Archive of SID

مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۶، شماره ۱۱، بهمن ۱۳۹۸ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 12:43 IRDT on Monday May 11th 2020

اثرهشت هفته تمرین تداومی و کروسین بر شاخص‌های آپوپتیک بافت بیضه رت‌های نر در معرض القاء آپوپتوز بوسیله دوکسوروبیسین

کیانوش دارش: دانشجوی دکتری، فیزیولوژی ورزشی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد واحداسلامی، شوشتر، ایران

محسن قنبرزاده: استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (*نویسنده مسئول) ghanbarzadmohsen@gmail.com

مسعود نیک بخت: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات نشان داد که فعالیت بدنی و مصرف گیاه دارویی زعفران در بیمارانی که مشکل بیضه دارند و افرادی که مستعد آپوپتوز هستند را تحت تاثیر قرار می‌دهند، کروسین غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی هستند تعداد اسپرم، قدرت، حرکت و قابلیت مورفولوژیکی اسپرم را افزایش می‌دهند. در این مطالعه اثر هشت هفته تمرین تداومی و مصرف آنتی اکسیدان کروسین بر شاخص‌های آپوپتیک بافت بیضه رت‌های نر در معرض القائی آپوپتوز بوسیله دوکسوروبیسین بررسی شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی ۴۰ سر رت نر در گروه‌های کنترل، شم (دوکسوروبیسین)، تمرین تداومی+ دوکسوروبیسین، تمرین تداومی+ دوکسوروبیسین+ کروسین، دوکسوروبیسین+ کروسین تقسیم شدند که در روزهای تمرین به مدت ۸ هفته ۵۰ mg/kg کروسین به‌صورت گاواژ دریافت کردند. تمام گروه‌ها بجز گروه کنترل، دوکسوروبیسین به میزان (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) شش بار و در انتهای هر هفته، از انتهای هفته دوم تا انتهای هفته هفتم، گروه کنترل تنها نرمال سالین به همان میزان دوکسوروبیسین در یافت کردند، گروه‌های تمرین تداومی به مدت ۸ هفته، ۵ جلسه در هفته به ترتیب ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۴۰ دقیقه بر روی نوارگردان دویدن، ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین و پس از ۱۲-۱۰ ساعت ناشتایی شبانه، پس از بیهوشی حیوانات نمونه‌های خونی و بافتی جمع‌آوری شد، سپس سطوح Bcl-2 و Bax با استفاده از روش Real-time PCR بافت بیضه اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) سطح معناداری P≤۰/۰۵ آنالیز شدند.

یافته‌ها: تمرین تداومی+ کروسین+ دوکسوروبیسین اثر معنی‌داری بر کاهش Bax و نسبت Bax / Bcl-2 و افزایش Bcl-2 داشت که گروه آزمایشی دوکسوروبیسین+ تمرین+ کروسین کمترین اختلاف میانگین (۰/۰۰۰۸) و اختلاف میانگین با گروه شم با بیشترین اختلاف میانگین (۰/۰۰۶۱) را دارا می‌باشد (P ≤۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد تمرین تداومی و تزریق وابسته به کروسین با کاهش سمیت ناشی از دوکسوروبیسین کاهش رادیکال‌های آزاد و ایجاد سازگاری مفید در سیستم آنتی اکسیدان بافت بیضه رت‌های نر می‌شوند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

تمرین تداومی،

کروسین،

دوکسوروبیسین،

بیضه،

آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۰۵

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۰۷

شیوه استناد به این مقاله:

Darash K, Ghanbarzadeh M, Nikbakht M. Effect of eight-week exercise and crocin on the apoptotic indices of male rats' testicles subjected to the apoptosis by doxorubicin. Razi J Med Sci. 2020;26(11):134-144.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

Razi Journal of Medical Sciences.2020;26(11):134-144. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Effect of eight-week exercise and crocin on the apoptotic indices of male rats' testicles subjected to the apoptosis by doxorubicin

Kiyanoosh Darash, Department of Sport Physiology, Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran
Mohsen Ghanbarzadeh, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (*Corresponding author) ghanbarzadmohsen@gmail.com
Masoud Nikbakht, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 12:43 IRDT on Monday May 11th 2020

Abstract

Background: Studies showed that physical activity and saffron plant usage can positively affect the persons with testicle problems and subject to apoptosis. Crocins are rich in antioxidant compounds and increase sperm count and strength, motility and morphological ability of sperm. In this study, effect of eight-week exercise and crocin on the apoptotic indices of male rats' testicles subjected to the apoptosis has been investigated by Doxorubicin.

Methods: In this experimental study, 40 male rats were divided into control, scheme (doxorubicin), continuous exercise + doxorubicin, continuous exercise + doxorubicin + crocin, doxorubicin + crocin which were administered 50 mg/kg crocin for 8 weeks by gavage. All groups except the control group received doxorubicin (2.5 mg/kg of body weight), six times at the end of each week. From the end of the second week until the end of the seventh week, the control group received only normal saline the same amount of doxorubicin. Continuous exercise groups for 8 weeks, 5 sessions per week, respectively, 16, 24, 32, 40 minutes on treadmill running, Blood and tissue samples were collected 48 hours after the last exercise session and after 10-12 hours of nocturnal fasting, after anesthesia, and Bcl-2 and Bax levels were measured using Real-Time PCR testicular tissue. The results of statistical analysis were analyzed by one-way (ANOVA), at $P \leq 0.05$.

Results: Continuous exercise + crocin + doxorubicin had a significant effect on decreasing Bax and Bax/Bcl-2 ratio and increasing Bcl-2, The experimental group with doxorubicin + exercise + crocin had the lowest mean difference (0.0008) and mean difference with the sham group with the highest mean difference (0.0061) ($P \leq 0.05$).

