

## تأثیر هشت هفته تمرین مقاومتی همراه با مصرف عصاره‌ی خارخاسک بر سازگار آپوتوز در بافت قلب موش‌های صحرایی در معرض استانوزولول

محمد درخشنده<sup>۱</sup>، فرزانه تقیان<sup>۱\*</sup>، خسرو جلالی دهکردی<sup>۱</sup>، سید علی حسینی<sup>۲</sup>

### چکیده

مقدمه: تجزیه و تحلیل هوش مصنوعی بر اساس مجموعه داده‌های به‌دست آمده از پایگاه داده DisGeNET، ژن‌های مهم دخیل در فرآیند آسیب قلبی را تعیین کرد. از این رو، ما میل ترکیبی مولکول‌های شیمیایی و زیست فعال گیاه خارخاسک را بر روی پروتئین سیتوکروم-C محاسبه کردیم. هدف این مطالعه، تعیین اثرات هشت هفته تمرین مقاومتی همراه با مصرف عصاره‌ی خارخاسک بر سازگار آپوتوز در بافت قلب موش‌های صحرایی در معرض استانوزولول انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی سی و پنج موش صحرایی نر به‌صورت تصادفی به هفت گروه پنج تایی تقسیم شدند که شامل: ۱- گروه کنترل، ۲- موش‌های تحت تیمار با استانوزولول، ۳- موش‌های تحت تیمار داروی استانوزولول و داروی گیاهی خارخاسک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۴- موش‌های تحت تیمار داروی استانوزولول و داروی گیاهی خارخاسک با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۵- موش‌های با تمرین مقاومتی و تحت تیمار استانوزولول، ۶- موش‌های با تمرین مقاومتی و تحت تیمار با داروی استانوزولول و داروی گیاهی خارخاسک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، و ۷- موش‌های صحرایی با تمرین مقاومتی و تحت تیمار با داروی استانوزولول و داروی گیاهی خارخاسک با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. بیان ژن‌های CRP و Cytochrome-c با تکنیک qPCR-Real Time در بافت قلب موش‌های صحرایی اندازه‌گیری شد. در تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک مسیر آپوتوز به‌عنوان فرآیند بحرانی در آسیب‌های قلبی تعریف شد. همچنین، اثرات خارخاسک و استانوزولول در بافت قلب از طریق مسیر آپوتوز با مدل‌سازی فارماکوفور و اتصال مولکولی تشخیص داده شد.

یافته‌ها: تمرینات مقاومتی همراه با مصرف عصاره‌ی خارخاسک با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب کاهش میزان بیان ژن‌های CRP و cytochrome-c گردد. همچنین، مصرف میزان دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره‌ی خارخاسک می‌تواند بر روی عملکرد ورزشکاران مقاومتی اثرات مفیدی نسبت به دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داشته باشد. نتیجه‌گیری: از سویی، با توجه به اثرات مفید خارخاسک نشان داده شد که این زیست فعال گیاهی می‌تواند خطرات قلبی را از طریق بهبود آپوتوزومی و التهاب کاهش دهد.

واژگان کلیدی: تمرینات ورزشی مقاومتی، خارخاسک، آپوتوز، بافت قلب، استانوزولول

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران

۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

\*نشانی: اصفهان، ارغوانیه، خیابان جی، بلوار دانشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشکده‌ی علوم ورزشی، تلفن:

۰۹۱۳۳۰۸۰۲۴۱، صندوق پستی: ۱۵۸/۸۱۵۹۵، پست الکترونیک: f\_taghian@yahoo.com

## مقدمه

استروئیدهای آنابولیک-آندروژنیک<sup>۱</sup> (AAS)، از جمله تستوسترون<sup>۲</sup>، ناندرولون<sup>۳</sup> و استانوزولول<sup>۴</sup> که باعث افزایش قدرت و توده‌ی عضلانی به سبب افزایش پروتئین‌های سلولی می‌شوند، در بروز صفات ثانویه جنسی در آقایان نقش به‌سزایی دارند [۱]. استروئیدهای آنابولیک-آندروژنیک به‌عنوان رویکرد های درمانی بالقوه در بهبود پوکی استخوان و کم‌خونی آپلاستیک<sup>۵</sup> مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲، ۳]. با این حال، ورزشکاران و جوانان از دوزهای فوق‌فیزیولوژیکی AAS برای بهبود عملکرد بدن استفاده می‌کنند [۴]. مصرف AAS دارای اثرات جبران‌ناپذیری است که می‌تواند باعث اختلالات متابولیسم در لیپوپروتئین‌ها<sup>۶</sup>، ترومبوز عروق<sup>۷</sup>، فشار خون بالا<sup>۸</sup>، نارسایی آریتمی<sup>۹</sup> و مرگ ناگهانی گردد. مصرف AAS در ورزشکاران ممکن است مسیرهای مولکولی درگیر در اتساع عروق<sup>۱۱</sup> مانند مسیر اکسید نیتریک<sup>۱۲</sup> را مختل کند که باعث اختلال در بیان گیرنده‌های لیپوپروتئین با چگالی کم<sup>۱۳</sup>، آپولیپوپروتئین‌های A-1 و B، اکسیداسیون  $\beta$  و همچنین سبب افزایش سطح پروتئین واکنشی سی (CRP)<sup>۱۴</sup> می‌شود [۲، ۵]. مطالعات نشان داده است که، استانوزولول (ST) می‌تواند بیان گیرنده‌های غشایی را نامنظم کرده و با فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسان ثانویه، منجر به افزایش انتشار یون کلسیم از شبکه‌ی سارکوپلاسمی<sup>۱۵</sup>، تغییر در نفوذ پذیری میتوکندری، فعال کردن پروتئین‌های آپوپتوز<sup>۱۶</sup> مانند سیتوکروم C<sup>۱۷</sup> و افزایش میزان التهاب در بافت قلب می‌شود، و احتمال سکته‌ی قلبی را بالا می‌برد. بر اساس این مطالعات مشخص شده است که مصرف مکمل‌های استروئیدی سبب افزایش بیان ژن‌های CRP و سیتوکروم C می‌گردد [۵، ۶].

