

The effect of resistance training with the consumption of different doses of *Tribulus Terrestris* on the expression of TNF- α and IL-10 genes in the heart tissue of laboratory rats exposed to anabolic steroid (stanazol)

Mojtaba Shojaeyan¹, Bahram Abedi^{2*}, Sayed Ali Hosseini³

1. Department of Physical Education Mahallat Branch, Islamic Azad University, Mahallat, Iran
2. Department of Physical Education Tehran north Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Department of Physical Education Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

* Corresponding author e-mail: abedi@iaumahallat.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Nowadays, the use of energizing substances has become a complex problem in sports, on the other hand, resistance training and tribulus terrestris have a great effect on controlling inflammatory indicators, but the interaction of the effect of resistance training with tribulus terrestris and Stanazol on inflammatory capacities have been investigated less than the others. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of eight weeks of resistance training with the consumption of Tribulus terrestris extract on TNF- α , IL-10 and the TNF- α /IL-10 ratio of heart tissue of male rats exposed to Stanazol.

Materials and Methods: In this experimental study, 48 large male rats with a weight range of 150 to 200 grams and an average age of 8 weeks were selected and randomly divided into 8 groups of 6 series including 1) control (C), 2) sham (Sh), 3) use of stanazol (S), 4) use of stanazol with 100 mg/kg of Tribulus Terrestris (ST100), 5) use of Stanazol with 50 mg/kg of Tribulus Terrestris (ST50), 6) use of Stanazol with resistance training (SRT), 7) use of Stanazol with resistance training and 100 mg/kg of Tribulus Terrestris (SRTT100) and 8) use of Stanazol with training Resistance and 50 mg/kg of Tribulus Terrestris (SRTT50). For eight weeks, the 3-8 groups received 5 mg/kg daily of stanazole peritoneally; Groups 6-8 performed resistance training three sessions per week and groups 4, 5, 7 and 8 received certain doses of Tribulus Terrestris daily. The amount of TNF- α , IL-10 and the ratio of TNF- α /IL-10 were measured by Real Time PCR method in the hearts of rats. To analyze the findings, one-way analysis of variance was used with Tukey's post hoc test ($p < 0.05$).

Results: Consumption of S had a significant effect on the increase of TNF- α gene expression and the ratio of TNF- α /IL-10 and the decrease of IL-10 in the heart tissue of rats ($P < 0.05$). However, SRT caused a significant increase of IL-10 and the reduction of TNF- α and the ratio of TNF- α /IL-10 ($P < 0.05$). Also, SRT100 had a significant effect on increasing IL-10 and decreasing TNF- α /IL-10 ratio ($P < 0.05$). SRTT100 and SRTT50 had a significant effect on the reduction of TNF- α and the ratio of TNF- α /IL-10 and the increase of IL-10 ($P < 0.05$). On the other hand, the expression level of TNF- α gene in ST100 and ST50 groups increased significantly ($P < 0.05$).

Conclusion: It seems that resistance training and consumption of tribulus terrestris extract with a higher dose separately have useful effects on the improvement of the gene expression of inflammatory indicators of heart tissue. However, in order to reach a better conclusion in connection with performing resistance exercises along with the consumption of Tribulus Terrestris, further research is needed on the expression of the gene of inflammatory indicators in the heart tissue caused by Stanazol poisoning.

Keywords: Resistance training, Heart, Stanazolol, Tribulus terrestris, TNF- α , IL-10

Received: Dec 12, 2022

Revised: Feb 06, 2023

Accepted: Apr 11, 2023

How to cite this article: Shojaeyan M, Abedi B, Hosseini A. The effect of resistance training with the consumption of different doses of tribulus terrestris on the expression of TNF- α and IL-10 genes in the heart tissue of laboratory rats exposed to anabolic steroid. Daneshvar Medicine 2023; 31(1):58-66.
doi: 10.22070/DANESHMED.2023.17128.1302

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

اثر تمرین مقاومتی همراه با مصرف دوزهای مختلف عصاره خارخاسک بر بیان ژن های $TNF-\alpha$ و IL-10 بافت قلب موش های بزرگ آزمایشگاهی در معرض استروئید آنابولیک (استانازول)

مجتبی شجاعیان^۱، بهرام عابدی^{۲*}، سید علی حسینی^۳

۱. گروه تربیت بدنی، واحد محلات، دانشگاه آزاد اسلامی، محلات، ایران
۲. گروه تربیت بدنی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. گروه تربیت بدنی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

Email: abedi@iaumahallat.ac.ir

*نویسنده مسئول: بهرام عابدی

چکیده

مقدمه و هدف: امروزه بهره‌گیری از مواد نیروزا به معضل پیچیده‌ای در ورزش تبدیل شده است، از طرفی تمرین مقاومتی و گیاه خارخاسک تاثیرگذاری زیادی در کنترل شاخص‌های التهابی دارد اما تعامل تاثیر تمرین مقاومتی همراه با گیاه خارخاسک و استانازول بر ظرفیت‌های التهابی کمتر بررسی شده است. از این رو هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر هشت هفته تمرین مقاومتی همراه با مصرف عصاره خارخاسک بر بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ ، IL-10، و نسبت $TNF-\alpha/IL-10$ بافت قلب موش های بزرگ آزمایشگاهی نر در معرض استانازول بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۴۸ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر با محدوده وزن ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم و میانگین سنی ۸ هفته، انتخاب و به طور تصادفی در ۸ گروه ۶ سری شامل ۱- کنترل (C)، ۲- شم (Sh)، ۳- مصرف استانازول (S)، ۴- مصرف استانازول همراه با ۱۰۰ mg/kg خارخاسک (ST100)، ۵- مصرف استانازول همراه با ۵۰ mg/kg خارخاسک (ST50)، ۶- مصرف استانازول همراه با تمرین مقاومتی (SRT)، ۷- مصرف استانازول همراه با تمرین مقاومتی و ۱۰۰ mg/kg خارخاسک (SRTT100) و ۸- مصرف استانازول همراه با تمرین مقاومتی و ۵۰ mg/kg خارخاسک (SRTT50) تقسیم شدند. در مدت هشت هفته گروه های ۳-۸ روزانه ۵ mg/kg استانازول به صورت صفاقی دریافت نمودند؛ گروه های ۶-۸ سه جلسه در هفته با شدت ۳۰ تا ۱۰۰ درصد وزن بدن خود، تمرینات مقاومتی را انجام دادند و گروه های ۴، ۵، ۷ و ۸ روزانه دوزهای معین خارخاسک را به صورت صفاقی دریافت نمودند. میزان $TNF-\alpha$ ، IL-10، و نسبت $TNF-\alpha/IL-10$ به روش Real Time PCR در بافت قلب موش های بزرگ آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد. جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه همراه با آزمون تعقیبی توکی استفاده شد ($P < 0.05$).