Conclusions The results of this study showed that continuous training and crocin-dependent injections reduce the free radicals and induce beneficial adaptation in the testicular tissue antioxidant system by reducing the toxicity induced by doxorubicin.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Keywords
Continuous exercise,
Crocin,
Doxorubicin,
Testis,
Apoptosis

Received: 27/07/2019
Accepted: 28/12/2019

Cite this article as:
Darash K, Ghanbarzadeh M, Nikbakht M. Effect of eight-week exercise and crocin on the apoptotic indices of male rats' testicles subjected to the apoptosis by doxorubicin. Razi J Med Sci. 2020;26(11):134-144.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 12:43 IRDT on Monday May 11th 2020

مقدمه

باروری در تداوم و ثبات زندگی زوجین نقش مهمی دارد به‌طورکلی در تمام دنیا ۱۵ درصد افراد نابارونـد (۱). تقریباً ۵۰ درصد ناباروری مربوط به عوامل مردانه است. علل ناباروری در مردان شامل موتاسیون‌های ژنی، آنوپلوئدی، بیماری‌های عفونی، انسداد مجرا، واریکوسل، شیمی درمانی رادیوتراپی و اختلال‌های انزالی است (۲). اگرچه دوکسوروبیسین دارویی بسیار قدرتمند و کارآمد در شیمی درمانی محسوب می‌شود، از معایب آن می‌توان به کشتن سلول‌های سالم اشاره کرد به‌ویژه سلول‌هایی که به‌طور مدام و با سرعت زیاد در حال تکثیر هستند مانند سلول‌های نطفه‌ی مذکر. از دیگر عوارض جانبی دوکسوروبیسین مرگ سلول نطفه‌ای می‌باشد (۵-۳). محققین معتقدند آپوپتوز یک فرایند بیولوژیکی بسیار سازمان یافته و دقیقاً هماهنگ شده است که یک نقش حیاتی در مشاهده رویدادهای غیر پاتولوژیکی گوناگون سلول ایفاء می‌کند. چندین ویژگی ریخت‌شناسی مشخص، آپوپتوز را تعریف می‌کند که عبارتند از جمع شدگی (کوچک شدن) سلول، تورم غشا پلاسمایی، تراکم کروماتین، کاهش یا فاسد شدن DNA کروموزوم در فاصله نوکلوئیدها و شکل‌گیری اجسام آپوپتیکی (۸-۶) آپوپتوز در تکثیر و حذف سلول‌های پیش سرطانی در بافت‌های میتوزی بزرگسالان مهم است و بی‌نظمی آپوپتوز به‌عنوان مکانیسم اساسی بسیاری از بیماری‌ها تشخیص داده شده در پاسخ به محرک‌های آپوپتوزی که تنوعی از سیگنال‌های درونی و بیرونی، بیان ژن‌هایی را تنظیم و شروع آپوپتوز را کنترل می‌کنند (۹). خانواده‌ی پروتئین Bcl-2 به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های بالا دست آپوپتوز شامل پروتئین‌های Bax و Bcl-2 به‌عنوان پروتئین‌های کلیدی مشهور در شکل‌گیری کانال‌های آپوپتوزی و تنظیم پیام‌های آپوپتوز میتوکندریایی شناخته شده‌اند (۱۰). زعفران (Crocus یا Saffron Officinarum) متعلق به رده تک‌لپه‌ای‌ها، تیره زنبق و جنس کروکوس یا زعفران است. رنگدانه‌های موجود در کلاله زعفران از گروه کاروتنوئیدهای دارای عامل کربوکسیل است. از میان گلیکوزیدهای کاروتنوئیدی محلول در آب، کروسین اهمیت بیش‌تری دارد. از کل مقدار کروسین موجود در کلاله زعفران ۹۴ درصد آن به‌صورت ترکیب گلیکوزیدی در کروسین و ۶ درصد آن به‌صورت کروستین آزاد است. پیکروکروسین و سافرانال عامل طعم، عطر و آنتی‌اکسیدانی زعفران هستند (۱۱). مهم‌ترین ترکیبات موجود در کلاله گیاه زعفران عبارت اند از: کارتنوئیدها (مانند کروستین، کروسین، آلفا کاروتن، لیکوپن، زآگزانتین)، آلدئیدهای مونوترپن، مونوترپنوئیدها (مانند کروکوسانتین‌ها)، ایزوفرون‌ها و فلاوونوئیدها (۱۲). عصاره زعفران، کروسین و سافرانال مانع عمل بیرنگ کنندگی رادیکال‌ها می‌شوند و مقدار آن‌ها در عصاره الکلی زعفران نسبت به عصاره آبی آن بیش‌تر است (۱۳). زعفران علاوه بر اینکه یک چاشنی غذایی پرمصرف است، اثرات فارماکولوژیک متعددی نیز دارد و یک داروی قوی محسوب می‌شود (۱۴).

اوهرا و همکاران در تحقیقی بررسی کردن فعالیت بدنی دارای پتانسیلی است که تکثیر و مرگ سلولی را از طریق سایتوکاین‌ها، هورمون‌ها، فاکتورهای رشد و مسیرهای متابولیک تعدیل می‌کند (۱۵)؛ بنابراین گرچه فعالیت ورزشی تولید ROS را در طول ورزش افزایش می دهد ولی ورزش منظم با کاهش بیماری‌های وابسته به استرس اکسیداتیو همراه بوده و متوسط طول عمر را افزایش می دهد. دلیل این مزیت، سازگاری ورزش با افزایش تولید رادیکال آزاد در حین ورزش است که این سازگاری افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی، افزایش بیان ژن مربوط به اکسیداسیون/احیاء و فعال شدن سیستم ترمیم/حذف آسیب را در بر می گیرد (۱۶). پاپ جونیور و همکاران نیز نشان دادند که ۳ ماه تمرین ورزشی هوازی باعث کاهش معناداری در بیان ژن Bax و Bax/Bcl-2 نسبت به گروه کنترل در موش‌ها شد (۱۷)؛ بنابراین استفاده از دوکسوروبیسین منجر به آسیب بافتی و ایجاد آپوپتوز می‌شود، بنابراین با توجه به اهمیت چگونگی طراحی برنامه های تمرینی و مصرف کروسین (عصاره زعفران) برای حصول نتایج

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 12:43 IRDT on Monday May 11th 2020

بهترو جلوگیری از اتلاف هزینه و ناکافی بودن مطالعات درباره اثر تمرینات تداومی و مصرف کروسین درطولانی مدت بر دفاع ضد آپوپتوز و همچنین وجود تناقض در رابطه با اثر فعالیت ورزشی و مصرف کروسین بر تقابل های شاخص های آپوپتیک، پژوهش حاضر آثار ۸ هفته ای تمرین تداومی و مصرف کروسین (عصاره زعفران) را بر میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی بر شاخص‌های آپوپتیک بافت بیضه موش های نرویستار تحت آلقائی آپوپتوز مورد بررسی قرار می دهد.

