Feyz Medical Sciences Journal
2024, Volume 28, Issue 2
Pages: 159-166
Doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.2.159
Original Article

The effect of aerobic exercise and ginger hydroalcoholic extract on the expression of VEGF and FGF-2 in cadmium chloride-induced infertile testis tissue in adult male Wistar rats

Amir Delshad [1*], Maryam Sadat Dashti [2], Nasrin Heidarieh [3], Fateme Movahedi Fard [4]

[1] Department of Sports Sciences, Faculty of Literature and Humanities, University of Qom, Qom, Iran
[2] Department of Sports Sciences, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Mazandaran University, Mazandaran, Iran
[3] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
[4] Master of Applied Sports Physiology, Tolo Mehr University, Qom, Iran

[*]**Corresponding author: Amir Delshad**, Department of Sports Sciences, Faculty of Literature and Humanities, University of Qom, Qom, Iran
Email: Ah_delshad@gmail.com

Received: 11 December 2023 **Revised:** 6 May 2024 **Accepted:** 6 May 2024

Abstract

Background and Aim: Cadmium, a heavy and toxic metal, is a known environmental pollutant with teratogenic effects. This study aims to assess the influence of a course of aerobic exercise and ginger hydroalcoholic extract on the expression of VEGF and FGF-2 in cadmium chloride-induced infertile testis tissue in adult male Wistar rats.

Methods: In this experimental study, 48 12-week-old adult male Wistar rats, weighing 250 ± 30 grams, were divided into six equal groups: healthy control, exercise, cadmium (Cd), exercise-Cd, ginger-50 Cd, and ginger-100 Cd. The rats received 3 mg of cadmium chloride and hydroalcoholic extract of ginger at a rate of 50 or 100 mg/kg of body weight. The training protocol included running on a treadmill with an intensity of 27 m/min. After a 5-week period, the rats were anesthetized with diethyl ether, and their testis tissue was evaluated to determine the quantity of FGF-1 and VEGF.

Results: The aerobic training group showed a significant increase (P=0.004) in the expression of VEGF and FGF-2 genes in testicular tissue compared to the control group. Conversely, the cadmium group displayed a significant decrease (P=0.001) in the expression of these genes. The ginger 100 and 50 + cadmium group did not show a significant change in VEGF and FGF-2 gene expression compared to the control group.

Conclusion: Cadmium exposure resulted in decreased VEGF and FGF-2 gene expression in testicular tissue, while exercise led to an increase. Additionally, ginger consumption appears to mitigate cadmium-induced tissue damage, although it does not increase the expression of VEGF and FGF-2 genes.

Keywords: Aerobic exercise, Cadmium, FGF-2, Ginger extract, Infertility, VEGF

Copyright© 2024. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms. Downloaded from: http://feyz.kaums.ac.ir/

مجله علوم پزشکی فیض
دوره ۲۸، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۴۰۳
صفحات: ۱۶۶-۱۵۹
Doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.2.159
اصیل پژوهشی

تأثیر یک دوره تمرین هوازی و عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر بیان VEGF و FGF-2 در بافت بیضه نابارور ناشی از کلرید کادمیوم در موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار

امیر دلشاد [۱*]، مریم سادات دشتی [۲]، نسرین حیدریه [۳]، فاطمه موحدی فرد [۴]

[۱] گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه قم، قم، ایران
[۲] گروه علوم ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزش، دانشگاه مازندران، ایران
[۳] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران
[۴] کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی کاربردی، دانشگاه طلوع مهر، قم، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۹/۲۰ **اصلاح مقاله:** ۱۴۰۳/۰۲/۱۷ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۳/۰۲/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: کادمیوم فلزی سنگین و سمی و از آلوده کننده‌های محیطی دارای اثرات تراتوژنیک است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی تأثیر یک دوره تمرین هوازی و عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر بیان VEGF و FGF-2 در بافت بیضه نابارور ناشی از کلرید کادمیوم در موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار بود.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۴۸ موش صحرایی نر بالغ ۱۲ هفته‌ای ویستار در محدوده وزنی ۳۰ ± ۲۵۰ گرم به ۶ گروه مساوی تقسیم شدند: کنترل سالم، تمرین، کادمیوم (Cd)، تمرین–Cd، زنجبیل ۵۰–Cd و زنجبیل ۱۰۰– Cd. حیوانات ۳ میلی‌گرم کلرید کادمیوم و عصاره هیدروالکلی زنجبیل را به میزان ۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. پروتکل تمرینی شامل دویدن روی تردمیل با شدت ۲۷ متر بر دقیقه بود. در پایان یک دوره ۵ هفته‌ای، موش‌ها با دی اتیل اتر بیهوش شدند و بافت بیضه آنها برای تعیین کمیت FGF-1 و VEGF مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: در گروه تمرین هوازی افزایش معنی‌دار (P=۰/۰۰۴) و در گروه کادمیوم کاهش معنی‌داری (P=۰/۰۰۱) در بیان ژن VEGF و FGF-2در بافت بیضه نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در گروه زنجبیل ۱۰۰ و ۵۰ + کادمیوم تغییر معناداری در بیان ژن VEGF و FGF-2 نسبت به گروه کنترل گزارش نگردید.

نتیجه‌گیری: کادمیوم منجربه کاهش اما ورزش منجر به افزایش بیان ژن VEGF و FGF-2 در بافت بیضه می‌شود. همچنین به نظر می‌رسد مصرف زنجبیل از آسیب کادمیوم بر بافت جلوگیری نماید، اگرچه باعث افزایش بیان ژن VEGF و FGF-2 نمی‌شود.

