

## *Effect of Resistance and Endurance Trainings on Nrf2/Keap1 Signaling Pathway in Testicular Tissue of Type 2 Diabetic Rats*

Zahra Nadi<sup>1</sup>,  
Yousef Abbasi<sup>2</sup>,  
Farideh Jalali Mashayekhi<sup>3</sup>,  
Mohammad Bayat<sup>2</sup>,  
Parvindokht Bayat<sup>4</sup>,  
Maryam Baazm<sup>5</sup>

<sup>1</sup> MSc in Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Biochemistry and Genetics, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

<sup>4</sup> Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

<sup>5</sup> Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received May 21, 2022 ; Accepted September 17, 2022)

### **Abstract**

**Background and purpose:** The antioxidant Nrf2/Keap1 pathway prevents cellular damages against oxidative stress and this pathway is disrupted following diabetes. The aim of this study was to investigate the effect of endurance and resistance training on antioxidant Nrf2/Keap1 pathway in testicular tissue of diabetic rats.

**Materials and methods:** In this experimental research, 48 male Wistar rats were randomly divided into six groups: control, resistance training control, endurance training control, diabetic, diabetic resistance training, and diabetic endurance training. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of 120 mg/kg nicotinamide and 65 mg/kg streptozotocin after 12 hours of fasting. Seventy two hours after induction of diabetes, resistance and endurance training protocols were performed for 10 weeks. Afterwards, the expression of Keap1, Nrf2, and HO1 genes in testicular tissues were measured by real-time PCR.

**Results:** According to findings, induction of diabetes significantly decreased the expression of Nrf2 and HO1 ( $P < 0.05$ ), while the expression of Keap1 increased ( $P > 0.05$ ). Endurance training significantly increased the expression level of Nrf2 ( $P < 0.05$ ) and resistance training changed the expression level of genes related to Nrf2/Keap1 pathway ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** Endurance and resistance exercises could activate Nrf2/Keap1 signaling pathway on gene expression following diabetes and by activating this pathway the complications of diabetes on testis might be reduced.

**Keywords:** diabetes, endurance training, resistance training, keap1, Nrf2, HO1

**J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (214): 24-34 (Persian).**

**Corresponding Author:** Maryam Baazm - School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. (E-mail: Dr.baazm@arakmu.ac.ir)

## اثر تمرینات مقاومتی و استقامتی بر مسیر پیام رسانی Nrf2/Keap1 در بافت بیضه رت های مبتلا به دیابت نوع دو

زهرا نادى<sup>1</sup>  
یوسف عباسی<sup>2</sup>  
فریده جلالی مشایخی<sup>3</sup>  
محمد بیات<sup>2</sup>  
پرویندخت بیات<sup>4</sup>  
مریم باعزم<sup>5</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** مسیر آنتی اکسیدانی Nrf2/Keap1 در سلول از آسیب سلولی در مقابل استرس اکسیداتیو جلوگیری می کند و این مسیر در اثر دیابت مختل می شود. هدف از این مطالعه، بررسی اثر تمرینات ورزشی استقامتی و مقاومتی بر این مسیر در بافت بیضه رت های مبتلا به دیابت است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی 48 سر رت نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به 6 گروه تقسیم شدند: کنترل، کنترل تمرین مقاومتی، کنترل تمرین استقامتی، دیابتی، دیابتی تمرین مقاومتی و دیابتی تمرین استقامتی بعد از 12 ساعت ناشتا نگهداشتن، دیابت در حیوانات از طریق تزریق داخل صفاقی 120mg/kg نیکوتین آمید و 65mg/kg استرپتوزوسین القا شد. 72 ساعت بعد از القای دیابت، حیوانات به مدت 10 هفته طبق پروتکل تحت تمرینات استقامتی و مقاومتی قرار گرفتند. پس از پایان تمرینات مورد نظر، بیان ژن های Nrf2، Keap1 و HO1 در بافت بیضه به روش real-time PCR اندازه گیری شد.

**یافته ها:** نتایج نشان داد که القای دیابت به صورت معنی داری منجر به کاهش بیان ژن های Nrf2 و HO1 شد ( $P < 0/05$ ) در حالی که بیان Keap1 افزایش نشان داد اما این افزایش معنی دار نبود ( $P > 0/05$ ). انجام تمرینات استقامتی به طور معنی داری سطح بیان Nrf2 را افزایش داد ( $P < 0/05$ ). تمرینات مقاومتی سبب تغییر بیان ژن های مرتبط با مسیر Nrf2/Keap1 شد اما این تغییرات معنی دار نبود ( $P > 0/05$ ).

**استنتاج:** تمرینات ورزشی استقامتی و مقاومتی می توانند منجر به فعال شدن بیان ژن های مسیر پیام رسانی Nrf2/Keap1 شوند و فعال کردن این مسیر ممکن است منجر به کاهش عوارض ناشی از دیابت بر بیضه شود.