نتایج: مصرف S اثر معناداری بر افزایش بیان ژن $TNF-\alpha$ و نسبت $TNF-\alpha/IL-10$ و کاهش IL-10 در بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی داشت ($P < 0.05$). با این وجود SRT باعث افزایش معنادار IL-10 و کاهش $TNF-\alpha$ و نسبت $TNF-\alpha/IL-10$ شد ($P < 0.05$). همچنین SRT100 تاثیر معناداری بر افزایش IL-10 و کاهش نسبت $TNF-\alpha/IL-10$ داشت ($P < 0.05$). SRTT50 و SRTT100 اثر معناداری بر کاهش $TNF-\alpha$ و نسبت $TNF-\alpha/IL-10$ و افزایش IL-10 داشت ($P < 0.05$). از طرفی سطح بیان ژن $TNF-\alpha$ در گروه‌های ST100 و ST50 به طور معناداری افزایش یافت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرین مقاومتی و مصرف عصاره خارخاسک با دوز بالاتر به طور مجزا اثرات موثری بر بهبود بیان ژن شاخص‌های التهابی بافت قلب دارند. با این وجود جهت نتیجه‌گیری بهتر در ارتباط با انجام تمرینات مقاومتی همراه با مصرف عصاره خارخاسک بر بیان ژن شاخص‌های التهابی در بافت قلب ناشی از مسمومیت با استانازول، نیازمند تحقیقات بیشتری است.

واژه‌های کلیدی: تمرین مقاومتی، قلب، استانازول، خارخاسک، $TNF-\alpha$ ، IL-10

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۰۹/۲۱

اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۱۱/۱۷

داده شود: ۱۴۰۲/۰۱/۲۲

مقدمه

استروئیدهای آنابولیک-اندروژنیک (AAS)، مشتقات مصنوعی مربوط به هورمون جنسی مردانه (تستوسترون) هستند که نقش مهمی در رشد بدن ایفا می‌کنند این ترکیبات در برخی کاربردهای بالینی از جمله آتروفی عضلانی، عقب ماندگی رشدی، آنمی، هیپوگنادیسم و کاهش مواد معدنی استخوان استفاده می‌شوند (۱). با توجه به خواص آنابولیک AAS، یکی از رایج ترین داروهای است که در میان ورزشکاران خواستار و جایگاه ویژه ای دارد. ترکیب AAS با تمرین مقاومتی به بهتر شدن عملکرد جسمانی، توده بدون چربی، اندازه عضله، قدرت، متابولیسم پروتئین، متابولیسم استخوان و سنتز کلاژن منجر می‌شود (۲). اگر چه به نظر می‌رسد در برخی شرایط پاتولوژیایی استفاده از AAS می‌تواند به بهتر شدن وضعیت فرد کمک کند، با این حال، اغلب ورزشکاران رقابتی با هدف افزایش توده عضلانی و بهتر شدن عملکرد ورزشی از AAS استفاده می‌کنند. در برخی موارد نیز افراد غیر ورزشکار با هدف بهتر شدن وضعیت ظاهری از AAS استفاده می‌کنند (۲). استانازول^۱ یکی از مهم‌ترین AAS است که فراوان از سوی انسان‌ها و اسب‌های مسابقه ای استفاده می‌شود. استانازول موجب افزایش اندازه عضلات از طریق تحریک سنتز پروتئین و کاهش تخریب آن می‌شود (۳). نشان داده شده است که مصرف AAS بخصوص استانازول موجب آسیب بافت عضله قلبی و سلول‌های عضله قلبی، و آپوپتوز بافت قلب می‌شود (۴). از طرفی مطالعات نشان داده اند مصرف AAS به شدت باعث تولید سایتوکین‌های التهابی و کاهش عامل‌های پیش التهابی در بافت قلب می‌شود (۵،۶). در طی پاسخ التهابی در ابتدا عامل نکروز تومور آلفا ($TNF-\alpha$) آزاد می‌شود و مقادیر $IL-6$ و $IL-8$ که از دیگر سایتوکین‌های پیش التهابی هستند را تنظیم می‌کند (۷). $TNF-\alpha$ یک سایتوکین مهم التهابی است که نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای سلولی و تولید $IL-10$ دارد و توسط اغلب سلول‌های سیستم دفاعی بدن، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های عضله صاف تولید می‌شود (۸). از طرفی $IL-10$ سایتوکین ضد التهابی

است که به کمک انواع سلول‌های ایمنی نظیر ماکروفاژها تولید می‌شود و توانایی مهار طیف گسترده ای از پاسخ‌های ایمنی و التهابی را دارد (۹). نسبت کم $IL-10$ به $TNF-\alpha$ با نارسایی قلبی در ارتباط است و کاهش آن به عنوان یک پیش‌بینی کننده در بیماری‌های قلبی به شمار می‌رود. فعالیت ضد التهابی $IL-10$ از تولید سایتوکین‌های پیش التهابی در مونوسیت‌های انسان باعث سرکوب فعال سازی مسیر فاکتور هسته ای کاپا ($NF-kB$) می‌شود (۱۰).

