

اثر استرس حرارتی بر روی متابولیسم پایه در بافت بیضه با تمرکز بر میتوکندری

فاطمه السادات موسوی

کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، رشته زیست-شناسی تکوین، دانشگاه ارومیه، ایران

چکیده

آسیب ناشی از گرما در بیضه-ها یکی از علل ناباروری در مردان و اغلب پستانداران محسوب می-شود. قرار گرفتن بیضه-ها در معرض گرما، حتی کوتاه مدت، منجر به توقف اسپرماتوژنز می-گردد. در مطالعه تجربی از ۱۸ سر موش صحرایی نر به طور تصادفی به ۳ گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند که شامل گروه ۱: کنترل، گروه ۲: استرس حرارتی ۳۷ و گروه ۳: استرس حرارتی ۴۰ درجه سانتی-گراد را دریافت را به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۲ روز دریافت کردند. پس از مرحله تیمار آسان کشی صورت گرفت و بیضه-های چپ جدا و تثبیت شدند برای آزمایشات ایمنوهیستو شیمیایی و بافت شناسی مورد ارزیابی قرار گرفتند و بیضه راست برای انجام بررسی-های اکسیداتیو و آنالیز-های مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت میزان مالون دی آلدئید و GSSG در مقایسه با کنترل افزایش یافته، در حالی که سطح آنزیم-های اکسیداتیو LDH، GSH و لاکتات دهیدروژناز در این غلظتها کاهش مییابد. نتایج و سترن بلات سطوح پروتئین-ها -B-Actin^۱ GLUT، -B-Actin^۳ GLUT و -B-Actin^۴ MCT- در گروه-های استرس حرارتی ۳۷ و ۴۰ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی-داری یافته بود. نتایج ایمنوهیستوشیمی-GLUT^۱، -B-Actin^۳ GLUT و -B-Actin^۴ MCT- در سلول-های سرتولی و اسپرماتوگونی گروه-های دریافت کننده استرس حرارتی نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود. در حالی که گروه استرس حرارتی ۴۰ میزان کاهش بیشتر از گروه استرس حرارتی ۳۷ بود اما این کاهش از نظر آماری معنی-دار نبود. مطالعه حاضر نشان داد که استرس حرارتی سبب آسیب اکسیداتیو و تغییرات بافت بیضه می-شود.

کلیدواژه: میتوکندری، متابولیسم پایه، بیضه، موش صحرایی نر

مقدمه

متابولیسم مجموعه ای تغییرات ترکیبی و تخریبی در موجودات زنده است. متابولیسم مجموعه ای از تحولات شیمیایی زندگی پایدار در سلول های سازواره های زنده است. به بیانی بسیار ساده، متابولیسم به مجموعه ی پروسه های بیوشیمیایی، و فیزیولوژیکی بدن انسان برای حفظ حالت هومئوستازی، نیز تجزیه ی مواد غذایی مصرفی توسط بدن، و همچنین استفاده از انرژی موجود در آنها اطلاق می گردد. یا به بیانی دیگر، متابولیسم مجموعه ی عملکردهای بیوشیمیایی بدن انسان می باشد (Sekirot et al., ۲۰۱۰). متابولیسم یا همان سوخت و ساز بدن، مجموعه ای از فرآیندهای بیوشیمیایی است که بدن انسان از آنها برای تبدیل غذا به انرژی استفاده می کند. این فرآیندهای متابولیک شامل تنفس، خوردن و هضم غذا، انتقال مواد مغذی به سلول ها از طریق خون، استفاده از انرژی توسط ماهیچه ها، اعصاب و سلول ها و در نهایت از بین بردن مواد زائد از بدن را می توان نام برد. متابولیسم پایه (BMR) به عنوان بزرگترین بخش انرژی روزانه بدن بوده و عوامل متعددی می توانند سبب تغییر در BMR افراد گردند (Schiavo et al., ۲۰۱۷).