گیاهان دارویی یک رویکرد مفید و مؤثر برای پیشگیری و درمان بیماری‌های قلبی عروقی هستند. علاوه بر این، گیاهان دارویی و

ورزش می‌توانند یک راهبرد سازنده در پیشگیری و درمان در نظر گرفته شود [۷]. گیاه دارویی خارخاسک با نام علمی Tribulus Terrestris (TT)، گیاهی است غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها و ترکیبات آلکالوئیدی که سبب بهبود استرس اکسیداتیو، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش آپوپتوز و التهاب می‌گردد [۸]. علاوه بر این، مطالعات زیادی نشان داده‌اند که خارخاسک می‌تواند سازگار عملکرد آنتی‌اکسیدان‌ها، متابولیسم چربی‌ها، التهاب و CRP را بهبود بخشیده و از سویی، مسیرهای مرگ سلولی و آسیب عصبی را در بیماری‌های قلبی-عروقی متوقف کند [۸، ۹]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵ مشاهده شد که مصرف خارخاسک سبب افزایش توده‌ی عضلانی و سطح غلظت تستسترون در ورزشکاران بوکسور نشده است اما به‌صورت معنی‌داری سبب بهبود تخریب عضلانی و عملکرد بی‌هوازی این ورزشکاران شده است. از طرفی، Pokrywka و همکاران نشان داده‌اند که مصرف عصاره‌ی خارخاسک و انجام تمرینات ورزشی باعث افزایش سطح تستوسترون و بهبود عملکرد ورزشکاران می‌شود [۱۰]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر توسط Delfani و همکاران در سال ۲۰۲۱ مشخص شد که مصرف عصاره‌ی خارخاسک سبب افزایش بیوزن میتوکندری و کاهش تخریب DNA در بافت قلب شده است [۸]. بر اساس موارد فوق، در این مطالعه، دوزهای مختلف عصاره‌ی خارخاسک همراه با تمرین مقاومتی را برای یافتن بهترین اثرات فیزیولوژیکی مورد بررسی قرار دادیم. اثرات مطلوب عصاره‌ی گیاه دارویی خارخاسک در برابر اثرات جبران‌ناپذیر سوءاستفاده از استروئیدهای آنابولیک بر بافت قلب، ممکن است اثرات مخرب مصرف استانوزولول را کاهش داده و به‌عنوان راهی مناسب برای جایگزینی یا کاهش تأثیرات آپوپتوز سلول‌های قلبی توسط استانوزولول پس از تمرین ورزشی در

<sup>10</sup> Arrhythmia<sup>11</sup> Vasodilation<sup>12</sup> Nitric oxide<sup>13</sup> Low-density lipoprotein<sup>14</sup> C-reactive protein<sup>15</sup> Sarcoplasmic reticulum<sup>16</sup> Apoptosis<sup>17</sup> Cytochrome C<sup>1</sup> Androgenic-anabolic steroids<sup>2</sup> Testosterone<sup>3</sup> Nandrolone<sup>4</sup> Stanozolol<sup>5</sup> Aplastic anemia<sup>6</sup> Lipoprotein<sup>7</sup> Thrombosis<sup>8</sup> Hypertension<sup>9</sup> Heart failure

داروی گیاهی خارخاسک به صورت صفاقی در روز در دوزهای مختلف (۵۰ میلی گرم در کیلوگرم، ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) تزریق شد. در نهایت، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و تزریق، موش‌ها با داروهای شیمیایی کتامین و زایلازین بیهوش شدند و بافت قلب برای آزمایش‌های بیشتر جدا شد و پس از انجماد سریع در نیتروژن مایع با رعایت زنجیره‌ی دمایی سرد به آزمایشگاه ژنتیک منتقل و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شد.

**پروتکل تمرین مقاومتی:** تمرینات مقاومتی (RT) با استفاده از نردبان یک متری، با فاصله‌ی ۴ سانتی‌متری بین پله‌ها و شیب ۸۵ درجه، انجام شد. تمرین مقاومتی با ۳۰ درصد وزن بدن در هفته‌ی اول آغاز شد و در هفته‌ی هشتم به ۱۰۰ درصد وزن بدن موش‌های صحرایی رسید. قابل توجه است که موش‌ها از نردبان تمرین چهار بار بدون وزنه بالا رفتند تا در ابتدای تمرین گرم شوند. همچنین، تمرین در هر جلسه شامل چهار ست (ست اول ۵۰٪، ست دوم ۷۵٪، ست سوم ۹۰٪ و ست چهارم ۱۰۰٪ وزنه‌ی آن هفته) و دو تکرار (دو بار صعود پله‌ها) انجام شد. فاصله‌ی بین هر ست ۲ تا ۳ دقیقه و فاصله‌ی بین هر تکرار ۴۰ تا ۶۰ ثانیه بود [۱۱].

**تهیه‌ی عصاره‌ی داروی گیاهی خارخاسک:** برای تهیه‌ی عصاره‌ی داروی گیاهی خارخاسک (TT)، ابتدا ۱۰۰ گرم میوه‌ی خشک شده‌ی این گیاه آسیاب شد، سپس پودر آن در ۸۰ میلی لیتر الکل ۷۰٪ قرار داده شد. این محلول به مدت سه روز در آزمایشگاه نگهداری شد. پس از سه روز، ابتدا محلول را از طریق یک فیلتر کاغذی عبور داده و قسمت مایع را با استفاده از دستگاه خلاء تصفیه و آب‌گیری کرده و در نهایت عصاره‌ی خشک این گیاه به دست آمد. متعاقباً، پس از رقیق کردن عصاره با نرمال سالین، موش‌های صحرایی با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت صفاقی در روز عصاره‌ی خارخاسک دریافت کردند [۱۲].