روش کار

در این تحقیق تجربی ابتدا ۴۰ سر رت نر نژاد ویستار (با میانگین سنی ۸ -۱۰ هفته و میانگین وزن اولیه ۲۰۰-۲۲۰ گرم) از مرکز پژوهش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز خریداری شد. پس از انتقال به آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی حیوانات، در شرایطی استاندارد با دمای محیطی ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد و نور کنترل شده (چرخه ۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی) نگهداری شده و دوره سازش پذیری ۱۰ روزه را طی کردند. تمام گروه ها بجز گروه کنترل، دوکسوروبیسین به میزان (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به وسیله سرنگ انسولینی به‌صورت زیر صفاقی شش بار و در انتهای هر هفته، از انتهای هفته دوم تا انتهای هفته هفتم، ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین و ۲۴ ساعت قبل از جلسه تمرین بعدی، تزریق شد. همچنین با توجه به اثرات احتمالی ناشی از تزریق در گروه‌های دریافت‌کننده دوکسوروبیسین، به منظور یکسان‌سازی شرایط برای همه آزمودنی‌ها، گروه کنترل نیز به همان میزان سالین (سدیم کلراید ۰/۹ درصد) دریافت کرد (۱۸). رت ها به ۵ گروه ۸ سری شامل: (۱) گروه کنترل، (۲) گروه بیمار (دوکسوروبیسین)، (۳) گروه دوکسوروبیسین + تمرین تناوبی، (۴) گروه دوکسوروبیسین+ تمرین +کروسین، (۵) گروه دوکسوروبیسین+ کروسین. همچنین، گروه ۴ و ۵ در روزهای تمرین روزانه ۵۰ mg/kg کروسین (حل شده در نرمال سالین) به مدت ۸ هفته به‌صورت خوراکی (گاواژ) دریافت کردند (۱۸). پروتکل تمرین: جهت برآورد حداکثر سرعت دویدن، آزمون عملکرد ورزشی مدرج با شیب صفر درجه اجرا شد. بدین منظور، ابتدا دویدن رت ها با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه آغاز شد و در ادامه، سرعت نوارگردان به ازای هر ۱ دقیقه یک متر اضافه شد. این روند تا وقتی ادامه داشت که رت ها دیگر قادر به دویدن نباشند. برنامه تمرین اصلی به‌صورت ابتدا به مدت ۵ دقیقه با شدت ۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه بر روی نوارگردان گرم کرده سپس با شدت ۶۰ درصد سرعت بیشینه در هفته اول؛ ۶۵ درصد بیشینه درهفته دوم؛ ۷۰ درصد سرعت بیشینه از هفته سوم به بعد تمرین روی نوارگردان را انجام دادند. ودرانتها رت ها پنج دقیقه سرد کردن را در با شدت ۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه انجام دادند. زمان کل تمرین در هفته اول ۱۶ دقیقه، در هفته دوم ۲۴ دقیقه، هفته سوم ۳۲ دقیقه، واز ابتدای هفته چهارم به بعد ۴۰ دقیقه و در پایان موش ها پنج دقیقه سرد کردن را در شدت ۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه انجام دادند (۱۹). ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و پس از ۱۲-۱۰ ساعت ناشتایی، بافت برداری انجام شد. رت ها با تزریق صفاقی ترکیبی از کتامین (۹۰ میلی گرم به ازای هرکیلو وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن) بیهوش می شدند. سپس بافت بیضه آنها توسط متخصصین استخراج شده و پس از قرار دادن در کرایوتیوب در نیتروژن مایع قرار داده شدند وبرای بررسی های بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. درضمن کلیه مراحل فوق با مجوز شماره IR.DUMS.REC.1398.003 مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور دزفول قرار گرفت.

استخراج RNA بر اساس دستورالعمل کیت استخراج RNA ساخت شرکت یکتا تجهیز، با استفاده از محلول‌های کیت استخراج و پروتکل پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد. برای این منظور ۳۰ میلی گرم بافت بیضه را در نیتروژن مایع خشک و پس از کوبیدن در آونگ استریل، درون تیوب ۱/۵ قرار دادیم. اولین مرحله برای استخراج RNA از سلول‌های حیوانی از بین بردن دیواره ی سل ها با کمک یک بافر لیز کننده (در اینجا RB Buffer) می‌باشد. ۳۵۰ µl از RB Buffer به نمونه (رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ) اضافه شد (از قبل به ازای هر ۱ میلی‌لیتر ۱۰ میکرولیتر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 12:43 IRDT on Monday May 11th 2020

β– mercaptoethanol به بافر اضافه شده است) و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد Filter Column **درون** Collection Tube قرار گرفت و مخلوط نمونه به Filter Column انتقال داده شد و با دور ۱۴۰۰۰RPM به مدت ۲ دقیقه سانترفیوژ گردید. بعد از سانترفیوژ محلول روشن از Collection Tube به یک تیوپ میکروسانترفیوژ جدید انتقال یافت. سپس هم حجم آن یعنی ۳۵۰ µl اتانول ۷۰ درصد به ان اضافه گردید سپس به خوبی ورتکس شد. RB Mini Column درون Collection Tube قرار گرفت و نمونه ای را که اتانول به ان اضافه شده بود به RB Mini Column انتقال یافت و با سرعت ۱۴۰۰۰ RPM به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ گردید و محلول درون Collection Tube دور ریخته شد. در مرحله بعد ۵۰۰ µl از Wash Buffer1 به RB Mini Column اضافه گردید و با سرعت ۱۴۰۰۰ RPM به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ گردید و محلول درون Collection Tube را دور شد. در ادامه RB Mini Column با ۷۵۰ µl از Wash Buffer2 با سرعت ۱۴۰۰۰RPM به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ شد و محلول درون Collection Tube دور ریخته شد. این مرحله دوبار تکرار شد و سپس به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰RPM سانترفیوژ انجام شد. سپس RB Mini Column **درون** Elution Tube قرار داده شد؛ و ۵۰ µl از RNase-free ddH2O به RB Mini Column اضافه شد و ۱ دقیقه به آن زمان داده شد و بعد از ۱ دقیقه به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰RPM سانترفیوژ گردید. محلول درون Elution Tube، RNA های استخراج شده بود که در ۷۰- نگهداری شدند.