استرس

هر انسانی در طول زندگی خود، استرس را تجربه می کند و چنین به نظر می رسد که این مقوله، جزو لاینفک زندگی امروزی شده و به ندرت می توان از آن دوری کرد. استرس مفهومی است آشنا، مانند عشق، نفرت، گرسنگی و موفقیت که کاربردی روزمره داشته و به زبان رانده می شود و برای بقا و تطابق دادن با تغییرات زندگی، امری آشنا به حساب می آید. استرس، امروزه به دلیل پیشرفت ها و تغییراتی که در زندگی پیش آمده، با بیماری ها و اختلالات گوناگونی در ارتباط است که زندگی میلیون ها انسان را به مخاطره می اندازد. یکی از پررونق ترین بیماری های زمان فعلی در سراسر جهان استرس می باشد که تقریباً همه ی افراد در برهه های از زمان استرس را تجربه می کنند. که البته وجود اندکی استرس در زندگی مطلوب می باشد. استرس را به عنوان تنشی در سیستم بدن که به صورت واکنش های داخلی بدن در برابر آثار نامطلوب فیزیکی جلوه می کند تعریف می کنند. از عواملی که موجب به وجود آمدن استرس در فرد می شود می توان ناهم خوانی میان خواسته ها و منابع، انجام دادن کاری بیش از اندازه در فرصت کم، نگرش منفی و بدبینانه نسبت به وقایع و اشخاص، خواسته های بلند پروازانه و... را نام برد (Lazarus, ۱۹۹۳).

استرس عبارت است از یک حالت تنش روان شناختی که به وسیله انواع نیروها یا فشارهای جسمانی، روانی، اجتماعی و... حاصل می گردد. تعاریف بسیاری از استرس وجود دارد. اما یک تعریف کلی از استرس، که توسط هانس سلیه^۱ که برخی او را پدر تحقیق درباره ی استرس می دانند، مطرح شده است این گونه است: استرس عکس العمل نامعین انسان است در مقابل فشار یا استرس واکنش فیزیولوژیک بدن ماست در مقابل هر تغییر، تهدید و فشار بیرونی یا درونی که تعادل روانی ما را بر هم می زند. کانن^۲ معتقد است هر چیزی که تعادل زیستی یا روانی ما را برهم میزند، در ما ایجاد استرس می کند. براین اساس هرچه ما تعادل بیشتری داشته باشیم مقاومت و پایداری بهتری در مقابل استرس داریم. هر چه نیازهای روانی ما بهتر و کامل تر ارضاء شود ما تعادل روانی بهتری داریم و از طرفی عدم پاسخ گویی به نیازهای روانی ما را به سمت نامتعادل بودن، ناکامی افزایش استرس و نهایتاً بیماری روانی می کشاند. به عبارت دیگر استرس به پاسخ عمومی و غیر اختصاصی بدن در مقابل هر عاملی که سبب تهدید و یا به هم زدن تعادل بدن ایجاد می گردد اطلاق می شود. انواع مختلف عوامل استرس زا را به عوامل استرس زای فیزیکی، فیزیولوژیک، شیمیایی و بیوشیمیایی تقسیم می کنند (Sherwood, ۲۰۰۱). مجموعه عواملی

^۱ HANS SELY

^۲ Cannon

که سبب به هم خوردن هومئوستاز بدن می شوند را عوامل استرسو^۳ می نامند. استرس به یک بخش جدایی ناپذیر زندگی انسان تبدیل شده است. موجودات معمولاً تحت تاثیر تحریک عوامل استرس زا قرار می گیرند که بر روی عملکرد فیزیولوژیکی مختلف تاثیر می گذارد. قابلیت مقابله با این محرک های استرس زا از مهم ترین عوامل سلامتی و بیماری به شمار می رود. استرس سبب تغییر در سیستم های مختلف بدن از جمله سیستم عصبی مرکزی و تغییر رفتار و شناخت می شود (Bali, ۲۰۱۳). همچنین استرس به شرایطی اطلاق می شود که در آن مغز مقدار تحریک را بیش از اندازه و یا کیفیت تحریک را تهدیدکننده ارزیابی می نماید (Chrousos, ۱۹۹۸). مواجهه با شرایط مخاطره آمیز (استرسور) سبب آغاز پاسخ های تطابقی مهمی جهت مقابله ارگانیسم با تغییرات محیط می شود (Carrasco and Van de Kar, ۲۰۰۳).

