

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

غلامرضا بیات^۱، سهراب حاجی زاده^{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

پذیرش: ۵ تیر ۹۰

دریافت: ۲۸ فروردین ۹۰

چکیده

مقدمه: اثرات سودمند ورزش منظم در کاهش شیوع بیماری های قلبی عروقی به خوبی شناخته شده و سوء استفاده از استروئیدهای آندروژنیک آنابولیک (AAS) همراه با بروز بیماری های قلبی عروقی بوده است. UCPها پروتئون ها را از عرض غشای داخلی میتوکندری منتقل می کنند و بدین وسیله گرادیان پروتون را کاهش می دهند و بنابراین اکسیداسیون را از تولید ATP جدا می کنند. این فرایند باعث کاهش تولید ATP می شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی دخالت پروتئین های UCP2 و UCP3 در مکانیسم آسیب قلبی ناشی از مصرف AAS می باشد.

روش ها: در این مطالعه موش های صحرایی نر نژاد ویستار به پنج گروه آزمایشی (n=8) 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 دکانوتیت با دوز 10mg/kg و روغن آراشید بعنوان حامل ناندرولون هفته ای یکبار برای مدت ده هفته در گروه های دریافت کننده در عضله رانی به صورت عمیق تزریق می شد. از روش Real time RT-PCR جهت بررسی میزان بیان ژن پروتئین های UCP2 و UCP3 استفاده شد.

یافته ها: نتایج نشان داد تجویز ناندرولون دکانوتیت باعث افزایش نسخه برداری پروتئین های UCP2 و UCP3 در قلب می شود و ورزش باعث جلوگیری از این اثر می شود. **نتیجه گیری:** ناندرولون با افزایش نسخه برداری پروتئین های UCP2 و UCP3 می تواند کارایی متابولیسم انرژی را از طریق اختلال تولید ATP کاهش دهد، بنابراین می تواند قلب را به آسیب های استرس اکسیداتیو مستعدتر نماید. از طرف دیگر ورزش با کاهش بیان UCP2 و UCP3 می تواند کارایی انرژی مکانیکی در قلب را بهبود ببخشد.

واژه های کلیدی: ناندرولون، ورزش، UCP2، UCP3

مقدمه

دارای اثرات آنابولیک بیشتر و اثرات آندروژنیک کمتر هستند و در ابتدا با هدف درمان تعداد زیادی از بیماری های انسان از جمله بیماری هایی که همراه با وضعیت های کاتابولیک می باشند مانند استئوپوروز، گرسنگی شدید، سوختگی ها و لاغری شدید ناشی از سرطان ها و غیره سنتز شدند. اولین مورد سوء استفاده از AAS در سال ۱۹۵۰ در وزنه برداران و سایر ورزشکاران قدرتی و بعدها در افراد غیر ورزشکار با هدف افزایش در عملکرد

استروئیدهای آندروژنیک آنابولیک (AAS) مشتقات سنتتیک تستوسترون می باشند که در مقایسه با تستوسترون

Hajizads@modares.ac.ir

* نویسنده مسئول مکاتبات:

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

UCP2 و UCP3 بسیار متفاوت از توزیع UCP1 می‌باشد که بطور اختصاصی در بافت چربی قهوه‌ای وجود دارد [۳، ۱۹، ۲۲]. UCP2 توزیع وسیعی در بافت‌های بدن و از جمله قلب را دارد اما UCP3 گستردگی محدودتری دارد به طوری که 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 ترموژن 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 کارایی 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 بدنال تجویز مزمن ASS در مدل ایسکمی - جریان مجدد افزایش می‌یابد [۴]. یکی از علل آسیب ایسکمی - 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 سلول قلبی شده و زمینه را برای آسیب که یکی از شاخص‌های مهم آن اندازه ناحیه آنفارکتوس می‌باشد 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 طوری که تحریک احتمالی بیان UCP2,3 در پاسخ به استفاده AASs حداقل قسمتی از اثرات زیان بار این عامل هورمونی سنتتیک بر روی میوکارد را توجیح نماید که تاکنون 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.

فیزیکی و افزایش توده و قدرت عضله اسکلتی گزارش شده است [۳۱]. تستوسترون و AAS سنتز پروتئین و بزرگی عضله را تحریک می‌کند [۲۱]. علی‌رغم 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 طوری که دوزهای بالای AAS خطر بیماری‌های قلبی عروقی ناشی از افزایش سطوح کلسترول، تری‌گلیسیرید و لیپوپروتئین 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 سازش‌های 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 قهوه‌ای 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 می‌شود، بنابراین نقش مهمی در ترموژن غیر لرزشی (nonshivering thermogenesis) در جوندگان دارد [۳، ۹، ۱۳، ۱۷، ۱۹].

