما با حضور فعال کننده‌های خاص این عملکرد فوق العاده افزایش می‌یابد [۹،۱۹].

در مطالعاتی نشان داده شده است که ورزش مزمن میزان بیان UCP2,3 در سطح mRNA را در عضله اسکلتی و قلب کاهش می‌دهد که به نظر می‌رسد جهت افزایش کارآیی متابولیسم انرژی نیاز به کاهش بیان UCP mRNA ها در عضلات اسکلتی و قلب می‌باشد که از این طریق موجب کاهش اتلاف انرژی در این بافت‌ها شود [۱،۳]. در مطالعات متعددی نشان داده شده است که اندازه ناحیه آنفارکتوس بدنبال تجویز مزمن ASS در مدل ایسکمی ــ جریان مجدد افزایش می‌یابد [۴]. یکی از علل آسیب ایسکمی ـ جریان مجدد بخصوص در زمان ایسکمی کاهش ذخایر و تولید ATP در سلول می‌باشد [۴،۲۸]. بنابراین از آنجائیکه UCPها با کاهش گرادیان هیدروژنی در عرض غشای داخلی میتوکندری باعث کاهش تولید ATP می‌گردند [۳،۹،۱۳،۱۷،۱۹]، بنابراین شاید تجویز ASS از طریق افزایش بیان UCP2,3 موجب کاهش تولید ATP در سلول‌قلبی شده و زمینه را برای آسیب که یکی از شاخص‌های مهم آن اندازه ناحیه آنفارکتوس می-باشد را فراهم نماید. بنابراین انتظار آن است که اثرات زیان بار AASs روی قلب به یک نحوی مرتبط به افزایش بیان UCP2,3 باشد به طوریکه تحریک احتمالی بیانUCP2,3 در پاسخ به استفاده AASs حداقل قسمتی از اثرات زیان‌بار این عامل هورمونی سنتتیک بر روی میوکارد را توجیح نماید که تا-کنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. علاوه بر این، اثر متقابل استرسی که توسط AASs و تمرین ورزشی بر روی قلب تحمیل می‌شود بر روی بیان UCP2,3 شناخته نشده است.

بنابراین، ما در این تحقیق اثرات تجویز ناندرولون دکانوئیت بر روی القای بیانUCP2,3 قلبی در موش‌های صحرایی ساکن و تحت تعلیم مزمن ورزشی را مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش ها

این تحقیق روی ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی بین ۱۶±۲۲۰ گرم که از انستیتو پاستور کرج تهیه شد انجام گردید. اتاق نگهداری دارای تجهیزات کنترل نور، تهویه، سیستم گرمایی و سرمایی و ثبت دمای بیشینه و کمینه بود. شرایط نوری حیوانات بطور ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی رعایت شد (شروع روشنایی ساعت ۷ صبح). حرارت حیوانخانه در محدوده ^{oc}۲۴-۲۲ نگهداری شد. آب و غذا برای حیوانات بطور آزاد وجود داشت. رطوبت تابع شرایط رطوبتی هوای آزاد بود. پیش از شروع آزمایشات زمان لازم برای سازش حیوانات با محیط آزمایشگاه رعایت شد. سپس حیوانات به صورت تصادفی به پنج گروه زیر تقسیم شدند و در هر گروه ۸ سر موش مورد آزمایش قرارگرفتند.

۱) گروه کنترل(C) ۲) گروه حامل دارو (V) ۳) گروه ناندرولون (N) ۴) گروه ورزش(E) ۵) گروه ورزش- ناندرولون (EN)

در گروه‌های ورزش موش‌های صحرایی برای پنج روز در هفته به مدت ده هفته تحت یک برنامه تعلیم ورزشی قرار گرفتند. در اولین هفته موش‌ها با دستگاه تریدمیل آشنا شدند: روز اول با سرعت ۱۰ متر در دقیقه برای مدت ۱۰ دقیقه، روز دوم با سرعت ۱۵ متر در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه، از روز سوم الی پنجم ۵ دقیقه به ازای هر روز به مدت ورزش افزوده - شد بطوریکه در روز پنجم مدت ورزش به ۳۵ دقیقه افزایش یافت، ولی سرعت دستگاه تریدمیل ۱۵ متر در دقیقه ثابت نگاه داشته می‌شد. در هفته دوم، سرعت به ۲۰ متر در دقیقه برای مدت ۳۰ دقیقه در روز اول افزایش داده می‌شد که به ازای هر روز ۵ دقیقه به مدت ورزش افزوده می‌گردید. در هفته سوم، تعلیم ورزشی۵۰ دقیقه با سرعت ۲۰ متر در دقیقه، در هفته چهارم، ۵۰ دقیقه با سرعت ۲۵ متر در دقیقه، در هفته پنجم و ششم، ۵۰ دقیقه با سرعت ۳۰ متر در دقیقه، در هفته هفتم و هشتم، ۵۰ دقیقه با سرعت ۳۲/۵ متر در دقیقه، در هفته نهم و دهم، ۵۰ دقیقه با سرعت ۳۵ متر در دقیقه اعمال می‌گردید. از هفته دوم تا انتهای کار ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن با سرعت ۱۵ متر در دقیقه در شروع و انتهای ورزش اعمال می‌شد. از هفته اول الی هفته پنجم شیب صفر درصد، در هفته ششم و هفتم شیب ۵ درصد و در هفته هشتم، نهم و دهم شیب ۱۰ درصد اعمال شد [۶].

