



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

کیانوش دارش: دانشجوی دکتری، فیزیولوژی ورزشی، واحد شوستر، دانشگاه آزاد واحد اسلامی، شوستر، ایران

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

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

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

تمرین تداومی،  
کروسین،  
دوکسوروبیسین،  
بیضه،  
آپوپتوz

**زمینه و هدف:** مطالعات نشان داد که فعالیت بدنی و مصرف گیاه دارویی زعفران در بیمارانی که مشکل بیضه دارند و افرادی که مستعد آپوپتوz هستند را تحت تاثیر قرار می‌دهند، کروسین غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی هستند تعداد اسپرم، قدرت، حرکت و قابلیت مورفو‌لوژیکی اسperm 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 القاء آپوپتوz 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 به صورت گاواز 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 انتهای‌های هفت‌هه دوم تا انتهای هفت‌هه هفتم، گروه کنترل تهها نرمال سالین به همان میزان دوکسوروبیسین در یافته کردند، گروه‌های تمرین تداومی به مدت ۸ هفته، ۵ جلسه در هفته به ترتیب ۱۶، ۱۴، ۱۲، ۱۰ دقیقه بر روی نوارگردان دویذن، ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین و پس از ۱۰-۱۲ ساعت ناشتاپی شبانه، پس از بیهوشی حیوانات نمونه‌های خونی و بافتی جمع‌آوری شد، سپس سطوح Bax و Bcl-2 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  $P \leq 0.05$  آنالیز شدند.

**یافته‌ها:** تمرین تداومی+کروسین+دوکسوروبیسین اثر معنی‌داری بر کاهش Bax و نسبت Bcl-2 / Bax و افزایش Bcl-2 داشت که گروه آزمایشی دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین کمترین اختلاف میانگین ( $0.0008 \pm 0.0001$ ) و اختلاف میانگین با گروه شم با پیشترین اختلاف میانگین ( $0.0061 \pm 0.0001$ ) را دارا می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ).

**نتجه‌گیری:** 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.

#### 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 به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



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

### 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.



## مقاله پژوهشی



## مقدمه

میان گلیکوزیدهای کاروتینوئیدی محلول در آب، کروسین اهمیت بیشتری دارد. از کل مقدار کروسین موجود در کلاله زعفران ۹۴ درصد آن به صورت ترکیب گلیکوزیدی در کروسین و ۶ درصد آن به صورت کروستین آزاد است. پیکروکروسین و سافرانال عامل طعم، عطر و آنتیاکسیدانی زعفران هستند (۱). مهم‌ترین ترکیبات موجود در کلاله گیاه زعفران عبارت اند از: کارتونوئیدها (مانند کروستین، کروسین، آلفا کاروتین، لیکوپن، زاگرانتین)، آلدیدهای مونوتربن، مونوتربنونوئیدها (مانند کروکوساتین‌ها)، ایزوفرون‌ها و فلاونونوئیدها (۱۲). عصاره زعفران، کروسین و سافرانال مانع عمل بیرنگ کنندگی رادیکال‌ها می‌شوند و مقدار آن‌ها در عصاره الكلی 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 بدنه 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 می‌دهد ولی ورزش منظم با کاهش بیماری‌های وابسته به استرس اکسیداتیو همراه بوده و متوسط طول عمر را افزایش می‌دهد. 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 می‌گیرد (۱۶). پاپ جونیور و همکاران نیز نشان دادند که ۳ ماه تمرین ورزشی هوایی باعث کاهش معناداری در بیان ژن Bax و Bax/Bcl-2 نسبت به گروه کنترل در موش‌ها شد (۱۷)؛ بنابراین استفاده از دوکسوروویسین منجر به آسیب بافتی و ایجاد آپوپتوز می‌شود، بنابراین با توجه به اهمیت چگونگی طراحی برنامه‌های تمرینی و مصرف کروسین (عصاره زعفران) برای حصول نتایج