کلیدواژه‌ها: تمرین هوازی، کادمیوم، FGF-2، عصاره زنجبیل، ناباروری، VEGF

*نویسنده مسئول: **امیر دلشاد.** پست الکترونیک: Ah_delshad@gmail.com
آدرس: گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه قم، قم، ایران

مقدمه

ناباروری با علت مردانه یک حالت پیچیده بالینی و از معضلات فعلی جامعه بشری است و علل متنوعی چون اشکال در آناتومی، عفونت‌ها، آسیب در اثر ضربه، بی‌نظمی‌های اندوکراین، مشکلات سیستم ایمنی و نقص‌های ژنتیکی در آن نقش دارند [۱]. کادمیوم فلزی سنگین و از آلوده کننده‌های محیطی دارای اثرات تراتوژنیک و از عناصر سمی است که در محیط وجود دارد و با توجه به نیمه‌عمر طولانی، اثرات زیانباری ایجاد می‌کند و می‌تواند از طریق آب، هوا، غذا و دخانیات وارد بدن انسان شود [۲]. همچنین به عنوان یک سم سیستمیک، پیش‌ساز سلول‌های گلیا را کاهش و تمایز و تکثیر سلول‌ها را مهار و بر بسیاری از عملکردهای سلولی موثر است و باعث ناباروری، اختلال در عملکرد کلیه‌ها و آسیب شدید به مغز می‌شود [۳]. مطالعات نشان می‌دهد عملکرد اسپرم توسط فلز سنگین کادمیوم مهار می‌شود که پس از قرار گرفتن در معرض سولفات مس و کلرید کادمیوم در شرایط آزمایشگاهی کاهش معنی‌داری در تحرک، زنده ماندن و بیش فعالی اسپرم ایجاد می‌کند و این فلزات می‌توانند کیفیت اسپرم را مختل کرده، در نتیجه بر قابلیت لقاح تأثیر بگذارند [۴]. در مطالعه‌ای، مواجهه مزمن با کادمیوم باعث متیلاسیون متفاوت در اسپرم موش گردید [۵]. در موش‌هایی که کادمیوم کلراید دریافت می‌کردند لوله‌های اسپرم‌ساز در ابعاد مختلف تحلیل رفته و همچنین هسته اسپرماتوگونیوم کوچک شده بود و میزان هورمون تستوسترون کاهش و سطح مالون‌دی‌آلدهید افزایش داشت [۶]. فعالیت بدنی و کم تحرکی می‌تواند بر ناباروری تأثیر مثبت یا منفی بگذارد [۷]. بر اساس شواهد موجود، تمرینات ورزشی در پیشگیری و درمان آسیب‌های عملکردی ساختاری بیضه و تغییرات شاخص‌های اسپرمی ناشی از سن و چاقی مؤثرند [۸]. نتایج مطالعه تصادفی کنترل شده از بهبود شاخص‌های اسپرمی مردان نابارور در پی فعالیت ورزشی مقاومتی و هوازی با شدت‌های متوسط و بالا حکایت دارند [۹]. فعالیت ورزشی منظم باعث رقابت بین عضلات اسکلتی جهت دریافت خون می‌گردد، در این حالت بین عضلات و بافت فعال و غیرفعال در بهره‌مندی از توزیع خون، اکسیژن و مواد مغذی رقابتی صورت می‌گیرد و متعاقباً کم اکسیژنی در آن ناحیه رخ می‌دهد و احتمال وقوع آپوپتوز افزایش می‌یابد. از جمله تغییراتی که هنگام فعالیت ورزشی در ساختار عروقی و عضله اسکلتی برای رفع شرایط استرسی رخ می‌دهد، فرایند رگ زایی است که متعاقب آن VEGF در پاسخ به محرک‌ها از سلول های اندوتلیال ترشح می‌شود و از طریق اتصال به گیرنده خود واقع در سلولهای اندوتلیال پیام‌دهی را انجام می‌دهد [۱۰]. شواهد نشان می‌دهد که VEGF یک عامل چندگانه است که عملکردهای بیولوژیکی متعددی از جمله نفوذپذیری عروقی، متابولیسم، سیستم ایمنی، التهاب و عملکردهای عصبی را تنظیم می‌نماید. این فاکتور، یک پروتئین همودایمر باند شونده به هپارین با وزن مولکولی ۴۵ کیلودالتون است که توانایی فعالیت آنژیوژنیک را در شرایط درون سلولی و برون سلولی دارد. تحریک VEGF موجب رشد، مهاجرت و بقای سلول‌های اندوتلیال و در نتیجه گسترش بیشتر شبکهٔ عروقی می‌شود [۱۱].

عوامل رشد فیبروبلاست یا FGF ها، در فرآیند گسترش و تمایز طیف گسترده‌ای از سلول‌ها و بافت‌ها، آنژیوژنز و توسعه جنینی نقش دارند. این سیستم همچنین در حفظ بافت‌های طبیعی نقش دارد. اجزای مسیر FGFs/FGFRs در دستگاه تناسلی ماده و نر به تنظیم عملکرد تولیدمثل کمک می‌کنند. مطالعه‌ای نشان داده که FGF2 و گیرنده‌های FGFR1، FGFR2، FGFR3 و FGFR4 در بافت‌های دستگاه تناسلی بیان می‌شود و در عصاره‌های پروتئین اسپرم، مجرای تخمک، تاژک و ناحیه آکروزومی اسپرم و اپیدیدیم دم شناسایی شده‌اند [۱۲].