داروها: در گروه‌های دریافت کننده یک نوع AAS از ناندرولون دکانوئیت (Gedeon Richter مجارستان) که از مشتقات استری ۱۷- بتای تستوسترون می‌باشد و در مقایسه با تستوسترون اثرات آنابولیک بیشتری دارد (هدیه شرکت دارویی ایران هورمون) با دوز 10mg/kg هفته ای یکبار بصورت تزریق عضلانی در عضله رانی به مدت ده هفته استفاده شد.جهت حل کردن ناندرولون دکانوئیت از روغن آراشیذ (Arachiz) [Henry Lamotte آلمان] (اهدایی شرکت دارویی ایران هورمون) استفاده شد. در گروه vehicle حامل ناندرولون دکانوئیت روغن آراشیذ با حجم مشابه با گروه‌های دریافت کننده ناندرولون دکانوئیت هفته‌ای یکبار به مدت ده هفته در عضله رانی به صورت عمیق تزریق می‌شد [۶].

جراحی و جدا کردن قلب: بعد از انجام پروتکل ورزش و تزریق ناندرولون دکانوئیت یا حامل آن جهت استخراج بافت ابتدا حیوان با استفاده از داروی تیوپنتال سدیم (۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش می‌شد. برای جدا سازی قلب، با ایجاد یک برش عرضی در قسمت بالایی شکم و بریدن جناغ و دنده‌ها قلب به آرامی از بافت‌های اطراف جدا می‌شد. بعد از آن به سرعت عروق متصل به قلب قطع می-گردید و قلب در داخل سرم فیزیولوژیک سرد انداخته می‌شد. سپس قلب از داخل سرم فیزیولوژیک خارج و پس ازخشک کردن با کاغذ جاذب رطوبت وزن می‌شد سپس بروی یک پلیت شیشه‌ای که در داخل ظرف یخ قرار داشت گذاشته می‌شد و به سرعت بطن چپ جدا و به چند قطعه تقسیم می‌گردید و در داخل لوله‌های اپندورف قرار داده می‌شد، سپس لوله‌ها را در داخل تانک نیتروژن وارد نموده تا به سرعت تا دمای ^{oC} ۱۸۰- فریز می‌شدند. سپس نمونه‌ها جمع‌آوری و به فریزر ^{oC} ۸۰- انتقال می‌یافت.

بررسی‌های مولکولی: جهت بررسی بیان mRNA پروتئین‌های UCP2 و UCP3 در عضله قلب از روش Real

Downloaded from ppj.phypha.ir at 19:19 +0430 on Sunday May 9th 2021

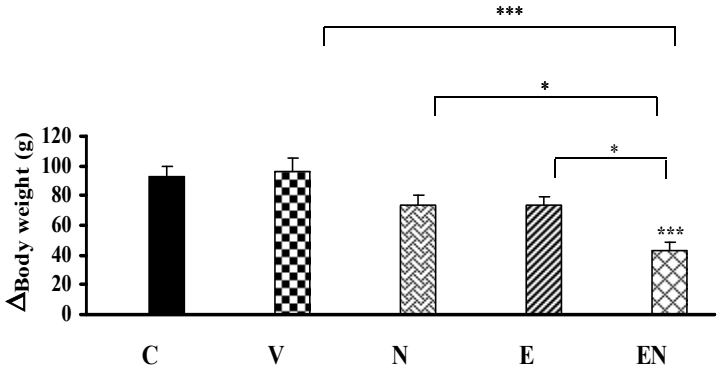
جدول ۱- پرایمرهای ژن‌های UCP2, UCP3 , B-actin

Genes	Primer sequences (5´-3)	
	Forward	Reverse
UCP2	5´-GCCCGGGCTGGTGGTGGTC-3´	5´-CCCCGAAGGCAGAAGTGAAGTGC-3´
UCP3	5´-GCGTGCTCGGTACCATCCTGACTA-3´	5´-TTCTTCCCTGGCGATGGTTCTGTA-3´
B-actin	5´-GAACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3´	5´-ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG-3´

time RT- PCR استفاده شد. RNA کل ازحدود ۳۰ میلیگرم بافت با استفاده از کیت RNeasy fibrous tissue minikit (شرکت کیاژن) مطابق با دستورالعمل سازنده استخراج شد. غلظت‌های RNA توسط اندازه‌گیری جذب طیف نوری در ۲۶۰ نانومتر برآورد شد، و خلوص آن توسط نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر تعیین شد. RNA کل (۱/۸ میکروگرم) در دمای ۷۰°C برای مدت ۵ دقیقه دناتوره گردید، بلافاصله سرد شد، و با استفاده از کیت سنتز شرکت Fermentas مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از آنزیم رونویسی معکوس (RT)، Random hexamer، dNTPs، در حجم کل ۲۰ میکرولیتر رونویسی معکوس انجام گرفت و cDNA ساخته‌شد. سپس با استفاده از Master mix SYBR Green شرکت کیاژن و پرایمرهای forward و reverse در حجم نهایی ۱۲/۵میکرولیترRT- PCR انجام گرفت. تکثیر در دمای Denaturation در ۹۵°C برای مدت ۳۰ ثانیه، Annealing در ۶۰°C برای مدت ۳۰ ثانیه و Extension در ۷۲°C برای مدت ۳۰ ثانیه به میزان ۴۰ سیکل انجام گرفت. میزان فلورسنت لازم و قابل شناسایی توسط سنسور دستگاه را آستانه (Threshold) گویند. سیکلی را که این آستانه را قطع می‌کند برای هر واکنش تعیین گردید (C_t). برای کنترل تغییر پذیری در مقدار mRNA برای هر نمونه عدد نرمالایز شده (ΔC_t) با استفاده از فرمول $\Delta C_t = C_{t\,(UCP)} - C_{t\,(\beta\text{-actin})}$ محاسبه شد. بیان نسبی mRNA به صورت $2^{-\Delta Ct} \times 1000$ گزارش گردید. توالی پرایمرهای Real time RT-PCR مطابق جدول ۱ بودند: اطلاعات هر گروه شامل نمونه های بدست آمده از ۴ تا ۷ حیوان بود. اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از برنامه آماری SPSS و Excel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین ± SEM ارائه شدند. مقایسه میانگین‌ها با کمک آزمون واریانس یکطرفه (One way ANOVA) آنالیز شد و جهت بررسی وجود تفاوت معنی دار بین گروه‌ها از پس-آزمون Tukey استفاده شد. مقادیر $P < ۰/۰۵$ به عنوان حداقل سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

