مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۰، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۸

بررسی بیان پروتئین شوک گرمایی A2 (HSPA2) در موش‌های صحرایی نر دیابتی پس از تمرین ورزشی

عباس صارمی .Ph.D[1*]، محمد پرستش .Ph.D[1]، محمد بیات .Ph.D[2]، زهرا داوود آبادی فراهانی .M.Sc[1]

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزش، اراک، ایران
۲- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پزشکی، گروه تشریح، اراک، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: saremi@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر ورزش هوازی بر بیان HSPA2 در بیضه و پارامترهای اسپرم در موش‌های صحرایی دیابتی بود.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار ۲ ماهه، به‌طور تصادفی به سه گروه (هر گروه ۱۰ سر): تقسیم شدند: کنترل (C)، دیابتی (D) و تمرین دیابتی (DT). دیابت از طریق یک نوبت تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین القا شد. موش‌های گروه DT به‌مدت ۸ هفته بر روی تردمیل تمرین استقامتی انجام دادند. ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین، بیضه‌ها از موش‌ها برداشته شدند و تحت آزمایش بافت شناسی قرار گرفتند. مایع منی تجزیه و تحلیل شد و RNA کل از بیضه‌ها برای اندازه‌گیری بیان HSPA2 mRNA با روش RT-qPCR جدا شد. برای تحلیل داده‌ها ازآزمون تحلیل واریانس استفاده شد ($p<۰/۰۵$).

نتایج: یافته‌ها نشان داد در گروه D تعداد ($p=۰/۰۰۱$) و تحرک اسپرم ($p=۰/۰۱$) کم وهمچنین مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم ($p=۰/۰۰۱$) بالا بود. علاوه‌براین، در گروه D، بیان HSPA2 در بافت بیضه ($p=۰/۰۱$) به‌طور معنی‌دارکاهش یافته بود. برخلاف گروه D، در گروه DT، تعداد ($p=۰/۰۴$) و زنده مانی ($p=۰/۰۲$) و همچنین بیان HSPA2 ($p=۰/۰۳$) افزایش یافته بود.

نتیجه‌گیری: در بیضه‌های موش صحرایی، دیابت بیان HSPA2 را دچار تنظیم کاهشی می‌کند که در مجموع برای پارامترهای اسپرم زیان‌بار است. ورزش به‌طور موثر در برابر این اثرات مضر نقش حفاظتی دارد.

واژگان کلیدی: ورزش، پروتئین شوک گرمایی A2، ناباروری، نر

مقدمه

دیابت شیرین یک اختلال متابولیکی پیچیده است که به‌صورت هایپرگلیسمی درازمدت مشخص می‌شود و از نقص در ترشح انسولین از سلول‌های بتا پانکراس یا عدم حساسیت بافت‌های هدف به انسولین ناشی می‌گردد. نشان داده شده است دیابت کارکرد تولید مثلی مردان را در چندین سطح از جمله کنترل هورمونی (محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گنادال) و اسپرماتوژنز تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱). در موش‌های دیابتی گزارش شده است سطوح سرمی تستوسترون، هورمون لوتئینی و محرک فولیکولار و تعداد سلول‌های لیدیگ کاهش می‌یابد (۲). به‌علاوه، شیریلاتا و همکاران دریافتند دیابتی کردن موش‌ها با استرپتوزوتوسین با آسیب به DNA اسپرم و کاهش تعداد اسپرم همراه است (۳). ناوارو و همکاران نیز گزارش کردند که در موش‌های دیابتی تحرک پذیری اسپرم، وزن بیضه و اپیدیدیمال کاهش می‌یابد (۴). روی‌هم‌رفته نتایج مطالعات انسانی و حیوانی حاکی از اثرات منفی دیابت بر باروری مردان می‌باشد (۱، ۴). جالب این‌که مطالعات همه‌گیرشناسی نیز بیانگر افزایش دیابت و کاهش همزمان ناباروری مردان در دنیا می‌باشد (۵). علی‌رغم معرفی چندین سازوکار فیزیولوژیک برای اثرات مخرب دیابت بر باروری، از جمله گونه‌های فعال اکسیژنی و واکنش‌های التهابی (۶)، اما ساز وکار این تعامل به‌خوبی روشن نیست و مستلزم مطالعات بیشتر در این زمینه است.

پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs)، ملکول‌های تکاملی حفاظت شده‌ای هستند که در ارگانیسم‌های یوکاریوتی وجود دارند و نقش مهمی در حفاظت ساختار سلولی دارند. آن‌ها در سیتوپلاسم و ساختارهای درون سلولی قرار دارند، جایی‌که به‌صورت پروتئین‌های چاپرون عمل می‌کنند. بیان این پروتئین‌ها در پاسخ به بالارفتن دما، استرس اکسیداتیو و تاخوردگی پروتئین، افزایش می‌یابد (۷). HSPs بر اساس وزن ملکولی به‌دو دسته طبقه‌بندی می‌شوند: HSP40، HSP60، HSP70، HSP90، HSP100 و پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک. پروتئین شوک حرارتی A2 (HSPA2) یک عضو از خانواده HSP70 است که به‌طور ویژه در بیضه بیان می‌شود. بیان این ملکول چاپرونی در تمام مراحل اسپرماتوژنز از جمله تقسیم میوز و اسپرمیوژنز به‌ویژه در سطح غشای پلاسمایی، بالا است (۸). HSPA2 نقش مهمی در تنظیم بلوغ، مورفولوژی، تحرک، زنده‌مانی و باروری اسپرم دارد. کاهش یا عدم بیان HSPA2 در مرحله میوزی به الیگواسپرمیا و آزواسپرمیا منجر می‌شود. همچنین هرگونه تغییر در بیان HSPA2 در مرحله اسپرمیوژنز با تخریب و آسیب DNA اسپرم، آپوپتوسیس و اختلال در جایگزینی هیستون-پروتامین همراه است (۹). در این ارتباط افیانی و همکاران گزارش کردند که در بیماران واریکوسلی بیان HSPA2 کاهش می‌یابد و افزایش بیان این پروتئین موجب پیچش صحیح پروتئین‌های درگیر دراسپرماتوژنز (هیستون-پروتامین)، کاهش آسیب به DNA و بهبود مورفولوژی و تحرک اسپرم می‌شود (۱۰). در مجموع شواهد پیشنهاد می‌کنند که کاهش بیان HSPA2 در پاتوژنز ناباروری مردان درگیر است و این‌که این پروتئین یک نشان‌گر معتبر برای عملکرد اسپرم و ناباروری مردان می‌باشد (۱۱).

ارتقای سلامت از طریق ورزش و فعالیت بدنی، به‌عنوان یک عامل مهم در رویه زندگی، به‌خوبی در به‌تاخیر انداختن برخی شرایط پاتولوژیک مثل حمله‌های قلبی و مغزی، آنفارکتوس میوکارد، سرطان و دیابت، روشن شده است (۱۲). در چندین مطالعه اثرات ورزش بر دستگاه تولید مثلی بررسی گردیده است و پیشنهاد بر این است که ورزش با شدت متوسط اثرات مفیدی بر ظرفیت باروری مردان دارد (۱۳)، در حالی که ورزش شدید مثل دوچرخه سواری حرفه‌ای اثرات منفی و مخربی بر قوای جنسی دارد (۱۴). در این ارتباط الهاشم و همکاران (۱۵) دریافتند ورزش می‌تواند فیزیولوژی اسپرم‌های معیوب را در موش‌های چاق بهبود بخشد. همچنین پرستش و همکاران (۱۶) نشان دادند در موش‌های دیابتی ۸ هفته تمرین با بهبود شاخص‌های اسپرمی همراه است. به‌هرحال، به‌رغم اهمیت و نقش مهم HSPA2 در سلامت باروری مردان، در مورد پاسخ این پروتئین به دیابت و ورزش بر اساس بررسی محققان مطالعه‌ای وجود ندارد. بنابراین با توجه به افزایش روزافزون دیابت و