باروری در تداوم و ثبات زندگی زوجین نقش مهمی دارد به طور کلی در تمام دنیا ۱۵ درصد افراد ناباروند (۱). تقریباً ۵۰ درصد ناباروری مربوط به عوامل مردانه است. علل ناباروری در مردان شامل موتاسیون‌های ژنی، آنولپلودی، بیماری‌های عفونی، انسداد مجراء، واریکوسل، شیمی درمانی رادیوتروپی و اختلال‌های انزالی است (۲). اگرچه دوکسوروویسین دارویی بسیار قدرتمند و کارآمد در شیمی درمانی محسوب می‌شود، از معایب آن می‌توان به کشنن سلول‌های سالم اشاره کرد به ویژه سلول‌هایی که به طور مدام و با سرعت زیاد در حال تکثیر هستند ساند سلول‌های نطفه‌ی مذکور. از دیگر عوارض جانبی دوکسوروویسین مرگ سلول نطفه‌ای می‌باشد (۳-۵). 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 نوکلئیدها و شکل‌گیری اجسام آپوپتیکی (۶-۸) آپوپتوز در تکثیر و حذف سلول‌های پیش سرطانی در بافت‌های میتووزی بزرگ‌سالان مهم است و بی‌نظمی آپوپتوز به عنوان مکانیسم اساسی بسیاری از بیماری‌ها تشخیص داده شده در پاسخ به حرکت‌های آپوپتوزی که تنوعی از سیگنال‌های درونی و بیرونی، بیان ژن‌هایی را تنظیم و شروع آپوپتوز را کنترل می‌کنند (۹). خانواده‌ی پروتئین Bcl-2 به عنوان تنظیم‌کننده‌های بالا دست آپوپتوز شامل پروتئین‌های Bcl-2 و Bax به عنوان پروتئین‌های کلیدی مشهور در شکل‌گیری کانال‌های آپوپتوزی و تنظیم پیام‌های آپوپتوز میتوکندریایی شناخته شده‌اند (۱۰). زعفران (Officinarum Saffron) یا Crocus تکلیف‌های، تیره زنبق و جنس کروکوس یا زعفران است. رنگدانه‌های موجود در کلاله زعفران از گروه کاروتینوئیدهای دارای کربوکسیل است. از

ورزشی مدرج با شیب صفر درجه اجرا شد. بدین منظور، ابتدا دویدن رت‌ها 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 رت‌ها دیگر قادر به دویدن نباشند. برنامه تمرین اصلی به صورت ابتدا به مدت ۵ دقیقه باشدت ۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت بیشینه بر روی نوارگردان گرم کرده سپس با شدت ۶۰ درصد سرعت بیشینه در هفته اول؛ ۶۵ درصد بیشینه در هفته دوم؛ ۷۰ درصد سرعت بیشینه از هفته سوم به بعد تمرین روی نوارگردان را انجام دادند. و در انتها رت‌ها پنج دقیقه سرد کردن را در باشدت 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، واژ ابتدای هفته چهارم به بعد ۴۰ دقیقه و در پایان موش‌ها 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 ۱۰-۱۲ ساعت ناشستایی، بافت برداری انجام شد. رت‌ها با تزریق صفاقی ترکیبی از کتامین (۰ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن) بیهوش می‌شدند. سپس بافت بیضه آنها توسط متخصصین استخراج شده و پس از قرار دادن در کرایوتیوب در نیتروژن مایع قرار داده شدند و برای بررسی های بعدی در دمای -۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در ضمن 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 دیواره‌ی سل‌ها با کمک یک بافر لیز کننده (در اینجا RB Buffer (RB Buffer می‌باشد.  $1\text{mL}$  از (رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ) اضافه شد (از قبل به ازای هر ۱ میلی‌لیتر ۱۰ میکرولیتر

بهتر و جلوگیری از اتلاف هزینه و ناکافی بودن مطالعات درباره اثر تمرینات تداومی و مصرف کروسین در طولانی مدت بر دفاع ضد آپوپتوz و همچنین وجود تنافض در رابطه با اثر فعالیت ورزشی و مصرف کروسین بر تقابل‌های شاخص‌های آپوپتیک، پژوهش حاضر آثار ۸ هفته‌ای تمرین تداومی و مصرف کروسین (عصاره زعفران) را بر میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی بر شاخص‌های آپوپتیک بافت بیضه موش‌های نرویستار تحت آلقائی آپوپتوz مورد بررسی قرار می‌دهد.