**واژه های کلیدی:** دیابت، تمرینات استقامتی، تمرینات مقاومتی، Keap1، Nrf2، HO1

### مقدمه

کاهش سطح تستوسترون، تحلیل غدد ضمیمه تولیدمثلی و هم چنین ایجاد تغییر در سطح اندامک های سلولی،

دیابت به عنوان یک بیماری مزمن با ایجاد تغییر در سطح هورمون های دخیل در اسپرماتوزون از جمله

E-mail: Dr.baazm@arakmu.ac.ir

**مؤلف مسئول:** مریم باعزم - اراک: دانشگاه علوم پزشکی اراک

1. کارشناسی ارشد علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
2. استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
3. دانشیار، گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
4. استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
5. دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 1401/2/31 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/4/5 تاریخ تصویب: 1401/6/26

طبیعی Nrf2 داخل سیتوپلاسم قرار دارد و به دلیل اتصال به Kelch-like ECH-associated protein (Keap1) فعالیت آن مهار می‌شود (13). در شرایط پاتولوژیک و تولید بیش از حد ROS، اکسیداسیون Keap1 رخ می‌دهد که منجر به برداشته شدن مهار از Nrf2 و آزاد شدن آن می‌شود. متعاقباً Nrf2 وارد هسته شده و منجر به بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase (GCS) و hemeoxygenase 1 (HO-1) و NAD quinone oxidoreductase 1 (NQO1) می‌شود. با فعال کردن پاسخ آنتی‌اکسیدانی، حفاظت سلولی افزایش می‌یابد (14). مطالعات متعدد بر روی انسان و حیوان نشان داده است که اختلال در این مسیر مهم آنتی‌اکسیدانی با پاتوفیزیولوژی دیابت و عوارض مرتبط با آن مثل نفروپاتی و زخم دیابتی ارتباط مستقیم دارد. از این رو به نظر می‌رسد درمان‌هایی که مسیر Nrf2/Keap1 را تحت تاثیر قرار می‌دهند می‌توانند در درمان عوارض دیابت نقش مهمی داشته باشند (15). با توجه به این که مطالعات متعددی در خصوص تاثیر ورزش‌های مقاومتی بر مسیر Nrf2/Keap1 در مدل حیوانی موش صورت گرفته است اما این مطالعات قابلیت تعمیم بر مدل حیوانی رت را ندارند. در این زمینه فقط یک مطالعه تاثیر ورزش مقاومتی را بر مسیر ذکر شده در میوکارد رت مورد بررسی قرار داده است (16) و مشخص شده که میزان بیان پروتئین Nrf2 به دنبال ورزش مقاومتی در میوکارد کاهش می‌یابد (17). در زمینه تاثیر ورزش استقامتی بر مسیر Nrf2/Keap1 مطالعات بیشتری در مدل حیوانی رت صورت گرفته است و در بافتهای مختلفی مثل قلب، مغز، عضله اسکلتی و هیپوکامپ این مسیر مورد ارزیابی قرار گرفته است و نتایج نشان می‌دهد انجام ورزش استقامتی موجب افزایش بیان Nrf2 در سطح mRNA و پروتئین می‌شود (16). همان‌طور که ذکر شد دیابت عوارض متعددی بر دستگاه تولید مثل دارد و هم‌چنین مسیر آنتی‌اکسیدانی Nrf2/Keap1 نیز

اثرات منفی بر عملکرد و ساختارهای سیستم تولیدمثل جنس مذکر می‌گذارد (1). این تغییرات ناشی از القای استرس اکسیداتیو، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی غشا، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و آپوپتوز بافت بیضه است که متعاقباً منجر به اختلال عملکرد جنسی و در نهایت ناباروری می‌شود (2). در حالت طبیعی وجود گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species: ROS) در مقادیر فیزیولوژیک برای حفظ هموستاز بدن مورد نیاز است، اما تولید بیش از حد ROS می‌تواند به ساختارهای سلولی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA آسیب برساند (3). دیابت با افزایش میزان استرس اکسیداتیو منجر به افزایش آسیب به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها در بافت‌های مختلف مانند بافت بیضه می‌شود (4). این آسیب‌ها در بافت بیضه می‌تواند سبب افزایش آسیب DNA میتوکندری، هسته اسپرم، تغییر در میزان بازها و کروموزوم‌های اسپرم (5) و کاهش میزان تحرک و قابلیت بقا اسپرم شود (6). فعالیت‌های بدنی و ورزش یک روش مناسب در حفظ هموستاز ردوکس (اکسیداسیون-احیا) محسوب می‌شود که منجر به بهبود عملکرد سیستم قلبی و تنفسی، تناسب اندام، تنظیم فشارخون، قندخون و تعادل آنتی‌اکسیدانی می‌شود (7). شدت، نوع و مدت زمان فعالیت‌های ورزشی تغییرات قابل توجهی در پارامترهای اسپرم ایجاد می‌کند (8). مطالعات بیان می‌کنند که تمرینات مقاومتی با شدت بالا در موش‌های صحرائی مبتلا به دیابت به دلیل افزایش استرس اکسیداتیو، کیفیت اسپرم‌زایی را کاهش می‌دهد (9). در حالی که ورزش منظم و متوسط موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود (10) و با حفاظت سلول‌های زایای بیضه در برابر آپوپتوز، باعث بهبود اسپرماتوزن می‌شود (11). فاکتور هسته‌ای اریتروئید 2 (Nuclear factor erythroid related factor 2: Nrf2) یک فاکتور رونویسی هسته‌ای است که از طریق فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش اساسی در حفظ هموستاز سلولی در شرایط استرس اکسیداتیو، التهاب، سرطان و آپوپتوز دارد (12). در شرایط