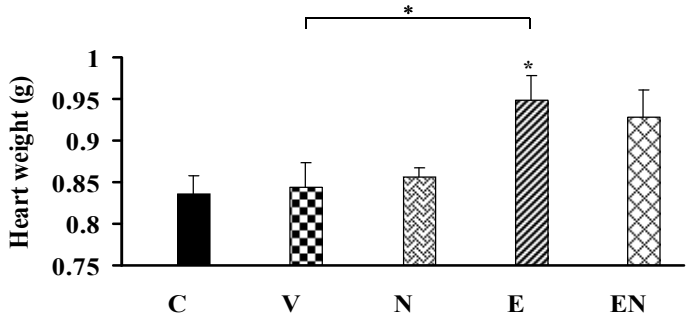
میانگین تغییر وزن در انتهای هفته دهم نسبت به شروع آزمایش (شکل۱) در گروه ورزش- ناندرولون (۴۲/۸۴±۵/۷۱g) کمتر از گروه کنترل (۹۳/۳۸±۶/۲۰ g, P<0.01) و گروه‌های حامل (۹۵/۹۴±۹/۲۰g, P<0.001)، ناندرولون (g, P<0.05) و گروه ورزش (g, ۷۳/۸۸±۶/۳۹)



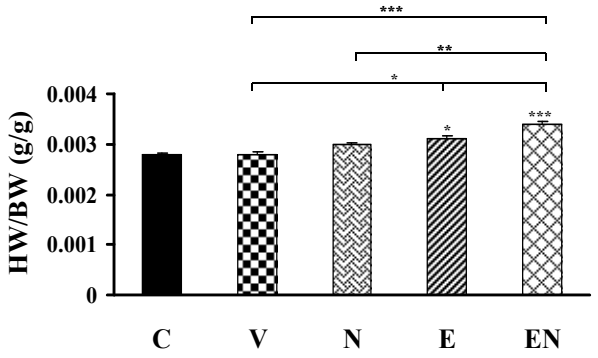
شکل ۱- مقایسه میانگین تغییر وزن بدن در هفته دهم نسبت به شروع آزمایش. مقادیر عبارتند از میانگین± خطای معیار. ***P<0.001,*P<0.05 درمقایسه با گروه کنترل و اختلاف آماری بین گروهی می‌باشد. کنترل=C، حامل دارو=V، ناندرولون=N، ورزش=E، ورزش-ناندرولون=EN

Downloaded from ppj.phypha.ir at 19:19 +0430 on Sunday May 9th 2021

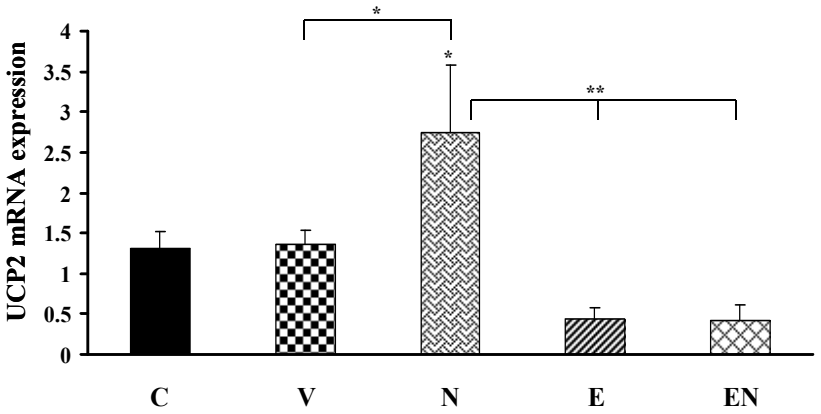
Downloaded from ppj.phypha.ir at 19:19 +0430 on Sunday May 9th 2021



شکل۲- مقایسه میانگین وزن قلب. مقادیر عبارتند از میانگین± خطای معیار. *P<0.05, درمقایسه با گروه کنترل و اختلاف آماری بین گروهی می‌باشد. کنترل=C، حامل دارو=V، ناندرولون=N، ورزش=E، ورزش-ناندرولون=EN



شکل۳- مقایسه میانگین نسبت وزن قلب به وزن بدن. مقادیر عبارتند از میانگین± خطای معیار. *P<0.05,**P<0.01,***P<0.001 درمقایسه با گروه کنترل و اختلاف آماری بین گروهی می‌باشد. کنترل=C، حامل دارو=V، ناندرولون=N، ورزش=E، ورزش-ناندرولون=EN.