## روش کار

در این تحقیق تجربی ابتدا ۴۰ سرعت 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 ۵۰±۵ ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی ۵۰٪ درصد و نور کنترل شده (چرخه ۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی) نگهداری شده و دوره سازش پذیری ۱۰ روزه را طی کردند. تمام گروه‌ها بجز گروه کنترل، دوکسوروبیسین به میزان (۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به وسیله سرنگ انسولینی به صورت 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). رت‌ها 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  $50\text{ mg/kg}$  کروسین (حل شده در نرمال سالین) به مدت ۸ هفته به صورت خوراکی (گواژ) دریافت کردند (۱۸). پروتکل تمرین: جهت برآورد حداکثر سرعت دویدن، آزمون عملکرد

نمونه تخلیص شده پس از قرائت جذب، حجمی شامل ۱۰۰۰ نانوگرم RNA برداشته سپس ۰/۵ میکرولیتر Random Hexamers (الیگوڈئوکسی ریبو نوکلوتید که به عنوان یک پرایمیر برای شروع سنتز cDNA استفاده می‌شود)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمیر oligoT 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 بخ قرار گرفت. در مرحله بعد ۴  $\mu$ l از ۵XReaction Buffer و ۲  $\mu$ l از dNTP Mix و RiboLock RNase Inhibitor ۱  $\mu$ l 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 قرار گرفت. 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. آماده شده جهت انجام RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت یا جهت نگهداری به فریزر  $^{\circ}$ ۲۰- منتقل گردید. پس از بهینه سازی واکنش، cDNA مربوط به گروههای مورد آزمایش تحت RT-PCR قرار گرفتند. اصول انجام RT-PCR مشابه PCR معمولی بود؛ با این تفاوت که به جای MasterMix معمولی از MasterMix حاوی سایبر گرین (تاکارا) استفاده گردید. دمای اتصال برای همه پرایمیرها  $^{\circ}$ ۶۰ درجه بود. توالی پرایمیرهای مورد استفاده نیز در حدود ۱ نشان داده شده است.

پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبني بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و ميزان نشرفلورسانس با محاسبه  $\Delta\Delta Ct$  ميزان تغيير در بيان ژن مورد نظر نسبت به GAP و حالت كنترل که فاقد محبيط هاي تمائيزی است، سنجيده شد؛ و سپس با استفاده از  $\Delta\Delta Ct$  ميزان بيان آن محاسبه گردید:

فرمول  $-2\Delta\Delta Ct$  میزان بیان آن محاسبه گردید:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{interests}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Treat} - \Delta Ct_{UnTreat}$$

بعد از گرفتن نمونه به درون Collection Tube قرار داده شد. در مرحله ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله ۲ دقیقه سانترفیوژ Collection Tube با دور ۱۴۰۰۰ RPM به مدت ۲ دقیقه سانترفیوژ شد و با دور ۱۴۰۰۰ RPM به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ محلول روشن از Collection Tube به یک تیوب میکروسانترفیوژ جدید انتقال یافت. سپس هم حجم آن یعنی ۳۵۰ µl اتانول ۷۰ درصد به RB Mini Column قرار گرفت و نمونه درون Collection Tube به RB Mini ای را که اتانول به ان اضافه شده بود به ۱۴۰۰۰ RPM انتقال یافت و با سرعت Column مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ گردید و محلول درون Collection Tube دور ریخته شد. در مرحله بعد ۵۰۰ از RB Mini Column به Wash Buffer1 به مدت ۱ دقیقه گردید و با سرعت ۱۴۰۰۰ RPM از Wash Buffer2 به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ گردید و محلول درون Collection Tube دور ریخته شد. این مرحله دوبار تکرار شد و سپس به مرحله ۳ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ RPM سانترفیوژ انجام شد. سپس RB Mini Column درون Elution Tube به آن زمان داده شد. در مرحله ۱ دقیقه به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ RPM سانترفیوژ گردید. محلول درون Elution Tube، RNA های استخراج شده بود که در ۷۰- نگهداری شدند.