120mg/kg نیکوتین آمید (سیگما، آلمان) و بعد از 15 دقیقه 65 mg/kg استرپتوزوسین (سیگما، آلمان) محلول در بافر سترات 0/1 مولار (pH=4/5) به صورت تزریق داخل صفاقی استفاده شد. بعد از 72 ساعت از رت‌های ناشتا خون‌گیری صورت گرفت و حیواناتی که میزان قندخون ناشتای آن‌ها بیش‌تر از 250 mg/dl بود به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (18). به موش‌های کنترل یک دوز نرمال سالیین به میزان 1 سی‌سی تزریق شد تا در شرایط مشابه با گروه‌های دیابتی قرار گیرند.

#### تمرین استقامتی

جهت تمرینات استقامتی از تردمیل 5 کاناله به دلیل کنترل آسان‌تر سرعت و زمان دویدن استفاده شد. رت‌ها 5 روز در هفته به مدت 10 هفته ورزش کردند. دوره تمرین شامل 3 مرحله آشنایی، اضافه بار و در نهایت حفظ و تثبیت شدت تمرین بود. در دوره آشنایی (هفته اول) رت‌ها با سرعت 8 m/min به مدت 10 تا 15 دقیقه هر روز روی تردمیل دویدند. پس از آن، در مرحله اضافه بار (هفته‌های دوم تا چهارم)، رت‌ها به مدت 20 دقیقه روی تردمیل با سرعت 27 m/min دویدند و متعاقباً زمان تمرین (هر جلسه 2 دقیقه) به آرامی در طی 3 هفته افزایش یافت و به 60 دقیقه رسید. در مرحله حفظ و تثبیت، رت‌ها دویدن را به مدت 3 هفته با سرعت 27 m/min به مدت 60 دقیقه انجام دادند. در ابتدا و انتهای هر جلسه تمرینی جهت گرم کردن و سرد کردن، رت‌ها به مدت 5 دقیقه با سرعت 6 m/min روی دستگاه قرار داده شدند (19).

#### تمرین مقاومتی

جهت تمرین مقاومتی 2 مرحله در نظر گرفته شد: در مرحله اول یک هفته آشناسازی حیوانات با وسایل،

متعاقب ابتلا به دیابت تغییر می‌کند. از این رو در این مطالعه بر آن شدیم تا تاثیر دو نوع تمرین ورزشی استقامتی و مقاومتی را بر مسیر آنتی‌اکسیدانی Nrf2/Keap1 در بافت بیضه رت‌های دیابتی در راستای کاهش عوارض ناشی از دیابت بررسی کنیم.

## مواد و روش‌ها

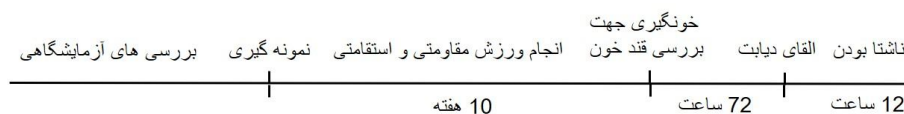
در این مطالعه تجربی از 48 سر موش صحرایی نر بالغ‌نژاد ویستار (200-250 گرم، پاستور، ایران) استفاده شد. حیوانات در دمای اتاق 22-24 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 45-50 درصد و چرخه استاندارد 12 ساعت نور و 12 ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به منابع آب و غذا نگهداری شدند. در تمامی مراحل کار، دستورالعمل اخلاق کار با حیوانات مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک مورد توجه قرار گرفت (کد اخلاق: IR.AUMS.REC 1395.9221313204).

#### طراحی مطالعه

در این مطالعه رت‌ها به‌طور تصادفی به 6 گروه تقسیم شدند (n=8): کنترل (C: Control)، کنترل تمرین مقاومتی (RT: Resistance training)، کنترل تمرین استقامتی (ET: Endurance training)، دیابتی (D: Diabetes)، دیابتی تمرین مقاومتی (D+RT: Diabetes+Resistance training) و دیابتی تمرین استقامتی (D+ET: Diabetes+Endurance training). مراحل انجام مطالعه در تصویر شماره 1 نشان داده شده است.