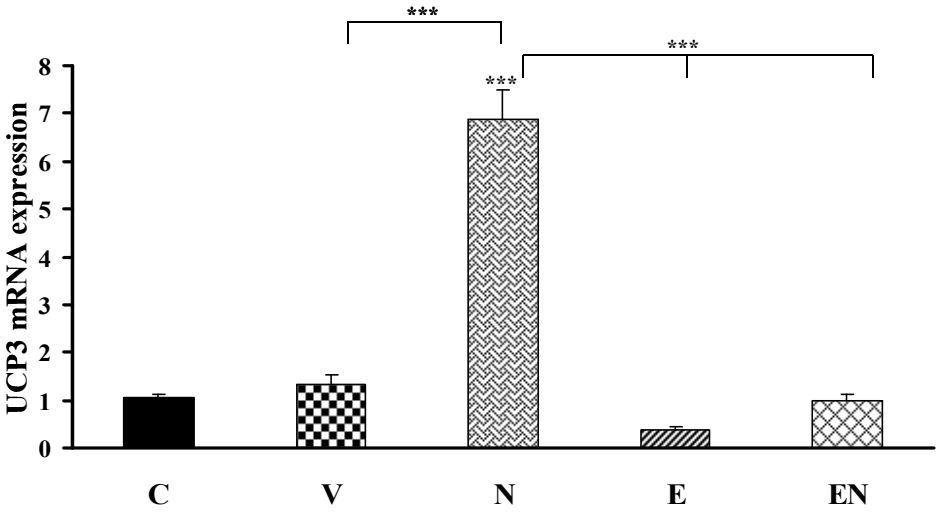


شکل٤- میزان بیان ژن UCP2 که نسبت به بیان ژن بتااکتین نرمالایز شده‌است. هر ستون به‌صورت میانگین± خطای معیار ارائه شده‌است. *P<0.05, **P<0.01 درمقایسه با گروه کنترل و اختلاف آماری بین گروهی می‌باشد. کنترل=C، حامل دارو=V، ناندرولون=N، ورزش=E، ورزش-ناندرولون=EN

P<0.05 (۷۳/۱۸±۵/۸۲) بود. درگروه ناندرولون و ورزش مقدار این متغیر کمتر از گروه کنترل بود ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت.

میانگین وزن قلب (شکل۲) در گروه کنترل (۰/۸۳۵±۰/۰۲۲g) و در گروه حامل (۰/۸۴۴±۰/۰۳۰g) کمتر از گروه ورزش (P<0.05 ,۰/۹۴۹±۰/۰۲۹g) بود. در گروه ناندرولون (۰/۸۵۶±۰/۰۱۲g) و بخصوص در گروه ورزش- ناندرولون (۰/۹۲۸±۰/۰۳۳g) این متغیر افزایش نشان داد ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت. میانگین نسبت وزن قلب به وزن بدن (شکل۳) در گروه کنترل (۰/۰۰۲۸۴±۰/۰۰۰۰۲g/g) و در گروه حامل (g/g ۰/۰۰۲۸۴±۰/۰۰۰۰۵) کمتر از گروه ورزش (P<0.05 ,g/g ۰/۰۰۳۱۱±۰/۰۰۰۰۸) و گروه ورزش- ناندرولون (g/g, P<0.001 ۰/۰۰۳۳۶±۰/۰۰۰۰۷) بود. مقدار این متغیر در

Downloaded from ppj.phypha.ir at 19:19 +0430 on Sunday May 9th 2021



شکل ۵- میزان بیان ژن UCP3 که نسبت به بیان ژن بتااکتین نرمالایز شده‌است. هر ستون به‌صورت میانگین± خطای معیار ارائه شده است. ***P<0.001 درمقایسه با گروه کنترل و اختلاف آماری بین گروهی می‌باشد. کنترل=C، حامل دارو=V، ناندرولون=N، ورزش=E، ورزش-ناندرولون=EN

ورزش- ناندرولون بیشتر از گروه ورزش (P<0.05) و گروه ناندرولون (۰/۰۰۳۰۱±۰/۰۰۰۰۴ g/g, P<0.01) بود. در گروه-های ورزش و ناندرولون میزان این متغیر از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت. میزان بیان mRNA پروتئین UCP2 (شکل۴) در گروه ناندرولون (۲/۷۳۵±۰/۸۴۲ A.U.) بیشتر از گروه‌های کنترل (۱/۳۱۸±۰/۲۰۳,P<0.05)، حامل , (۱/۳۶۱±۰/۱۸۲P<0.05)، ورزش(۰/۴۳۴±۰/۱۳۵, P<0.01) و ورزش- ناندرولون (۰/۴۱۹±۰/۱۹۱ P<0.01) بود. در گروه ورزش و ورزش-ناندرولون با وجود کاهش نسبت به گروه کنترل ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود.

میزان بیان mRNA پروتئین UCP3 (شکل۵) در گروه ناندرولون (۶/۸۶۸±۰/۶۳۲ A.U.) بیشتر از گروه‌های کنترل (۱/۰۵۸±۰/۰۰۷۹ ,P<0.001)، حامل (۱/۳۱۸ ±۰/۲۰۳, P<0.001)، ورزش (۰/۳۷۰ ± ۰/۰۷۴, P<0.001) و ورزش- ناندرولون (۰/۹۹۰±۰/۱۱۹,P<0.001) بود. در گروه ورزش- ناندرولون و بخصوص ورزش با وجود کاهش نسبت به گروه کنترل ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود.