سنتز cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت فرمانتاز (K1622) تهیه گردید. واکنش رونویسی RevertAid<sup>TM</sup>M- معکوس با استفاده از آنزیم MuLVReverse transcriptas آماده سازی و تهییه cDNA از

## جدول ۱ - توالی پر ایمراهای BAX و BCL-2

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

(جدول ۲) همه میانگین‌ها با گروه کنترل تفاوت معناداری در سطح  $P \leq 0.05$  دارند، یعنی میانگین گروه‌های دیگر از میانگین گروه کنترل پایین‌تر هستند. در بین این گروه‌ها، گروه آزمایشی دریافت دوکسوروبیسین + تمرین + کروسین (T3) با اختلاف میانگین ( $0.022$ ) کمترین و گروه آزمایشی دریافت دوکسوروبیسین (T1) با اختلاف ( $0.005$ ) بیشترین

اختلاف میانگین را دارا می‌باشد (شکل ۲).

اما میزان ساختاری بیان زن BAX/BCL-2 در بافت بیضه (جدول ۲) اختلاف میانگین معناداری بین گروه‌ها در سطح  $P \leq 0.05$  وجود دارد که نشان می‌دهد سایر گروه‌ها بیشتر از گروه کنترل هستند. به این ترتیب که گروه آزمایشی دوکسوروبیسین + تمرین + کروسین (T3) با اختلاف میانگین ( $0.0359$ ) کمترین و گروه آزمایشی دوکسوروبیسین (T1) با اختلاف میانگین ( $0.017$ ) بیشترین اختلاف را نشان می‌دهد (شکل ۳).

طبق تحقیقات انجام شده بر روی بافت بیضه گروه‌ها

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 میانگین‌های تعقیبی توکی نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد.

### یافته‌ها

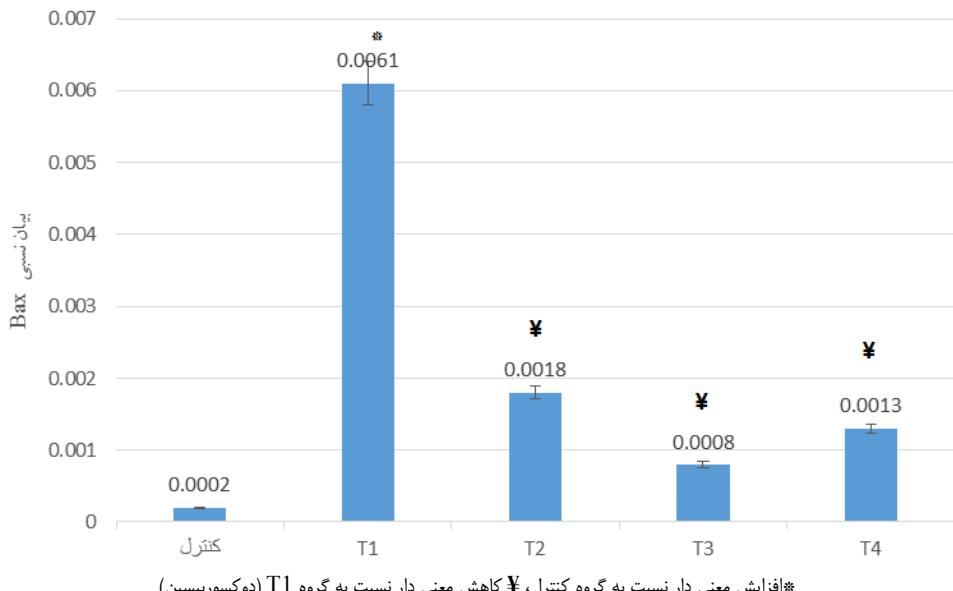
یافته‌های این پژوهش نشان داد که میزان بیان زن BAX بافت بیضه در تمام گروه‌های با گروه کنترل اختلاف معناداری دارند، این اختلاف همانطور که در (جدول ۲) نشان داده شده است گروه آزمایشی دوکسوروبیسین + تمرین + کروسین (T3) کمترین اختلاف میانگین ( $0.0008$ ) و اختلاف میانگین با گروه شم (T1) با بیشترین اختلاف میانگین ( $0.0061$ ) را دارد می‌باشد و این اختلاف میانگین در سطح  $P \leq 0.05$  معنادار است (شکل ۱).