با وجود پیشرفت در روش‌های کمک باروری، میزان موفقیت در بارداری نسبتاً پایین است. لذا، امروزه گیاهانی با خواص دارویی وجود دارند که می‌توانند برای درمان اختلالات باروری مورد استفاده قرار گیرند. یکی از گیاهان موثر در زمینه ناباروری مردان، استفاده از گیاه دارویی زنجبیل (Zingiber officinale Roscoe) می‌باشد [۱۳]. زنجبیل حاوی فلاونوئیدها و ترکیبات پلی‌فنلی است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد دیابتی و کاهش چربی خون و فعالیت ضد سرطانی می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی زنجبیل به مواد اصلی آن، یعنی زینجرون، جینجردیول، زینگیبرن، جینجرول و شوگوال نسبت داده شده است. فراکسیون‌های فنلی بدون زنجبیل و همچنین عصاره زنجبیل هیدرولیز شده با زنجبیل خواص مهار رادیکال‌های آزاد را دارند و همچنین مهار پراکسیداسیون لیپیدی، و محافظت از DNA را نشان دادند که بیانگر خواص آنتی‌اکسیدانی قوی است [۱۴]. گاواژ عصاره زنجبیل به موش در مدت ۳۰ روز باعث افزایش سطح تستوسترون سرم و بهبود آسیب بیضه ناشی از حرارت در مقایسه با گروه تنش گرما به صورت وابسته به دوز گردید [۱۵]. همچنین ورزش و فعالیت بدنی به عنوان یک راه‌کار مؤثر غیردارویی برای پیشگیری و درمان مشکلات ناباروری پیشنهاد شده است [۱۶]. از آنجایی که تمرینات ورزشی و مصرف داروهای گیاهی عوارض کمتری نسبت به شیوه‌های دیگر درمان دارند، با توجه به ریسک بالای اکثر روش‌های درمانی و هزینه‌های ناباروری مخصوصاً در این چند سال اخیر، در این پژوهش از تمرینات هوازی و مکمل‌دهی زنجبیل استفاده شده است. بنابراین هدف از این پژوهش یافتن روش جدید و کم هزینه و تعیین اثر محافظتی و ضد سمی فعالیت بدنی و زنجبیل بر عوامل آنژیوژنزی و رشدی بافت بیضه موش‌های نر نابارور می‌باشد.

روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی و بنیادی است. تعداد ۴۸ سر

موش صحرایی نر، نژاد ویستار بالغ و سالم با دامنه وزنی۳۰±۲۵۰ گرم و سن ۱۲ هفته از انستیتو پاستور تهران تهیه و بر اساس تحقیقات گذشته [۱۷] به‌عنوان نمونه اماری در نظر گرفته شد. موش‌ها در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی قم با میانگین دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴±۵۵ درصد و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفسه‌ای مخصوص حیوانات آزمایشگاهی از جنس پلی کربنات نگهداری شدند که همواره به آب و غذای ویژه موش (شرکت خوراک دام پارس) به صورت آزاد و بدون محدودیت دسترسی داشتند. در مرحله آشناسازی ۲ هفته‌ای با چگونگی دویدن بر نوار گردان و شرایط آزمایشگاهی آشنا شدند، در این مرحله، حیوانات ۵ روز در هفته با سرعت ۵ تا ۱۰ متر به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه روی نوار گردان راه رفتند.

موش‌ها به صورت تصادفی ساده در ۶ گروه کنترل (Co) (n=۸) گروه تمرین هوازی (E) (n=۸)، این گروه فقط در برنامه تمرینی نوارگردان شرکت کردند. گروه کلرید کادمیوم (C) (n=۸) فقط کادمیوم دریافت کردند، گروه تمرین+کادمیوم (C+E) (n=۸)که شامل تمرین و سمیت کادمیوم بود، گروه زنجبیل با دوز ۵۰ (G50) (n=۸) و گروه زنجبیل با دوز ۱۰۰ (G100) (n=۸) که شامل مصرف زنجبیل و سمیت کادمیوم بود قرار گرفتند.

موش‌ها ۵ روز در هفته ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کلرید+کادمیوم رقیق شده با آب مقطر (به صورت گاواژ) جهت القای ناباروری دریافت کردند [۱۸]. عصاره زنجبیل ۵ روز در هفته به صورت تزریق درون صفاقی با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم انجام گرفت. پس از پایان دوره ۵ هفته‌ای (مرحله مداخله) و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و مصرف زنجبیل، موش‌ها با دی اتیل اتر بیهوش و با ایجاد یک برش در ناحیه خلفی شکم محوطه بطنی، بیضه‌ها و اپیدیم ها خارج شدند. بعد از جداسازی چربی‌ها و نسوج اضافی، بیضه‌ها، مجرای دفران، اپی‌دیدیم با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ کیلوگرم وزن شدند و بیضه‌ها در پلیت قرار گرفتند و با ابزارهای جراحی تقسیم و در میکروتیوب ها دردمای ۷۰- درجه نگه‌داری شدند. بعد از یک هفته برای انجام آزمایش‌ها و ارزیابی بیان ژن‌های VEGF و FGF-2 مورد استفاده قرار گرفتند.

پروتکل تمرینی

پروتکل تمرینی تمرینات هوازی، ۵ جلسه در هفته و به مدت ۵ هفته روی نوار گردان ویژه جوندگان انجام شد. شدت و حجم تمرین توسط زمان فعالیت به تدریج افزایش یافت. پروتکل تمرینی شامل دویدن موش‌ها روی تردمیل با سرعت ۲۷ متر بر دقیقه که با زمان ۱۶ دقیقه شروع شد و روزانه ۱ دقیقه تا هفته ۴ به زمان تمرین اضافه شد و به ۳۰ دقیقه در هر جلسه رسید. پس از آن برای اینکه سازگاری های به دست آمده به حالت یکنواخت باقی بماند، زمان و شدت تمرین در هفته های چهارم و پنجم ثابت نگه داشته شد [۱۹].