#### القای دیابت نوع 2

جهت القای دیابت، رت‌ها ابتدا وزن شدند و بعد از 12 ساعت ناشتا ماندن، جهت القای دیابت از محلول



تصویر شماره 1: مراحل انجام کار

## واکنش Real-time PCR

پس از استخراج RNA و ساخت cdNA از تمام نمونه‌ها، بیان ژن‌های مسیر Nrf2/Keap1 شامل ژن‌های HO1، Keap1، Nrf2 و هم‌چنین Cyclo A به عنوان Housekeeping با استفاده از روش real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش Real-time PCR توسط دستگاه (Roche Diagnostics GmbH) Life Cyclor 96 (آلمان) انجام شد. به این منظور حجم کلی واکنش 20 µl در نظر گرفته شد که این حجم حاوی 2 µl از cdNA رقیق شده (به میزان یک پنجم)، 0/5 µl از پرایمرهای اختصاصی F و R ژن‌ها (جدول شماره 1)، 7 µl از محلول سایبرگرین (یکتا تجهیز، ایران) و آب فاقد نوکناز (سیناکلون، ایران) بود. مخلوط حاصل طبق برنامه دمایی تنظیم شده در داخل دستگاه قرار داده شد. واکنش به صورت تکرارهای سه تایی برای همه نمونه‌ها صورت گرفت. پس از انجام واکنش، داده‌های خام به صورت سیکل آستانه (Cycle threshold: CT) از دستگاه استخراج و سنجش میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش  $\Delta\Delta CT$  تعیین شد.

جدول شماره 1: توالی پرایمر ژن‌ها

Primer sequences (5'-3')		ژن
CTAGCCTGGTCAAGATACTAC	Sense	HO1
GGAAACTGAGTGTGAGGAC	Antisense	
ACAACTGGATGAAGAGACCG	Sense	Nrf2
TGTGGGCAACCTGGGAGTAG	Antisense	
CAGCGTGGAGAGATATGAG	Sense	Keap-1
AGTAACATTCTGCCGAGTT	Antisense	
GGCAAATGTCTGGACCAACAC	Sense	Cyclo A
TTAGAGTGTCCACAGTCGGAGATG	Antisense	

## آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار Prism Pad Graph 8 صورت گرفت. برای بررسی تفاوت معنی‌داری میانگین‌ها از آزمون پارامتریک آنالیز واریانس یک طرفه (One-way analysis of variance: ANOVA) استفاده شد. در صورت معنادار بودن آنالیز واریانس یک طرفه از آزمون تعقیبی Tukey جهت پیدا کردن محل اختلاف استفاده شد. داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شدند. لازم به ذکر است که سطح معنی‌داری اختلاف بین گروهی  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

نردبان و آموختن بالا رفتن از پله‌های نردبان در نظر گرفته شد. در مرحله دوم حیوانات 5 روز در هفته به مدت 10 هفته تمرین کردند. هر جلسه شامل 3 ست تمرین بود که در هر ست 4 بار بالا رفتن حیوان از نردبان مخصوص (دارای 26 پله) به ارتفاع یک متر انجام گرفت. بین هر ست 1 دقیقه استراحت برای حیوانات در نظر گرفته شد. از شروع هفته دوم هر هفته وزنه‌هایی به میزان 30 درصد وزن اولیه رت‌ها به دم آنها بسته می‌شد که این مقدار در آخرین هفته به 200 درصد وزن آن‌ها رسید (20).

## نمونه‌گیری

48 ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، حیوانات از طریق بیهوشی عمیق با تزریق داخل صفاقی 70 mg/kg کتامین (آلفاسان، ایران) و 4 mg/kg زایلوزین (آلفاسان، ایران) آسان‌کشی شدند. بیضه چپ حیوانات خارج و بلافاصله به تانک نیتروژن منتقل شد و سپس جهت آزمایشات بعدی در فریزر 70- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

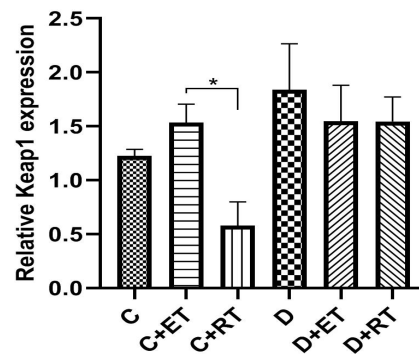
## استخراج RNA و ساخت cdNA

ابتدا نمونه‌ها از فریزر خارج و روی یخ قرار داده شدند. سپس RNA کل با استفاده از RNX-Plus (یکتاتجهیز، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. RNA استخراج شده در Diethylpyrocarbonate (DEPC) treated water (سیناکلون، ایران) حل شد. غلظت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ و اندازه‌گیری میزان جذب RNA در دو طول موج 260 و 280 نانومتر و نسبت 260/280 تعیین شد. بلافاصله پس از ساخت RNA، مقدار 2 µg از RNA کل جهت ساخت cdNA با استفاده از کیت ساخت cdNA (پارس توس، ایران) استفاده شد. cdNA ساخته شده در فریزر 70- درجه سانتی‌گراد تا زمان بررسی بیان ژن نگهداری شد.

## یافته ها

## بیان ژن Keap1

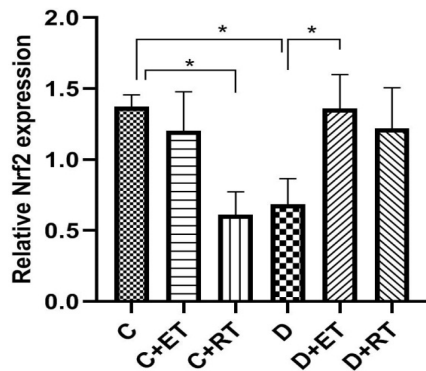
تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که میزان بیان ژن Keap1 در گروه کنترل تمرین مقاومتی در مقایسه با گروه کنترل تمرین استقامتی به‌طور معنی‌داری ( $P=0/04$ ) کاهش یافته است. میزان بیان ژن Keap1 در بافت بیضه گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داد هر چند این تغییرات معنی‌دار نبود. هم‌چنین میزان بیان ژن Keap1 در گروه‌های دیابتی با تمرین مقاومتی و دیابتی با تمرین استقامتی در مقایسه با گروه دیابتی کاهش یافت اما تفاوت‌ها معنی‌دار نبودند ( $P<0/05$ ) (تصویر شماره 2).