بحث

در این تحقیق اثرات ناندرولون و ورزش بر بیان ژن‌های UCP2 وUCP3 قلب موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از روش Real-time RT PCR جهت بررسی تغییرات بیان UCP2 و UCP3 در سطح mRNA استفاده شد. همچنین اثرات ناندرولون و ورزش بر وزن بدن، وزن قلب و نسبت وزن قلب به وزن بدن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد تجویز ناندرولون یا ورزش به تنهایی اثری روی وزن بدن نداشت ولی در گروه ورزش- ناندرولون به‌طور قابل توجهی وزن بدن دچار کاهش گردید (شکل۱). از طرفی وزن مطلق قلب در گروه ورزش افزایش نشان داد. در گروه ورزش-ناندرولون افزایش وزن قلب نسبت به گروه‌های کنترل و ناندرولون مشاهده شد هر چند از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل۲). همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که در گروه‌های ورزش و ورزش-ناندرولون نسبت وزن قلب به وزن بدن افزایش یافت (شکل۳). در بررسی‌های مولکولی نتایج این پژوهش نشان داد تجویز ناندرولون میزان بیان mRNA پروتئین UCP2 و UCP3 را در گروه ناندرولون افزایش می‌دهد. در گروه ورزش و ورزش-ناندرولون با وجود کاهش نسبت به گروه کنترل، ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل‌های۴ و ۵). افزایش وزن مطلق قلب و نسبت آن به وزن بدن در گروه ورزش دلالت بر هیپرتروفی قلب در این گروه می‌باشد. در گروه ورزش- ناندرولون افزایش نسبت وزن قلب به وزن بدن قسمتی مربوط به کاهش وزن بدن در این گروه می‌باشد قسمتی نیز می‌تواند مربوط به افزایش وزن قلب در این گروه باشد هر چند که از نظر آماری معنی‌دار نبود، که در مجموع می‌توان استنباط کرد که در این گروه با توجه به

Downloaded from ppj.phypha.ir at 19:19 +0430 on Sunday May 9th 2021

کاهش شدید وزن بدن نسبت به گروه کنترل نمی‌توان نتیجه گیری کرد که به مانند گروه ورزش هیپرتروفی قلبی اتفاق افتاده‌است.

در مطالعات مختلفی گزارش‌های متفاوتی در رابطه با تأثیر ورزش و تجویز استروئید روی وزن بدن گزارش شده است، به‌طوریکه برخی مطالعات عدم تأثیر ورزش [۶،۸،۱۴،۲۱،۲۶] و تجویز استروئید روی وزن بدن را گزارش کرده‌اند [۸،۲۱،۶] و در تحقیقی که توسط وودیویس و همکاران انجام شده گزارش شده است که ورزش روی وزن بدن تأثیر گذار نبوده ولی تجویز استروئید باعث کاهش وزن بدن شده‌است [۳۴]. همچنین در مطالعات دیگری نیز نشان داده شده است که تجویز استروئید به‌تنهایی هم رشد بدنی و هم رشد قلب را سرکوب می‌کند [۳۲،۳۳]. کاهش وزن بدن مربوط به کاهش هم در توده چربی و هم در Lean body mass محاسبه شده بوده است [۳۲].

به نظر می‌رسد نوع، شدت و مدت ورزش و مقدار و دفعات تزریق استروئید در جواب‌های متفاوت در این تحقیقات موءثر بوده‌است. از طرفی در مطالعاتی نشان داده‌شده‌است که استرس و اضطراب از طریق سیستم عصبی مرکزی با اثرات اتونومیک رشد قلب را تحریک می‌کند و ممکن است میزان اشتها را کاهش دهد و از این طریق روی وزن بدن تأثیر بگذارد [۳۴]. در ورزش دوی ارادی که بدون فشار و استرس روی حیوان بوده وزن بدن تغییر نکرده‌است [۳۴]. استروئیدهای آندروژنیک آنابولیک دارای توانایی اثرات بالقوه کاتابولیک و همچنین آنابولیک روی رشد قلب و بدنی هستند که بستگی به شرایط آزمایش دارد [۳۵]. در این تحقیق ورزش یا تجویز استروئید به تنهایی باعث کاهش وزن بدن شده هر چندکه از نظر آماری معنی‌دار نبوده‌است این نتیجه نشان دهنده آن است که شدت ورزش نسبتاً بالا بوده است که توانسته تا حدی باعث کاهش وزن شود و از طرفی تجویز دوز فوق فیزیولوژیک ناندرولون دکانوئیت با اثر روی رشد بدنی تا حدی موجب کاهش وزن بدن شده‌است. به نظر می‌رسد در گروه ورزش–ناندرولون، ورزش و استروئید با هم اثر افزایشی داشته به طوریکه توانسته‌است باعث کاهش قابل توجه در وزن بدن گردد.