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** RNA ابتدا بر اساس پروتکل شرکت سازنده (CinnaGen، ایران) از بافت قلب استخراج شد. سپس غلظت و خلوص نمونه mRNA توسط دستگاه

نظر گرفته شود. از این رو، در این مطالعه، مصرف عصاره‌ی خارخاسک و تمرینات مقاومتی را بر روی بافت قلب در موش‌هایی که مکمل استانوزولول را دریافت کرده‌اند ارزیابی شد.

## روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع مطالعات تجربی و بنیادی، با طرح گروهی چند متغیره و از نوع کاربردی است که با تأیید کمیته‌ی اخلاق در پژوهش بر روی حیوانات دانشکده‌ی علوم ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) با کد اخلاق (IR.IAU.KHUISF.REC.1398.264) و با رعایت کلیه‌ی پروتکل‌های کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است.

در این مطالعه‌ی تجربی، ۳۵ موش صحرایی با نژاد-Sprague Dawley در محدوده‌ی وزن ۲۰۰-۱۵۰ گرم و میانگین سنی ۸ هفته خریداری و به آزمایشگاه منتقل شد. موش‌های صحرایی در لانه‌ی حیوانات در شرایط استاندارد دمای ۲۴-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت  $5 \pm 65$  درصد با چرخه‌ی ۱۲ ساعت نور/۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. همچنین، حیوانات با رژیم غذایی استاندارد تغذیه شدند. پس از یک هفته سازگاری با محیط لانه‌ی حیوانات، موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به هفت گروه تقسیم شدند (در هر گروه ۵ سر موش)، شامل ۱- گروه کنترل، ۲- موش‌های تحت تیمار با استانوزولول (ST)، ۳- موش‌های تحت تیمار به‌طور هم‌زمان با داروی استانوزولول و داروی گیاهی خارخاسک با غلظت ۱۰۰ mg/kg (ST+TT100)، ۴- موش‌های تحت تیمار به‌طور هم‌زمان با داروی استانوزولول و داروی گیاهی خارخاسک با غلظت ۵۰ mg/kg (ST+TT50)، ۵- موش‌های با تمرین مقاومتی و تحت تیمار استانوزولول (RT+ST)، ۶- موش‌های با تمرین مقاومتی و تحت تیمار به‌طور هم‌زمان با داروی استانوزولول و داروی گیاهی خارخاسک با غلظت ۱۰۰ mg/kg (RT+ST+TT100) و ۷- موش‌های صحرایی با تمرین مقاومتی و تحت تیمار به‌طور هم‌زمان با داروی استانوزولول و داروی گیاهی خارخاسک با غلظت ۵۰ mg/kg (RT+ST+TT50). تزریق داروی شیمیایی استانوزولول به صورت صفاقی و در روز انجام شد. علاوه بر این،

روی چرخه‌ی حرارتی PCR کاربردی ارزیابی شد. ارزیابی بیان ژن بر اساس روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  انجام شد و سطح بیان ژن‌های مرجع در این مطالعه به وسیله ژن بتا-۲-میکروگلوبولین (B2M) در نظر گرفته شد. علاوه بر این، آغازگرها از شرکت ماکروژن (کره جنوبی) خریداری شده‌اند توالی ژن‌ها در جدول ۱ آمده است.

اسپکتروفوتومتر نانودراپ<sup>۱</sup> (USA, Thermo Scientific) در جذب ۲۸۰/۲۶۰ ارزیابی شد. علاوه بر این، سنتز cDNA طبق پروتکل سازنده انجام شد و سپس cDNA سنتز شده برای انجام واکنش رونویسی معکوس استفاده شد. بیان نسبی mRNA با روش کمی q-RT PCR با CYBR Green (TaKaRa، ژاپن) بر

جدول ۱- توالی پرایمرها

اندازه (bp)	ژن	ژن
۲۴۴	B2m Reverse: 5'-ATATACATCGGTCTCGGTGG-3'	B2m
۹۰	CRP Reverse: 5'- GACTCTGCTTCCAGGGACAC-3'	CRP
۱۱۵	Cytochrome-c Reverse: 5'-CATTGTTAGCCATTCATGATCT-3'	Cytochrome-c

سیتوکروم-C بر اساس روش پراش اشعه‌ی ایکس با کد شناسایی 6ECJ و قدرت تفکیک  $2.7\text{\AA}$  از پایگاه داده بانک پروتئینی به آدرس <https://www.rcsb.org/> با فرمت PDB به دست آمد. اتصال مولکولی ترکیبات در جایگاه فعال پروتئین سیتوکروم-C پس از کمینه‌سازی ساختار و انرژی در نرم‌افزار UCSF chimera با استفاده از روش داکینگ مولکولی در نرم افزار PyRx مورد بررسی قرار گرفت. امتیازدهی داکینگ مولکولی بر اساس میل اتصال کمتر از  $5\text{kdal/mol}$ - و انحراف جذر مربع میانگین<sup>۲</sup> کمتر از ۲ انجام پذیرفت. ابعاد فضای جستجوی تعریف شده برای این پروتئین: X: 39.1625, Y: 41.6318, Z: 35.8480 و با تعداد دفعات واکنش ۱۰ بوده است. روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism جهت آمار توصیفی و استنباطی محاسبه شد است. برای همگن‌سازی توزیع، آزمون Shapiro-Wilk انجام شد. علاوه بر این، داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با آزمون تعقیبی Tukey محاسبه شد. در سطح آمار توصیفی نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) نشان داده شده است. سطح اهمیت آماری در همه‌ی تجزیه و تحلیل‌ها  $P < 0.05$  تعیین شد.