اهمیت HSPA2 در بیماری‌زایی ناباروری، به‌نظر می‌رسد مطالعات بیشتری در مورد نقش فعالیت ورزشی بر پیشگیری و بهبود ناباروری‌های مرتبط با دیابت و سازوکار اثرات آن (هدف گزینی HSPA2) نیاز باشد. بنابراین سوال پژوهش حاضر این است که آیا ۱۰ هفته تمرین هوازی بر شاخص‌های اسپرمی و بیان HSPA2 در بیضه موش‌های دیابتی اثر دارد؟.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها: روش پژوهش از نوع تجربی بود. در تعیین حجم نمونه، با توجه به فرمول حجم نمونه برای نمره‌های پیوسته، درصورتی‌که تفاوت‌های مورد انتظار برابر با ۱/۵ باشد، با توان آزمون ۸۰ درصد در سطح معنی‌داری α=۰/۰۵، تعداد آزمودنی‌های هر گروه برابر ده سر می‌باشد. در این تحقیق از ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ با دامنه وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم و سن ۱۰ هفته‌ای که از مرکز علوم حیوانات آزمایشگاهی تهیه گردیده بودند، استفاده شد. موش‌ها در محیطی با دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و در قفس‌های پلی‌کربنات (۵ موش در هر قفس) نگهداری شدند. جهت ایجاد دیابت نوع ۲ بعد از ۱۲ ساعت ناشتا بودن موش‌های صحرایی مورد نظر از محلول نیکوتین آمید (ساخت شرکت سیگما، آمریکا) محلول شده در نرمال سالین با دوز ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم و بعد از ۱۵ دقیقه از محلول استرپتوزوتوسین (ساخت شرکت سیگما، آمریکا) محلول در بافر سیترات ۰/۱ مولار با دوز ۶۵ میلی‌گرم بر کیلو گرم به‌صورت تزریق درون صفاقی استفاده شد. یک هفته پس از تزریق جهت اطمینان از دیابتی شدن، موش‌های صحرایی که میزان قند خون آنها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود به عنوان دیابتی در نظر گرفته شد (۱۷). سطوح قند خون در موش‌های صحرایی توسط گلوکومتر (بیورر مدل GL42، ساخت کشور آلمان) در هر مرتبه بعد از ۱۲ ساعت ناشتا بودن، اندازه‌گیری شد. در ادامه موش‌های صحرایی دیابتی شده به‌طور تصادفی در دو گروه: گروه دیابتی تمرین استقامتی (۱۰ سر) و گروه کنترل دیابتی (۱۰ سر) تقسیم شدند. به‌علاوه یک گروه دیگر از موش‌های صحرایی که قند خون طبیعی داشتند نیز به‌عنوان گروه کنترل سالم (۱۰ سر) در نظر گرفته شدند. در این پژوهش کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است.

برنامه تمرین استقامتی: برنامه تمرین استقامتی روی تردمیل ۵ کاناله به‌دلیل کنترل آسان‌تر سرعت و مدت زمان دویدن اجرا شد. موش‌ها در گروه تمرین به‌مدت ۱۰ هفته، هرهفته ۵ روز تمرین کردند. کل دوره تمرین به ۳ مرحله آشنایی، اضافه‌بار، حفظ و تثبیت شدت‌کار تقسیم شد. در مرحله آشنایی (هفته‌اول) موش‌ها هرروز به‌مدت ۱۵ -۱۰ دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه برروی نوار گردان راه رفتند. در مرحله اضافه‌بار (هفته دو متاچهارم) موش‌ها ابتدا به‌مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۲۷ متر در دقیقه روی نوارگردان دویدند و به‌تدریج در طول مدت ۳ هفته، مدت فعالیت افزایش می‌یافت (هر جلسه ۲ دقیقه) تابه‌میزان نهایی، ۶۰ دقیقه رسید. در نهایت در مرحله حفظ و تثبیت، شدت‌کار به‌مدت ۳ هفته تمرین استقامتی به‌مدت ۶۰ دقیقه و با سرعت ۲۷ متر در دقیقه رسید. در ضمن در هر جلسه تمرینی موش‌ها ابتدا ۵ دقیقه گرم می‌کردند (با شدت ۱۶متر در دقیقه) و در انتها ۵ دقیقه برای سرد کردن (شدت ۱۶متر در دقیقه و با کاهش تدریجی شدت به‌کم‌ترین مقدار) اختصاص داده می‌شد (۱۸).

اندازه‌گیری بیوشیمیایی: تمامی موش‌ها، ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین، با کلروفرم بی‌هوش، تشریح و نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌های خونی بعد از خون‌گیری (۵ سی‌سی) و لخته شدن در سانتریفیوژ قرار گرفتند و با دور ۳۵۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سرم آنها استخراج و جهت اندازه‌گیری در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

شمارش اسپرم: بلافاصله بعد از تشریح حیوان و وزن نمودن بیضه چپ آن، انتهای اپی‌دیدیم خارج و در ۵ سی‌سی محیط کشت (21F-MEMD) (muideM s'elgaE fo noitacifidoM s'occebluD) انتقال یافت و به‌منظور خروج اسپرم به‌درون محیط کشت به قطعات کوچکی بریده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد، بعد از این مرحله ۱ میلی لیتر از مخلوط محیط کشت و اسپرم به ۹ میلی‌لیتر از محیط کشت اضافه رقیق و فیکس شد. شمارش سرهای اسپرم با استفاده از لام نئوبار انجام گرفت و سپس تعداد اسپرم‌ها در میلی‌لیتر محاسبه شد. شمارش اسپرم‌ها بر اساس دستورالعمل ارائه شده از طرف سازمان بهداشت جهانی (WHO) انجام شد (۱۹).