سنتز cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز (K1622) تهیه گردید. واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAid™M- MuLVReverse transcriptas صورت گرفت. هنگام آماده سازی و تهیه cDNA از نمونه تخلیص شده پس از قرائت جذب، حجمی شامل ۱۰۰۰ نانوگرم RNA برداشته سپس ۰/۵ میکرولیتر Random Hexamers (الیگودئوکسی ریبو نوکلوتید که به‌عنوان یک پرایمر برای شروع سنتز cDNA استفاده می‌شود)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر oligodT و سپس تا حجم ۱۲ میکرولیتر آب موجود در کیت اضافه گردید و به دمای ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه منتقل گردید و سپس به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. در مرحله بعد ۴µl از 5XReaction Buffer و ۲ µl از dNTP Mix و ۱ µl از RiboLock RNase Inhibitor **و** ۱ µl از RevertAid RT به ترکیب قبل که برای ۵ دقیقه در دمای ۶۵ قرار گرفته بود، اضافه شد. سپس ترکیب ابتدا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ قرارگرفت. بعد از آن به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ قرار گرفت. در آخر به منظور از کار افتادن آنزیم RT، تیوب های واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. cDNA آماده شده جهت انجام RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت یا جهت نگهداری به فریزر ۲۰C°- منتقل گردید. پس از بهینه سازی واکنش، cDNA مربوط به گروه‌های مورد آزمایش تحت واکنش RT-PCR قرار گرفتند. اصول انجام RT-PCR **مشابه** PCR معمولی بود؛ با این تفاوت که به جای MasterMix معمولی از MasterMix حاوی سایبرگرین (تاکارا) استفاده گردید. دمای اتصال برای همه پرایمرها ۶۰C° درجه بود. توالی پرایمرهای مورد استفاده نیز در جدول ۱ نشان داده شده است.

پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشرفلورسانس با محاسبه ΔΔCt میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت به GAP و حالت کنترل که فاقد محیط های تمایزی است، سنجیده شد؛ و سپس با استفاده از فرمول $^{-\Delta\Delta Ct}$ ۲ میزان بیان آن محاسبه گردید:

$$\Delta Ct = Ct\ interests - Ct\ GAPDH$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ Treat - \Delta Ct\ Un\ Treat$$

جدول ۱- توالی پرایمرهای BCL-2 و BAX

ژن	رفت (3´-5´)	برگشت (3´-5´)	سایز محصول (bp)
BAX	GCA AAC TGG TGC TCA AGG	CAG CCA CAA AGA TGG TCA	۸۷/۰۹
BCL -2	GAGTGGGATACTGGAGATGAAG	TGGTAGCGACGAGAGAAGT	۹۱/۵۷
GAP	AAGTTCAACGGCACAGTCAAG	CAG CCA CAA AGA TGG TCA	۸۰/۹۷

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 12:43 IRDT on Monday May 11th 2020

در این مطالعه جهت بررسی طبیعی بودن توزیع یافته‌ها از آزمون شاپیرو ویلکز و همچنین جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) همراه با مقایسه میانگین های تعقیبی توکی نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد.

یافته‌ها

یافته‌های این پژوهش نشان داد که میزان بیان ژن BAX بافت بیضه در تمام گروه‌های با گروه کنترل اختلاف معناداری دارند، این اختلاف همانطور که در (جدول ۲) نشان داده شده است گروه آزمایشی دوکسوروبیسین+ تمرین+ کروسین (T3) کمترین اختلاف میانگین (۰/۰۰۰۸) و اختلاف میانگین با گروه شم (T1) با بیشترین اختلاف میانگین (۰/۰۰۶۱) را دارا می‌باشد و این اختلاف میانگین درسطح P ≤ ۰/۰۵ معنادار است (شکل ۱).

میزان بیان ژن BCL-2 در بافت بیضه با توجه به (جدول ۲) همه میانگین‌ها با گروه کنترل تفاوت معناداری درسطح P≤ ۰/۰۵ دارند، یعنی میانگین گروه‌های دیگر از میانگین گروه کنترل پایین تر هستند. در بین این گروه ها، گروه آزمایشی دریافت دوکسوروبیسین+ تمرین+ کروسین (T3) با اختلاف میانگین (۰/۰۲۲) کمترین و گروه آزمایشی دریافت دوکسوروبیسین (T1) با اختلاف (۰/۰۰۵) بیشترین اختلاف میانگین را دارا می‌باشد (شکل ۲).