در تحقیقی که توسط وودیویس و همکاران [۳۵] انجام شده گزارش شده است که ورزش مزمن باعث افزایش وزن قلب، وزن مرطوب بطن چپ و وزن خشک بطن چپ می‌شود که بیانگر اثر ورزش در ایجاد هیپرتروفی فیزیولوژیکی قلب است که یک سازش فیزیولوژیکی می‌باشد و توسط ناتالی و همکاران [۲۳]، هانگ و همکاران [۱۴] و پاورز و همکاران [۲۶] (افزایش وزن مطلق قلب و هم افزایش نسبت وزن قلب به وزن بدن) نیز گزارش شده است. در این تحقیق [۳۵] تجویز ناندرولون دکانوئیت اثر مخالف داشته است. در گروه ورزش–ناندرولون علی‌رغم اثر ناندرولون در ممانعت از رشد قلب افزایش وزن قلب مشابه با گروه ورزش مشاهده شد که نشان می‌دهد استروئید نتوانسته مانع از اثر ورزش در القای هیپرتروفی شود [۳۵]. در تحقیقاتی که توسط چاوز و همکاران [۶] و لونز و همکاران [۲۱] انجام گردید تغییری در وزن مطلق بدن و قلب در گروه‌های ورزش و دریافت کننده استروئید مشاهده نشد. ولی وقتی وزن قلب با تقسیم به وزن بدن نرمالیزه شد یک افزایش قابل توجه در گروه‌های دریافت کننده استروئید ساکن و تحت ورزش مزمن مشاهده شد که بیانگر آن است که تجویز استروئید می‌تواند باعث هیپرتروفی قلبی به تنهایی یا با ورزش شود، اثری که توسط مطالعات دیگر نیز گزارش شده است [۲۴].

در مطالعه‌ای که توسط دوتویت و همکاران انجام گردید فقط افزایش در نسبت وزن قلب به وزن بدن در گروه استروئید–ورزش در مقایسه با گروه استروئید ساکن مشاهده شد [۸]. کارهونن و همکاران نیز افزایش در وزن قلب موش‌های صحرایی همراه با برنامه ورزشی که استروئید آندروژنیک دریافت کرده‌اند را گزارش کرده‌اند [۱۵]. از طرفی لینانگ و همکاران مشاهده کردند که تفاوتی در وزن‌های قلب بدنبال یا تجویز استروئید یا ورزش مزمن وجود ندارد [۲۰]. تفاوت در این گزارشات می‌تواند احتمالاً مربوط به اختلاف پروتکل‌های ورزشی (ورزش ارادی روی چرخ که توسط وودیویس و همکاران مورد استفاده شده در برابر ورزش روی تریدمیل که توسط کارهونن و همکاران مورد استفاده قرار گرفت) و تعداد تجویز استروئید در هفته (دو بار در هفته توسط وودیویس و همکاران و یک بار در هفته توسط کارهونن و همکاران) باشد. در بررسی‌های مولکولی نتایج این پژوهش نشان داد که میزان بیان mRNA پروتئین UCP2 و UCP3 در گروه ناندرولون بیشتر از سایرگروه‌ها می‌باشد. در گروه ورزش و ورزش–ناندرولون با وجود کاهش نسبت به گروه کنترل ولی از نظر

Downloaded from ppj.phypha.ir at 19:19 +0430 on Sunday May 9th 2021

آماری معنی‌دار نبود (شکل‌های۴ و ۵). این نتیجه همسو با نتایج باس و همکاران [۳] می‌باشد که در تحقیقی نشان دادند که تمرین استقامتی (endurance training) در موش‌های صحرایی موجب کاهش ۷۶٪ و ۵۹٪ در بیان mRNA پروتئین UCP3 به ترتیب در عضله‌های تیبیالیس قدامی و سولئوس گردید. سطح mRNA پروتئین UCP2 همچنین درعضله تیبیالیس قدامی و در قلب به‌ترتیب ۵۴٪ و ۴۱٪ کاهش یافت. نتایج این مطالعه نشان داد که نیاز به کارآمدی متابولیک بالاتر همراه با کاهش بیان mRNA پروتئین‌های Uncoupling در عضلات اسکلتی و قلب می‌باشد که باعث کاهش در اتلاف انرژی در این بافت‌ها می‌گردد. از طرفی کاهش بیان mRNA پروتئین UCP2 وUCP3 ممکن است همچنین به بازیافت سریع وزن بعد از آنکه تمرین ورزشی متوقف می‌شود کمک نماید.

همچنین بو و همکاران [۱] در تحقیقی دیگر نشان دادند بعد از ۶ هفته تمرین ورزشی اعمال یک دوره کوتاه مدت و حاد ورزش باعث افزایش چهار برابری در میزان بیان mRNA پروتئین UCP2 نسبت به سطح استراحت در میوکارد می‌شود که این افزایش در گروه بدون تمرین ورزشی بیشتر (۷ و ۶ برابر بعد از ۴۵ و ۹۰ دقیقه بعد از اعمال ورزش حاد به ترتیب) بود. البته این افزایش گذرا بوده و بعد از ۹۰ دقیقه در هر دو گروه به سطح استراحت بر می‌گردد.

این محققین نتیجه گیری کردند که این افزایش بیان UCP2 پروتئین mRNA ممکن است قسمتی از پاسخ اولیه دفاع آنتی اکسیدانی با هدف کاهش استرس اکسیداتیو میتوکندری و حفظ عملکرد تنفسی باشد. تنظیم افزایشی (upregulation) بیان UCP2 یک مکانیسم مهم برای کاهش تولید ROS از طریق زنجیره انتقال الکترون است که در طی مرحله اولیه ورزش وقتی ورود اکسیژن چندین برابر افزایش می‌یابد و حذف ROS توسط MnSOD و سایر آنتی اکسیدان‌ها نظیر گلوتاتیون هنوز صورت نگرفته است. این مطالعه همچنین اثبات می‌کند تمرین استقامتی برای ۶ هفته افزایش mRNA پروتئین UCP2 القاء شده توسط ورزش حاد را در قلب موش صحرایی تقلیل می‌دهد (افزایش۴ برابری در موش‌های تحت تعلیم در مقایسه با افزایش ۷ برابری در موش‌های بدون تعلیم) که این محققین دلیل این موضوع را به بالا بودن ۳۰ درصدی فعالیت MnSOD در قلب موش صحرایی تحت تمرین مزمن ورزشی نسبت دادند که باعث حذف قسمتی از یون سوپراکساید بعنوان تحریک کننده بالقوه UCP2 میشود.