میزان بیان زن BCL-2 در بافت بیضه با توجه به

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

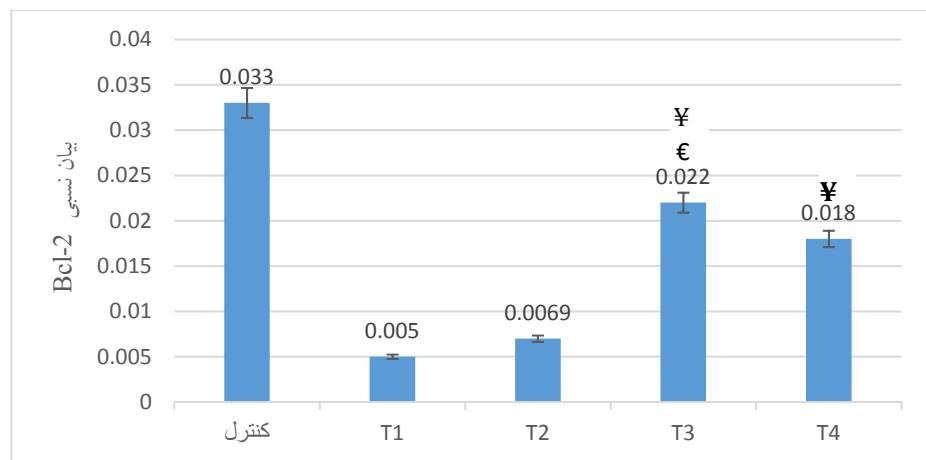
گروه	کنترل	T1	T2	T3	T4	F	sig
Bax	/.../.../...	/.../.../...	/.../.../...	/.../.../...	/.../.../...	25/78	/0.01
Bcl-2	/.../.../...	/.../.../...	/.../.../...	/.../.../...	/.../.../...	22/23	/0.01
Bax/Bcl- 2	/.../.../...	/.../.../...	/.../.../...	/.../.../...	/.../.../...	22/93	/0.01

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



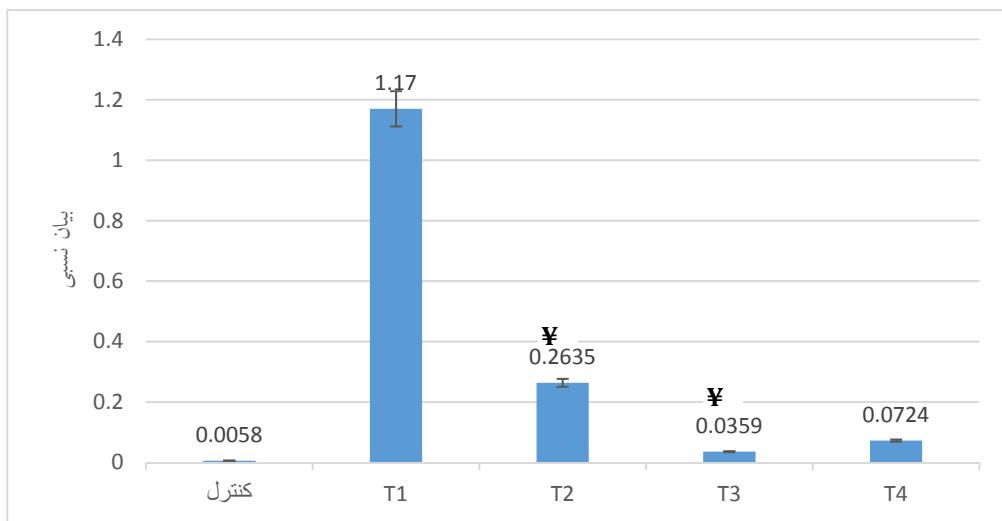
\*افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل، \u03a3 کاهش معنی دار نسبت به گروه T1 (دوکسوروبیسین)