UCP2 در سال ۱۹۹۷ [۱۰] و UCP3 بلافاصله بعد از آن [۲] کlon شد. UCP2 و UCP3 به ترتیب ۵۹٪ و ۵۷٪ شباهت به UCP1 یا همان UCP کلاسیک دارند. توزیع

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 ناندربولون دکانونییت (Gedeon Richter مجارستان) که از مشتقات استری ۱۷- بنای 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 ناندربولون دکانونییت از روغن آراشید (Arachiz) [Henry Lamotte آلمان] (اهدایی شرکت دارویی ایران هورمون) استفاده شد. در گروه vehicle حامل ناندربولون دکانونییت روغن آراشید با حجم مشابه با گروه‌های دریافت کننده ناندربولون دکانونییت 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 ناندربولون دکانونییت یا حامل آن جهت استخراج بافت ابتدا حیوان با استفاده از داروی تیوپنتال سدیم (۵۰ میلی گرم 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 می‌گردید و قلب در داخل سرم فیزیولوژیک سرد انداخته می‌شد. سپس قلب از داخل سرم فیزیولوژیک خارج و پس از خشک 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 180°C - فریز می‌شدند. سپس نمونه‌ها جمع‌آوری و به فریزر 80°C - انتقال می‌یافت.

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

بنابراین، ما در این تحقیق اثرات تجویز ناندربولون دکانونییت بر روی القای بیان UCP2,3 قلبی در موش‌های صحرایی ساکن و تحت تعلیم مزمن ورزشی را مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

این تحقیق روی ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی بین 16 ± 220 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 $22-24^{\circ}\text{C}$ 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 قرار گرفتند.

۱) گروه کنترل (C) ۲) گروه حامل دارو (V) ۳) گروه ناندربولون (N) ۴) گروه ورزش (E) ۵) گروه ورزش - ناندربولون (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 تردمیل 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 تردمیل 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 ورزشی ۵۰ 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

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

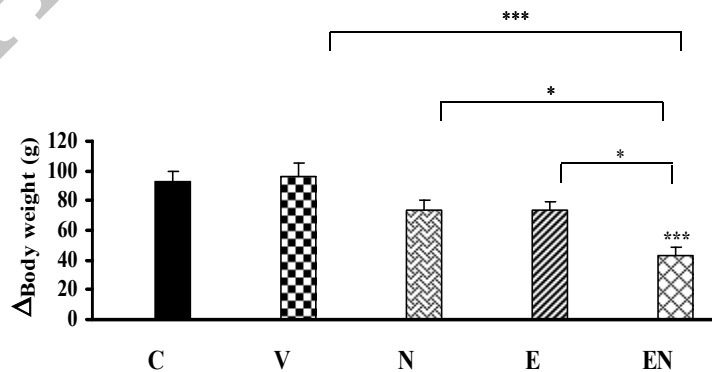
Genes	Primer sequences (5'-3')	
	Forward	Reverse
UCP2	5'-GCCCCGGGCTGGTGGTGGTC-3'	5'-CCCCGAAGGCAGAAGTGAAGTGC-3'
UCP3	5'-GCGTGCTCGGTACCATCCTGACTA-3'	5'-TTCTTCCCTGGCGATGGTTCTGTA-3'
B-actin	5'-GAACCTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3'	5'-ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG-3'

در مقدار mRNA برای هر نمونه عدد نرمالایز شده (ΔC_t) با استفاده از فرمول $C_t(\beta\text{-actin}) - C_t(\text{UCP}) = \Delta C_t$ محاسبه شد. بیان نسبی mRNA به صورت $2^{-\Delta C_t} \times 1000$ 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 جمع آوری شده با استفاده از برنامه آماری SPSS و Excel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین \pm SEM ارائه شدند. مقایسه میانگین ها با کمک آزمون واریانس یکطرفه (One way ANOVA) آنالیز شد و جهت بررسی وجود تفاوت معنی دار بین گروه ها از پس-آزمون Tukey استفاده شد. مقادیر $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