داده‌کای بیوانفورماتیکی: در این مطالعه از الگوریتم‌های مختلف بیوانفورماتیکی و شبکه‌ی میانکشی‌های پروتئین-پروتئین برای شناسایی مهم‌ترین ژن‌های دخیل در پاتوژنز بافت قلب استفاده شده است. بدین منظور از پایگاه داده DisGeNET برای به‌دست آوردن لیست ژن‌های مرتبط با ایسکمی قلب بهره گرفتیم. شبکه‌ی میانکشی‌های پروتئین-پروتئین در پایگاه داده‌ی STRING 11.0 رسم شد و آنالیز شبکه بر اساس پارامترهای درجه و مرکزیت انجام گرفت. مسیرهای مولکولی و کلیدی در ارتباط با ژن‌ها بر اساس الگوریتم داده‌کای مشخص شدند. از میان 25 پروتئین کلیدی جمع‌آوری شده بر اساس آنالیز داده‌های بیوانفورماتیکی، دو پروتئین CRP و Cytochrome-c مورد بررسی آزمایشگاهی قرار گرفت.

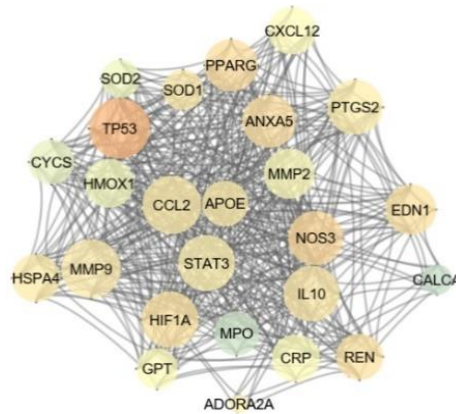
داکینگ مولکولی: به‌منظور پیش‌بینی تأثیر ترکیب شیمیایی stanozolol و Flavonol 3-O-D-glucoside بر روی پروتئین سیتوکروم-C از روش داکینگ مولکولی استفاده شده است. در ابتدا ترکیبات مؤثره گیاه خارخاسک را بر اساس مطالعات گذشته شناسایی کردیم. در مرحله‌ی بعد، ساختار سه بعدی ماده‌ی مؤثره ی Flavonol 3-O-D-glucoside و stanozolol را از پایگاه داده ی ترکیبات شیمیایی PubChem با فرمت داده‌ی فضایی SDF بارگیری شدند. ساختار کریستالوگرافی مناسب برای پروتئین

<sup>1</sup> Nanodrop spectrophotometer<sup>2</sup> Root-mean-square deviation

## یافته‌ها

به‌عنوان ژن‌های کلیدی دخیل در پاتوژنز بافت قلب شناسایی شد. خوشه‌بندی این ژن‌ها بر اساس ارتباطات مولکولی بین پروتئین‌ها انجام گرفته است و درسه گروه تقسیم‌بندی شده‌اند.

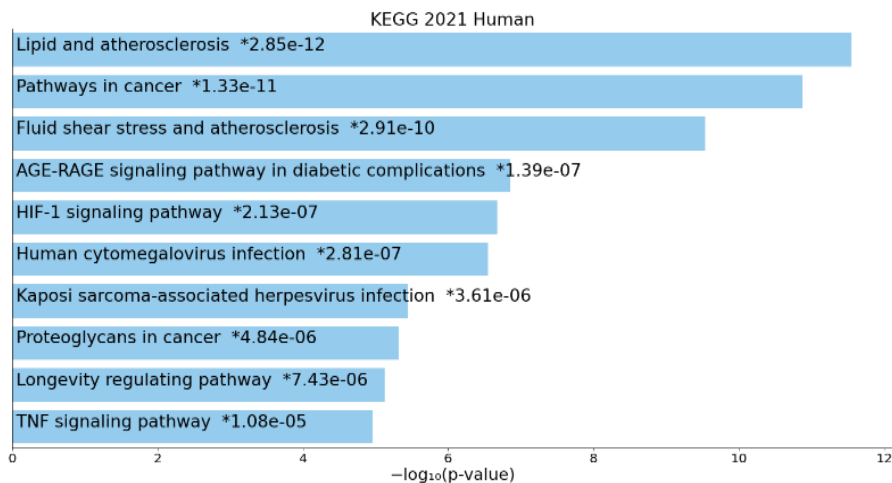
براساس آنالیز داده‌های بیوانفورماتیکی، همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، از میان 103 ژن دخیل در ایسکمی قلب در پایگاه داده DisGeNET، 25 ژن با بیشترین درجه و مرکزیت



شکل ۱-ژن‌های کلیدی دخیل در ایسکمی بافت قلب

بافت قلب نشان می‌دهد که این ژن‌ها در فرآیند تصلب شرائین به‌واسطه اختلالات لیپیدی و همچنین مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها (آپوپتوز) دخیل هستند (شکل ۲).