قابلیت تحرک اسپرم: به‌منظور بررسی قابلیت حیات اسپرم‌های هر گروه بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) (۱۹) به‌روش رنگ آمیزی ائوزین– نیگروزین انجام شد. به‌طور خلاصه ائوزین (۱ درصد، مرک، آلمان) و نیگروزین (۱۰ درصد، مرک، آلمان) در آب مقطر آماده شد. ابتدا یک حجم مخلوط محیط کشت و اسپرم با دو حجم ائوزین مخلوط و پس از گذشت ۳۰ ثانیه حجم مساوی نیگروزین به مخلوط ساخته شده اضافه شد. سپس گسترش‌های نازکی از مخلوط تهیه و پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش و نسبت درصد اسپرم‌های زنده در گروه‌های مختلف محاسبه شد. در این روش سر اسپرم‌های زنده به رنگ سفید، در حالی‌که سر اسپرم‌های مرده به‌رنگ قرمز متمایل به بنفش ظاهر می‌شوند.

مورفولوژی اسپرم: قبل از بررسی مورفولوژیک اسپرم‌های هر گروه ابتدا گسترش‌های تهیه شده از مخلوط اسپرم و محیط کشت به‌روش پاپانیکولائو رنگ‌آمیزی و پس از خشک شدن براساس دستور العمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) مورد استفاده قرار گرفتند. برای هر نمونه ۱۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ۱۰۰۰ میکروسکوپ نوری بررسی و ناهنجاری موجود به‌صورت درصد بیان شد (۱۸).

همچنین بافت بیضه بلافاصله پس از جداسازی و شست و شو با سالین فورا در تیوب‌های حاوی RNA later جهت جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شده و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگه‌داری شد. برای جلوگیری از تاثیر آهنگ شبانه روزی، نمونه‌گیری از ساعت ۸ آغاز و ۱۱:۳۰ به اتمام رسید. برای بررسی بیان HSPA2 در هر گروه از تکنیکPCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج شد و به cDNA تبدیل شد. سپس cDNA به‌روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری

نتایج به‌صورت میانگین± انحراف استاندارد برای نمونه‌های موجود در هر گروه بیان شده است. جهت آنالیز آماری پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون برآورد نرمالی شاپیرو-ویلیک و برای بررسی فرض برابری واریانس‌ها از آزمون لون استفاده شد. پس از مشخص شدن طبیعی بودن توزیع داده‌ها و برقراری فرض برابری واریانس‌ها، به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری $p\leq ۰/۰۵$ استفاده شد. تمام محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار آماری $SPSS_{16}$ صورت گرفت.

نتایج

میانگین داده‌های مربوط به وزن بدن موش‌ها بعد از ۸ هفته اعمال متغیر مستقل بین هیچ‌یک از گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p=۰/۰۹) (جدول ۱). میانگین داده‌های مربوط به‌وزن بیضه چپ، تنها اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه دیابتی تمرین (p=۰/۰۳) و گروه دیابتی (p=۰/۰۱) مشاهده شد (جدول۱).

جدول ۱: وزن بدن و وزن بیضه چپ حیوانات در گروه‌های مورد مطالعه (بر حسب گرم)

گروه / زمان	کنترل	دیابتی	دیابت تمرینی
وزن بیضه چپ	۱/۵۵±۰/۲۲*	۱/۲۹±۰/۲۱	۱/۳۷±۰/۱۸
وزن قبل از تمرین	۲۴۵/۵±۱۷/۲	۲۳۸/۵±۱۹/۵	۲۳۹/۳±۲۲/۳
وزن بعد از تمرین	۲۵۸/۱±۱۹/۵	۲۳۶/۷±۲۰/۲	۲۳۴/۱±۲۳/۲

*بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین گروه کنترل با دیابتی و دیابت تمرینی.

نتایج در مورد مقایسه تعداد اسپرم گروه‌ها نشان داد اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها وجود دارد (F=۱۱/۲p=۰/۰۰۱). نتایج آزمون توکی نشان داد تعداد اسپرم به‌طور معنی‌دار در گروه دیابتی کمتر از گروه کنترل (p=۰/۰۱) و گروه دیابتی تمرین (p=۰/۰۴) است. به‌علاوه تعداد اسپرم در گروه کنترل به‌طور معنی‌دار بیشتر از گروه دیابتی تمرین بود (p=۰/۰۳) (جدول ۲).
همچنین بررسی قابلیت تحرک اسپرم نشان داد که قابلیت تحرک اسپرم در بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری دارد (F=۱۰/۳, p=۰/۰۱). نتایج آزمون توکی نشان داد تحرک اسپرم در گروه کنترل به‌طور معنی‌دار بیشتر از گروه دیابتی (P=۰/۰۰۱) و گروه دیابتی تمرین (p=۰/۰۰۱) است. اما اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دیابتی تمرین و دیابتی وجود نداشت(p=۰/۲۳) (جدول ۲).