تصویر شماره 2: تغییرات بیان ژن Keap1 به دنبال تمرینات استقامتی و مقاومتی در گروه‌های مختلف. میزان بیان Keap1 در گروه کنترل تمرین مقاومتی در مقایسه با گروه کنترل استقامتی کاهش معنی‌داری نشان داد. C: کنترل، C+ET: کنترل تمرینات استقامتی، C+RT: کنترل تمرینات مقاومتی، D: دیابتی، D+ET: دیابتی تمرین مقاومتی، D+RT: دیابتی تمرین استقامتی

## بیان ژن Nrf2

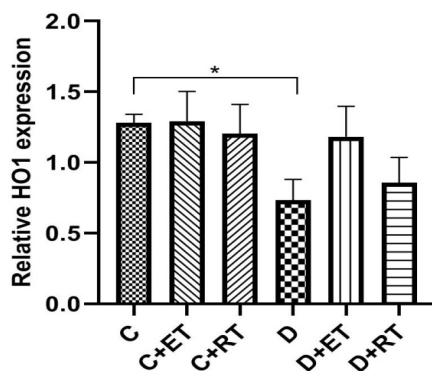
نتایج نشان داد که سطح بیان ژن Nrf2 در بافت بیضه گروه‌های دیابتی و کنترل تمرین مقاومتی در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش معنی‌داری یافته است ( $P=0/02$ ). هم‌چنین میزان بیان این ژن در گروه‌های دیابتی با تمرین مقاومتی و دیابتی با تمرین استقامتی در مقایسه با گروه دیابتی افزایش یافت، البته این افزایش فقط در گروه دیابتی با تمرین استقامتی معنی‌دار بود ( $P=0/04$ ) (تصویر شماره 3).



تصویر شماره 3: تغییرات بیان ژن Nrf2 به دنبال تمرینات استقامتی و مقاومتی در گروه‌های مختلف. میزان بیان Nrf2 به دنبال دیابت کاهش می‌یابد و انجام تمرینات استقامتی منجر به افزایش بیان این ژن می‌شود. C: کنترل، C+ET: کنترل تمرینات استقامتی، C+RT: کنترل تمرینات مقاومتی، D: دیابتی، D+ET: دیابتی تمرین مقاومتی، D+RT: دیابتی تمرین استقامتی

## بیان ژن HO1

طبق نتایج به دست آمده از این مطالعه، میزان بیان نسبی ژن HO1 در بافت بیضه گروه دیابتی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد. هم‌چنین میزان بیان ژن HO1 در گروه‌های دیابتی با تمرین استقامتی و مقاومتی در مقایسه با گروه دیابتی افزایش نشان داد اما این افزایش معنی‌دار نبود ( $P<0/05$ ) (تصویر شماره 4).



تصویر شماره 4: تغییرات بیان ژن HO1 به دنبال تمرینات استقامتی و مقاومتی در گروه‌های آزمایشی. میزان بیان ژن HO1 به دنبال دیابت در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌یابد. C: کنترل، C+ET: کنترل تمرینات استقامتی، C+RT: کنترل تمرینات مقاومتی، D: دیابتی، D+ET: دیابتی تمرین مقاومتی، D+RT: دیابتی تمرین استقامتی

## بحث

در این مطالعه تأثیر تمرینات استقامتی و مقاومتی بر مسیر پیام‌رسانی Nrf2/Keap1 در بیضه موش‌های دیابتی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه حاضر نشان داد که به دنبال القای دیابت میزان بیان ژن Keap1 در بیضه افزایش و بیان ژن‌های Nrf2 و HO1 کاهش می‌یابد و به دنبال استفاده از ورزش، به‌ویژه ورزش استقامتی بهبود در عملکرد این مسیر به ویژه افزایش بیان ژن Nrf2 رخ می‌دهد. امروزه شیوع دیابت به سرعت در حال افزایش است و به عنوان یکی از بزرگترین تهدیدهای سلامت در جوامع محسوب می‌شود (21). ناباروری و اختلالات هورمونی در مردان از جمله عوارض ناشی از دیابت هستند. یکی از عوارض مخرب دیابت در سیستم تولیدمثل مردان تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در بافت بیضه است که منجر به کاهش توانایی آن در محافظت از بافت بیضه در برابر آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود (22). افزایش سطح استرس اکسیداتیو جزو مهم‌ترین علل اختلال در روند اسپرماتوژنز محسوب می‌شود (23). متعاقب دیابت تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش استرس اکسیداتیو منجر به آسیب بافت بیضه، اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA (24) و تغییرات بیوشیمیایی و هورمونی می‌شود (25). یکی از مسیرهایی که به دنبال آسیب سلولی فعال می‌شود مسیر Nrf2/Keap1 است که بیش از 200 ژن محافظ سلول را در برابر فشار اکسایشی تنظیم می‌کند (26). نتایج به‌دست آمده از مطالعات انجام شده بر روی حیوانات نشان می‌دهد در حیواناتی که ژن Nrf2 در آن‌ها غیرفعال است (Nrf2<sup>-/-</sup>) میزان استرس اکسیداتیو در کلیه بافت‌ها افزایش می‌یابد و حیوان مستعد ابتلا به بیماری‌های مزمن می‌شود (27). مطالعه حاضر نشان داد میزان بیان ژن Nrf2 به دنبال دیابت کاهش یافته است و متعاقباً کاهش بیان ژن HO1 نیز مشاهده شد. هم‌سو با مطالعه حاضر، Li و همکاران (2019) نشان دادند القای هایپرگلیسمی در ماکروفازهای کشت داده شده، مهار فعالیت Nrf2 را به دنبال داشته و به دنبال مهار Nrf2، مهار بیان ژن‌های