بر اساس داده‌کاوای متون دو ژن Cytochrome-c و CRP برای ادامه بررسی‌ها انتخاب شدند. داده‌کاوای این ژن‌ها به‌منظور مشخص کردن مسیرهای مولکولی مهم درگیر در فرآیند پاتوژنز

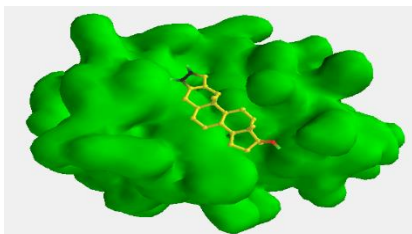


شکل ۲- داده‌کاوای ژن‌های کلیدی بر اساس پایگاه داده KEGG

stanozolol و glucoside بر روی پروتئین سیتوکروم-C از نوع اتصالات پایدار و قابل قبول است. انرژی اتصال این پیوندها به

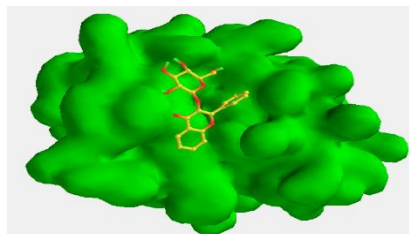
نتایج به‌دست آمده از داکینگ مولکولی که در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است که اتصال مولکولی ترکیبات Flavonol 3-O-D-

پروتئین و تأثیر بر عملکرد آن رقابت وجود دارد. با توجه به محاسبات داکینگ مولکولی، قدرت اتصال و میل ترکیبی بین Flavonol 3-O-D-glucoside و پروتئین سیتوکروم-C بالاتر از stanozolol است.



شکل ۳- قدرت اتصال استانوزولول به پروتئین سیتوکروم-C

ترتیب 6.5- و 6.1- کیلوکالری بر مول محاسبه شده است. از طرفی نتایج داکینگ مولکولی جایگاه اتصال یکسانی برای این ترکیبات را شناسایی کرده است که می‌توان چنین استنباط کرد که بین Flavonol 3-O-D-glucoside و stanozolol در اتصال به



شکل ۴- قدرت اتصال فلاونوئید به پروتئین سیتوکروم-C

است. همچنین میل اتصال لیگاندها بر روی پروتئین سیتوکروم-C نشان داده شده است.

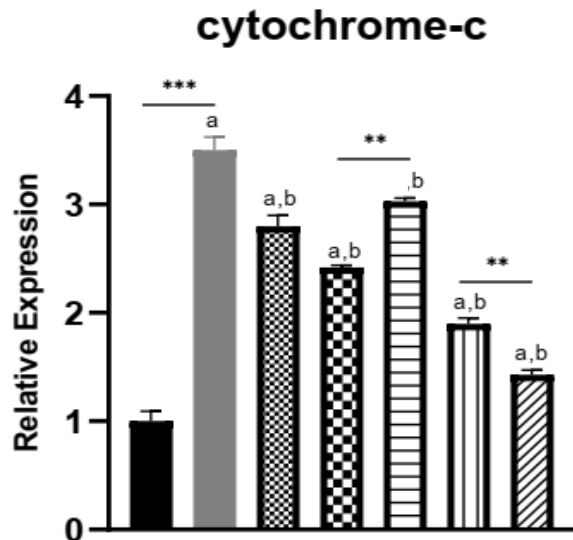
همچنین در جدول ۲ نتیجه‌ی بررسی داکینگ مولکولی شامل نام ترکیبات (لیگاندها) و شناسه PubChem آنها مشخص شده

جدول ۲- آنالیز داکینگ مولکولی ماده‌ی مؤثره‌ی خارخاسک و استانوزولول

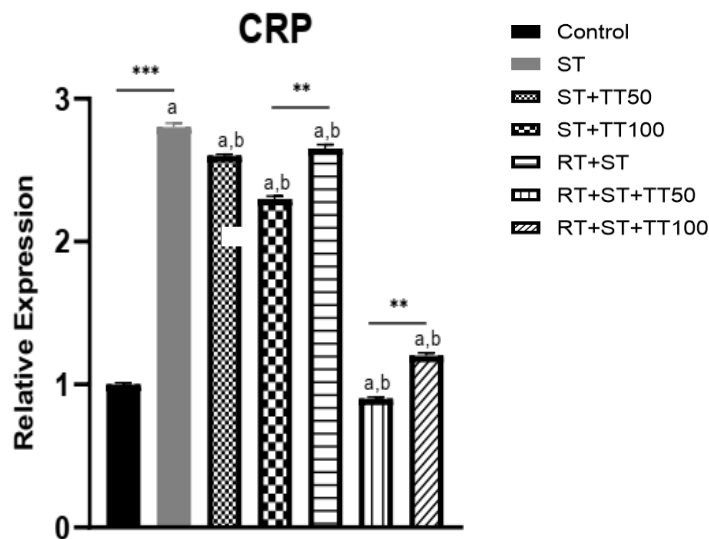
میل اتصال لیگاند بر روی پروتئین سیتوکروم C- (kcal/mol)	شناسه PubChem	ماده مؤثره	نام ترکیب
-6.5	11953828	Flavonol 3-O-D-glucoside	خارخاسک
-6.1	25249	stanozolol	استروئیدهای آنابولیک-آندروژنیک

داروی استانوزولول است ( $P=0.2$ ). همچنین، کاهش قابل توجه بیان ژن‌های CRP و Cytochrome-c در گروه‌های تمرین مقاومتی و تحت تیمار با داروی استانوزولول و داروی گیاهی خارخاسک با غلظت ۱۰۰ mg/kg و ۵۰ mg/kg مشاهده شد ( $P<0.05$ ). علاوه بر این، در این مطالعه مشاهده شده که در گروه تمرین مقاومتی و تحت تیمار با داروی استانوزولول و داروی گیاهی خارخاسک با غلظت ۱۰۰ mg/kg نسبت به سایر گروه تأثیر فزاینده‌ای بر روی کاهش بیان ژن‌های CRP و Cytochrome-c داشته است ( $P<0.05$ ) و گیاه دارویی خارخاسک با غلظت ۱۰۰ mg/kg تأثیر بیشتری بر روی عملکرد ورزشکاران مقاومتی دارد.