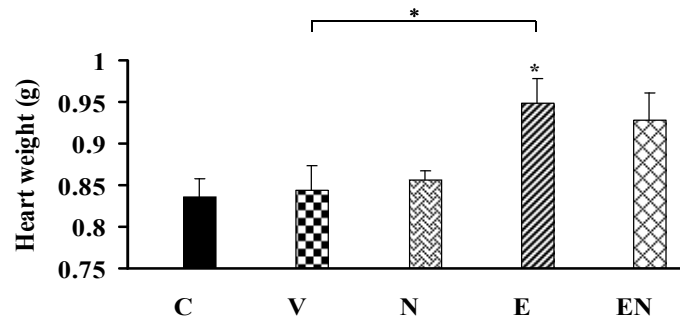
یافته ها

میانگین تغییر وزن در انتهای هفته دهم نسبت به شروع آزمایش (شکل ۱) در گروه ورزش- ناندربولون ($42/84 \pm 5/71$ g) کمتر از گروه کنترل ($93/38 \pm 6/20$ g, $P < 0.01$) و گروه های حامل ($95/94 \pm 9/20$ g, $P < 0.001$)، ناندربولون (g)، $P < 0.05$ ($73/88 \pm 6/39$) و گروه ورزش (g)

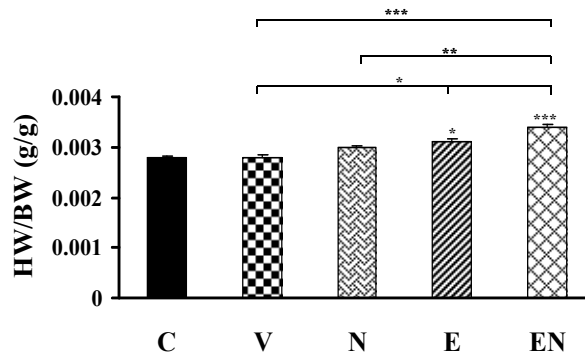
RT-PCR time استفاده شد. RNA کل از حدود ۳۰ میلیگرم بافت با استفاده از کیت RNeasy fibrous tissue minikit (شرکت کیاژن) مطابق با دستورالعمل سازنده استخراج شد. غلظت های RNA توسط اندازه گیری جذب طیف نوری در ۲۶۰ نانومتر برآورد شد، و خلوص آن توسط نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر تعیین شد. RNA کل (۱/۸ میکروگرم) در دمای 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 ساخته شد. سپس با استفاده از Master mix SYBR Green شرکت کیاژن و پرایمرهای forward و reverse در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر RT-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 می کند برای هر واکنش تعیین گردید (C_t). برای کنترل تغییر پذیری



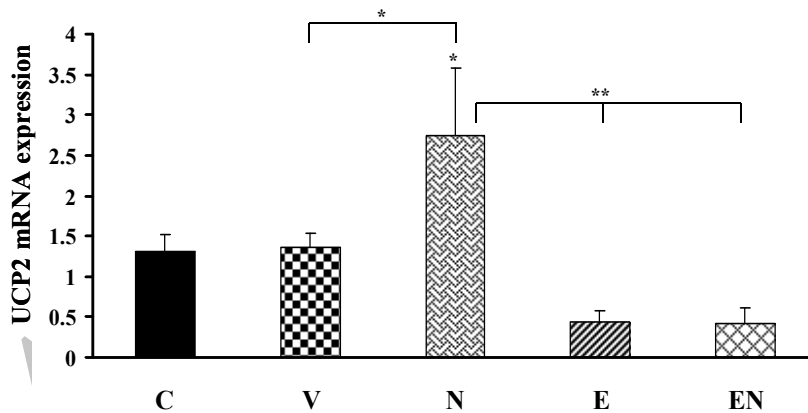
شکل ۱- مقایسه میانگین تغییر وزن بدن در هفته دهم نسبت به شروع آزمایش. مقادیر عبارتند از میانگین \pm خطای معیار. $P < 0.001$, $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل و اختلاف آماری بین گروهی می باشد. کنترل = C، حامل دارو = V، ناندربولون = N، ورزش = E، ورزش-ناندربولون = EN



شکل ۲- مقایسه میانگین وزن قلب. مقادیر عبارتند از میانگین \pm خطای معیار. $*P < 0.05$, درمقایسه با گروه کنترل و اختلاف آماری بین گروهی می باشد. C=کنترل، حامل دارو=V، ناندربولون=N، ورزش=E، ورزش-ناندربولون=EN