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همانند HO1 و NQO1 صورت می‌گیرد (28). سرکوب Nrf2 در موش‌های نر باعث اختلال در تولید اسپرم (29) و کاهش تحرک آن می‌شود (30). طبق مطالعات صورت گرفته استفاده از موادی که منجر به افزایش فعالیت Nrf2 در بیضه می‌شوند مانند Sulforaphane (31) و *Artemisia judiaca L* (32) با جلوگیری از القای آپوپتوز در سلول‌های زیای موجود در بیضه موش‌های دیابتی، باعث بهبود اسپرماتوژنز در آن‌ها می‌شوند.

ورزش که به عنوان یک رکن اساسی و ضروری در کیفیت زندگی افراد محسوب می‌شود (33) می‌تواند عوارض منفی دیابت را بر پارامترهای اسپرم و کیفیت اسپرم کاهش دهد (34). در مطالعه قبلی از همین نویسندگان نشان داده شد که انجام فعالیت‌های فیزیکی در رت‌های دیابتی موجب افزایش زنده مانی اسپرم‌ها و تعداد سلول‌های سرتولی می‌شود (35). ورزش از طریق فعال کردن مسیر Nrf2 موجب بهبود دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود (12). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از تمرینات استقامتی و مقاومتی در موش‌های دیابتی می‌تواند به طور قابل توجهی سطح بیان Nrf2 را افزایش دهد که این افزایش به دنبال انجام ورزش استقامتی به صورت معنی‌دار بود. هم‌چنین میزان بیان Nrf2 و Keap1 در موش‌های سالم تحت ورزش مقاومتی به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد.

به نظر می‌رسد میزان تغییر در بیان Nrf2 با توجه به مدت زمان تمرینات، روش تمرین و نوع بافت مورد ارزیابی متفاوت است (16). در همین راستا Gomes و همکاران (2016) بیان کردند که به دنبال تمرین مقاومتی در میزان بیان Nrf2 در پروستات موش‌های صحرایی جوان تغییری ایجاد نمی‌شود (36). هم‌چنین در صورتی که میزان فعالیت فیزیکی کم‌تر از 1 ساعت باشد تغییری در بیان Nrf2 دیده نمی‌شود و هنگامی که مدت زمان ورزش به 90 دقیقه می‌رسد افزایش بیان Nrf2 در عضله اسکلتی و مغز مشاهده می‌شود (37).

اینترلوکین‌های ۱ بتا و ۶ هم افزایش می‌یابد (40). انجام فعالیت‌های ورزشی شدید هم با کاهش تستوسترون و افزایش میزان اسپرم‌های مرده باعث کاهش باروری می‌شود در حالی که انجام ورزش‌های متوسط باعث افزایش تعداد اسپرم‌ها می‌گردد (41). به نظر می‌رسد انجام فعالیت‌های ورزشی به‌طور کلی موجب افزایش سطح Nrf2 می‌شود اما انجام ورزش‌های خیلی شدید میزان آن را کاهش می‌دهد (16). با توجه به این که در این مطالعه بررسی اثر ورزش‌های مقاومتی و استقامتی بر بیان ژن‌های مسیر Nrf2/Keap1 در رت‌های دیابتی صورت گرفته است در همین راستا بررسی‌های بیش‌تری به ویژه در سطح پروتئین برای واضح‌تر شدن اثر تمرینات ورزشی بر مسیر پیام‌رسانی Nrf2/Keap1 مورد نیاز است تا بتوان همراه با شناخت و بررسی سایر مسیرهای مولکولی وابسته به Nrf2 روش‌های کارآمدتری برای بهبود عوارض دیابت پیشنهاد کرد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به‌طور کلی دیابت موجب کاهش بیان ژن‌های مسیر Nrf2/Keap1 در بافت بیضه می‌شود و انجام فعالیت‌های فیزیکی به ویژه تمرینات استقامتی می‌تواند منجر به بهبود این مسیر در موش‌های دیابتی شود.