تاثیر استرس بر روی سیستم تولید مثلی

استرس بر سیستم تولیدمثلی تاثیر منفی داشته و سبب سرکوب می شود. استرس مزمن به دلیل سرکوب هورمون های گنادوتروپین، سبب ناباروری می شود (Eman, ۲۰۱۵). محرک های استرس زا باعث فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) و محور سمپاتیک-آدرنال-گناد (HPG^۴) می شوند هورمون های ترشح شده توسط این سیستم ها پس از محرک های استرس زا منجر به تنظیم بدن غیرطبیعی، طولانی مدت و یا بیش از حد ناشی از استرس می شود که می تواند به طور بالقوه تغییرات طولانی مدت عصبی و غدد درون ریز را ایجاد کند و بر باروری تاثیر بگذارد (Kirby, ۲۰۰۹). از نظر بیولوژیکی، استرس سبب فعال شدن (HPA) می شود که به نوبه خود باعث مهار شدن محور HPG و در نهایت ترشح هورمون آزاد کننده گنادوتروپین^۵ (GnRH) را مهار می کند. آسیب ناشی از گرما در بیضه ها یکی از علل ناباروری در مردان و اغلب پستانداران محسوب می شود. قرار گرفتن بیضه ها در معرض گرما، حتی کوتاه مدت، منجر به توقف اسپرماتوزن می گردد که آغاز بهبودی در آن حدود ۴۰ یا حتی ۶۰ روز طول می کشد. نشان داده شده است که وزن بیضه ها حتی ۶۰ روز پس از یکبار قرار گرفتن در معرض گرما، به مقادیر طبیعی بازنگشته است (Setchell, ۱۹۹۸). مکانیسم سلولی که به موجب آن استرس گرما باعث آسیب بافت بیضه می شود، به طور کامل شناخته نشده است. تحقیقاتی که توسط آیکدا و همکاران انجام شده است، نقش بسیار موثر گونه های فعال اکسیژن رادیکال را در آسیب سلول های زایای بیضه در اثر استرس گرمایی، نشان داده است (Ikeda et al., ۱۹۹۱).

اسپرماتوزن

اسپرماتوزن یک فرآیند بسیار هماهنگ شامل: تقسیمات سلولی و تمایز برای تولید سلول های زایای مردانه هاپلوئید از سلول های پیش ساز دیپلوئید است. اسپرماتوزن پستانداران را می توان به مراحل قبل از میوز، میوز و پس از میوز تقسیم نمود. در مرحله قبل از میوز، اسپرماتوگونی دیپلوئید پس از تقسیم میتوز به اسپرماتوسیت اولیه تمایز می یابد. از طریق دو تقسیم میوز اسپرماتوسیت اولیه، چهار اسپرماتید گرد هاپلوئید را تولید و در مرحله پس از میوز، تغییرات مورفولوژیکی اسپرماتید گرد منجر به تولید اسپرماتید طویل و در نهایت اسپرماتوزوای بالغ می شود (Durairajanayagam et al., ۲۰۱۵). به علاوه مرگ طبیعی سلول زایا یا آپوپتوز نیز در اسپرماتوگونی طی این فرآیند رخ می دهد که نقش مهمی در تولید و بلوغ اسپرم در بیضه دارد. این فرآیند می تواند توسط فاکتورهای متعدد مانند مواد شیمیایی گنادوتروپین یا تستسترون، گرما اشعه و غیره دچار تداخل گردد. مرگ طبیعی سلول زایا یا آپوپتوز نیز در اسپرماتوگونی ها طی این فرآیند رخ می دهد که نقش مهمی در تولید و بلوغ اسپرم در بیضه دارد. افزایش سطح دمای بیضه باعث سرکوب اسپرماتوزن در گونه های مختلف