شکل ۳- مقایسه میانگین نسبت وزن قلب به وزن بدن. مقادیر عبارتند از میانگین \pm خطای معیار. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ درمقایسه با گروه کنترل و اختلاف آماری بین گروهی می باشد. C=کنترل، حامل دارو=V، ناندربولون=N، ورزش=E، ورزش-ناندربولون=EN

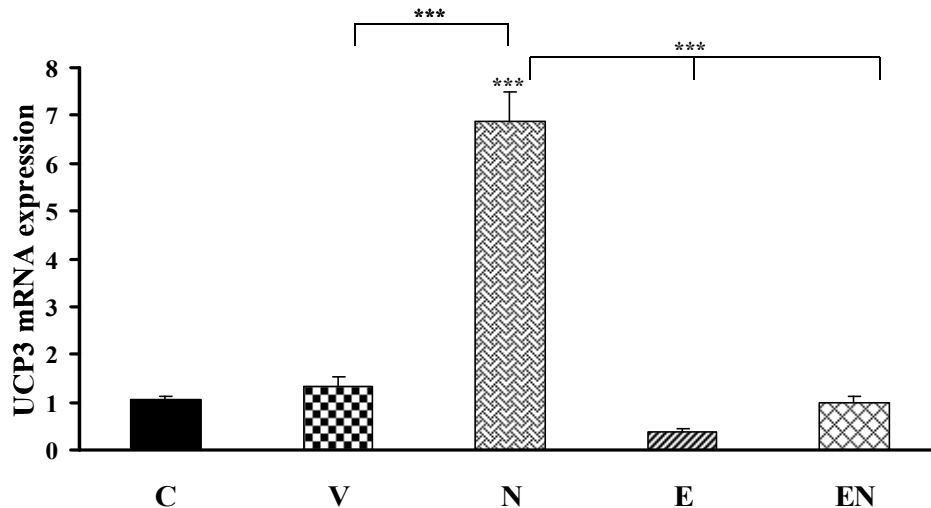


شکل ۴- میزان بیان ژن UCP2 که نسبت به بیان ژن بتاآکتین نرمالایز شده است. هر ستون به صورت میانگین \pm خطای معیار ارائه شده است. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ درمقایسه با گروه کنترل و اختلاف آماری بین گروهی می باشد. C=کنترل، حامل دارو=V، ناندربولون=N، ورزش=E، ورزش-ناندربولون=EN

ناندربولون (0.928 ± 0.033 g) این متغیر افزایش نشان داد ولی از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشت. میانگین نسبت وزن قلب به وزن بدن (شکل ۳) در گروه کنترل (0.0028 ± 0.0002 g/g) و در گروه حامل (0.00284 ± 0.0002 g/g, $P < 0.05$) کمتر از گروه ورزش (0.0031 ± 0.0005 g/g) و گروه ورزش-ناندربولون (0.0033 ± 0.0008 g/g) بود. مقدار این متغیر در $P < 0.001$ (0.00336 ± 0.0007 g/g) بود.

در گروه ناندربولون و ورزش مقدار این متغیر کمتر از گروه کنترل بود ولی از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشت.

میانگین وزن قلب (شکل ۲) در گروه کنترل (0.84 ± 0.022 g) و در گروه حامل (0.85 ± 0.030 g) کمتر از گروه ورزش (0.95 ± 0.029 g, $P < 0.05$) بود. در گروه ناندربولون (0.86 ± 0.012 g) و بخصوص در گروه ورزش-



شکل ۵- میزان بیان ژن UCP3 که نسبت به بیان ژن بتاکتین نرمالایز شده است. هر ستون به صورت میانگین \pm خطای معیار ارائه شده است. $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل و اختلاف آماری بین گروهی می باشد. کنترل = C، حامل دارو = V، ناندرولون = N، ورزش = E، ورزش-ناندرولون = EN