### سپاسگزاری

مطالعه حاضر بر اساس طرح تحقیقاتی مورد تایید معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شده است. از همه کسانی که ما را در این راه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

### References

1. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AEJJo. Diabetes mellitus and sperm parameters. *J Androl* 2012; 33(2): 145-153.
2. Ikeda A, Matsushita S, Sakakibara Y. Inhibition of protein kinase C  $\beta$  ameliorates

Li و همکاران (2015) در مطالعه‌ای موشها را به مدت 1 و 6 ساعت بر روی تردمیل ورزش دادند و بلافاصله بعد از اتمام این زمان میزان بیان ژن Nrf2 و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را مورد بررسی قرار دادند. مطالعه آن‌ها نشان داد که یک ساعت تمرین موش‌ها روی تردمیل تغییرات قابل توجهی در بیان ژن Nrf2 در عضله اسکلتی ایجاد نمی‌کند، اما 6 ساعت تمرین موجب افزایش بیان Nrf2 و هم‌چنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در عضله اسکلتی موش می‌شود (38). هم‌چنین به نظر می‌رسد با افزایش سن میزان فعالیت Nrf2 کاهش می‌یابد و تجمع Nrf2 در هسته و فعال شدن Nrf2/ARE به دنبال ورزش فقط در موش‌های جوان دیده می‌شود (39).

صرف‌نظر از مدت زمان (4-24 هفته) و نوع ورزش، انجام فعالیت هوازی و منظم باعث فعال شدن Nrf2 در بیش‌تر بافت‌های بدن مثل کلیه، مغز، کبد، بیضه و پروستات می‌شود و با وجود عدم تغییر Nrf2 با افزایش سن، می‌توان با انجام فعالیت‌های منظم منجر به تغییرات Nrf2 شد (27).

Zhang و همکاران (2019) نشان دادند که انجام تمرینات خسته‌کننده توسط رت‌ها منجر به کاهش میزان Nrf2 و HO1 و هم‌چنین کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش میزان مالون دی‌آلدئید می‌شود (17).

در مطالعه انجام شده توسط Duan و همکاران (2017) مشخص شد انجام ورزش‌های شدید می‌تواند منجر به کاهش میزان Nrf2 و HO1 در عضله اسکلتی و کبد شود هم‌چنین میزان فاکتور نکروز دهنده تومور،

impaired angiogenesis in type I diabetic mice complicating myocardial infarction. *Circ J* 2012; 76(4): 943-949.

3. Vargas-Mendoza N, Morales-González Á, Madrigal-Santillán EO, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, García-Melo LF, et al.

- Antioxidant and adaptative response mediated by Nrf2 during physical exercise. *Antioxidants* 2019; 8(6): 196.
4. Son SMJDr, practice c. Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77(3): S65-S70.
  5. Aslani BA, Ghobadi SJLs. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci* 2016; 146: 163-173.
  6. Tvrdá E, Kňazická Z, Bárdos L, Massányi P, Lukáč NJAvh. Impact of oxidative stress on male fertility—A review. *Acta Vet Hung* 2011; 59(4): 465-484.
  7. Mallard AR, Spathis JG, Coombes JS. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) and exercise. *Free Radic Biol Med* 2020; 160: 471-479.
  8. Józków P, Rossato M. The impact of intense exercise on semen quality. *Am J Mens Health* 2017; 11(3): 654-662.
  9. Mombeyni A, Bahmanzade M, Sarami A, Changizi-Ashtiyani S, Parastesh M. The Effect of Increasing Resistance Training on Testicular Oxidative Stress and Quality of Spermatogenesis in Male Rats. *J Arak Univ Med Sci* 2018; 21(4): 86-97 (Persian).
  10. Adlard PA, Perreau VM, Cotman CW. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiol Aging* 2005; 26(4): 511-520.
  11. Samadian Z, Tofighi A, Razi M, Tolouei Azar J, Ghaderi Pakdel F. Moderate-intensity exercise training ameliorates the diabetes-suppressed spermatogenesis and improves sperm parameters: Insole and simultaneous with insulin. *Andrologia* 2019; 51(11): e13457.
  12. Tu W, Wang H, Li S, Liu Q, Sha H. The anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in chronic diseases. *Aging Dis* 2019; 10(3): 637-651.
  13. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J Biol Chem* 2003; 278(24): 21592-21600.
  14. Zhang J, Bao X, Zhang M, Zhu Z, Zhou L, Chen Q, et al. MitoQ ameliorates testis injury from oxidative attack by repairing mitochondria and promoting the Keap1-Nrf2 pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019; 370: 78-92.
  15. David JA, Rifkin WJ, Rabbani PS, Ceradini DJJJodr. The Nrf2/Keap1/ARE pathway and oxidative stress as a therapeutic target in type II diabetes mellitus. *J Diabetes Res* 2017; 2017: 4826724.
  16. Mallard AR, Spathis JG, Coombes JSJFRB, Medicine. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) and exercise. *Free Radic Biol Med* 2020; 160: 471-479.
  17. Zhang H, Liu M, Zhang Y, Li X. Trimetazidine attenuates exhaustive exercise-induced myocardial injury in rats via regulation of the Nrf2/NF-κB signaling pathway. *Front Pharmacol* 2019; 10: 175.
  18. Satheesh MA, Pari L. Effect of pterostilbene on lipids and lipid profiles in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetes mellitus. *J Appl Biomed* 2008; (61): 31-37.
  19. Parastesh M, Heidarianpour A. Effects of endurance training on the serum level of sex hormones and sperm parameters after diabetic induction by streptozotocin-nicotinamide. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2017; 19(5) :94-104 (Persian).
  20. Kim H-J, So B, Son JS, Song HS, Oh SL,