تمرینات ورزشی برای حفظ سلامتی و کاهش خطر بیماری‌های مختلف توصیه شده است، هم‌چنین فعالیت ورزشی منظم می‌تواند بر تعادل بین سایتوکین‌ها تاثیر بگذارد که با یک تنظیم افزایشی در تولید سایتوکین‌های ضد التهابی و یک تنظیم کاهشی نسبی در سایتوکین‌های پیش التهابی همراه است (۱۱). در همین راستا خدادوست و همکاران (۲۰۲۱) در یک مطالعه کارآزمایی بالینی نشان دادند تمرینات منظم پیلاتس باعث کاهش سایتوکین‌های التهابی مانند $TNF-\alpha$ و افزایش سایتوکین ضد التهابی $IL-10$ می‌شود (۱۲). هم‌چنین در مطالعات حیوانی فعالیت‌های ورزشی منظم بخصوص تمرینات مقاومتی در نهایت باعث کاهش سایتوکین‌های التهابی بخصوص $TNF-\alpha$ و افزایش سطح برخی سایتوکین‌های ضد التهابی مانند $IL-10$ در بافت‌های مختلف می‌شود (۸،۱۳). علاوه بر فعالیت‌های ورزشی، گزارش شده است که مواد غذایی آنتی‌اکسیدانی می‌توانند دارای اثرات ضد التهابی باشند (۱۴). یکی از این مواد گیاه خارخاسک با نام علمی *Tribulus terrestris*^۴ است. مطالعات نشان می‌دهد گیاه خارخاسک محتوی استروئیدها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، اسیدهای چرب غیر اشباع، ویتامین‌ها، تانن‌ها، رزین‌ها، پتاسیم نیترات، آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید است (۱۵). این گیاه دارای فواید مختلفی از جمله خاصیت ضد میکروبی، ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، پاکسازی رادیکال‌های آزاد و تعدیل عوامل التهابی است. در طب سنتی درمان انواع بیماری‌ها از جمله کاهش فشارخون، اثرات ضد دیابتی، بیماری‌های دستگاه قلبی-عروقی، اختلالات معده‌ای-روده‌ای، تقویت کننده

¹ Stanozolol² Tumor necrosis factor-alpha³ interleukin-10⁴ Tribulus terrestris

استانازول همراه با تمرین مقاومتی و 50 mg/kg خارخاسک (SRTT50) تقسیم شدند. در مدت هشت هفته گروه‌های ۳-۸ روزانه 5 mg/kg استانازول به صورت صفاقی دریافت نمودند (۱۶). گروه‌های ۶-۸ سه جلسه در هفته تمرینات مقاومتی را انجام دادند و گروه‌های ۴، ۵، ۷ و ۸ روزانه دوزهای معین خارخاسک را به صورت صفاقی دریافت نمودند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و تزریق استانازول و خارخاسک موش‌های صحرایی به وسیله کتامین با دوز 95 mg/kg و زایلازین با دوز 5 mg/kg به صورت داخل صفاقی و با سرنگ انسولین تزریق و بی‌هوش شدند و بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی توسط متخصصین آزمایشگاه جلداسازی و در ادامه بلافاصله در ازت مایع فریز شده و در دمای -70°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت قلب طبق پروتکل شرکت سازنده (سیناژن، ایران)، انجام گرفت، سپس با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج 260 nm و با کمک رابطه زیر غلظت و درجه خلوص نمونه RNA به صورت کمی بدست آمد.

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A260 \times \epsilon \times d/1000$$

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بسیار بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا پرایمرهای طراحی شده، مربوط به ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت، و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام پذیرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. همچنین جهت بررسی بیان ژن‌های IL-10 ، $\text{TNF-}\alpha$ ، برای گروه‌های سلولی از مخلوط $\text{RealQ 2x Master mix Green Dye}$ (ساخت AMPLQON آلمان) طبق دستورالعمل کیت و جدول شماره ۲ استفاده شد. برنامه دستگاه Real-time PCR به صورت ۲ مرحله‌ای و بر طبق جدول ۳ تنظیم گردید. پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشر فلورسانس با محاسبه $\Delta\Delta C_t$ میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت به

بهبود عملکرد جنسی و درمان بیماری‌های کبدی برای خارخاسک گزارش شده است (۱۴). از آنجایی که مصرف استروئیدهای آنابولیک موجب افزایش التهاب، استرس اکسیداتیو و خطرات قلبی عروقی می‌شود و اثرات ضد التهابی گیاه خارخاسک به خوبی در مطالعات مختلف نشان داده شده است (۱۴، ۴)، با در نظر گرفتن مطالب فوق و باتوجه به مصرف گسترده استروئیدهای آنابولیک آندروژنیک توسط ورزشکاران و اثرات جانبی آنها روی ساختار بافت قلب، همچنین با توجه به عدم مشاهده مطالعه‌ای که به بررسی اثر همزمان مصرف عصاره خارخاسک و تمرین مقاومتی بر شاخص‌های التهابی قلب در افراد مصرف کننده استانازول پرداخته باشد، که از این نظر تحقیق حاضر از اهمیت بالایی برخوردار است، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر تمرینات مقاومتی همراه با عصاره خارخاسک بر بیان ژن شاخص‌های التهابی در بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر در معرض استانازول صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۴۸ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر از نژاد اسپراگ-دوالی با محدوده وزن ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم و میانگین سنی ۸ هفته از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت خریداری و به آزمایشگاه تخصصی فیزیولوژی ورزشی این واحد دانشگاهی منتقل شدند. پژوهش حاضر مطابق دستورالعمل‌های موسسه ملی بهداشت (NIH) انجام و با کد اخلاق (IR.IAU.M.REC.1401.029) توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تایید و انجام شد. پس از طی دوره یک هفته‌ای سازگاری با محیط آزمایشگاه موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در ۸ گروه ۶ سری شامل ۱- کنترل سالم (C)، ۲- شم، نرمال سالیین (Sh)، ۳- مصرف استانازول (S)، ۴- مصرف استانازول همراه با 100 mg/kg خارخاسک (ST100)، ۵- مصرف استانازول همراه با 50 mg/kg خارخاسک (ST50)، ۶- مصرف استانازول همراه با تمرین مقاومتی (SRT)، ۷- مصرف استانازول همراه با تمرین مقاومتی و 100 mg/kg خارخاسک (SRTT100) و ۸) مصرف

$$\Delta C_t = C_t \text{ interets} - C_t B2m$$

$$C_t = \Delta C_t \text{ Treat} - \Delta C_t \text{ Un Treat}$$

B2m و گروه کنترل سنجیده شد و سپس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta C_t}$ میزان بیان آن محاسبه گردید (۱۷).