جدول-۱. پروتکل تمرین هوازی

هفته ها	روز در هفته	شدت و مدت تمرین	
اول	۵ روز	۱۶ تا ۲۰ دقیقه در ۵ جاسه گه هر جاسه ۱ دقیقیه به زمان تمرین اضافه می شد سرعت ثابت ۲۷ متر در دقیقه	هفته اول آشنایی
دوم		۲۱ تا ۲۵ دقیقه در ۵ جاسه گه هر جاسه ۱ دقیقیه به زمان تمرین اضافه می شد سرعت۲۷ متر در دقیقه	هفته دوم اضافه بار
سوم		۲۶ تا ۳۰ دقیقه در ۵ جلسه گه هر جاسه ۱ دقیقیه به زمان تمرین اضافه می شد سرعت۲۷ متر در دقیقه	هفته سوم اضافه بار
چهارم و پنجم		۳۰ دقیقه در ۵ جلسه هفته های ۴ و ۵ زمان ثابت بود سرعت۲۷ متر در دقیقه	هفته چهارم حفظ و تثبیت

مراحل استخراج RNA

استخراج RNA با استفاده از کیت شرکت Samzol TMReagent با Cat No.Mas150 و فرآیند لیز بافتی انجام شد. نمونه هموژن شده داخل میکروتیوب استریل ریخته و مقدار ۰/۷ ml از محلول Samzol TMReagent به نمونه لیز شده اضافه شد. ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس گردید و ۵ دقیقه در دمای اتاق آزمایشگاه قرار گرفت. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه شد تا رنگ شیری ایجاد شود و میکروتیوب به مدت ۳ دقیقه در دمای آزمایشگاه و پس از آن به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ یا دمای °C ۴- قرار گرفت. سپس با RPM ۱۴۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و مقدار ۱ ml اتانول ۷۰٪ سرد به آن اضافه گردید و به آرامی سر و ته شد و با RPM ۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی دور ریخته و میکروتیوب با درب باز زیر هود قرار گرفت تا اتانول آن تبخیر شود. غلظت و خلوص RNA استخراج شده، بر اساس مقادیر جذب نوری در موج‌های۲۶۰ و۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت آن بر اساس ضریب رقت برحسب ng/µl مشخص گردید.

مراحل انجام سنتز cDNA

بعد از انجام استخراج، با استفاده از کیت Sambi0 TMcDNA synthesis سنتز cDNA انجام شد. ابتدا ۲۰ cc مواد به میکروتیوب اضافه شد. پس از ۲۰ ثانیه سانتریفیوژ، نمونه در دمای ۲۵ درجه

سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و در دمای ۴۷ درجه به مدت ۶۰ دقیقه و سپس در دمای ۸۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. در پایان نمونه‌ها به منفی ۷۰ درجه انتقال داده شدند تا برای بررسی بیان ژن‌ها استفاده شوند.

انجام تکنیک Real-Time PCR

تعیین mRNA توسط Real-Time PCR انجام شد. Set up کردن واکنش آن در دستگاه (Systems Applied Biosystems, Sequence Detection) ABI انجام شد. برای آنالیز تفسیر میزان بیان ژن موردنظر نیاز به ژن کنترل داخلی یا House Keeping Gene بود. برای بهینه‌سازی و گرفتن بهترین نتیجه تمام اجزای موردنیاز آزمایش برای ژن‌ها در غلظت‌های متفاوت و دماهای متفاوت تست، بهترین غلظت و دما انتخاب شد. منحنی‌های تکثیر و تفکیک با استفاده از نرم‌افزار ABI SDS تحلیل شد. تفاوت Ct ژن هدف به ژن‌رفرنس به‌صورت ΔCt برای هر نمونه محاسبه و به دست آمد. علاوه بر این، در این آزمایش تجزیه وتحلیل منحنی ذوب ΔΔCT صورت گرفت. این واکنش با حجم نهایی ۱۰ µl و به صورت دوتایی برای نمونه‌ها و به‌صورت تکی برای نمونه‌های شاهد انجام شد. درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه یا مخلوطی به حجم ۱۰ میکرولیتر متشکل از ۵ میکرولیتر مخلوط اصلی سایبرگرین (Mix Master Green SYBR)، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای اختصاصی هر ژن (پیش رو و پس رو)، ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی و ۲ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز تهیه شد.

طراحی پرایمر و تعیین بیان ژن

ابتدا توالی mRNA های مربوط به ژن‌های VEGF و FGF-2 با استفاده از سایت NCBI استخراج شد. پرایمرها با نرم‌افزار کامپیوتری AllelID ساخته شد و سپس هر پرایمر با نرم‌افزار BLAST جهت اطمینان از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها، مورد ارزیابی قرار گرفت. پرایمرها توسط شرکت سیناژن ساخته شد. در این تحقیق از ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

جدول-۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده

Genes	Primer sequence
VEGF	′- CAATGATGAAGCCCTGGAGT -3′For: 5
	′- TATGTGCTGGCTTTGGTGAG -3′Rev: 5
FGF-2	′- GATCCCAAGCGGCTCTACT -3′For: 5
	′- GCACACACTCCCTTGATGG -3′Rev: 5
GAPDH	′- TGCCAGCCTCGTCTCATAG -3′For: 5
	′- AATGAAGGGGTCGTTGATGG -3′Rev: 5

محاسبات آماری

ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها و همسان بودن واریانس‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون‌های شاپیرو ولیک و لون ارزیابی شدند. سپس از آزمون تحلیل آماری آنووا یک راهه برای مقایسه تغییرات برون گروهی و به دنبال آن برای مقایسه جهت تعیین محل دقیق این تفاوت از آزمون تعقیبی بونفرونی در سطح معناداری (P≤۰/۰۵) استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر طبق معاهده هلسینکی و قوانین و نحوه رفتار با حیوانات (آشناسازی، تمرین، بیهوشی و کشتن حیوان) بر اساس انجمن و ارزیابی اعتباربخشی بین‌المللی مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی و با مجوز معاونت پژوهشی و کمیته تخصصی اخلاق در تحقیقات زیست پزشکی دانشگاه قم به کد IR.QOM.REC.1399.022 انجام شد.