با توجه به نمودار ۱ و ۲ نتایج به‌دست آمده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه مشخص شده است که میزان بیان ژن CRP و Cytochrome-c در گروه تحت تیمار داروی استانوزولول نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ( $P<0.05$ ). از سویی، گروهی که تحت تیمار استانوزولول و داروی گیاهی خارخاسک با غلظت ۱۰۰ mg/kg و ۵۰ mg/kg شده‌اند میزان بیان بیان ژن CRP و Cytochrome-c نسبت به گروه تحت تیمار داروی استانوزولول کاهش یافته است. از نکات برجسته‌ی این مطالعه عدم تأثیر تمرینات مقاومتی بر روی بیان میزان بیان ژن CRP و Cytochrome-c در گروه تمرین مقاومتی و تحت تیمار استانوزولول نسبت به گروه تحت تیمار



نمودار ۱- میزان بیان ژن Cytochrome-c در بافت قلب موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف  
حروف مشابه نشان دهنده‌ی معنی‌داری است



نمودار ۲- میزان بیان ژن CRP در بافت قلب موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف  
حروف مشابه نشان دهنده‌ی معنی‌داری است

طریق فعال‌سازی عوامل رونویسی تنظیم اکسیداسیون اکسیداسیون، باعث کاهش فاکتورهای مانند سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در بافت قلب می‌شود [۱۳]. همچنین، انجام تمرینات ورزشی با بهبود متابولیسم اسیدهای چرب، لاکتات، گلوکز و کاهش گونه‌های اکسیژن فعال، منجر به افزایش سازگار رگ‌زایی و افزایش فاکتور رشد

### بحث

در این مطالعه مشاهده شد که انجام تمرینات مقاومتی همراه با مصرف عصاره‌ی داروی گیاهی خارخاسک سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های CRP و Cytochrome-c می‌گردد. ورزش طولانی مدت باعث تحریک و تنظیم سنتز آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در قلب می‌شود. با تحریک اندک استرس اکسیداتیو از

در بافت قلب موش‌ها را کاهش می‌دهد [۲۱]. با این حال، به نظر می‌رسد این اثرات ضد آپوپتوتیک عصاره‌ی خارخاسک مربوط به دوز عصاره‌ی خارخاسک و سطوح اولیه استرس اکسیداتیو در بافت قلب است.

نتایج نشان داد که تمرینات مقاومتی همراه با مصرف عصاره‌ی خارخاسک دارای اثرات فزاینده بر کاهش بیان ژن CRP و Cytochrome-c در بافت قلب موش‌های صحرایی در معرض استانوزولول داشته است.

مطالعات نشان داده است که ورزش سازگار آنتی‌اکسیدان‌ها را تحریک می‌کند، سوخت و ساز بدن را بهبود می‌بخشد و رگ‌زایی قلب را افزایش می‌دهد [۲۲، ۱۴]. در مطالعه‌ای توسط Reshma و همکاران نشان داده شد که مصرف عصاره‌ی خارخاسک بر روی بیان ژن‌های آپوپتوزی مانند Bax, Bad, Bcl-2 نقش کلیدی داشته و از سویی عصاره‌ی خارخاسک در موش‌هایی که دچار سکته‌ی قلبی شده‌اند از طریق مسیرهای کلیدی مانند mitogen-activated protein kinases like p38 و Jnk سبب کاهش میزان آپوپتوز و بیان ژن‌های Bax و Bad شده است. بر این اساس، مصرف عصاره‌ی خارخاسک از طریق سازگار آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش میزان سطوح اکسیداتیو، تعدیل نشانگرهای زیستی قلب و عروقی می‌گردد [۲۱].

مطالعات محدودی در مورد اثرات متقابل تمرینات مقاومتی همراه با مصرف عصاره‌ی خارخاسک بر آپوپتوز بافت قلب ناشی از مصرف ترکیبات استروئیدی وجود دارد. با این حال، مطالعات نشان داده‌اند که ورزش و عصاره‌ی خارخاسک بر ترکیب بدن، عملکرد قلب و قدرت ماهیچه‌ها تأثیر مثبت می‌گذارد [۲۳]. همچنین، مصرف این گیاه دارویی با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در روز به دلیل خواص نیمه استروژنیک آن ممکن است با افزایش فاکتورهای رشد عضلانی و کاهش استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی از آسیب عضلانی ورزشکاران جلوگیری کند [۲۴]. بررسی بیان ژن‌ها و مولکول‌های دخیل در مسیرهای التهاب و متابولیسم و از سویی به‌کارگیری تمرینات ورزشی مقاومتی با مدت، شدت و تکرارهای مختلف. همچنین، سنش میزان رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو و رابطه آنها با مسیر آپوپتوز بافت قلب از دیگر محدودیت‌های این مطالعه است.

اندوتلیال عروقی (VEGF) در قلب می‌گردد [۱۴]. از سوی دیگر، اگرچه ورزش عملکرد قلب را بهبود می‌بخشد اما استفاده از ترکیبات آنابولیکی همراه با تمرینات ورزش یکی از شایع‌ترین علل نارسایی قلبی در ورزشکاران است [۱۵]. بنابراین، به نظر می‌رسد که نوع و شدت ورزش و میزان مصرف ترکیبات آنابولیکی می‌تواند تأثیرات متفاوتی بر آپوپتوز و سازکارهای استرس اکسیداتیو داشته باشد [۱۶]. علاوه بر این، مصرف ۲ میلی‌گرم/کیلوگرم در روز استانوزولول، فلوکسی استرون، متاندرستونولون ممکن است باعث نقص در عملکرد آنزیم‌های زنجیره انتقال الکترون در کبد موش‌های صحرایی شود [۱۷]. همچنین، ورزش و مصرف ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در هفته ناندرون دکانونات باعث افزایش کاسپاز ۳ و محرک‌های آپوپتوز در سلول‌های اسپرما توژنز موش‌ها شد [۱۸].