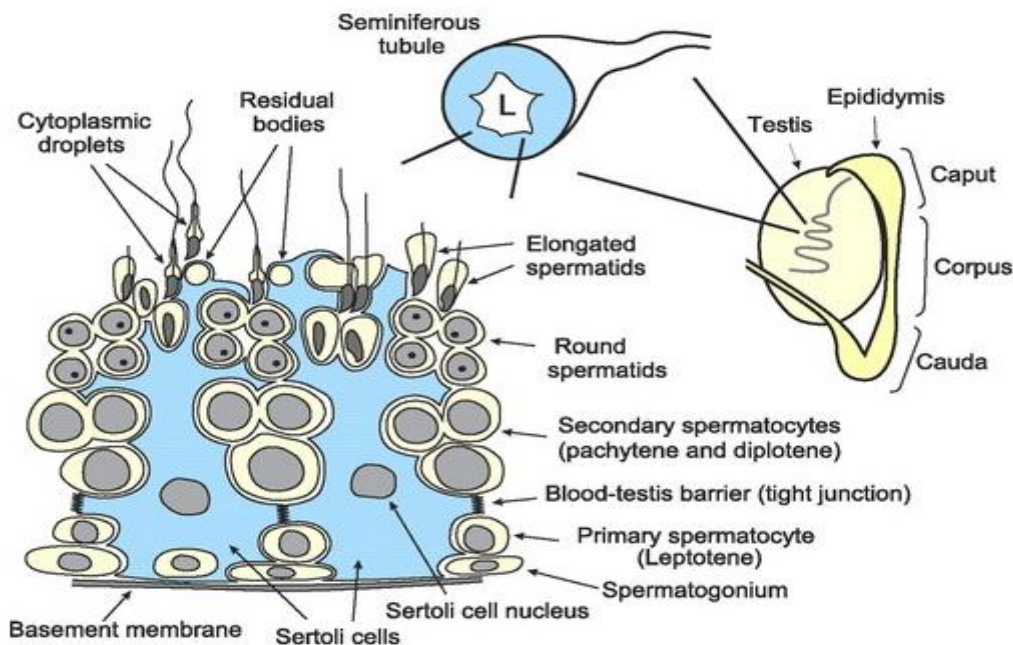
^۳ Stressor

^۴ Hypothalamic-pituitary-gonadal

^۵ Gonadotropin-Releasing Hormone

^۱ Glutathione

پستانداران از جمله انسان می شود. این فرآیند در موش و ۵۳ روز و در انسان ۷۵ روز طول می کشد و در طول زندگی جهت اطمینان از تأمین مداوم اسپرم در مردان ادامه می یابد. در حالی که بلوغ اپیدیدیمی سلول های اسپرم انسانی ۱۲ روز کامل طول می کشد. سد خونی- بیضوی (BTB)^۶ یکی از محدودترین موانع خونی بافتی در بدن پستانداران است. این ساختار ایجاد شده توسط اتصالات اختصاصی (اتصالات محکم، اکتوپلاسمیک پایه ای و اتصالات دسموزوم)، با محدود کردن جریان سلولی مواد از عرض سلول های سرتولی به قسمت رأسی، یک محیط مناسب برای تکوین اسپرماتیدهای پس میوزی در قسمت رأسی اپیتلیوم لوله منی ساز را فراهم می کند. این سد، اپیتلیوم لوله اسپرم ساز را به دو بخش بازال و اپیکال تقسیم می کند (Zhang et al., ۲۰۱۲). سه رویداد اصلی که در بخش اپیکال در طول اسپرماتوسیتوز^۷ رخ می دهد، شامل: میوز I و II، اسپرمیوز^۸ و اسپرمیشن^۸ پیشرفت اسپرماتوسیت اولیه از مراحل زیگوتن، پاکتی تن و دیپلوتن، به اسپرماتوسیت ثانویه و سپس اسپرماتید هاپلوئید، رشد اسپرماتید گرد اولیه به اسپرماتید طویل و به دنبال آن تحت فرآیند اسپرمیوز^۸ به شکل اسپرم با کروماتین کاملاً فشرده تمایز می یابند و در نهایت اسپرمیشن (بلوغ و متعاقب آن آزادسازی اسپرماتوزوآ به لومن لوله های اسپرم ساز) رخ می دهد. ولی تجدید اسپرماتوگونی و تمایز و پیشرفت چرخه سلولی تا مرحله پری لپتوتن اسپرماتوسیت خارج از BTB و در بخش بازال اپیتلیوم انجام میشود (Cheng and Mruk., ۲۰۱۲).



شکل ۱-۱ فرآیند اسپرماتوزن (Darszon et al., ۲۰۱۱).