**شکل ۱**- بیان زن Bax در گروه‌های پنج گانه تحقیق



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

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



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

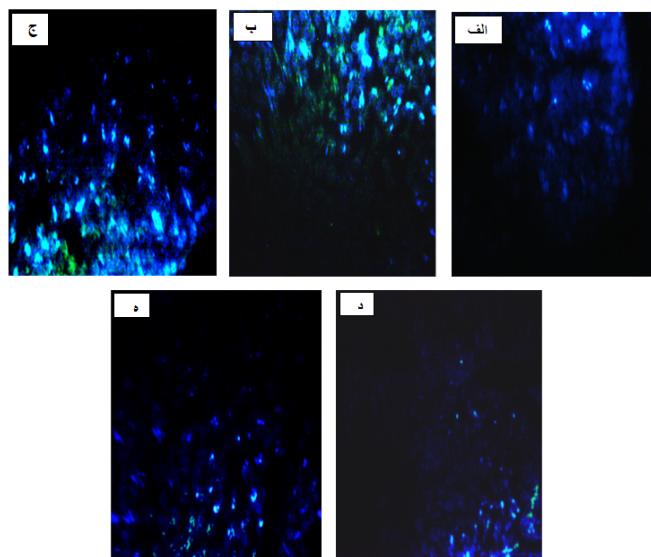
شکل ۳- بیان ظن Bax/Bcl-2 در گروه های پنج گانه تحقیق

می شود (۲۰). سطوح BCL-2 در جوندگان تمرین کرده افزایش یافت که به کاهش نسبت BAX به BCL-2 منجر می شود و در نتیجه مقدار قطعه قطعه شدن آپوپتوزی تا حد (BCL-2, BCL-X) (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-2

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

### بحث و نتیجه گیری

در رابطه با اثر تمرینات ورزشی بر آپوپتوز نیز مطالعات متعددی صورت گرفته است. به عنوان مثال: در این زمینه وولگاموت و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که یک برنامه تمرین دویden ۱۲ هفته ای روی ترمیم باعث کاهش بیان BAX در عضله دوقلوی رت های پیر



**شکل ۴**-الف (گروه کنترل): نمای از سلول بافت بیضه که ساختار آن طبیعی میباشد با میکروسکوپ فلورسنت، نمای عکس ۴۰۰. ب (T1) : نمای عکس ۴۰۰ ج (T2) : نمای از سلولهای بافت بیضه گروه آزمایشی دوکسوروبیسین با میکروسکوپ فلورسنت که نقاط روشن آبی مایل به سبز آپوپتوز ایجاد شده در اثر دوکسوروبیسین با کم رنگ سبزآپوپتوز ایجاد شده در اثر دوکسوروبیسین + تمرین با میکروسکوپ فلورسنت که نقاط روشن آبی + کروسین با میکروسکوپ فلورسنت که نقاط آبی پر رنگ سلول های که در اثر 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 د (T3) : نمایی از سلولهای 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 آپوپتوز ایجاد شده که نسبت به گروه (T1) کمتر می باشد، با خاطر مصرف کروسین با نمای عکس ۴۰۰.

افزایش نسبت BAX به میزان BCL-2 نشان دهنده ای افزایش سیگنالینگ آپوپتوز شد و ورزش کامل توانست منجر به اختلال در سیستم ماتریکس میتوکندری شود. به طور کلی نتیجه گرفتند که ورزش کامل موجب افزایش آپوپتوز و اختلال در تنظیم متابولیسم و اختلال در متابولیسم ماتریکس میتوکندری می شود (۲۵). سانتانا و همکاران در سال ۲۰۱۴ پژوهشی را با عنوان "تمرینات هوایی موجب القا ضد آپوپتوز در بافت قلب موش های صحرایی می گردد" انجام دادند. نتایج نشان داد تمرینات ورزشی موجب افزایش معنی دار بیان ژن های ضد آپوپتوز (BCL-2) و کاهش معنی دار بیان ژن عوامل آپوپتوزی (BAX) می گردد. به طور کلی یافته های این تحقیق نشان داد تمرینات ورزشی می تواند موجب افزایش عوامل ضد آپوپتوزی شود (۲۶). شریفی و همکاران (۱۳۹۵) در تحقیقی نتایج نشان داد تزریق دوکسوروبیسین موجب افزایش معنادار بیان ژن BAX/BCL-2 و نسبت BAX/BCL-2 و کاهش جزئی بیان ژن BCL-2 شد. از طرفی انجام تمرین هوایی قبل و طی

در از طریق کاهش بیان پروتئین BAX و افزایش سطوح 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 موش های پیر کاهش می دهد. یافته ها کاهش سطوح پروتئین X در گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل و همچنین افزایش سطوح پروتئین 2 BCL-2 را نشان داد (۲۳). فرناندز و همکاران (۲۰۱۲) مشاهده کردند که ۱۰ هفته تمرین منظم شنا در موش های نر باعث افزایش پروتئین های ضد آپوپتوز و کاهش پروتئین های طرفدار آپوپتوز (BAD) می گردد 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 و امانده 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