نتایج نشان داد که مصرف عصاره‌ی خارخاسک بیان ژن CRP و Cytochrome-c را در بافت قلب موش‌های صحرایی در معرض stanazolol کاهش می‌دهد. علاوه بر این، داده‌ها نشان داده است که این اثرات وابسته به دوز هستند به طوری که دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خارخاسک نسبت به دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خارخاسک تأثیر مطلوب‌تری در کاهش بیان ژن‌ها و بهبود التهاب و آپوپتوز داشته است. علاوه بر این، در مطالعه‌ای نشان داده شده است که مصرف عصاره‌ی خارخاسک سطح غلظت لاکتات دهیدروژناز، کراتینین کیناز، ترانس آمیناز گلوتامیک اگزالواستیک، ترانس آمیناز گلوتامیک پیروویک و آنزیم‌های وابسته به سوخت و ساز بدن را تغییر داده است [۱۹]. عصاره‌ی خارخاسک، از طریق برخی از مسیرهای پیام‌رسانی مانند گیرنده‌های بتا آدرنرژیک، ممکن است مولکول‌های التهابی را سرکوب کرده و فسفوریلاسیون گیرنده‌های التهابی را کاهش دهد. این امر منجر به افزایش فعالیت ضد آپوپتوز می‌شود [۲۰]. در این راستا، شواهد نشان داده است که عصاره‌ی خارخاسک با غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش بیان ژن‌های Bax (B-cell lymphoma 2 Associated X) و Bad (B-cell lymphoma 2 Associated Agonist Of Cell Death) و Kinase (MAPK و Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) Kinase) و افزایش Mitogen-Activated Protein Kinase) شده و در نهایت آپوپتوز



اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز، عدم اندازه‌گیری این شاخص‌ها یکی از محدودیت‌های مطالعه‌ی حاضر به‌نظر می‌رسید. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که این عوامل در مطالعات آینده اندازه‌گیری شود.

### سپاسگزاری

از همکاران محترم در واحد مرودشت کمال تشکر را داریم.

با توجه به نتایج فوق می‌توان پیشنهاد شود که مصرف خارخاسک همراه با تمرینات مقاومتی سبب افزایش عملکرد ورزشکاران و کاهش آسیب‌های عضلانی می‌گردد. از سویی، این گیاه دارویی می‌تواند جایگزین مناسبی به‌جای داروها و مکمل‌های استروئیدی شود و یا در کنار مصرف این مکمل‌ها، استفاده از عصاره‌ی خارخاسک سبب کاهش عوارض جانبی در ورزشکاران می‌گردد. با توجه به تأثیر استانوزولول بر اختلال متابولیسم لیپیدها و تأثیر مشخصات چربی بر شروع استرس

### مآخذ

- Perry JC, Schuetz TM, Memon MD, Faiz S, Cancarevic I. Anabolic steroids and cardiovascular outcomes: the controversy. *Cureus* 2020; 12(7).
- Angelini G, Pollice P, Lepera M, Favale S, Caiati C. Irreversible Dilated Cardiomyopathy After Abuse of Anabolic Androgenic Steroids-A Case Report and Literature Review. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* 2019; 21(4):16106-12.
- Vale FBC, Boroni JD, Geber G, Antunes EMG, Bretas T, Lopes GP, et al. Effect of Tribulus Terrestris in the Treatment of Female Sexual Dysfunction and Clitoral Vascularization. Results of a Randomized Study Comparing Two Different Dosage Regimes. *Journal of Sex & Marital Therapy* 2021; 1-11.
- Bu D, Luo H, Huo P, Wang Z, Zhang S, He Z, et al. KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. *Nucleic Acids Research* 2021;
- PL R, RC V, KG R, NR H. Pretreatment of Tribulus terrestris L. causes anti-ischemic cardioprotection through MAPK mediated anti-apoptotic pathway in rat. *Biomed Pharmacother* 2019;111:1342-1352.
- Garner O, Iardino A, Ramirez A, Yakoby M. Cardiomyopathy induced by anabolic-androgenic steroid abuse. *Case Reports* 2018; 2018:bcr-2017-223891.
- Semerdjieva IB, Zheljzkov VD. Chemical constituents, biological properties, and uses of Tribulus terrestris: A Review. *Natural Product Communications* 2019; 14(8):1934578X19868394.
- Delfani N, Peeri M, Matin Homae H. Effect of Aerobic Exercise and Hydroalcoholic Extract of Tribulus Terrestris on Mitochondrial Oxidative Stress Markers in Heart Tissue of Rats Poisoned With Hydrogen Peroxide. *Complementary Medicine Journal* 2021; 11(1):30-43.
- Kim J-Y, Shim SH. Medicinal herbs effective against atherosclerosis: classification according to mechanism of action. *Biomolecules & therapeutics* 2019; 27(3):254.
- Ma Y, Guo Z, Wang X. Tribulus terrestris extracts alleviate muscle damage and promote anaerobic performance of trained male boxers and its mechanisms: Roles of androgen, IGF-1, and IGF binding protein-3. *Journal of sport and health science* 2017; 6(4):474-81.
- Dolati S, Rostami R, Hosseini SA, Hariri Far A, Zar A. Lipid-lowering Effects of Endurance Training and Cinnamon Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Nutrition, Fasting and Health* 2021.
- Shamsi B, Abedi B, Hosseini SA. Effect of Resistance Training and Tribulus Terrestris Consumption on Avoidance and Working Memory in Rats Exposed to Stanazolol. *Avicenna Journal of Neuro Psycho Physiology* 2021; 8(2):84-9.
- Rahbarghazi A, Siahkoughian M, Rahbarghazi R, Ahmadi M, Bolboli L, Keyhanmanesh R, et al. Role of melatonin in the angiogenesis potential; highlights on the cardiovascular disease. *Journal of Inflammation* 2021; 18(1):1-10.
- Hassan AF, Kamal MM. Effect of exercise training and anabolic androgenic steroids on hemodynamics, glycogen content, angiogenesis and apoptosis of cardiac muscle in adult male rats. *International journal of health sciences* 2013; 7(1):47.
- Falqueto H, Júnior JL, Silvério MN, Farias JC, Schoenfeld BJ, Manfredi LH. Can conditions of skeletal muscle loss be improved by combining exercise with anabolic-androgenic steroids? A systematic review and meta-analysis of testosterone-based interventions. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2021; 1-18.