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد مطالعه

Genes	Primer Sequences	Sizes (bp)
B2m	Forward: 5'- CGTGCTTGCCATTCAGAAA -3'	244
	Reverse: 5'-ATATACATCGGTCTCGGTGG -3'	
TNF- α	Forward: 5'- CCCACGTCGTAGCAAACCAC-3'	264
	Reverse: 5'- TAGGGCAAGGGCTCTTGATG -3'	
IL-10	Forward: 5'- GTAGAAGTGATGCCCCAGGC -3'	124
	Reverse: 5'- CACAGGGGAGAAATCGATGACAG -3'	

جدول ۲. مواد و مقادیر مورد نیاز جهت Real-time PCR

مواد	مقدار [μ l]
RealQ 2x Master mix Green	۱۰
پرایمر رفت	۱
پرایمر برگشت	۱
cDNA	۲۵ (Δ ng)
RNase free water	تا حدودی که حجم نهائی به ۲۰ μ l برسد

جدول ۳. برنامه دستگاه Real-time PCR

مرحله	دما [$^{\circ}$ C]	زمان
Holding stage	۹۵	۱۰ دقیقه
Cycling stage	۹۵	۱۵ ثانیه
	۶۰	۶۰ ثانیه
	۶۰	۱ دقیقه
Melt curve stage	۹۵	۱۵ ثانیه

دستگاه بر روی ۴۵ دور تنظیم شد.

پروتکل تمرینات مقاومتی

دقیقه انجام شد و جهت گرم کردن ابتدای تمرینات موش‌های صحرایی چهار تکرار بدون وزنه از نرده بان تمرین بالا می رفتند. همچنین تمرینات در هر جلسه شامل چهار ست (ست اول ۵۰ درصد، ست دوم ۷۵ درصد، ست سوم ۹۰ درصد و ست چهارم ۱۰۰ درصد وزنه تعیین شده برای آن هفته) و دو تکرار (دو بار بالا رفتن از پله ها) را انجام می دادند. فاصله بین هر ست ۲ تا ۳ دقیقه و فاصله بین هر تکرار ۴۰ تا ۶۰ ثانیه در نظر گرفته می شد (۱۸).

موش‌های بزرگ آزمایشگاهی تمرینات مقاومتی را با استفاده از نرده بانی با ارتفاع یک متر، فاصله بین پله ها ۴ سانتی متر و شیب ۸۵ درجه انجام دادند به طوری که تمرینات مقاومتی از ۳۰ درصد وزن بدن در هفته اول شروع شد و به ۱۰۰ درصد وزن بدن موش های صحرایی در هفته هشتم خاتمه یافت. این نکته قابل ذکر است که تمامی تمرینات در ساعت ۱۰ تا ۱۲ صبح به مدت ۴۵

تهیه خارخاسک

جهت تهیه عصاره خارخاسک ابتدا میوه این گیاه آسیاب شد در ادامه ۱۰۰ گرم از پودر در ۸۰ میلی لیتر الکل ۷۰ درصد قرار گرفت در ادامه این محلول به مدت ۳ روز در آزمایشگاه نگهداری شد پس از گذشت سه روز محلول ابتدا از صافی کاغذی عبور داده شد و بخش مایع با استفاده از دستگاه خلا خالص سازی و عصاره خشک این گیاه بدست آمد. در ادامه پس از تغلیظ عصاره به وسیله نرمال سالین موش‌های بزرگ آزمایشگاهی دوزهای ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg را در روز به صورت صفاقی دریافت نمودند (۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی طبیعی بودن توزیع یافته‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه همراه با آزمون تعقیبی توکی در نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد ($P < 0.05$).

نتایج

وزن موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در گروه‌های هشت گانه تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است. سطوح بیان ژنی TNF- α ، IL-10 و نسبت TNF- α /IL-10 به ترتیب در نمودارهای ۱-۳ ارائه شده است. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد تفاوت معناداری در سطوح TNF- α ($F=12/054, P=0/001$) و IL-10 ($P=0/002$) و TNF- α /IL-10 ($F=5/643$) و بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در گروه‌های هشت گانه تحقیق وجود دارد.

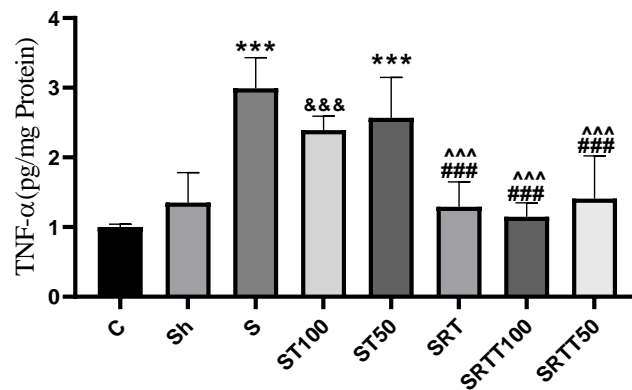
نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد سطوح TNF- α در گروه S به طور معناداری بالاتر از C و Sh بود ($P=0/001$)، همچنین گروه‌های ST100 ($P=0/004$) و ST50 ($P=0/001$) به طور معناداری بالاتر از C بود. با این وجود سطوح TNF- α در گروه‌های SRT، SRTT100 و SRTT50 به طور معناداری پایین تر از S بود ($P=0/001$). TNF- α در گروه‌های SRT، SRTT50 و SRTT100 به طور معناداری پایین تر از S بودند ($P=0/001$). با این حال تفاوتی در گروه‌های SRT، SRTT100 و SRTT50 مشاهده نشد ($P \geq 0/05$) (نمودار ۱).