- Seong JK, et al. Resistance training inhibits the elevation of skeletal muscle derived-BDNF level concomitant with improvement of muscle strength in zucker diabetic rat. *J Exerc Nutrition Biochem* 2015; 19(4): 281-288.
21. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(5): 1047-1053.
  22. Rohbarian R, SepehriMoghadam H, Sadooghi SD. Effect of aqueous extract of *Launaea acanthodes* on testicular tissue and sperm parameters in alloxan-induced diabetic rats. *Intern Med Today* 2015; 21(1): 21-29.
  23. Gharagozloo P, Gutiérrez-Adán A, Champroux A, Noblanc A, Kocer A, Calle A, et al. A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. *Hum Reprod* 2016; 31(2): 252-262.
  24. Shah NA, Khan MRJBri. Antidiabetic effect of *Sida cordata* in alloxan induced diabetic rats. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 671294 .
  25. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 2008; 85(3): 335-353.
  26. Sahraei M, Abdi A, Jalal H. Protective Effect of Berberine Chloride and Aerobic Training on Liver Nrf2/HO-1 Pathway and PPAR $\gamma$  in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *J Ardabil Univ Med Sci* 2020; 20(3): 296-306 (Persian).
  27. Done AJ, Traustadóttir TJRb. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biol* 2016; 10: 191-199.
  28. Li M, Yu H, Pan H, Zhou X, Ruan Q, Kong D, et al. Nrf2 suppression delays diabetic wound healing through sustained oxidative stress and inflammation. *Front Pharmacol* 2019: 1099.
  29. Nakamura BN, Lawson G, Chan JY, Banuelos J, Cortés MM, Hoang YD, et al. Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner. *Free Radic Biol Med* 2010; 49(9): 1368-1379.
  30. Chen K, Mai Z, Zhou Y, Gao X, Yu B. Low NRF2 mRNA expression in spermatozoa from men with low sperm motility. *Tohoku J Exp Med* 2012; 228(3): 259-266.
  31. Wang Y, Zhang Z, Guo W, Sun W, Miao X, Wu H, et al. Sulforaphane reduction of testicular apoptotic cell death in diabetic mice is associated with the upregulation of Nrf2 expression and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; 307(1): E14-E23.
  32. Saeedan AS, Soliman GA, Abdel-Rahman RF, Abd-Elsalam RM, Ogaly HA, Foudah AI, et al. *Artemisia judaica* L. diminishes diabetes-induced reproductive dysfunction in male rats via activation of Nrf2/HO-1-mediated antioxidant responses. *Saudi J Biol Sci* 2021; 28(3): 1713-1722.
  33. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(9): 5119-5123.
  34. Lavín-Pérez AM, Collado-Mateo D, Villafaina S, Calle-Guisado V. The role of exercise to reduce the impact of diabetes in the seminal quality: A systematic review. *Medicina* 2021; 57(2): 159.
  35. Nadi Z, Madadi S, Bayat P, Abbasi Y. Effect of Resistance and Endurance Trainings on Sperm Parameters and Spermatogenesis Indices in Type 2 Diabetic Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2020; 30(186): 47-57 (Persian).

36. Gomes F, Chuffa L, Scarano W, Pinheiro P, Fávaro W, Domeniconi RF. Nandrolone decanoate and resistance exercise training favor the occurrence of lesions and activate the inflammatory response in the ventral prostate. *Andrology* 2016; 4(3): 473-480.
37. Bos I, De Boever P, Panis LI, Sarre S, Meeusen RJN. Negative effects of ultrafine particle exposure during forced exercise on the expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the hippocampus of rats. *Neuroscience* 2012; 223: 131-139.
38. Li T, He S, Liu S, Kong Z, Wang J, Zhang Y. Effects of different exercise durations on Keap1-Nrf2-ARE pathway activation in mouse skeletal muscle. *Free Radic Res* 2015; 49(10): 1269-1274.
39. Done AJ, Gage MJ, Nieto NC, Traustadóttir TJFRB, Medicine. Exercise-induced Nrf2-signaling is impaired in aging. *Free Radic Biol Med* 2016; 96: 130-138.
40. Duan F-f, Guo Y, Li J-w, Yuan KJOM, Longevity C. Antifatigue effect of luteolin-6-C-neohesperidoside on oxidative stress injury induced by forced swimming of rats through modulation of Nrf2/ARE signaling pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 3159358.
41. Vaamonde D, Garcia-Manso JM, Hackney ACJRadmdd. Impact of physical activity and exercise on male reproductive potential: a new assessment questionnaire. *Rev Andal Med Deport* 2017; 10(2): 79-93.