با توجه به اینکه تاکنون گزارشی در رابطه با نقش AASs بر روی بیان mRNA پروتئین UCP2,3 وجود ندارد و این تحقیق اولین گزارش در این رابطه می‌باشد، به نظر می‌رسد استفاده از دوزهای فوق فیزیولوژیک AASs با عث افزایش قابل توجه در بیان UCP2 و UCP3 در سطح mRNA و احتمالاً در سطح پروتئین می‌گردد و بدین طریق گرادیان هیدروژنی در دو سوی غشای داخلی میتوکندری که توسط زنجیره انتقال الکترون ایجاد می‌شود را کاهش می‌دهد. بنابراین کارآیی متابولیسم انرژی از طریق کاهش و یا اختلال در تولید ATP کاهش می‌یابد که این موضوع می‌تواند قلب را به آسیب‌های استرس اکسیداتیو مستعدتر نماید. شواهدی در دست است که تجویز مزمن AAS با دوز فوق فیزیولوژیک باعث افزایش قابل توجه اندازه ناحیه آنفارکتوس در مدل ایسکمی ـ جریان مجدد در قلب موش صحرایی شده است [۴]. یکی از علل مهم آسیب نکروتیک بدنبال ایسکمی ــ جریان مجدد کاهش ذخایر و تولید ATP در میوسیت‌های قلبی است [۴،۲۸]. بنابراین احتمال دارد یکی از مکانیسم‌های اثر تجویز مزمن یک نوع از AAS مانند ناندرولون در افزایش اندازه ناحیه آنفارکتوس که شاخصی از میزان آسیب به میوکارد می‌باشد، افزایش بیان UCP2 و UCP3 در قلب باشد.

از طرفی مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ورزش استقامتی مزمن می‌تواند اندازه ناحیه آنفارکتوس را هم در مدل invivo [۱۱،۱۲] و هم invitro [۱۴] به‌طور قابل توجهی کاهش دهد. در شناخت مکانیسم‌های اثر ورزش در کاهش ضایعات بافتی در قلب تحقیقات متعددی انجام گردیده است و عوامل گوناگونی مانند افزایش بیان یا فعالیت کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP (KATP channels) [۵] و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی درون زا مانند منگنز سوپر اکساید دسموتاز [۱۲،۱۴] بعنوان محافظت کننده میوکارد مطرح شده است. کاهش بیان mRNA پروتئین UCP2 وUCP3 در میتوکندری‌های قلب ممکن است موجب القای یک سازش فیزیولوژیکی به استرس‌های اکسیداتیو مانند ورزش گردد و با افزایش دادن بازده متابولیسم انرژی شاید یکی از مکانیسم‌های محافظتی القاء شده

Downloaded from ppj.phypha.ir at 19:19 +0430 on Sunday May 9th 2021

توسط ورزش محسوب شود.

در این مطالعه در گروه‌های ورزش و ورزش- ناندرولون هر چند میزان نسخه برداری UCP2 و UCP3 با وجود کاهش، از نظر آماری با گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان نداد ولی نسبت به گروه ناندرولون کاهش قابل توجه مشاهده شد که بیانگر آن است ورزش مزمن میزان نسخه برداری UCP2 و UCP3 را کاهش می‌دهد و در حضور ورزش تجویز ناندرولون تأثیری در افزایش بیان UCP2 و UCP3 در سطح mRNA ندارد، بنابراین، می‌توان نتیجه گیری کرد که ورزش مزمن می‌تواند کارآیی انرژی مکانیکی قلب را با کاهش نسخه برداری UCP2 و UCP3 بهبود ببخشد.

سپاسگزاری

این تحقیق مستخرج از رساله دکتری رشته فیزیولوژی و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده‌است. نویسندگان این مقاله از دکتر علیرضا مانی استادیار محترم گروه فیزیولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل مشاوره‌های سودمندشان در طی انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

References

[1] Bo H, Jiang N, Ma G, Qu J, Zhang G,Cao D, Wen L, Liu S, Ji LL, Zhang Y, Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: Role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. ***Free Radic Biol Med*** 44 (2008) 1373 –81.

[2] Boss O: Uncoupling protein-3, a new member of the mitochondrial carrier family with tissue specific expression. ***FEBS Lett*** 408 (1997) 39- 42.

[3] BOSS O, Samec S, Desplanches D, Matet MH, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP, Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, 3 in the rat. ***FASEB J*** 12 (1998) 335-9.

[4] Brown DA, Moor RL, Perspectives in innate and acquired cardioprotection: cardioprotection acquired through exercise. ***J Appl Physiol*** 103 (2007) 1894-9.

[5] Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA, Moore RL, Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the K_{ATP} channel in the rat. ***J Physiol*** 569 (2005) 913–24.

[6] Chaves E, Pereira-Junior PP, Fortunato RS, Masuda MO, Nascimento JHM, Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cadioprotection: Role of antioxidant enzymes. ***J Steroid Biochem Mol Biol*** 99 (2006) 223-30.