سطوح IL-10 در گروه S به طور معناداری پایین تر از C و Sh بود ($P=0/001$). با این وجود سطوح IL-10 در گروه‌های SRT، ST100 ($P=0/002$) و SRTT100 و SRTT50 ($P=0/001$) به طور معناداری بالاتر از گروه S بود. همچنین گروه SRT به طور معناداری بالاتر از ST50 ($P=0/02$) بود. گروه SRTT100 و SRTT50 به طور معناداری بالاتر از ST50 بود ($P=0/001$) (نمودار ۲).

سطوح بیان ژن نسبت TNF- α /IL-10 در گروه S به طور معناداری بالاتر از گروه کنترل بود ($P=0/001$). با این حال در گروه‌های SRT، SRTT100 و SRTT50 ($P=0/001$) و ST100 ($P=0/006$) به طور معناداری پایین تر از گروه S بود. گروه SRTT100 به طور معناداری پایین تر از ST50 بود ($P=0/03$). با این حال تفاوتی در گروه‌های SRT، SRTT100 و SRTT50 مشاهده نشد ($P \geq 0/05$) (نمودار ۳).

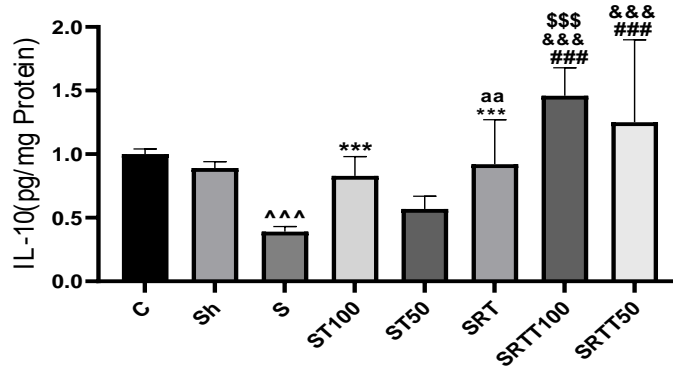
جدول ۱. سطوح پیش آزمون و پس آزمون وزن موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در گروه‌های مورد مطالعه

گروه	پیش آزمون (گرم)	پس آزمون (گرم)
	میانگین \pm انحراف استاندارد	میانگین \pm انحراف استاندارد
کنترل (C)	۱۳۳/۱۳ \pm ۴/۵۷	۱۳۳/۷۵ \pm ۴/۶۴
شم (Sh)	۱۷۴/۲۵ \pm ۲/۶۷	۱۷۴/۴۱ \pm ۳/۶۷
استانازول (S)	۱۷۴/۱۴ \pm ۳/۵۹	۱۸۰/۲۳ \pm ۲/۴۱
استانازول + خارخاسک ۵۰ (ST50)	۱۷۵/۱۹ \pm ۲/۱۱	۱۷۹/۳۲ \pm ۲/۳۷
استانازول + خارخاسک ۱۰۰ (ST100)	۱۷۵/۱۹ \pm ۳/۹۷	۱۷۹/۶۳ \pm ۴/۱۳
استانازول + تمرین (SRT)	۱۷۴/۱۴ \pm ۳/۶۷	۱۹۰/۲۵ \pm ۴/۳۵
استانازول + تمرین + خارخاسک ۵۰ (SRTT50)	۱۷۴/۹۲ \pm ۲/۱۵	۱۹۱/۰۵ \pm ۴/۱۹
استانازول + تمرین + خارخاسک ۱۰۰ (SRTT100)	۱۷۵/۳۶ \pm ۲/۱۷	۱۹۱/۱۷ \pm ۲/۵۳



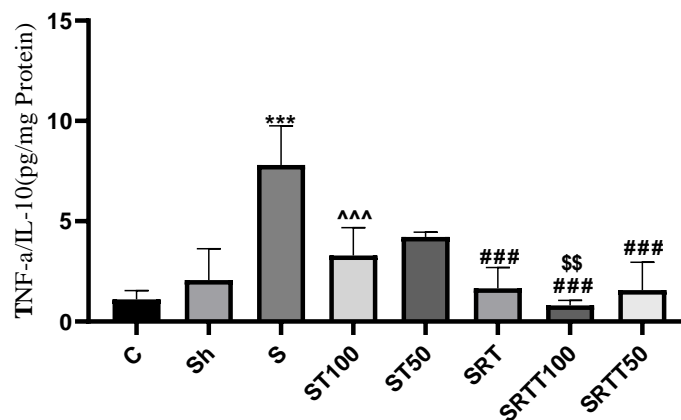
نمودار ۱. بیان TNF-α در گروه های هشت گانه تحقیق

***P=0/001 افزایش معنادار در مقایسه با گروه C و Sh و P=0/004 افزایش معنادار در مقایسه با گروه C P=0/001### کاهش معنادار در مقایسه با گروه S P=0/001^^^ کاهش معنادار در مقایسه با گروهها ST50,ST100



نمودار ۲. بیان IL-10 در گروه های هشت گانه تحقیق

^^^P=0/001 کاهش معنادار در مقایسه با گروه C, P=0/002*** افزایش معنادار در مقایسه با گروه S, P=0/001### افزایش معنادار در مقایسه با گروه S, P=0/002&&& افزایش معنادار در مقایسه با گروه ST50 معنادار در مقایسه با گروه SRT, P=0/002\$\$\$ افزایش معنادار در مقایسه با گروه ST50, P=0/02aa افزایش معنادار در مقایسه با گروه ST50



نمودار ۳. بیان TNF-α/IL-10 در گروه های هشت گانه تحقیق

***P=0/001 افزایش معنادار در مقایسه با گروه C, P=0/001### کاهش معنادار در مقایسه با گروه S, P=0/006## کاهش معنادار در مقایسه با گروه S, P=0/03\$ کاهش معنادار در مقایسه با گروه ST50