بررسی درصد اسپرم‌های زنده نشان دادکه بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد (F=۱۲/۶, p= ۰/۰۰۱). نتایج آزمون توکی نشان داد قابلیت حیات اسپرم به‌طور معنی‌دار در گروه دیابتی کمتر از گروه کنترل (p=۰/۰۰۲) و گروه دیابتی تمرین (p=۰/۰۰۲) است. به‌علاوه قابلیت حیات اسپرم در گروه دیابتی تمرین به‌طور معنی‌دار بیشتر از گروه دیابتی بود (p=۰/۰۲) (جدول ۲).

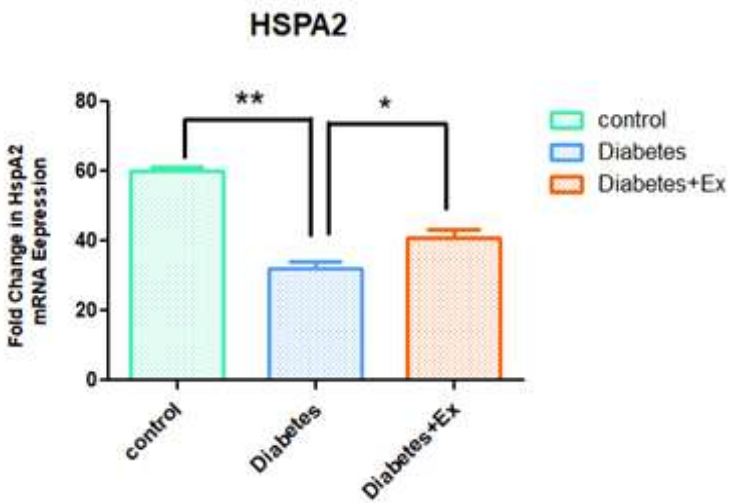
نتایج مورفولوژی اسپرم نشان دادکه بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد (F=۳/۶۵, p=۰/۰۳). نتایج آزمون توکی نشان داد میانگین درصد مورفولوژی‌های طبیعی اسپرم به‌طور معنی‌دار در گروه بیشتر از گروه دیابتی (p=۰/۰۰۱) و گروه دیابتی تمرین (p=۰/۰۳) است. اما اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دیابتی تمرین و دیابتی مشاهده نشد (p=۰/۳۶) (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه پارامترهای اسپرمی در گروه‌های مورد مطالعه بعد از مداخله

گروه / متغیر	کنترل	دیابتی	دیابت تمرینی
تعداد اسپرم($۱۰^{۶}$)	۳۸/۴±۱۴/۱*	۱۹/۶±۶/۱	۲۷/۱±۹/۳#
زنده مانی اسپرم(٪)	۶۲/۴±۵/۲*	۳۰/۱±۶/۷	۳۹/۷±۴/۵#
تحرک پذیری اسپرم(٪)	۶۹/۷±۸/۲*	۳۲/۲±۶/۱	۳۴/۵±۶/۲
مورفولوژی اسپرم(٪)	۹۶/۱±۴/۳*	۸۴/۸±۵/۲	۸۹/۱±۵/۷

*بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین گروه کنترل با دیابتی و دیابت تمرینی.
#بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین گروه دیابتی و دیابت تمرینی.

مقایسه شاخص مقاومت به انسولین در گروه‌های مختلف نشان داد که بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود دارد (F=۶/۴۵, p= ۰/۰۱). به‌طوری‌که بین گروه کنترل با گروه دیابتی (p=۰/۰۱) و بین گروه دیابتی تمرین و گروه دیابتی (p=۰/۰۰۳) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد، اما بین گروه کنترل و گروه دیابتی تمرین (p=۰/۴۳) اختلاف معنی‌داری ملاحظه نشد. در بررسی بیان HSPA2 در بافت بیضه بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (۰/۰۲ , F=۳/۴۱p=). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بین گروه دیابتی با کنترل (p=۰/۰۱) و دیابتی تمرین (p=۰/۰۳) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. از سویی، بین گروه کنترل و گروه دیابتی تمرین (p=۰/۳۴) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه بیان HSPA2 در بافت بیضه بین گروه‌های مورد مطالعه. *بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین گروه دیابتی و دیابت تمرینی. **بیانگر اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین گروه کنترل با دیابتی.

بحث

یافته اصلی مطالعه حاضر این است که دیابتی کردن موش‌ها با کاهش شاخص‌های اسپرمی و بیان HSPA2 در بافت بیضه همراه است و یک دوره مداخله برنامه ورزشی استقامتی منجر به بهبود شاخص‌های اسپرمی و همزمان افزایش بیان HSPA2 می‌شود.