[7] Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, Naito H, Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia–reperfusion in the rat. ***J Appl Physiol*** 91 (2001) 2205–12.

[8] Du Toit EF, Rossouw E, Rooyen JV, Lochner A, Proposed mechanisms for the anabolic steroid-induced increase in myocardial susceptibility to ischaemia/reperfusion injury. ***Cardiovasc J of South Africa*** 16 (2005) 21-28.

[9] Echtay KS, Mitochondrial uncoupling proteins-what is their physiological role? ***Free Radic Biol Med*** 23 (2007) 2-19.

[10] Fleury C, Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. ***Nature Genet*** 15 (1997) 269- 72.

[11] Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, Powers SK, Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. ***Free Radic Biol Med*** 34 (2003). 800–809.

[12] Hamilton KL, Quindry JC, French JP, Staib J, Hughes J, Mehta JL, Powers SK, MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. ***Free Radic Biol Med*** 37 (2004) 1360–68.

[13] Himms-Hagen J, Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. ***FASEB J*** 4 **(**1990) 2890–98.

[14] Hwang H, Reiser PJ, Billman GE, Effects of exercise training on contractile function in myocardial trabeculae after ischemia-reperfusion. ***J Appl Physiol*** 99 (2005) 230–36.

[15] Karhunen K, Ramo P, Kettunen R, Anabolic steroids alter the haemodynamic effects of endurance and deconditioning of rats**.** ***Acta Physiol Scand*** 133 (1988) 297–306.

[16] Karila T, Adverse effects of anabolic androgenic

Downloaded from ppj.phypha.ir at 19:19 +0430 on Sunday May 9th 2021

steroids on the cardiovascular, metabolic and reproductive systems of anabolic substance abusers. **[Thesis] Helsinki University** (2003) 1-66.

[17] Klingenberg M, Huang S G, Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. ***Biochim Biophys Acta*** 1415 (1999) 271–96.

[18] Kloner RA, Simkhovich BZ**,** Benefit of an exercise program before myocardial infarction. ***J Am Coll Cardiol*** 45 (2005) 939-40.

[19] Krauss S, Zhang CY, Lowell BB, The mitochondrial uncouplingprotein homologues. ***Nat Rev Mol Cell Biol*** 6 (2005) 248–61.

[20] Liang, MTC, Paulson DJ, Kepp SJ, Glenek T, Meneses P, GierkeLW, Sekwartz FN, Effects of anabolic steroids and endurance exercise on cardiac performance. ***Int J Sports Med*** 14 (1993) 324–29.

[21] Lunz W, Oliveira EC, Neves MTD, Fontes EPB, Dias CMGC, Natali AJ, Anabolic steroid- and exercise-induced cardiac stress protein (HSP72) in the rat. **Brazillian J Med Biol Res** 39 (2006) 889-93.

[22] Murray AJ, Anderson R, Watson GC, Radda G, Clarke K, Uncoupling proteins in human heart. ***Lancet*** 364 (2004) 1786-88.

[23] Natali AJ, Wilson LA, Peckham M, Turner DL, Harrison SM, White E, Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. ***J Physiol*** 541 (2002) 863-75.

[24] Pescola MK: Reversibility of the haemodynamic effects of anabolic steroids in rats. **Eur J Appl Physiol** 58 (1988)125-131.

[25] Powers SK, Criswell D, Lawler D, Martin D, Lieu FK, Ji LL, Herbet RA, Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. ***Am J Physiol*** 265 (1993) H2094–98.

[26] Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA, Jessup J, Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. ***Am J Physiol*** 275 (1998) 1468-77.

[27] Powers SK, Locke M, Demirel HA**,** Exercise, heat shock proteins and myocardial protection from I–R injury. ***Med Sci Sports Exer*** 33 (2001) 386–92.

[28] Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN, Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. ***Free Radic Biol Med*** 44 (2008) 193-201.

[29] Quindry J, French J, Hamilton K, Lee Y, Mehta JL, Powers S, Exercise training provides cardioprotection against ischemia–reperfusion induced apoptosis in young and old animals. ***Exp Gerontol*** 40 (2005) 416–425.

[30] Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH, Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. ***Circ Res*** 74 (1994) 349–53.

[31] Sullivan ML, Martinez CM, Gennis P, Gallagher EJ**,** The cardiac toxicity of anabolic steroids. ***Prog Cardiovasc Dis*** 41 (1998) 1–15.

[32] Trifunovic B, Norton GR, Duffield MJ, Avraam P, Woodiwiss AJ, An androgenic steroid decreases left ventricular compliance in rats. ***Am J Physiol*** 268 (1995) H1096–105.

[33] Trifunovic BA, Woodiwiss J, Duffield M, Norton GR, Novel attributes of an androgenic steroid-mediated increase in cardiac end diastolic stiffness in rats. ***Can J Physiol Pharmac*ol** 76 (1998) 1–8.

[34] Woodiwiss AJ, and Norton GR, Exercise-induced cardiac hypertrophy is associated with an increased myocardial compliance. **J Appl Physiol** 78 (1995) 1303–11.

[35] Woodiwiss AJ, Trifunovic B, Philippides M, Norton GR, Effects of an androgenic steroid on exercise-induced cardiac remodeling in rats. ***J Appl Physiol*** 88 (2000) 409-15.

[36] Yamashita N, Baxter GF, Yellon DM, Exercise directly enhances myocardial tolerance to ischemia–reperfusion injury in the rat through a protein kinase C mediated mechanism. ***Heart*** 85 (2001) 331–6.