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد مصرف استانازول باعث افزایش بیان ژن $TNF-\alpha$ و نسبت $TNF-\alpha/IL-10$ و کاهش بیان ژن $IL-10$ بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی می‌شود که همسو با نتایج مطالعات قبلی است (۶،۲۰). مطالعات نشان داده‌اند سوء مصرف AAS تغییر در ساختار قلب، اندازه و ضخامت بطن و همچنین التهاب بافت را به همراه دارد (۲۱). نتایج حییبی پور و همکاران (۲۰۱۸) نشان می‌دهد که استروئیدهای آنابولیک ممکن است بازسازی بافت قلب را تخریب کرده و منجر به اختلال قلبی شود (۲۲). مکانیسم‌های عمل فیزیولوژیک و دارویی AAS بر بافت قلب به طور واضحی مشخص نشده‌اند. AAS به گیرنده‌های آندروژنی در قلب و شریان‌های اصلی متصل می‌شوند و سطوح فیزیولوژیک ممکن است تأثیر مثبتی روی عروق کرونر از طریق رهائش نیتریک اکساید اندوتلیال و مهار تون عضلانی عروق صاف داشته باشند (۲۳). مطالعات حیوانی نشان داده‌اند و استفاده از AAS با دوز بالا ممکن است این پاسخ گشادکننده عروق را معکوس کند و منجر به پیشبرد اثرات رشد آن بر بافت قلب، به عنوان کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک شده و به دنبال آن مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را موجب گردد (۶). این اثرات به احتمال زیاد توسط آبشارهای پیام رسان گیرنده ثانویه غشاء که جریان Ca^{2+} داخل سلولی و فراخوان Ca^{2+} از شبکه سارکوپلاسمی را افزایش می‌دهند، تعدیل می‌شوند (۶). افزایش Ca^{2+} نفوذپذیری میتوکندری را تحت تأثیر قرار می‌دهد و منجر به رهائش عوامل آپوپتوزیک مانند سیوکروم C، عامل القا کننده آپوپتوز و کاسپاز ۹ می‌شود (۲۳). این یافته‌ها ممکن است مشاهدات بالینی را توضیح دهند که AAS بدون ترومبوز کرونر می‌تواند به مرگ یا تصلب شریان قلبی منجر شوند و التهاب بافت قلب را افزایش دهند. از طرفی نتایج بدست آمده نشان داد تمرین مقاومتی تأثیر معنادار بر کاهش بیان ژن $TNF-\alpha$ ، نسبت $TNF-\alpha/IL-10$ و افزایش $IL-10$ بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی مسموم شده با استانازول دارد. در همین راستا محققان نشان داده‌اند که انجام فعالیت‌های ورزشی منظم بخصوص فعالیت‌های مقاومتی باعث کاهش شاخص‌های التهابی $TNF-\alpha$ و $IL-$

10 می‌شود (۶،۱۳،۲۴). نتایج مطالعات نشان داده‌اند اثرات ضد التهابی فعالیت‌های ورزشی با ماهیت ورزش و همچنین مدت آن مرتبط است. مکانیسم دقیق تمرین در کاهش نشانگرهای التهابی هنوز به طور کامل مشخص نشده است، با این وجود مشخص شده است پروتکل‌های تمرینی که موجب کاهش چربی بدن و بهبود معنادار شاخص توده بدن شده‌اند در کاهش عوامل التهابی و افزایش عوامل ضد التهابی تأثیرگذار هستند (۲۴). یکی از مکانیسم‌های شناخته شده درگیر در افزایش $IL-10$ پس از تمرین ورزشی، افزایش اینترلوکین ۶ ($IL-6$) در اثر تمرین است. تمرین باعث افزایش سوخت و ساز عضلانی شده و منجر به افزایش $IL-6$ در عضله و خون می‌شود. افزایش $IL-6$ باعث افزایش ترشح $IL-10$ در ماکروفاژها می‌شود (۲۵). علاوه بر این فعالیت ورزشی درازمدت، تولید سلول‌های هسته‌ای سایتوکین‌های آتروژنیک همچون فاکتور نکروز تومور آلفا $TNF-\alpha$ و اینترفرون گاما ($IFN-\gamma$)^۱ را کاهش می‌دهد، در حالی که تولید سایتوکین‌های ضد التهابی همچون $IL-10$ را افزایش می‌دهد (۲۴). این تأثیرات چند گانه ورزش، تعادل سایتوکین‌های استراحتی را به حالت ضد التهابی تبدیل می‌کند. با توجه به مکانیسم‌های ملکولی، تمرین ورزشی با تنظیم منفی فعالیت فاکتور هسته‌ای کاپا بی ($NF-kB$) سبب افزایش ترشح $IL-10$ به وسیله مونوسیت‌ها و سلول‌های T از طریق مسیر $Th2$ می‌شود (۲۴). این در حالی است که افشان و همکاران در مطالعه خود نشان دادند تمرینات مقاومتی به مدت یک هفته باعث افزایش شاخص‌های التهابی $TNF-\alpha$ و $IL-10$ شده است. همچنین در برخی مطالعات گزارش شده است آسیب‌های مکانیکی وارده به عضلات اسکلتی متعاقب تمرین مقاومتی باعث افزایش التهاب و در نتیجه باعث افزایش $TNF-\alpha$ می‌شود (۲۶). که ناهمسو با نتایج بدست آمده در پژوهش ما است. به نظر می‌رسد این عدم همسو بودن ریشه در شدت و یا مدت تمرینی دارد که مطالعات استفاده کرده‌اند. تمرینات کوتاه مدت (یک جلسه تمرین شدید) با افزایش شاخص‌های التهابی همراه بوده است (۲۶).