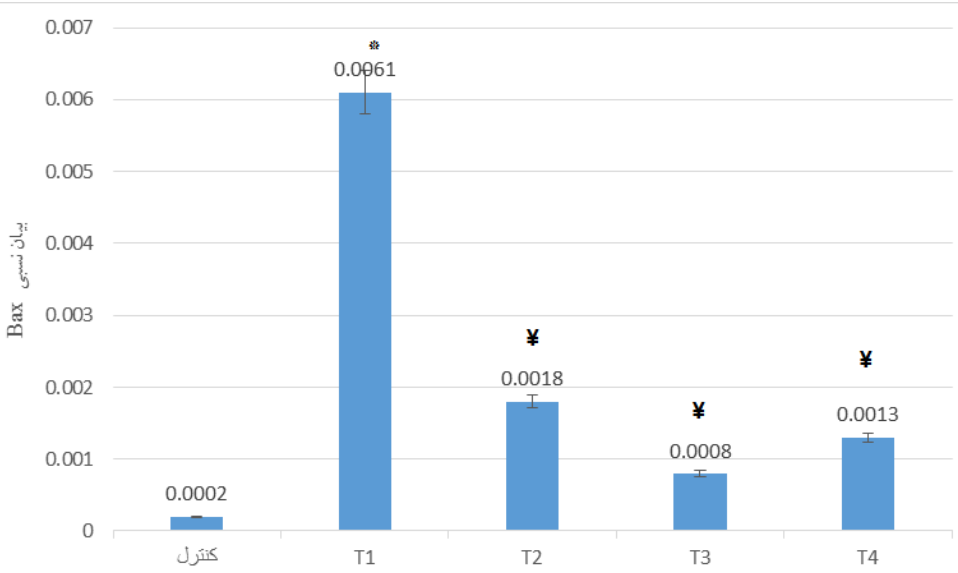
و اما میزان شاخص بیان ژن BAX/BCL-2 در بافت بیضه (جدول ۲) اختلاف میانگین معناداری بین گروه‌ها درسطح P≤۰۵ وجود دارد که نشان می دهد سایر گروه‌ها بیشتر از گروه کنترل هستند. به این ترتیب که گروه آزمایشی دوکسوروبیسین+ تمرین+ کروسین (T3) با اختلاف میانگین (۰/۰۳۵۹) کمترین و گروه آزمایشی دوکسوروبیسین (T1) با اختلاف میانگین (۱/۱۷) بیشترین اختلاف را نشان می دهد (شکل ۳).

طبق تحقیقات انجام شده بر روی بافت بیضه گروه ها

جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص‌های BAX، BCL-2، و نسبت BAX/BCL-2 در گروه‌های مورد مطالعه

گروه	کنترل	T1	T2	T3	T4	F	sig
Bax	۰/۰۰۰۲± ۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۱۶± ۰/۰۰۶۱	۰/۰۰۰۳± ۰/۰۰۱۸	۰/۰۰۰۴± ۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۲± ۰/۰۰۱۳	۲۵/۷۸	۰/۰۰۱
Bcl-2	۰/۰۰۱۵± ۰/۰۳۳	۰/۰۰۰۳± ۰/۰۰۵۲	۰/۰۰۰۸± ۰/۰۰۶۹	۰/۰۰۵۹± ۰/۰۲۲۳	۰/۰۰۵۵± ۰/۰۱۸۴	۲۲/۲۳	۰/۰۰۱
Bax/Bcl- 2	۰/۰۰۰۶± ۰/۰۰۵۸	۳۷± ۱/۱۷	۰/۰۸۶۴± ۲۶۳۵	۰/۰۱۱۴± ۰/۰۳۵۹	۰/۰۱۸۶± ۰/۰۷۲۴	۲۲/۹۳	۰/۰۰۱

T1: گروه آزمایشی دریافت کننده دوکسوروبیسین؛ T2 گروه آزمایش دریافت کننده دوکسوروبیسن+ تمرین. T3 گروه آزمایشی دریافت کننده دوکسوروبیسین+ تمرین+ کروسین؛ T4 گروه آزمایشی دریافت کننده دوکسوروبیسین+ کروسین



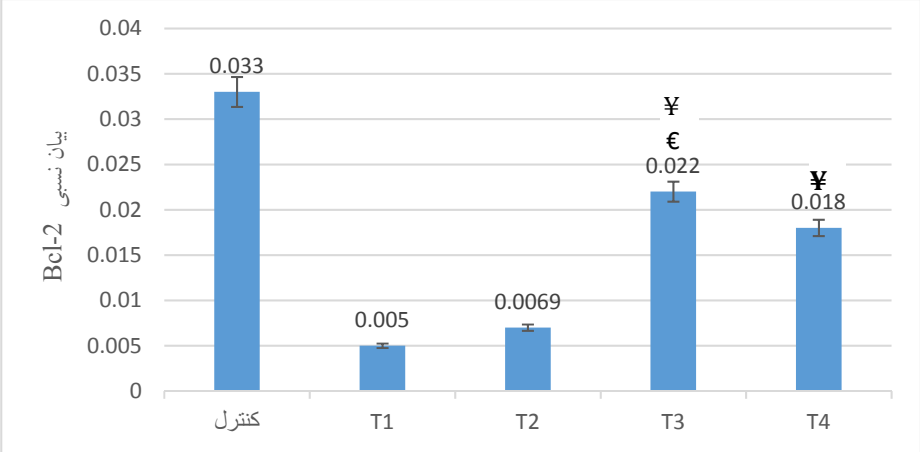
*افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل، ¥ کاهش معنی دار نسبت به گروه T1 (دوکسوربیسین)

شکل ۱- بیان ژن Bax درگروه های پنج گانه تحقیق

www.SID.ir

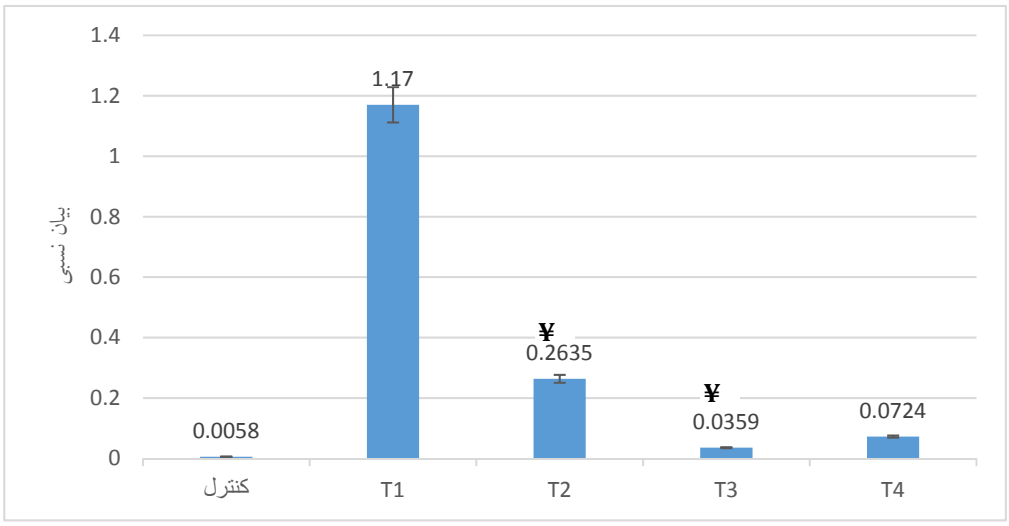
Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 12:43 IRDT on Monday May 11th 2020



*کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل، ¥ افزایش معنی دار نسبت به گروه T1 (دوکسوربیسین)، € افزایش معنی دار نسبت به گروه T2 (تمرین + دوکسوربیسین)

شکل ۲- بیان ژن Bcl-2 در گروه های پنج گانه تحقیق



¥ کاهش معنی دار نسبت به گروه T1 (دوکسوربیسین)، * افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل

شکل ۳- بیان ژن Bax/Bcl-2 درگروهای پنج گانه تحقیق

و همچنین مشاهده گروه کنترل نشان دهنده ی تاثیر دارو و تمرین بر روی روند درمان بوده است که عکس بافت گروه‌ها میزان بهبود بافت‌ها را نشان می‌دهد.

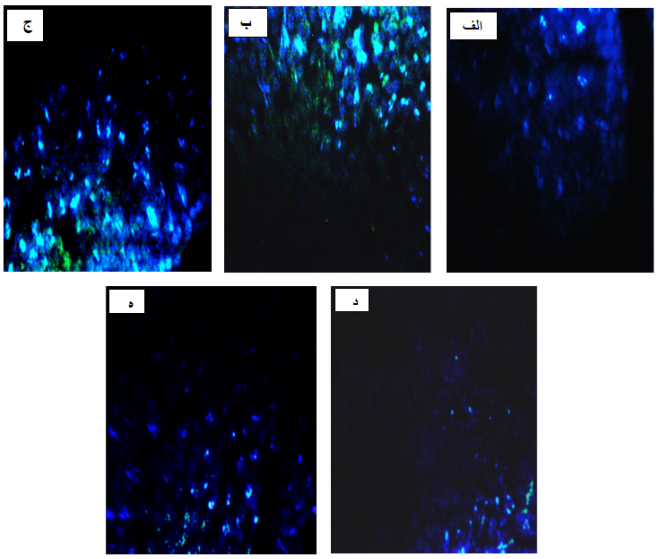
بحث و نتیجه‌گیری

در رابطه با اثر تمرینات ورزشی بر آپوپتوز نیز مطالعات متعددی صورت گرفته است. به‌عنوان مثال: در این زمینه وولگاموت و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که یک برنامه تمرین دویدن ۱۲ هفته ای روی تردمیل باعث کاهش بیان BAX در عضله دوقلوی رت های پیر می‌شود (۲۰). سطوح BCL-2 در جوندگان تمرین کرده افزایش یافت که به کاهش نسبت BAX به BCL-2 منجر می‌شود و در نتیجه مقدار قطعه قطعه شدن DNA آپوپتوزی تا حد (BCL-X, BCL-2) چشم گیری توسط ورزش جبران شد (۱۴). همچنین کواک و همکاران (۲۰۰۶) اثر محافظتی تمرین ورزشی را در برابر آپوپتوز افزایش یافته از طریق کاهش سطح کاسپاز ۹ و نسبت BAX به BCL-2 را نشان دادند (۲۱). پژوهش های قبلی نشان داده اند که تمرین ورزشی در سالمندی، سطوح کاسپاز ۹ و نسبت BAX /BCL-

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 12:43 IRDT on Monday May 11th 2020



شکل ۴- الف (گروه کنترل): نمای ازسلول بافت بیضه که ساختار آن طبیعی میباشد با میکروسکوپ فلورسنت، نمای عکس ۴۰۰. ب (T1) : نمایی ازسلول‌های بافت بیضه گروه آزمایشی دوکسوروبیسین با میکروسکوپ فلورسنت که نقاط روشن آبی مایل به سبز آپوپتوز ایجاد شده در اثردوکسوروبیسین با نمای عکس ۴۰۰. ج (T2) : نمای ازسلولهای بافت بیضه گروه آزمایشی دریافت کننده دوکسوروبیسین+ تمرین با میکروسکوپ فلورسنت که نقاط روشن آبی کم رنگ سبزآپوپتوزایجاد شده دراثردوکسوروبیسین ، با نمای عکس ۴۰۰ . د (T3) : نمایی ازسلولهای بافت بیضه گروه آزمایشی دوکسوروبیسین+ تمرین+ کروسین با میکروسکوپ فلورسنت که نقاط آبی پر رنگ سلول های که دراثر تمرین و کروسین بهبودی پیدا کرده و آن نقاط روشن آبی کم رنگ مایل به سبز آپوپتوز ایجاد شده می باشد با نمای عکس ۴۰۰ . ه (T4) : نمایی ازسلولهای بافت بیضه گروه آزمایشی دوکسوروبیسین+ کروسین با میکروسکوپ فلورسنت که نقاط آبی پر رنگ سلول های که در اثر دریافت کروسین بهبودی پیدا کرده و نقاط سبزرنگ سلول های آپوپتوزایجاد شده که نسبت به گروه (T1) کمتر می باشد، بخاطرمصرف کروسین با نمای عکس ۴۰۰.