سلامت تولید مثلی به‌طور قوی به‌وسیله شرایط پاتولوژیکی مثل چاقی و دیابت تحت تاثیر قرار می‌گیرد. هر چند سازوکار دقیق فیزیولوژیک اثرات مخرب دیابت بر باروری مردان به‌خوبی مشخص نیست، اما عواملی چون استرس اکسیداتیو، آپوپتوزیس و جایگزینی پروتامین-هیستون پیشنهاد شده است (۱۹). چندین محقق اثرات دیابت بر شاخص‌های کارکرد تولید مثلی جنس نر را مورد بررسی قرار داده‌اند. برای مثال اومولوی و همکاران (۲۰) دریافتند که دیابتی کردن موش‌ها با STZ منجر به کاهش وزن بیضه و فقدان مراحل II و III اسپرماتوژنز می‌شود. همچنین مقدمی و همکاران (۲۱) و ناوارو و همکاران (۲۲) نشان دادند وزن بیضه در موش‌های دیابتی کاهش می‌یابد. همسو با این مطالعات در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد وزن بیضه موش‌های دیابتی شده نسبت به موش‌های سالم به‌طور معنی‌دار کمتر است. از طرفی به‌نظر می‌رسد اثرات منفی دیابت از طریق STZ بر بافت بیضه به شکل وابسته به دوز باشد و هر چه شدت دیابت بیشتر باشد، اثرات مخرب آن بیشتر است (۴).

در مورد اثرات دیابت بر پارامترهای اسپرمی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد پس از دیابتی کردن موش‌ها تحرک‌پذیری، تعداد، زنده مانی و مورفولوژی اسپرم دچار اختلال می‌شود. در واقع، یافته ما موافق با تحقیقاتی است که نشان می‌دهند دیابتی کردن موشها با دوز ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم STZ موجب کاهش شاخص‌های باروری اسپرم می‌شود (۲۰،۲۳). در این ارتباط اومولوی

و همکاران (۲۰) نشان دادند در موش‌های دیابتی مرحله تقسیم میوز و اسپرمیوژنز از مراحل اسپرماتوژنز دچار اختلال می‌شود که پیامد آن کاهش تعداد اسپرم‌های بالغ و مورفولوژی معیوب است. در این مطالعات چندین سازوکار فیزیولوژیک برای اثرات منفی دیابت بر باروری مردان معرفی گردیده است، از جمله تغییرات هورمونی، اختلال در وضعیت آنتی اکسیدانتی و نوروپاتی که همگی منتج از هایپرگلیسمی هستند (۲۳). HSPA2 به‌عنوان یک عضو از خانواده HSPA2، چاپرونی مولکولی است که به‌طور عمده در بیضه بیان می‌شود و در مراحل مختلف اسپرماتوژنز درگیر است (۸). از این‌رو در پژوهش‌های متعدد گزارش شده است که کاهش بیان HSPA2 با پاتوژنز ناباروری مردان مرتبط است. برای مثال سدنو و همکاران (۲۴) دریافتند بیان HSPA2 در مردان نابارور الیگواسپرمی نسبت به مردان بارور به‌طور قابل توجهی کمتر است. به‌طور مشابه، ارگور و همکاران (۲۵) گزارش کردند که در اسپرماتوزوا نابالغ انسان، که نمی‌توانند اسپرماتوژنز طبیعی را طی کنند، بیان پروتئین HSPA2 پایین است و به‌علاوه کاهش این پروتئین با کم شدن شانس باروری در شرایط *in vitro* همراه است. در تحقیق حاضر نیز برای اولین‌بار مشاهده شد بیان HSPA2 در موش‌های دیابتی کمتر از موش‌های سالم است و به‌نظر می‌رسد کاهش بیان HSPA2 در بیضه موش‌های دیابتی یکی از علل فیزیولوژیک کاهش باروری آن‌ها می‌باشد.