^۱ Interferon gamma

(NF-KB) را کاهش می‌دهد، همچنین افزایش سیتوکین ضد التهابی IL-10 و مهار TNF- α ، IL-1 β ، IL-6 و IL-8 هم اثرات ضد التهابی و هم اثرات ضد آپوپتوزی خارخاسک در مطالعات گزارش شده است (۲۸). بررسی‌ها نشان می‌دهند طول دوره و دوز مصرفی عامل مهمی در اثر گذاری این گیاه دارویی است، به طوری که مطالعات نشان داده اند اثرات آنتی اکسیدانی مصرف عصاره خارخاسک وابسته به دوز آن است. به طوری که به نظر می‌رسد مصرف دوز ۱۰۰ mg/kg اثرات مطلوب‌تری نسبت به دوزهای ۱۰ mg/kg و ۱ mg/kg دارد (۲۹). در مجموع با توجه به افزایش بیان ژن TNF- α پس از مصرف عصاره خارخاسک در موش‌های در معرض استانازول و با توجه به در دسترس نبودن پیشینه پژوهش در این رابطه، بررسی ارتباط بین فعالیت‌های ورزشی، مصرف عصاره خارخاسک، AAS و بیان ژن‌های التهابی بافت قلب نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. قابل کنترل بودن زمان تمرینات، در دسترس بودن وسایل و امکانات مورد نیاز از نقاط قوت مطالعه حاضر بود. محدودیت‌هایی نیز در تحقیق حاضر وجود داشت که از جمله می‌توان به مطالعه بر روی نمونه‌های حیوانی و عدم اندازه‌گیری فاکتورهای التهابی دیگر قلب اشاره کرد. بررسی تأثیر دوزهای مختلف مکمل خارخاسک همراه با تمرین پس از مسمومیت با استانازول نیز می‌تواند در تبیین و تفسیر بهتر نتایج به ویژه در بافت قلب کمک نماید. این نقطه ضعف پژوهشی پیشنهادی به مطالعات آینده به منظور اندازه‌گیری این عوامل در بافت قلب همراه با مصرف عصاره خارخاسک و AAS است.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد تغییرات بیان ژن TNF- α ، IL-10 و نسبت TNF- α /IL-10 در بافت قلب گروه‌های تمرین و تمرین همراه با مصرف عصاره خارخاسک به طور معناداری مطلوب است. با این حال با توجه به افزایش بیان ژن TNF- α پس از مصرف عصاره خارخاسک و با توجه به نبود پیشینه پژوهش در این رابطه، بررسی روی ارتباط مصرف خارخاسک به تنهایی و همراه با مسمومیت با

نتایج دیگر مطالعه حاضر نشان داد مصرف عصاره خارخاسک با دوز ۱۰۰ mg/kg و اثر تعاملی تمرین مقاومتی و مصرف خارخاسک با دوزهای ۱۰۰ mg/kg و ۵۰ mg/kg اثر معناداری بر کاهش نسبت TNF- α /IL-10 و افزایش IL-10 در بافت قلب موش‌های بزرگ آزمایشگاهی مسموم شده با استانازول دارد این در حالی است که مصرف عصاره خارخاسک در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در معرض استانازول باعث افزایش TNF- α در بافت قلب می‌شود. با این حال با توجه به مطالعات بدست آمده، مطالعه ای یافت نشد که به بررسی همزمان تمرینات ورزشی همراه با مصرف عصاره خارخاسک بر شاخص‌های التهابی بافت قلب تحت مسمومیت با استانازول پرداخته باشد، از این رو مقایسه مطالعه حاضر با مطالعات مشابه دچار محدودیت بود. اما مطالعاتی به بررسی تأثیر تمرینات مختلف همراه با مکمل خارخاسک و دیگر مکمل‌ها بر شاخص‌های التهابی در بافت‌های مختلف پرداخته‌اند. به عنوان مثال عباسی و همکاران در مطالعه خود نشان دادند ۱۲ هفته تمرین استقامتی همراه با مصرف ال کارنیتین باعث کاهش شاخص‌های التهابی TNF- α و IL-1 β در بافت قلب رت‌های ویستار پس از مصرف AAS بولدنون شده است (۶). حسینی و همکاران نیز نشان دادند ۸ هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف رزوراترول باعث کاهش معنادار TNF- α و افزایش IL-10 در موش‌های صحرایی دیابتی شده است (۸). در مطالعه‌ای مزارعی زاده و همکاران نشان دادند تمرین تناوبی شدید همراه با مصرف مکمل خارخاسک موجب افزایش سطوح فیبروبلاست ۲۱ و آدیپونکتین شده است (۱۴). همچنین شمسی و همکاران نیز در مطالعه خود نشان دادند ۸ هفته تمرین مقاومتی همراه با مصرف عصاره خارخاسک تأثیر معناداری بر افزایش شاخص‌های آنتی اکسیدانی بافت هیپوکپ موش‌های مسموم شده با استانازول دارد (۲۷). که همسو با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر است. پیشینه تحقیق نشان می‌دهد مصرف گیاه خارخاسک با فعال‌سازی پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن به افزایش بیان پروتئین‌های سوخت و ساز چربی منجر می‌شود در ادامه سطوح استرس اکسیداتیو و عوامل التهابی مانند عامل رونویسی هسته‌ای کاپا B-

استروئید های آنابولیک بر بیان ژن سایتوکین های التهابی در بافت قلب نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

IR.IAU.M.REC.1401.029) توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تایید و انجام شد.

استروئید های آنابولیک بر بیان ژن سایتوکین های التهابی در بافت قلب نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر مطابق دستورالعمل های موسسه ملی بهداشت (NIH) انجام و با کد اخلاق