2را از طریق کاهش بیان پروتئین BAX و افزایش سطوح BAX، BCL-2، کاهش می دهد(۲۲). سانگ و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که ۱۲ هفته تمرینات ورزشی، میزان آپوپتوز و نسبت BAX به BCL-2 ناشی از پیری را در بطن چپ موش‌های پیر کاهش می‌دهد. یافته‌ها کاهش سطوح پروتئین BAX در گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل و همچنین افزایش سطوح پروتئین BCL-2 را نشان داد (۲۳). فرناندز و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند که ۱۰ هفته تمرین منظم شنا در موش‌های نر باعث افزایش پروتئین‌های ضد آپوپتوز و کاهش پروتئین‌های طرفدار آپوپتوز (BAD) می‌گردد و در ادامه با فسفوریلاسیون BAD و کاهش نسبت BAD به BCL-2 همراه است (۲۴). اولا و همکاران در سال ۲۰۱۵ تحقیقی را با هدف بررسی اثرات ورزش حاد وامانده ساز بر قلب در مدل موش های آزمایشگاهی انجام دادند. نتایج تجزیه و تحلیل بیان ژن میوکارد نشان داد آنزیم های آنتی اکسیدان پس از ورزش کامل افزایش یافته بود. و افزایش نسبت BAX به میزان BCL-2 نشان دهنده ی افزایش سیگنالینگ آپوپتوز شد و ورزش کامل توانست منجر به اختلال در سیستم ماتریکس میتوکندری شود. به‌طور کلی نتیجه گرفتند که ورزش کامل موجب افزایش آپوپتوز و اختلال در تنظیم متابولیسم و اختلال در متابولیسم ماتریکس میتوکندری می‌شود (۲۵). سانتانا و همکاران در سال ۲۰۱۴ پژوهشی را با عنوان "تمرینات هوازی موجب القا ضد آپوپتوز در بافت قلب موش های صحرایی می گردد" انجام دادند. نتایج نشان داد تمرینات ورزشی موجب افزایش معنی دار بیان ژن‌های ضد آپوپتوز (BCL-2) و کاهش معنی دار بیان ژن عوامل آپوپتوزی (BAX) می گردد. به‌طور کلی یافته های این تحقیق نشان داد تمریات ورزشی می‌تواند موجب افزایش عوامل ضد آپوپتوزی شود (۲۶). شریفی و همکاران (۱۳۹۵) در تحقیقی نتایج نشان داد تزریق دوکسوروبیسین موجب افزایش معنادار بیان ژن BAXو نسبت BAX/BCL-2 و کاهش جزئی بیان ژن BCL-2 شد. از طرفی انجام تمرین هوازی قبل و طی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 12:43 IRDT on Monday May 11th 2020

القای دوکسوروبیسین از افزایش نسبت BAX/BCL-2 و کاهش بیان ژن BCL-2 ناشی از تزریق دوکسوروبیسین پیشگیری کرد (۲۷) با توجه به کاهش معنادار در نسبت BAX/BCL-2 در قلب موش های گروه تمرین کرده درمان شده با دوکسوروبیسین نتیجه گرفته شد که تمرین ورزشی هوازی قبل و طی درمان دوکسوروبیسین احتمالاً می تواند به‌عنوان راهبرد غیر دارویی، موجب محافظت سلول های قلب از آپوپتوز ناشی از القای دوکسوروبیسین شود. از طرفی دیگر، در حال حاضر مصرف بعضی از گیاهان دارویی برای درمان و پیشگیری برخی بیماری‌ها افزایش یافته است. بنابراین با توجه به این که مصرف مکمل های گیاهی در مقایسه با داروهای شیمیایی اثرات جانبی کمتری دارد، احتمالاً استفاده از این مکمل های گیاهی در برخی موارد می‌تواند جایگزین مناسبی برای دارو درمانی باشد (۲۸) استفاده های سنتی از گیاه زعفران و مواد موثره آن از جمله کروسین مورد تائید و تصدیق قرار گرفته است. نشان داده شده است که کروسین غلظت چربی پلاسما، استرس اکسیداتیو و سایتوکاین‌های التهابی را بهبود می بخشد (۲۹، ۲۸).

تارانتیلیس گزارش کرد که رنگ دانه های موجود در کلاله زعفران از گروه کاروتنوئیدهای دارای عامل کربوکسیل هستند و یکی از رنگ دانه های محلول در چربی آن بتاکاروتن است (۲۹) که این ماده قادر است با حذف رادیکال آزاد اکسیژن واسطه‌ای (O2-0 و O2) واکنش زنجیره ای اکسیداسیون این رادیکال‌ها را خاتمه دهد و با اکسید کردن خود از اکسیداسیون سایر مولکول ها جلوگیری کند (۳۰). بنابراین اثر عصاره زعفران در مطالعه حاضر با نتایج تحقیقات انجام شده مطابقت دارد. علی‌رغم خواص دارویی زیادی که برای زعفران و تمرین هوازی ذکر شده است و نیز اثر آنتی اکسیدانی آن ها، مطالعات کمی در مورد اثرات این گیاه وتمرین هوازی بر روی دستگاه تناسلی وجود دارد.

در رابطه با اثر کروسین بر BCL-2 و BAX مطالعه صدوقی در سال ۱۳۹۶ بود که نشان داد دریافت ۰/۵ میلی لیتر کروسین موجب کاهش BAX و افزایش BCL-2 و آنزیم های آنتی اکسیدانی می گردد با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی موجب کاهش روند آپوپتوز می گرد. با این وجود کروسین اثر محافظتی بر عملکرد کلیه موش های صحرایی دیابتی دارد (۳۱) که نتایج مطالعه ی آنها همسو با مطالعه ی حاضر می‌باشد.

بررسی ها نشان داد که منابع در مورد بررسی اثرات تعاملی تمرینات ورزشی و عصاره زعفران و کروسین بر شاخص‌های آپوپتوزی بسیار معدود و اثرات ضد آپوپتوز همسو بودند که از دلایل احتمالی را می‌توان به مکانیسم مولکولی گیاه زعفران و خواص ضد التهابی آن بیان نمود. از این جهت مطالعه ای مناسب جهت مقایسه با مطالعه حاضر یافت نشد.

استفاده ازدوکسوروبیسین منجر به آسیب بافتی وایجاده آپوپتوز می‌شود که به دنبال انجام تمرینات تداومی ومصرف کروسین سیستم دفاع سلولی سعی در برقراری تعادل و با افزایش آنزیمهای آنتی اکسیدانی در مقابل استرس اکسیداتیوها و رادیکال ها آزاد را دارد. احتمالاً تمرینات تداومی به همراه کروسین سبب افزایش بیشتر سطوح دفاع سلولی و فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی و جلوگیری از فعالیت رادیکالهای آزاد می شود. با افزایش فعالیت آنتی اکسیدان BCL-2، اثرات مفیدی بر کاهش میزان BAX و نسبت BAX/BCL-2 داشته است.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر گرفته از رساله ی دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی میباشد. تحقیق بدون حمایت مالی انجام شده، وازرحمات استاد ارجمند دکترسید علی حسینی واحد دانشگاه آزاد مرودشت، وخانم مریم روحانی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Templeton A, Fraser C, Thompson B. The epidemiology of infertility in Aberdeen. BMJ. 1990;301(6744):148-52.