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 به طور قابل توجهی وزن بدن دچار کاهش گردید (شکل ۱). از طرفی وزن مطلق قلب در گروه ورزش افزایش نشان داد. در گروه ورزش-ناندرولون افزایش وزن قلب نسبت به گروه های کنترل و ناندرولون مشاهده شد هر چند از نظر آماری معنی دار نبود (شکل ۲). همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که در گروه های ورزش و ورزش-ناندرولون نسبت وزن قلب به وزن بدن افزایش یافت (شکل ۳). در بررسی های مولکولی نتایج این پژوهش نشان داد تجویز ناندرولون میزان بیان mRNA پروتئین UCP2 و UCP3 را در گروه ناندرولون افزایش می دهد. در گروه ورزش و ورزش-ناندرولون با وجود کاهش نسبت به گروه کنترل، ولی از نظر آماری معنی دار نبود (شکل های ۴ و ۵). افزایش وزن مطلق قلب و نسبت آن به وزن بدن در گروه ورزش دلالت بر هیپرتروفی قلب در این گروه می باشد. در گروه ورزش-ناندرولون افزایش نسبت وزن قلب به وزن بدن قسمتی مربوط به کاهش وزن بدن در این گروه می باشد قسمتی نیز می تواند مربوط به افزایش وزن قلب در این گروه باشد هر چند که از نظر آماری معنی دار نبود، که در مجموع می توان استنباط کرد که در این گروه با توجه به

ورزش-ناندرولون بیشتر از گروه ورزش ($P < 0.05$) و گروه ناندرولون (0.0004 ± 0.0301 g/g, $P < 0.01$) بود. در گروه های ورزش و ناندرولون میزان این متغیر از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشت. میزان بیان mRNA پروتئین UCP2 (شکل ۴) در گروه ناندرولون (2.735 ± 0.842 A.U.) بیشتر از گروه های کنترل (1.318 ± 0.203 , $P < 0.05$)، حامل ورزش (1.361 ± 0.182 , $P < 0.05$)، ورزش (0.4334 ± 0.135 , $P < 0.01$) و ورزش-ناندرولون (0.419 ± 0.191 , $P < 0.01$) بود. در گروه ورزش و ورزش-ناندرولون با وجود کاهش نسبت به گروه کنترل ولی از نظر آماری معنی دار نبود. میزان بیان mRNA پروتئین UCP3 (شکل ۵) در گروه ناندرولون (6.868 ± 0.632 A.U.) بیشتر از گروه های کنترل (1.058 ± 0.079 , $P < 0.001$)، حامل (0.203 , $P < 0.001$)، ورزش (1.318 ، ورزش (0.370 ± 0.074 , $P < 0.001$) و ورزش-ناندرولون (0.990 ± 0.119 , $P < 0.001$) بود. در گروه ورزش-ناندرولون و بخصوص ورزش با وجود کاهش نسبت به گروه کنترل ولی از نظر آماری معنی دار نبود.

بحث

در این تحقیق اثرات ناندرولون و ورزش بر بیان ژن های UCP2 و UCP3 قلب موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از روش Real-time RT PCR جهت

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

در مطالعات مختلفی گزارش‌های متفاوتی در رابطه با تأثیر ورزش و تجویز استروئید روی وزن بدن گزارش شده است، به طوریکه برخی مطالعات عدم تأثیر ورزش [۲۶، ۲۱، ۱۴، ۸، ۶] 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 شده است [۳۴]. همچنین در مطالعات دیگری نیز نشان داده شده است که تجویز استروئید به تنهایی 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 مؤثر بوده است. از طرفی در مطالعاتی نشان داده شده است 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 نکرده است [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 چند که از نظر آماری معنی‌دار نبوده است 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 ناندربولون دکانونیت با اثر رشد بدنی تا حدی موجب کاهش وزن بدن شده است. به نظر می‌رسد در گروه ورزش-ناندربولون، ورزش و استروئید با هم اثر افزایشی داشته به طوریکه توانسته است 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

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

در مطالعات مختلفی گزارش‌های متفاوتی در رابطه با تأثیر ورزش و تجویز استروئید روی وزن بدن گزارش شده است، به طوریکه برخی مطالعات عدم تأثیر ورزش [۲۶، ۲۱، ۱۴، ۸، ۶] 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 شده است [۳۴]. همچنین در مطالعات دیگری نیز نشان داده شده است که تجویز استروئید به تنهایی 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 مؤثر بوده است. از طرفی در مطالعاتی نشان داده شده است 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 نکرده است [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 چند که از نظر آماری معنی‌دار نبوده است 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 ناندربولون دکانونیت با اثر رشد بدنی تا حدی موجب کاهش وزن بدن شده است. به نظر می‌رسد در گروه ورزش-ناندربولون، ورزش و استروئید با هم اثر افزایشی داشته به طوریکه توانسته است 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