16. McCullough D, Webb R, Enright KJ, Lane KE, McVeigh J, Stewart CE, et al. How the love of muscle can break a heart: Impact of anabolic androgenic steroids on skeletal muscle hypertrophy, metabolic and cardiovascular health. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2021; 22(2):389-405.
17. Molano F, Saborido A, Delgado J, Morán M, Megías A. Rat liver lysosomal and mitochondrial activities are modified by anabolic-androgenic steroids. *Medicine and science in sports and exercise* 1999; 31(2):243-50.
18. Shokri S, Aitken RJ, Abdolvahabi M, Abolhasani F, Ghasemi FM, Kashani I, et al. Exercise and supraphysiological dose of nandrolone deconoate increase apoptosis in spermatogenic cells. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2010; 106(4):324-30.
19. Tuncer MA, Yaymaci B, Sati L, Cayli S, Acar G, Altug T, et al. Influence of Tribulus terrestris extract on lipid profile and endothelial structure in developing atherosclerotic lesions in the aorta of rabbits on a high-cholesterol diet. *Acta histochemica* 2009; 111500-488(6).
20. Baburao B, Rajyalakshmi G, Venkatesham A, Kiran G, Shyamsunder A, Gangarao B. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of methanolic extract of Tribulus terrestris Linn plant. *Int J Chem Sci* 2009; 7(3):1867-72.
21. Reshma P, Binu P, Anupama N, Vineetha R, Abhilash S, Nair RH, et al. Pretreatment of Tribulus terrestris L. causes anti-ischemic cardioprotection through MAPK mediated anti-apoptotic pathway in rat. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019; 111 :1342-52.
22. Dos Santos GB, Rodrigues MJM, Gonçalves EM, Marcondes MCG, Areas MA. Melatonin reduces oxidative stress and cardiovascular changes induced by stanozolol in rats exposed to swimming exercise. *The Eurasian journal of medicine* 2013; 45(3):155.
23. Wang S-S, Ji Y-S, Li H, Yang S-J. Mechanisms of gross saponins of Tribulus terrestris via activating PKCepsilon against myocardial apoptosis induced by oxidative stress. *Yao Xue Xue Bao* 2009; 44(2):134-9.
24. Rogerson S, Riches CJ, Jennings C, Weatherby RP, Meir RA, Marshall-Gradisnik SM. The effect of five weeks of Tribulus terrestris supplementation on muscle strength and body composition during pre-season training in elite rugby league players. *The Journal of Strength & Conditioning Research* 2007; 21(2):348-53.

## The Effect of Eight Weeks of Resistance Training with Tribulus Terrestris Extract on the Apoptosis Mechanism in the Heart Tissue of Rats Exposed To Stanozolol

Mohammad Derakhshandeh<sup>1</sup>, Farzaneh Taghian<sup>1\*</sup>, Khosro Jalali Dehkordi<sup>1</sup>, Seyed Ali Hosseini<sup>2</sup>

1. Department of Sports Physiology, School of Sports Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2. Department of Sport Physiology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

### ABSTRACT

**Background:** Artificial intelligence analysis based on the gene list obtained from the DisGeNET database identified the important genes involved in the heart damage process. Data enrichment highlighted the apoptosis signaling pathway as a vital pathway in cardiovascular risk. Hence, we estimated the binding affinity of chemical and plant bioactive molecules for cytochrome-c protein. Here, we performed to evaluate the effect of eight weeks of resistance training (RT) with Tribulus Terrestris (TT) consumption on the mechanism of apoptosis in the heart tissue of rats exposed to stanozolol.

**Methods:** Thirty-five male rats were divided into seven groups: (1) Control, (2) Stanozolol (ST), (3) ST + 100 mg / kg TT, (4) ST + 50 mg / kg TT, (5) ST + RT (SRT), (6) S + RT + 100 mg / kg T (SRTT100), and (7) ST + RT + 50 mg / kg T (SRTT50). Differential gene expression was measured by q-RT-PCR. In bioinformatics analysis, the apoptosis signaling pathway was defined as a critical process in heart damage. In addition, adverse effects of Tribulus Terrestris and stanozolol on heart tissue were detected through the apoptotic pathway by molecular docking.

**Result:** Resistance training along with 100 mg/kg reduced CRP and cytochrome-c. Moreover, 100 mg/kg TT as a more favorable effect than 50 mg/kg TT.

**Conclusion:** we showed the beneficial effects of Tribulus Terrestris, the plant's bioactive compound that can reduce cardiovascular risks by impairing the formation of apoptosome assemblages and inflammation.

**Keywords:** Exercise training, Tribulus Terrestris, Apoptosis, Heart tissue, Stanozolol

\* University Blvd, Arqavanieh, Jey Street, Faculty of Sports Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. Postcode: 81551-39998, Tele: +989133080241, Fax: +98031-353-54135, Email: f\_taghian@yahoo.com