2. Hauser R, Paz G, Botchan A, Yogev L, Yavetz H. Varicocele and male infertility: Part II: Varicocele: effect on sperm functions. Hum Reprod Update. 2001;7(5):482-5.

3. Hou M, Chrysis D, Nurmio M, Parvinen M, Eksborg S, Söder O, et al. Doxorubicin induces apoptosis in germ line stem cells in the immature rat testis and amifostine cannot protect against this cytotoxicity. Cancer Res. 2005;65(21):9999-10005.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 12:43 IRDT on Monday May 11th 2020

4. Suominen JS, Linderborg J, Nikula H, Hakovirta H, Parvinen M, Toppari J. The effects of mono-2-ethylhexyl phathalate, adriamycin and N-ethyl-N-nitrosourea on stage-specific apoptosis and DNA synthesis in the mouse spermatogenesis. Toxicol Lett. 2003;143(2):163-73.

5. Yeh YC, Lai HC, Ting CT, Lee WL, Wang LC, Wang KY, et al. Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. Biochem Pharmacol. 2007;74(7):969-80.

6. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. Aging (Albany NY). 2012;4(5):330.

7. McMillan EM, Graham DA, Rush JW, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. J Appl Physiol. 2012;113(7):1048-57.

8. Konstantinidis K, Whelan RS, Kitsis RN. Mechanisms of cell death in heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32(7):1552-62.

9. Gorji SM, Malekshah A. Effect of doxorubicin on Bcl2 and Bax expression in Rat heart. J Gorgan Uni Med Sci. 2013;15(1).

10. Siahkohian M, Asgharpour-Arshad M, Bolboli L, Jafari A, Hesari FS. Effect of 12-weeks aerobic training on some indices of skeletal muscle apoptosis in male rats. Majallah-i pizishki-i Danishgah-i Ulum-i Pizishki va Khadamat-i Bihdashti-i Darmani-i Tabriz. 2018;39(6):35-43.

11. Amidi F, Ebrahimi S, Abbasi M, Yazdani M, Ghasemi S. Effects of saffron extract on sperm parameters in rats with experimentally induced varicocele. J Qazvin Uni Med Sci. 2014;18(5):4-11.

12. Hosseinzadeh H, NassiriAsl M. Avicenna's (Ibn Sina) the canon of medicine and saffron (Crocus sativus): a review. Phytother Res. 2013;27(4):475-83.

13. Hosseinzadeh H, Modaghegh MH, Saffari Z. Crocus sativus L.(Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. Evid-Bas Complem Alter Med. 2009;6(3):343-50.

14. Minigh J. Saffron in the treatment of premenstrual syndrome. HerbalGram. 2008.

15. Ohara O, Gahara Y, Miyake T, Teraoka H, Kitamura T. Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene. J Cell Biol. 1993;121(2):387-95.

16. Radák Z, Sasvári M, Nyakas C, Pucsok J, Nakamoto H, Goto S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. Arch Biochem Biophysic. 2000;376(2):248-51.

17. Pope Jr HG, Wood RI, Rogol A, Nyberg F, Bowers L, Bhasin S. Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an Endocrine Society scientific statement. Endocrine Rev. 2013;35(3):341-75.

18. Frias MA, Lang U, Gerber-Wicht C, James RW. Native and reconstituted HDL protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis. Cardiovasc Res. 2009;85(1):118-26.

19. Oharomari LK, Garcia NF, de Freitas EC, Júnior AAJ, Ovídio PP, Maia AR, et al. Exercise training and taurine supplementation reduce oxidative stress and prevent endothelium dysfunction in rats fed a highly palatable diet. Life Sci. 2015;139:91-6.

20. Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. Sci World J. 2010;10:340-9.

21. Kwak H-B, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. FASEB J. 2006;20(6):791-3.

22. Daud DM, Karim AAH, Mohamad N, Hamid NAA, Wan Ngah W. Effect of exercise intensity on antioxidant enzymatic activities in sedentary adults. Malays J Biochem Mol Biol. 2006;13(11):37-7.

23. Song W, Kwak H-B, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. Antioxid Redox Signal. 2006;8(3-4):517-28.

24. Fernandes T, Magalhães FdC, Carmo ECd, Oliveira EMd. Aerobic exercise training inhibits skeletal muscular apoptotic signaling mediated by VEGF-VEGR2 in spontaneously hypertesive rats. Revista Brasileira de Medicina do Esporte. 2012;18(6):412-8.

25. Oláh A, Németh BT, Mátyás C, Horváth EM, Hidi L, Birtalan E, et al. Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model. International journal of cardiology. 2015;182:258-66.

26. Santana ET, Serra AJ, Silva Junior JA, Bocalini DS, Barauna VG, Krieger JE, et al. Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. Motriz: Revista de Educação Física. 2014;20(2):233-8.

27. Sharifi F, Roshan V, Mazaheri Z. Effect of Pretreatment of Aerobic Training on Doxorubicin-induced Left Ventricular Apoptosis Gene Expression in Aging Model Rats. Pathobiol Res. 2016;43(2):19-29.

28. Sasaki JI, Kita T, Ishita K, Uchisawa H, Matsue H. Antibacterial activity of garlic powder against Escherichia coli O-157. J Nutr Sci Vitaminol. 1999;45(6):785-90.

29. Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. J Chromatography A. 1994;664(1):55-61.

30. Duru NK, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane

www.SID.ir

Archive of SID

integrity of human spermatozoa. Fertil Steril. 2000;74(6):1200-7.

31. Sadoughi S. Effect of crocin on Bax/Bcl-2 ratio, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in liver tissue of chick embryo treated with silver nanoparticles. Horiz Med Sci. 2017;23(4):293-9.

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 12:43 IRDT on Monday May 11th 2020

www.SID.ir