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 می باشد، به نظر می رسد استفاده از دوزهای فوق فیزیولوژیک AASs باعث افزایش قابل توجه در بیان UCP2 و UCP3 در سطح mRNA و احتمالاً در سطح پروتئین می گردد و بدین طریق گرادیان هیدروژنی در دو سوی غشای داخلی میتوکندری که توسط زنجیره انتقال الکترون ایجاد می شود را کاهش می دهد. بنابراین کارآیی متابولیسم انرژی از طریق کاهش و یا اختلال در تولید ATP کاهش می یابد که این موضوع می تواند قلب را به آسیب های استرس اکسیداتیو مستعدتر نماید. شواهدی در دست است که تجویز مزمن AAS با دوز فوق فیزیولوژیک باعث افزایش قابل توجه اندازه ناحیه آنفارتوس در مدل ایسکمی - جریان مجدد در قلب موش صحرایی شده است [۴]. یکی از علل مهم آسیب نکروتیک بدنبال ایسکمی - جریان مجدد کاهش ذخایر و تولید ATP در میوسیت های قلبی است [۴،۲۸]. بنابراین احتمال دارد یکی از مکانیسم های اثر تجویز مزمن یک نوع از AAS مانند ناندرولون در افزایش اندازه ناحیه آنفارتوس که شاخصی از میزان آسیب به میوکارد می باشد، افزایش بیان UCP2 و UCP3 در قلب باشد.

از طرفی مطالعات مختلف نشان داده اند که ورزش استقامتی مزمن می تواند اندازه ناحیه آنفارتوس را هم در مدل *in vivo* [۱۱،۱۲] و هم *in vitro* [۱۴] به طور قابل توجهی کاهش دهد. در شناخت مکانیسم های اثر ورزش در کاهش ضایعات بافتی در قلب تحقیقات متعددی انجام گردیده است و عوامل گوناگونی مانند افزایش بیان یا فعالیت کانال های پتاسیمی وابسته به ATP (KATP channels) [۵] و آنتی اکسیدان های آنزیمی درون زا مانند منگنز سوپر اکساید دسموتاز [۱۲،۱۴] بعنوان محافظت کننده میوکارد مطرح شده است. کاهش بیان mRNA پروتئین UCP2 و UCP3 در میتوکندری های قلب ممکن است موجب القای یک سازش فیزیولوژیکی به استرس - های اکسیداتیو مانند ورزش گردد و با افزایش دادن بازده متابولیسم انرژی شاید یکی از مکانیسم های محافظتی القاء شده

آماری معنی دار نبود (شکل های ۴ و ۵). این نتیجه همسو با نتایج باس و همکاران [۳] می باشد که در تحقیقی نشان دادند که تمرین استقامتی (endurance training) در موش های صحرایی موجب کاهش ۷۶٪ و ۵۹٪ در بیان mRNA پروتئین UCP3 به ترتیب در عضله های تیبیالیس قدامی و سولئوس گردید. سطح mRNA پروتئین UCP2 همچنین در عضله تیبیالیس قدامی و در قلب به ترتیب ۵۴٪ و ۴۱٪ کاهش یافت. نتایج این مطالعه نشان داد که نیاز به کارآمدی متابولیک بالاتر همراه با کاهش بیان mRNA پروتئین های Uncoupling در عضلات اسکلتی و قلب می باشد که باعث کاهش در اتلاف انرژی در این بافت ها می گردد. از طرفی کاهش بیان mRNA پروتئین UCP2 و UCP3 ممکن است همچنین به باز یافت سریع وزن بعد از آنکه تمرین ورزشی متوقف می شود 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 می شود 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 می گردد.

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 می یابد و حذف ROS توسط MnSOD و سایر آنتی اکسیدان ها نظیر گلوکاتایون هنوز صورت نگرفته است. این مطالعه همچنین اثبات می کند تمرین استقامتی برای ۶ هفته افزایش mRNA پروتئین UCP2 القاء شده توسط ورزش حاد را در قلب موش صحرایی تقلیل می دهد (افزایش ۴ برابری در موش های تحت تعلیم در مقایسه با افزایش ۷ برابری در موش های بدون تعلیم) که این محققین دلیل این موضوع را به بالا

UCP2 و UCP3 بهبود ببخشد.

توسط ورزش محسوب شود.

سپاسگزاری

این تحقیق مستخرج از رساله دکتری رشته فیزیولوژی و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. 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.

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 کارایی انرژی مکانیکی قلب را با کاهش نسخه برداری

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 cardioprotection: 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

- 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 uncoupling protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 248-61.
- [20] Liang, MTC, Paulson DJ, Kepp SJ, Glenek T, Meneses P, Gierke LW, 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. *Brazilian 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, Herbert 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 Pharmacol* 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.