از سویی، شواهد اخیر بر اهمیت ورزش و فعالیت بدنی در حفظ غلظت و تحرک پذیری اسپرم که از اجزای ضروری برای باروری هستند، تاکید دارند. در این ارتباط، روزتی و همکاران (۲۶) گزارش کردند که یک دوره مداخله ورزش هوازی با بهبود کیفیت اسپرم در افراد چاق و بی‌تحرک همراه است. همچنین پرستش و همکاران (۱۶) دریافتند تمرین ورزشی موجب افزایش تعداد، تحرک و زنده مانی موش‌های دیابتی می‌شود. همسو با این مطالعات، در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد پس از ده هفته دویدن روی تردمیل شاخص‌های اسپرمی چون تحرک، مورفولوژی و زنده‌مانی موش‌های دیابتی شده بهبود می‌یابد. روی هم‌رفته، مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کنند که تمرین ورزشی با شدت متوسط اثرات مفیدی بر باروری افراد با اختلالات تولید مثلی (از جمله افراد چاق، واریکوسلی و دیابتی) دارد (۲۷). برای اثرات مثبت ورزش بر باروری چندین سازوکار معرفی شده است، از جمله بهبود دفاع آنتی اکسیدانتی و وضعیت هورمون‌های جنسی (۱۵، ۱۶، ۲۶، ۲۷). به‌هرحال، در مورد مکانیزم‌های اثر ورزش در بهبود شاخص‌های اسپرمی و باروری تناقضات زیادی وجود دارد که مستلزم مطالعات بیشتر در این زمینه است. در تحقیق حاضر برای اولین‌بار ملاحظه شد که در گروه دیابتی تمرین سطح 2APSH به‌طور معنی‌دار در بافت بیضه افزایش می‌یابد. با توجه به نقش حفاظتی 2APSH در سلامت اسپرماتوژنز و باروری مردان (۷، ۹) به‌نظر می‌رسد یکی از سازوکارهای اثر مثبت ورزش بر قابلیت باروری افراد دیابتی از طریق این مسیر اعمال می‌گردد. در واقع این یافته ما همسو با مطالعاتی است که نشان می‌دهد حذف ژن HSPA2 با اختلال در میوسیس، آپوپتوزیس اسپرماتوسیت‌ها و ناباروری در موش همراه است (۸) درحالی‌که افزایش بیان HSPA2 به بهبود شاخص‌های اسپرمی منجر می‌شود (۸۲). در مجموع، HSPA2 برای اسپرماتوژنز ضروری است و همسو با مطالعه حاضر بیان کم آن با ناباروری جنس نر مرتبط است و به‌نظر می‌رسد ورزش استقامتی از طریق افزایش بیان این پروتئین در بیضه افراد با اختلال باروری به‌سلامت تولید مثل و ارتقای شاخص‌های اسپرمی کمک می‌کند. هر چند ساز و کار اثرات ورزش در افزایش بیان HSPA2 در بافت بیضه روشن نیست که ضرورت پژوهش بیشتر در این زمینه را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

این یافته‌ها شواهد متقاعد کننده‌ای را فراهم می‌کند که تمرین هوازی با شدت متوسط ممکن است همزمان با افزایش بیان HSPA2، پارامترهای اسپرم و قابلیت باروری را در موش های دیابتی شده با STZ بهبود بخشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزش در دانشگاه اراک می‌باشد. نویسندگان از همکاری تمامی افرادی که در تحقیق حاضر شرکت داشتند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Maresch CC, Stute DC, Alves MG, Oliveira PF, et al. Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review. Hum Reprod Update. 2018; 24(1): 86-105.
2. Ballester J, Muñoz MC. Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms.J Androl. 2004; 25(5): 706-19.
3. Shrilatha B, Muralidhara N. Early oxidative stress in testis and epidymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. ReprodToxicol. 2007; 23(4): 578-87.
4. Navarro-Casado L, Juncos-Tobarra MA, Chafer-Rudilla M. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity. Study in rats. J. Androl. 2010; 31 (6): 584–592.
5. Lutz W. Fertility rates and future population trends: will Europe’s birth rate recover or continue to decline? Int J Androl. 2006; 29(1): 25–33.
6. Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health.FertilSteril. 2018; 110(5): 810-814.
7. Naaby-Hansen S, Herr JC. Heat shock proteins on the human sperm surface. J Reprod Immunol. 2010; 84(1): 32-40.
8. Nixon B, Bromfield EG, Cui J, De Iuliis GN. Heat shock protein A2 (HSPA2): regulatory roles in germ cell development and sperm function. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2017; 222:67-93.
9. Motiei M, Tavalaee M, Rabiei F, Hajihosseini R, et al. Evaluation of HSPA2 in fertile and infertile individuals.Andrologia. 2013; 45(1): 66-72.
10. Afiyani AA, Deemeh MR, Tavalaee M, Razi M. Evaluation of heat-shock protein A2 (HSPA2) in male rats before and after varicocele induction.MolReprod Dev. 2014; 81(8): 766-76.
11. Nixon B, Bromfield EG, Dun MD, Redgrove KA, et al. The role of the molecular chaperone heat shock protein A2 (HSPA2) in regulating human sperm-egg recognition.Asian J Androl. 2015; 17(4): 568-73.
12. Gibala M, Little J. Physiological adaptations to low-volume and high-intensity interval training in healthy and disease. The Journal of Physiology. 2012; 590(5): 1077-84.
13. Rafiee B, Morowvat MH, Rahimi-Ghalati N. Comparing the effectiveness of dietary vitamin C and exercise interventions on fertility parameters in normal obese men. Urol J. 2016; 13(2): 2635-9.
14. De Souza M, Miller B. The effect of endurance training on reproductive function in male runners. A 'volume threshold' hypothesis. Sports Med. 1997; 23(6): 357-74.
15. Alhashem F, Alkhateeb M, Sakr H, Alshahrani M, et al. Exercise protects against obesity induced semen abnormalities via downregulating stem cell factor, upregulating Ghrelin and normalizing oxidative stress. EXCLI J. 2014; 13: 551-72.
16. Parastesh M, Saremi A, Ahmadi A, Kaviani M. The effect of aerobic training training on serum levels of adiponectin, hypothalamic-pituitary gonadal axis and sperm quality in diabetic rats. Urol J. 2019; 16(6): 592-597.
17. Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, et al. Development of a new model of type 2 diabetes in adult rats administered with streptozotocin and nicotinamide. Diabetes. 1998; 47(2): 224-9.