^۶ barrier testis-Blood

^۷ Spermatocytogenesis

^۸ Spermiation

میتوکندری

نام میتوکندری، از دو کلمه یونانی Mito به معنای رشته و Chondrion به معنی دانه برگرفته شده است. از آن جا که این اندامک اغلب رشته ای درهم یا به صورت دانه های کوچک در سیتوپلاسم می باشد، این اسم به این دلیل نامگذاری گردید. تحقیقات اولیه انجام شده بر روی میتوکندری، در سال ۱۸۹۰ به وسیله آلمن صورت گرفت که آن ها را بیوپلاست یا جایگاه های زنده نامید (Beal, ۱۹۹۸). در یوکاریوتها، تنفس سلولی، تولید انرژی و دیگر فرآیندهای متابولیک تخصصی در میتوکندری که شامل یک غشا بیرونی و یک غشای داخلی است، انجام می شود که ۳۱٪ از حجم سیتوپلاسم را به خود اختصاص داده است. میتوکندری نه تنها نقش بسیار مهمی در متابولیسم سلول، به دلیل تولید انرژی دارد، بلکه مکانی برای تولید گونه های اکسیژن فعال است و نقش کلیدی در آپوپتوز و هموستاز کلسیم بازی می کند (Hudson et al., ۲۰۰۴). پتانسیل غشای میتوکندری شاخص بارزشی جهت تعیین سلامت و عملکرد سلول است. در مطالعه ای که بر روی رابطه بین پتانسیل غشای میتوکندری و کیفیت اسپرم و توانایی باروری انجام گرفته، نشان داده شد که پتانسیل غشای میتوکندری بالا نشان دهنده اسپرم های طبیعی با حرکت بیشتر می باشد (Gallon et al., ۲۰۰۶). میتوکندری منبع عمده تولید ROS داخل سلولی می باشد. مزدوج شدن انتقال الکترون با فسفریلاسیون اکسیداتیو سبب حفظ پتانسیل غشای بالا در میتوکندری می شود که نیازمند تولید ATP در سلولهای سوماتیک می باشد. این فرایند در اسپرم در اثر تولید ROS آسیب می بیند، بنابراین پتانسیل غشای میتوکندری کاهش می یابد (Guthrie and Welch, ۲۰۰۶).

پیشینه

Billig و همکاران در سال ۱۹۹۵ در مطالعات خود نشان دادند که در تنش حرارتی، فعالیت آنزیم های اندونوکلاز منجر به تقسیم DNA در سلول های زایا به زنجیره هایی با وزن مولکولی پایین می شود که این شکسته شدن داخل نوکلئومی DNA به عنوان شاخص آپوپتوز در سلول های زایای بافت بیضه به خصوص در اسپرماتوسیت های پکی تن و اسپرماتیدها قابل مشاهده می باشد.

Ikeda و همکاران در سال ۱۹۹۹ با افزایش حرارت در بافت بیضه میزان پراکسیداسیون چربی در سلول های زایا افزایش می یابد و علاوه بر آن فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانسی نیز دچار اختلال می شود.

Setchell در سال ۲۰۰۲ در مطالعه خود نشان دادند که شمارش سلول های اسپرماتوژنیک و سرتولی در بافت بیضه گروه های تحت تنش حرارتی کاهش معنی داری را در تعداد این سلول ها نشان داد بود. که نتیجه متعاقب تنش حرارتی، بافت بیضه دچار آسیب شده و روند اسپرماتوژنز مختل شده بود. همچنین مدت کوتاهی پس از قرار دادن بیضه در معرض گرما، از دست دادن وزن بیضه رخ می دهد. این کاهش در وزن بیضه می تواند منسوب به از دست دادن سلولهای زایا توسط آپوپتوز باشد. اگرچه وزن بیضه ممکن است تا چند هفته پس از قرار گرفتن در معرض گرما در موش بازگردد، با این حال وزن بیضه کمتر از قبل خواهد ماند.

در بررسی صورت گرفته توسط Yaeram و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که سپرم های اپیدیمی در معرض گرما قرار گرفته متفاوت از سلولهای زایا تحت تأثیر قرار می گیرد. بررسی ها بر روی موشهایی که به مدت ۱۲ ساعت در دو روز پی در پی در معرض حرارت ۵۶ درجه سانتیگراد قرار گرفتند، در مقایسه با گروه کنترل، تعداد اسپرم کمتر، وزن بیضه پایین تر، کاهش ظرفیت لقاح اسپرم در داخل بدن و تولید موشهایی با اندازه های کوچکتر را نشان داد. اسپرم اپیدیمی موش حرارت دیده دارای خاصیت اتصال کمتر به لایه زونا پلوسیدا و ظرفیت نفوذ کمتر به تخمک می باشد. این اثرات ابتدا در ۱ هفته پس از قرار گرفتن در معرض گرما دیده می شد و در ۲ هفته پس از آن برجسته تر شد.

Kanter و همکاران در سال ۲۰۱۳ با مطالعاتی که بر روی استرس حرارتی انجام دادند نشان دادند که آزمایشهای میکروسکوپی در بیضه موش صحرایی پس از قرار گرفتن در معرض گرما، هضم میتوکندری، اتساع شبکه آندوپالسمی صاف و فضاهای گسترده در هر دو سلول سرتولی و اسپرماتید را نشان میدهد.