نتایج

در جدول-۳ ویژگی‌های آنتروپومتریک موش‌ها آمده است که عدم تغییرات را در وزن بدن و همچنین وزن بیضه در گروههای مختلف را نشان می‌دهد. تحلیل آماری آنالیز واریانس یک راهه در جدول-۴ نشان می‌دهد، در میزان بیان ژن VEGF بین ۶ گروه تحقیقی تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P=۰/۰۰۱، F=۶/۶۵). نتایج آزمون تعقیبی بونفرنی حاکی از آن بود که در گروه تمرین هوازی (P=۰/۰۰۴) افزایش معنی‌دار و در گروه کادمیوم (P=۰/۰۰۱) کاهش معنی‌داری در بیان ژن VEGF در بافت بیضه نسبت به گروه کنترل ایجاد کردند. همچنین کادمیوم به‌طور خاص منجر به کاهش معنی‌داری در بیان VEGF نسبت به گروه‌های تمرین هوازی (P=۰/۰۰۴)، تمرین-کادمیوم (P=۰/۰۱)، زنجبیل ۵۰ (P=۰/۰۱)، زنجبیل ۱۰۰ (P=۰/۰۱) شد. اما بین گروه زنجبیل ۵۰ و زنجبیل ۱۰۰+ کادمیوم نسبت به گروه کنترل در بیان ژن VEGF در بافت بیضه تفاوت معنی‌داری دیده نشد (P=۰/۴۶).

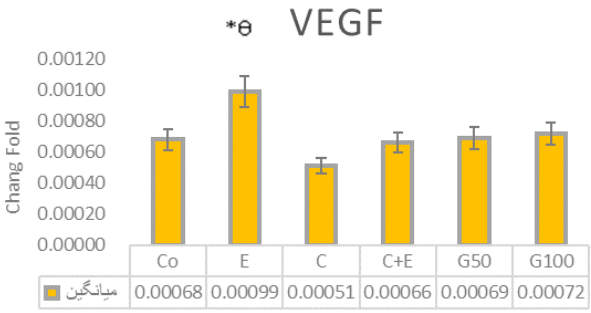
در میزان بیان ژن FGF-2 هم بین ۶ گروه تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P=۰/۰۰۱) (F=۱۰/۸۳) و بررسی نتایج آزمون تعقیبی بونفرنی نشان داد در گروه تمرین هوازی (P=۰/۰۲۱) افزایش معنی‌دار و گروه کادمیوم (P= ۰/۰۰۵) کاهش معنی‌داری در بیان ژن FGF-2 در بافت بیضه نسبت به گروه کنترل ایجاد شده است. همچنین کادمیوم به‌طور خاص منجر به کاهش معنی‌داری در بیان FGF-2 نسبت به گروه‌های تمرین هوازی (P= ۰/۰۰۶)، تمرین-کادمیوم (P=۰/۰۱)، زنجبیل ۵۰ (P=۰/۰۰۱)، زنجبیل ۱۰۰ (P=۰/۰۰۱) شده است. اما بین گروه زنجبیل ۵۰ و زنجبیل ۱۰۰ + کادمیوم نسبت به گروه کنترل در بیان ژن FGF-2 در بافت بیضه تفاوت معنی‌داری دیده نشد (P=۰/۹۷).

جدول-۳. ویژگی‌های آنتروپومتریک موش‌ها در پایان دوره تمرین

گروه ها	**سن** (هفته)	**وزن** (گرم)	**وزن بیضه راست** (گرم)	**وزن بیضه چپ** (گرم)
کنترل (اینتکت)	۱۲	۲۶۷/۰۸ ± ۳۳/۵۶	۱/۳۷ ± ۰/۲۷	۱/۵۴ ± ۰/۲۱
تمرین	۱۲	۲۶۰/۰۸ ± ۲۶/۵۶	۱/۴۱ ± ۰/۴۸	۱/۴۰ ± ۰/۳۶
کادمیوم	۱۲	۲۶۶/۱۷ ± ۳۶/۶۴	۱/۳۲ ± ۰/۳۹	۱/۳۳ ± ۰/۳۲
تمرین کادمیوم	۱۲	۲۶۲/۸۳ ± ۶۳/۲۳	۱/۳۸ ± ۰/۴۸	۱/۳۸ ± ۰/۴۸
زنجبیل ۵۰	۱۲	۲۶۳/۸۳ ± ۴۴/۴۶	۱/۴۶ ± ۰/۱۲	۱/۴۸ ± ۰/۲۲
زنجبیل ۱۰۰	۱۲	۲۶۴/۰۸ ± ۲۱/۳۲	۱/۳۴ ± ۰/۳۹	۱/۳۹ ± ۰/۲۹

جدول-۴. مقایسه میانگین و انحراف استاندارد میزان بیان ژن VEGF و FGF-2 در گروه های پژوهش

گروه متغیر	**کنترل** (Co)	**تمرین** (E)	**کادمیوم** (C)	**تمرین کادمیوم** (E+C)	**زنجبیل ۵۰** (G50)	**زنجبیل ۱۰۰** (G100)	F	P
	میانگین و انحراف استاندارد							
VEGF	۰±/۰۰۰۳۷ ۰/۰۰۰۶۸	۰±/۰۰۰۴۴ ۰/۰۰۰۹۹	۰±/۰۰۰۲۴ ۰/۰۰۰۵۱	۰±/۰۰۰۱۷ ۰/۰۰۰۶	۰±/۰۰۰۵۵ ۰/۰۰۰۶۹	۰±/۰۰۰۱۲ ۰/۰۰۰۷۲	۶/۶۵	۰/۰۰۱*
FGF-2	۰±/۰۰۰۱۲ ۰/۰۰۰۳۶	۰±/۰۰۰۰۷۱ ۰/۰۰۰۴۹	۰±/۰۰۰۰۹ ۰/۰۰۰۲۱	۰±/۰۰۰۵ ۰/۰۰۰۶	۰±/۰۰۰۳۹ ۰/۰۰۰۶۹	۰±/۰۰۰۴ ۰/۰۰۰۷۲	۱۰/۸۳	۰/۰۰۱ *