منابع

- Hernández-Guerra AI, Tapia J, Menéndez-Quintanal LM, Lucena JS. Sudden cardiac death in anabolic androgenic steroids abuse: case report and literature review. *Forensic Sciences Research* 2019;4(3):267-73.
- Galderisi M, Cardim N, D'andrea A, Bruder O, Cosyns B, Davin L, et al. Atlet kalbine çoklu modaliteli kardiyak görüntüleme yaklaşımy: Avrupa Kardiyovasküler Görüntüleme Derneđi Uzman Uzlařysý. *TÜRK Kardýyoloji Derneđý Arřıvy* 2016;44(Supp: 1):1-21.
- Marocolo M, Katayama PL, Meireles A, Barbosa Neto O. Combined effects of exercise training and high doses of anabolic steroids on cardiac autonomic modulation and ventricular repolarization properties in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2019;97(12):1185-92.
- Arjmand A, Abedi B, Hosseini SA. Anti-Apoptotic Effects of Resistance Training and Tribulus Terrestris Consumption in the Heart Tissue of Rats Exposed to Stanozolol. *The Eurasian Journal of Medicine* 2021;53(2):79.
- Du Toit E, Rossouw E, Van Rooyen J, Lochner A. Proposed mechanisms for the anabolic steroid-induced increase in myocardial susceptibility to ischaemia/reperfusion injury: Cardiovascular topic. *Cardiovascular Journal of South Africa* 2005;16(1):21-8.
- Abbassi-Daloii A. The effect of endurance training and L-Carnitine consumption on TNF-a and IL-1 β gene expression of heart tissue in wistar male rats following anabolic steroid consumption (Boldenone). *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 2019;9(4):1903-12.
- Zhou M, Cheng S, Yu J, Lu Q. Interleukin-8 for diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis. *PloS one* 2015;10(5):e0127170.
- Hosseini M, Hosseini M. The synergistic effect of eight weeks high-intensity interval training and resveratrol consumption on il-10 and tnf- α in diabetic male rats. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism* 2020;19(3):134-42.
- Jenkins NT, Padilla J, Arce-Esquivel AA, Bayless DS, Martin JS, Leidy HJ, et al. Effects of endurance exercise training, metformin, and their combination on adipose tissue leptin and IL-10 secretion in OLETF rats. *Journal of applied physiology* 2012;113(12):1873-83.
- Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 Inhibits Nuclear Factor κ B (NF κ B) Activation in Human Monocytes: IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270(16):9558-63.
- Donatto F, Neves R, Rosa F, Camargo R, Ribeiro H, Matos-Neto E, et al. Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. *Cytokine* 2013;61(2):426-32.
- Khodadoust M, Habibian M. Investigating the changes of tumor necrosis factor-A and interleukin-10 after 8 weeks of regular pilates exercise and vitamin D intake in overweight men: A randomized clinical trial. *Journal of Arak University of Medical Sciences* 2020;23(6):888-901.
- Soltanian Z, Vanaky B, Ramezani N, Shakeri N, Shams Z, Fakhari RF. Effect of eight weeks resistance training on gene expression of TNF- α and IL10 in the heart of type ii diabetic male rats. *The Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences* 2019;27(6):1656-67.
- Mazareizadeh A, Abdollahi S, Hashemi FS, Ershadi R. The effect of intensity interval training and Tribulus terrestris supplementation on fibroblast growth factor 21 and adiponectin in obese women. *Iranian Journal of Physiology and Pharmacology* 2021;5:97-106.
- Santos HO, Howell S, Teixeira FJ. Beyond Tribulus (Tribulus terrestris L.): The effects of phytotherapies on testosterone, sperm and prostate parameters. *Journal of Ethnopharmacology* 2019;235:392-405.
- dos Santos GB, Rodrigues MJM, Gonçalves EM, Marcondes MCGG, 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.
17. Roozbehi M, Gaeini A, Nouri R, Kordi MR. Interaction effect of stanozolol and endurance training on oxidant and antioxidant capacity in liver tissue of healthy male wistar rats. *Studies in Medical Sciences* 2019;30(7):537-47.
 18. Dehghan F, Hajiaghaalipour F, Yusof A, Muniandy S, Hosseini SA, Heydari S, et al. Saffron with resistance exercise improves diabetic parameters through the GLUT4/AMPK pathway in-vitro and in-vivo. *Scientific Reports* 2016;6:25139.
 19. Arjmand A, Abedi B, Hosseini SA, Ramezani S. The Effect of Resistance Training with Tribulus terrestris Extract on Apoptosis of Heart Tissue in Rats. *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences* 2021;13(2):70-6.
 20. Lima EM, Nascimento AM, Brasil GA, Kalil IC, Lenz D, Endringer DC, et al. Cardiopulmonary reflex, cardiac cytokines, and nandrolone decanoate: response to resistance training in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2015;93(11):985-91.
 21. Ahmadi M, Abbassi-Dalooi A, Ziaolhagh SJ, Yahyaei B. Structural changes of cardiac tissue in response to boldenone supplementation with or without alcoholic extract of jujuba fruit during resistance training in male Wistar rats. *Journal of Kashan University of Medical Sciences* 2017;21(6):534-42.
 22. Habibpoor Karimabadi F, Abbassi Dalooi A, Abdi A, Ziaolhagh S. Evaluation of ziziphus jujube extract effect during endurance training on cardiac tissue in wistar male rats toxicated by boldenone. *Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences* 2018;13(2):42-9.
 23. Frati P, P Busardo F, Cipolloni L, De Dominicis E, Fineschi V. Anabolic androgenic steroid (AAS) related deaths: autoptic, histopathological and toxicological findings. *Current Neuropharmacology* 2015;13(1):146-59.
 24. Ghaderi Goodarzi S, Abbassi Dalooi A, Abdi A, Saeidi A. The Effect of 12 Weeks Combined Training and Caffeine on Plasma Levels of Interleukin-1 β and Interleukin 10 in Obese Men. *The Horizon of Medical Sciences* 2021;27(4):450-65.
 25. Lankster G. Exercise and cytokines. Gleeson M *Immune function in sport and exercise* 2th ed Tehran: Hatmi 2015:304-23.
 26. Afshan S, Roshan VD. Comparing the effect of two resistance training with and without supplement ginger on inflammatory markers. *Respiratory Medicine* 2016;40(3):118-24.
 27. Shamsi B, Abedi B, Ramezani S. The effect of eight weeks of resistance training with consumption of Tribulus terrestris extract on antioxidant indices of hippocampal tissue in male rats exposed to stanazol. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology* 2022;9(1):48-60.
 28. Kovac JR, Pan M, Arent S, Lipshultz LI. Dietary adjuncts for improving testosterone levels in hypogonadal males. *American Journal of Men's Health* 2016;10(6):NP109-NP17.
 29. Kormanovski A, del Carmen Castillo-Hernández M, Guevara-Balcázar G, Pérez T, Lara-Padilla E. Gender differences in nitric oxide and antioxidant response to physical stress in tissues of trained mice. *Physiology and Pharmacology* 2019;23(3):224-34.