عملکرد کلیه موش های صحرایی دیابتی دارد (۳۱) که نتایج مطالعه‌ی آنها همسو با مطالعه‌ی حاضر می‌باشد. بررسی‌ها نشان داد که منابع در مورد بررسی اثرات تعاملی تمرینات ورزشی و عصاره زعفران و کروسین بر شاخص‌های آپوپتوزی بسیار معدهود 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 مطالعه‌ای مناسب جهت مقایسه با مطالعه حاضر یافت نشد.

استفاده از دوکسوروبیسین منجر به آسیب بافتی وايجاده 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 رادیکال‌ها 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 می‌شود. 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 رساله‌ی دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی می‌باشد. تحقیق بدون حمایت مالی انجام شده، واژه‌محمات استاد ارجمند دکترسید علی حسینی واحد دانشگاه آزاد مرودشت، و خانم مریم روحانی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوستر تشرک و قدردانی می‌گردد.

### References

- Templeton A, Fraser C, Thompson B. The epidemiology of infertility in Aberdeen. *BMJ*. 1990;301(6744):148-52.
- Hauser R, Paz G, Botchan A, Yoge L, Yavetz H. Varicocele and male infertility: Part II: Varicocele: effect on sperm functions. *Hum Reprod Update*. 2001;7(5):482-5.
- Hou M, Chrysis D, Nurmi 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.

الای دوکسوروبیسین از افزایش نسبت BAX/BCL-2 و کاهش بیان زن BCL-2 ناشی از تزریق دوکسوروبیسین پیشگیری کرد (۲۷) با توجه به کاهش معنادار در نسبت BAX/BCL در قلب موش‌های گروه تمرین کرده درمان شده با دوکسوروبیسین نتیجه گرفته شد که تمرین ورزشی هوایی قبل و طی درمان دوکسوروبیسین احتمالاً می‌تواند به عنوان راهبرد غیر دارویی، موجب محافظت سلول‌های قلب از آپوپتوز ناشی از الای 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 مکمل‌های گیاهی در مقایسه با داروهای شیمیایی اثرات جانبی کمتری دارد، احتمالاً استفاده از این مکمل‌های گیاهی در برخی موارد می‌تواند جایگزین مناسبی برای دارو درمانی باشد (۲۸) استفاده‌های سنتی از گیاه زعفران و مواد موثره آن از جمله کروسین مورد تأیید و تصدیق قرار گرفته است. نشان داده شده است که کروسین غلظت چربی پلاسمما، استرس اکسیداتیو و سایتوکاین‌های التهابی را بهبود می‌بخشد (۲۹، ۳۰).

تارانتیلیس گزارش کرد که رنگ دانه‌های موجود در کلاله زعفران از گروه کاروتونوئیدهای دارای عامل کربوکسیل هستند و یکی از رنگ دانه‌های محلول در چربی آن بتاکاروتون است (۳۱) که این ماده قادر است با حذف رادیکال آزاد اکسیژن واسطه‌ای (O<sub>2</sub>- و O<sub>2</sub>) واکنش زنجیره‌ای اکسیداسیون این رادیکال‌ها را خاتمه دهد و با اکسید کردن خود از اکسیداسیون سایر مولکول‌ها جلوگیری کند (۳۰). بنابراین اثر عصاره زعفران در مطالعه حاضر با نتایج تحقیقات انجام شده مطابقت دارد. علی‌رغم خواص دارویی زیادی که برای اکسیدانی آن‌ها، مطالعات کمی در مورد اثرات این گیاه و تمرین هوایی ذکر شده است و نیز اثر آنتی اکسیدانی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تناслی 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 آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌گردد با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی موجب کاهش روند آپوپتوز می‌گرد. با این وجود کروسین اثر محافظتی بر

4. Suominen JS, Linderborg J, Nikula H, Hakovirta H, Parvinen M, Toppari J. The effects of mono-2-ethylhexyl phthalate, 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. *Arterioscleros Thrombos 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 Ulumi 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 Biophys.* 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 hypertensive 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 picrocrocins, 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

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.