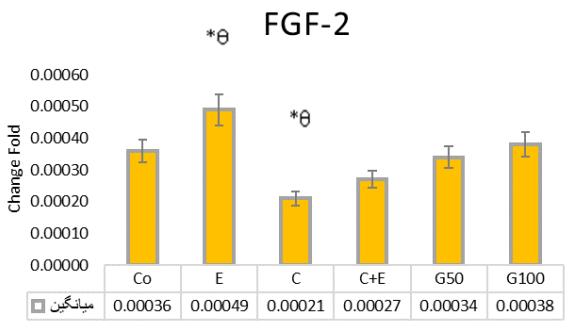


نمودار-۱. مقایسه میانگین درمیزان بیان ژن VEGF در ۶ گروه تحقیقی

داده ها به صورت میانگین± انحراف معیار بیان شده

*نشانه اختلاف معنادار است در سطح $P \leq ۰/۰۵$

* تفاوت معنی دار با گروه کنترل، θ تفاوت معنی دار با دیگر گروه ها



نمودار-۲. مقایسه میانگین بیان ژن FGF-2 در ۶ گروه تحقیقی

* تفاوت معنی دار با گروه کنترل، θ تفاوت معنی دار با دیگر گروه ها

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد القای مسمومیت ناشی از کلرید کادمیوم باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن FGF و VEGF در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار شد، اما ورزش هوازی از کاهش آنها جلوگیری و حتی منجر به افزایش جبرانی (ترمیمی) بیان ژن VEGF و FGF-2 گردید. در شرایط هایپوکسی و ایسکمی ناشی از اجرای فعالیت ورزشی، فاکتور قابل القای HIF افزایش می‌یابد. این فاکتور با اثرگذاری روی بخشی از ژن VEGF، موجب افزایش بیان آن می‌شود [۲۰]. فعال‌سازی HIF-1 سازگاری‌های عملکردی (بیان ژنی اریتروپوئیتین، VEGF و آنزیم‌های گلیکولیتیک) را آغاز می‌کند که این عوامل می‌تواند اثرات منفی قرارگیری در معرض هایپوکسی را کاهش دهند. HIF-1 می‌تواند عناصر واکنش دهنده به هایپوکسی (HER) که روی ژن‌های هدف در هسته قرار گرفته‌اند را شناسایی کند. از جمله دلایل افزایش VEGF متعاقب تمرینات، احتمالاً تولید بیشتر رادیکال های ازاد ناشی از اجرای این فعالیت می‌باشد. افزایش ژنی VEGF به علت اجرای فعالیت هوازی تداومی با شدت ۷۵ درصد VO_2max باعث فعال شدن پی در پی مسیرهای پیام رسان می‌شود که متعاقباً موجب افزایش فرآیند رگ‌زایی و ایجاد سازگاری می‌گردد [۲۱]. همچنین با افزایش شدت فعالیت، تجمع لاکتات و آدنوزین افزایش می‌یابد. آدنوزین از طریق فعالسازی گیرنده A2، موجب افزایش غلظت cAMP و متعاقب آن افزایش VEGF mRNA می‌شود. همچنین گزارش شده که آدنوزین در آزاد شدن VEGF سلولی نقش دارد و هنگام فعالیت ورزشی، جریان خون بافتی افزایش می‌یابد و نیروی هیدرودینامیکی- اصطکاکی به جداره عروقی وارد می‌کند. وارد شدن این نیرو به‌صورت حاد، موجب افزایش بیان اتساع‌کننده‌های عروقی به ویژه نیتریک‌اکساید (NO) پروستاسیکلین‌ها و پروستانوئیدها می‌شود. عوامل مذکور می‌توانند بیان ژنی VEGF را

افزایش دهند [۲۰]. در مطالعه‌ای نشان داده شده که تمرینات استقامتی می‌تواند شدت اثرات کادمیوم بر رگ‌زایی غیرطبیعی موش‌ها را کاهش دهد [۲۲]. از سوی دیگر، شکارچی‌زاده و همکاران نشان دادند ۴ هفته تمرین مقاومتی تاثیری بر سطوح سرمی VEGF نداشت [۲۳].

تاکنون تحقیقاتی در رابطه با تاثیر ورزش بر FGF-2 در آسیب بافت بیضه ناشی از کلرید کادمیوم مورد مطالعه قرار نگرفته است. Matos و همکاران با بررسی اثر تمرین ورزشی بر عملکرد بیضه نتیجه گرفتند که اثرات ورزش بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد، تحت تأثیر نوع، شدت و مدت برنامه تمرینی می‌باشد و ورزش با شدت بالا باعث کاهش پارامترهای اسپرم می‌شود. بنابراین، بر عملکرد بیضه تأثیر منفی می‌گذارد. برعکس، شواهدی وجود دارد که تمرین ورزشی با اختلال عملکرد بیضه ناشی از افزایش سن، چاقی و فلزات سنگین مانند کادمیوم جلوگیری می‌کند. این اثر مثبت احتمالاً نتیجه کاهش استرس اکسیداتیو و وضعیت التهابی است [۲۴]. بررسی‌ها نشان می‌دهد که FGF-2 در بافت‌های دستگاه تناسلی زنانه و در اسپرم موش وجود دارد و rFGF2 بر تحرک اسپرم و اگزوسیتوز آکروزومی تأثیر می‌گذارد که نشان‌دهنده دخالت این سیستم در تنظیم عملکرد اسپرم است [۱۲]. در تحقیق حاضر افزایش معنی‌دار FGF-2 در گروه‌ها نشان داده شد.