18. Afzalpour ME, Chadorneshin HT, Foadoddini M, Eivari HA. Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. PhysiolBehav. 2015; 147: 78-83.
19. Wang Y, Yang J, Jia Y, Xiong C, et al. Variability in the morphologic assessment of human sperm: use of the strict criteria recommended by the World Health Organization in 2010. Fertility and sterility. 2014; 101(4): 945-9.
20. Omolaoye TS, Skosana BT, du Plessis SS. Diabetes mellitus-induction: Effect of different streptozotocin doses on male reproductive parameters. Acta Histo chem. 2018; 120(2): 103-109.
21. Mogaddami Z, Sheikhzadeh F, Hatami H, Khojasteh SMB. Effects of short- and long-term regular exercise on reproductive tissue in streptozotocin-induced diabetic male Wistar rats. Endocr Regul. 2018; 52(4):167-175.
22. Navarro L. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity. Study in rats. J Androl. 2010; 31(6): 584-92.
23. Jangir RN, Jain GC. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. Curr Diabetes Rev. 2014; 10(3): 147-57.
24. Cedenho AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine DM, et al. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. Hum Reprod. 2006; 21(7): 1791–4.
25. Ergur AR, Dokras A, Giraldo JL, Habana A, et al. Sperm maturity and treatment choice of in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection: diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. FertilSteril. 2002; 77(5): 910–8.
26. Rosety M, Diaz AJ, Rosety JM, Pery MT, et al. Exercise improved semen quality and reproductive hormone levels in sedentary obese adults.Nutr Hosp. 2017; 34(3): 603-607.
27. Nematollahi A, Kazeminasab F, Tavalaee M, Marandi S. Effect of aerobic exercise, low-fat and high-fat diet on the testis tissue and sperm parameters in obese and nonobese mice model.Andrologia. 2019; 51(6): 13273-78.
28. Zi-Liang J, Yong-Gang D, Li-Sha M. Association of heat shock proteins, heat shock factors and male infertility. Asian Pacific Journal of Reproduction. 2012; 1(1): 76-84.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2020; 10(4) *Original Article*

Evaluation of heat-shock protein A2 (HSPA2) expression in diabetic male rats after exercise training

Saremi A, Ph.D.[1*], Parastesh M, Ph.D.[1], Bayat M, Ph.D.[2], Davood Abadi Farahani Z, M.Sc.[1]

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Arak University, Arak, Iran
2. Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Arak University, Arak, Iran

* Email corresponding author: saremi@araku.ac.ir

Received: 11 Nov. 2019 Accepted: 9 Feb. 2020

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the effect of aerobic exercise on HSPA2 expression in testes and sperm parameters in diabetic rats.

Material and Methods: Two-month-old male wistar rats were randomly divided into three groups (n=10 in each group): control (C), diabetic (D) and diabetic training (DT). Diabetes was induced with a single intraperitoneal injection of streptozotocin. The DTrats were conditioned to run on a treadmill for the 8-week period. 48 hours after the last session, the testes were removed, and subjected to histological examination, semen analysis and total RNA was isolated from testes to measure by RT-qPCRHSPA2 mRNA expression level. The variance analysis test were applied to analyze the data ($P<0.05$).

Results: Findings show that the D group had a decrease in sperm count ($P=0.01$), motility ($P=0.001$), as well as increase in abnormal sperm morphology ($P=0.001$). Furthermore, in the D group, HSPA2 expressionin testicular tissue was significantly reduced ($P=0.01$). Unlike the D group, in the DT group sperm count ($P=0.04$) and viability ($P=0.02$), and HSPA2 expression ($P=0.03$) were elevated.

Conclusion: In rat testes, diabetes down regulates HSPA2 expression, which is collectively detrimental to semen parameters. Exercise protected effectively against this detrimental effect.

Keywords: Exercise, heat-shock protein A2, infertility, male