همچنین بخشی از نتایج این تحقیق نشان داد که بین گروه ورزش و دوزهای زنجبیل (۵۰ و ۱۰۰) در بیان ژن FGF-2 و VEGF تفاوتی دیده نشد که احتمالاً زنجبیل هم در جلوگیری از کاهش بیان FGF-2 و VEGF بافت بیضه نقش داشته است. مصرف زنجبیل می‌تواند منجر به تحریک قاعدگی، رفع بی‌نظمی عادت ماهیانه، مؤثر در اسپرماتوژنز و افزایش میل جنسی باشد. ترکیبات فعال جینجرول، شوگائول و کورکومین موجود در زنجبیل توانایی مهار پروستاگلاندین‌ها، نیتریک اسید و اینترلوکین‌های درگیر در التهاب را دارند و می‌تواند سیتوکین‌ها، کموکین و ژن‌های کد کننده سیکلواکسیژناز (Cox) را مهار کند [۲۵]. جینجرول موجود در زنجبیل دارای خواص آنتی اکسیدانی در محیط Invivo و یک عامل موثر برای جلوگیری از تولید Ros و بیان cox القا شده توسط اشعه ماورا بنفش است که می‌تواند از آسیب DNA القا شده توسط H_2O_2 محافظت نماید. همچنین با توجه به نقش پروستاگلاندین‌ها در تولید گنادوتروپین، جینجرول موجود در زنجبیل، از اثر خودتنظیمی منفی گنادوتروپین بر تستوسترون جلوگیری کرده و سبب افزایش تستوسترون می‌شود و با تحریک اندروژن‌ها و ترشح تستوسترون، تکثیر سلول‌های زاینده جنسی را افزایش می‌دهد [۲۶]. اثر محافظتی بالقوه زنجبیل در برابر آسیب‌شناسی بیضه ناشی از کلرید کادمیوم در موش‌ها بررسی شد [۲۷]. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد مصرف زنجبیل به‌صورت درمانی باعث افزایش معنی‌داری سطح تستوسترون، وزن بیضه و اپیدیدیم و افزایش وابسته به دوز و مدت زمان در تعداد و تحرک اسپرم می‌شود [۲۸] و به عنوان یک داروی گیاهی بدون عوارض جانبی در دوزهای بالا می‌تواند جایگزین موثر و خوبی در بهبود PCOS باشد [۲۹].

از محدودیت‌های مطالعه حاضر این بود که مدت زمان تمرین کوتاه بود و احتمالاً با افزایش مدت زمان، اثرات بهتری می‌توانست داشته باشد. همچنین در این مطالعه تاثیر زنجبیل به همراه تمرین بررسی نشد. بنابراین نیاز به مطالعات بیشتر برای روشن شدن این موضوعات وجود دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثر مستقیم فعالیت بدنی هوازی بر بهبود عوامل رگ‌زایی و ترمیمی بافتی (FGF و VEGF) و عدم تفاوت نقش زنجبیل نسبت به تمرین هوازی در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت، در صورت آسیب به سیستم باروری توسط مواد شیمیایی از جمله کادمیوم می‌توان با اجرای فعالیت بدنی هوازی روند بیماری جلوگیری نمود، اما مصرف روزانه مکمل زنجبیل از آسیب بیشتر کادمیوم بر بافت بیضه نسبت به گروه‌های دیگر جلوگیری می‌کند.

تشکر و قدردانی: از همه اساتیدی که در غنای مطالب حاضر یاری‌رسان بودند، نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Akhtarkhavari T, Behjati F. Role of Epigenetics in Male Infertility. SJRM. 2018; 3(3):177-83 doi:10.29252/sjrm.2.4.177
2. Sobhan Ardakani S, Hosseini NS. Assessing the Toxicity and Related Health Risks of Potentially Toxic Elements (Zn, Pb, Cd, and Cr) in the Roadside Soils of City of Hamedan. JES. 2023; 49(1): 71-90.
3. Khodaei-Motlagh M. An overview of the antioxidant effects of silymarin and its role in reducing the harmful effects of some heavy metals, radiation and nicotine on sperm quality. J CT. 2023; 14(1): 1-6 doi:10.61186/JCT.14.1.1
4. Hardneck F, de Villiers C, Maree L. Effect of copper sulphate and cadmium chloride on non-human primate sperm function in vitro. IJERPH. 2021; 18(12): 6200. doi:10.3390/ijerph18126200 PMid:34201151 PMCid:PMC8228149
5. Saintilnord WN, Tenlep SY, Preston JD, Duregon E, DeRouchey JE, Unrine JM, et al. Chronic exposure to cadmium induces differential methylation in mice spermatozoa. J Toxicol Sci. 2021; 180(2): 262-76. doi:10.1093/toxsci/kfab002 PMid:33483743 PMCid:PMC8041459
6. Etemadi T, Momeni HR, Ghafarizadeh AA. Impact of

silymarin on cadmium-induced apoptosis in human spermatozoa. Andrologia. 2020; 52(11): e13795. doi:10.1111/and.13795 PMid:32829504
7. Govil V, Rashmi R, Ritu R, Rani A, Puhal S, Bajaj N. Anesthetic management of a pregnant patient with uncontrolled hyperthyroidism for emergency caesarean section - a case report. Novel Clin Med, 2023; 2(3): 163-167. doi: 10.22034/ncm.2023.412332.1112
8. Yi X, Gao H, Chen D, Tang D, Huang W, Li T, et al. Effects of obesity and exercise on testicular leptin signal transduction and testosterone biosynthesis in male mice. APS. 2017; 312(4): R501-10 doi:10.1152/ajpregu.00405.2016 PMid:28100475
9. Dutra Gonçalves G, Antunes Vieira N, Rodrigues Vieira H, Dias Valério A, Elóisa Munhoz de Lion Siervo G, Fernanda Felipe Pinheiro P, et al. R ole of resistance physical exercise in preventing testicular damage caused by chronic ethanol consumption in UChB rats. Microscopy Res Technique. 2017; 80(4): 378-86 doi:10.1002/jemt.22806 PMid:27891737
10. Hoeben AN, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacological Rev. 2004; 56(4): 549-80. doi:10.1124/pr.56.4.3 PMid:15602010
11. Fathollahi Shourabeh F, Tarverdizadeh B, Keihani M. The impact of eight weeks of resistance training on some angiogenesis indicators in women with breast cancer. IJOGI. 2017; 20(3): 9-17
12. Koksoy Vayisoglu S, Aydin Besen M, Oncu E. Perspectives of midwifery and nursing students on recommending the COVID-19 vaccine to women of reproductive age and factors influencing counseling competency: a cross-sectional study. J Prev Complement Med. 2024; 3(1): 1-11. doi: 10.22034/ncm.2023.418212.1133
13. Hosseini J, MardiMamaghani A, Hosseinifar H, Sadighi Gilani MA, Dadkhah F, Sepidarkish M. The influence of ginger (Zingiber officinale) on human sperm quality and DNA fragmentation: A double-blind randomized clinical trial. Int J Reprod Biomed. 2016; 14(8): 533-40. doi:10.29252/ijrm.14.8.533 PMid:27679829 PMCid:PMC5015668
14. Akbari A, Nasiri K, Heydari M, Mosavat SH, Iraji A. The protective effect of hydroalcoholic extract of Zingiber officinale Roscoe (Ginger) on ethanol-induced reproductive toxicity in male rats. JEBIM. 2017; 22(4): 609-17. doi:10.1177/2156587216687696 PMid:29228791 PMCid:PMC5871263
15. Khaki A, Khaki AA, Hajhosseini L, Golzar FS, Ainehchi N. The anti-oxidant effects of ginger and cinnamon on spermatogenesis dys-function of diabetes rats. AJTCAM. 2014; 11(4): 1-8. doi:10.4314/ajtcam.v11i4.1 PMid:25392573 PMCid:PMC4202389
16. Afshoun Pour MT, Habibi A, Ranjbar R. Comparison the effect of two different intensities of acute aerobic exercise on plasma concentrations of apelin, blood glucose and insulin resistance in type 2 diabetic men. IJSPP. 2016; 8(30): 115-28. doi:10.17795/jjhs-32217
17. Alimohamadi Y, Sepandi M. Sample Size in Animal Studies (The number of laboratory animals in a Research study). IJMM. 2022; 16(2):173-6 doi:10.30699/ijmm.16.2.173
18. Ghahreman E, EIDI A, Mortazavi P, Oryan S. Protective effect of purslane (Portulaca Oleracea) on cadmium chloride-induced testicular damage in adult male Wistar rats. J Comparatave Pathobiol. 2018; 16(3): 2883-92.
19. Nikokalam Nazif N, Khosravi M, Ahmadi R, Bananej M, Majd A. Effect of treadmill exercise on catalepsy and the expression of the BDNF gene in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinson in male NMRI mice. Iran J Basic Med Sci. 2020; 23(4):483-93.
20. Ravasi AA, Yadegari M, Choobineh S. Comparison of two types of physical activity on response serum VEGF-A, non-athletic men. J Sport Biosciences. 2014; 6(1):41-56.
21. Kordi MR, Nekouei A, Shafiee A, Hadidi V. The effect of eight weeks high intensity aerobic continuous and interval training on gene expression of vascular endothelial growth factor in soleus muscle of healthy male rats. Arak Med Univ J. 2015; 18(8):53-62.
22. Torabimehr F, Kazemi N, Hosseini SA. Effects of resistance and endurance training on HIF-1α and VEGF in heart tissues of pregnant rats with cadmium toxicity. GCT. 2019; 6(1) doi:10.5812/gct.88363
23. Shekarchizadeh EP, Gharakhanlou R, Karimian J, Safarzade A, Khazaei M. Changes of plasma angiogenic factors during Chronic resistance exercise in Type I Diabetic Rats. SPECIALIST. 2012; 28(2)
24. Matos B, Howl J, Ferreira R, Fardilha M. Exploring the effect of exercise training on testicular function. EJAP. 2019; 119:1-8 doi:10.1007/s00421-018-3989-6 PMid:30196449
25. Tavakoli H, Aryaeian N. A review of the effects of Ginger in inflammation. Rahavard Salamat J. 2016; 2(1): 51-64.
26. Bagherian M, Karimi A, Pilevarian AA. The Effect of HCG and Zingiber Extract on the Growth of Gonads and Accessory Glands in the Immature Male Rats. JAVM. 2020; 12(4):1-8.
27. Motawee ME, Damanhory AA, Sakr H, Khalifa MM, Atia T, Elfiky MM, Sakr HI. An electron microscopic and biochemical study of the potential protective effect of ginger against Cadmium-induced testicular pathology in rats. Front Physiol. 2022; 13, 996020. doi:10.3389/fphys.2022.996020 PMid:36262262 PMCid:PMC9574188
28. Morakinyo AO, Achema PU, Adegoke OA. Effect of Zingiber officinale (Ginger) on sodium arsenite-induced reproductive toxicity in male rats. Afr J Bio Res. 2010; 13(1): 39-45.
29. Atashpour S, Jahromi HK, Jahromi ZK, Maleknasab M. Comparison of the effects of Ginger extract with clomiphene citrate on sex hormones in rats with polycystic ovarian syndrome. IJRM. 2017; 15(9): 561 doi:10.29252/ijrm.15.9.561 PMid:29662964 PMCid:PMC5894472

How to Cite this Article:
Delshad A, Dashti M S, Heidarieh N, Movahedi Fard F. The effect of aerobic exercise and ginger hydroalcoholic extract on the expression of VEGF and FGF-2 in cadmium chloride-induced infertile testis tissue in adult male Wistar rats. Feyz Med Sci J. 2024;28(2):159-166.
doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.2.159