Kim و همکاران در سال ۲۰۱۳ پس از مطالعات که انجام دادند دریافتند که اسپرماتوژنز، به خصوص تمایز و بلوغ اسپرماتوسیت و اسپرماتید، به دما حساس است. اسپرماتوژنز ایدئال باید حداقل در دمای ۲ درجه سانتی گراد پایین تر از درجه حرارت مرکزی بدن رخ می دهد. افزایش دمای کیسه بیضه، نه تنها، باعث آتروفی ژرمینال بیضه، توقف اسپرماتوژنز و کاهش سطح اینهیپین B (یک مارکر بیوشیمیایی اسپرماتوژنز) می شود، بلکه، منجر به کاهش تعداد اسپرم در مایع منی خواهد شد.

Durairajanayagam و همکاران در سال ۲۰۱۵ با مطالعه ای که بر روی علل و مکانیسم مولکولی استرس حرارتی و اثر بر بافت بیضه انجام دادند افزایش دمای بیضه روی اسپرماتوژنز پستانداران و اسپرمهای حاصل از آن تأثیر مخربی دارد. بنابراین، عدم تنظیم حرارتی منجر به استرس گرمایی کیفیتی اسپرم را به خطر می اندازد و خطر ناباروری را افزایش می دهد. در این پژوهش، چندین نوع مختلف عوامل خارجی و داخلی که ممکن است در ایجاد تنش گرمایی بیضه نقش داشته باشند، را مورد بررسی قرار دادند نتایج نشان داد که قرار گرفتن در معرض حرارت و مکانیسمهای احتمالی دخیل در آسیب سلولهای زایای ناشی از گرما، از جمله آپوپتوز، آسیب DNA شده و. در نهایت، این مکانیسم های پیچیده آپوپتوز منجر به مرگ سلول های زایا می شود.

Garolla و همکاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی هایی که انجام دادند نشان داده اند که افزایش طولانی مدت دمای کیسه ی بیضه فقط برای $1-5^{\circ}\text{C}$ می تواند باعث القا آپوپتوز در سلول های زایا و کاهش اندازه ی بیضه شود که منجر به پایین آمدن تولید اسپرم و مورفولوژی تغییر شکل یافته اسپرم می شود

مطالعات Rao و همکاران روی تأثیر شدت استرس گرمایی بر روی اسپرم و پارامترهای مایع منی در انسان نشان داد که پارامترها و عملکرد اسپرم به صورت برگشت پذیری کاهش یافته، در حالی که سطح سرمی هورمون های جنسی، اپیدیدیمس و عملکرد غدد جنسی تحت تأثیر قرار نمی گرفت. علاوه بر اینکه استرس اکسیداتیو در آسیب اسپرماتوژنز شرکت می کند، قرار گرفتن در معرض حرارت متقاطع نسبت به حرارت متوالی می تواند به صورت جدی تر به فرآیند اسپرماتوژنز آسیب برساند.

نتایج مطالعات Barekat و همکاران در سال ۲۰۱۶، نشان دادند که افزایش استرس اکسیداتیو و دمای بیضه در افراد مبتال به واریکوسل علاوه بر کاهش کیفیت پارامترهای اسپرم، بر سلامت کروماتین اسپرم نیز تأثیر منفی داشته و در نتیجه، روند اسپرماتوژنز و میزان باروری را تحت تأثیر قرار می دهد.

نتایج مطالعات Hjollund و همکاران استرس اکسیداتیو یک جنبه کلیدی از پاتوژنز در بسیاری از بیماریها است. مطالعات نشان داده اند که افزایش دمای بیضه مشاهده شده در بیضه افراد مبتلا به واریکوسل و کریپتورکیدیسم، با افزایش سطح استرس اکسیداتیو در ارتباط است. اسپرم انسان به استرس اکسیداتیو، سطح بالینی از رادیکال های آزاد و گونه های اکسیژن (ROS) از جمله: آنیون سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن بسیار حساس هستند. استرس اکسیداتیو می تواند آسیب رسان بوده . باعث آسیب اکسیداتیو به غشای پلاسمایی اسپرم و قطعه قطعه شدن (DNA) هر دو ژنوم هسته ای و میتوکندری می شود.

مواد و روش کار

این مقاله در خانه حیوانات دانشگاه ارومیه انجام گرفت و لذا در اینجا مواد و روش های مورد استفاده را معرفی می نمایم.

مواد

الکل (پاکدیس، ایران)، سرم فیزیولوژی (سها، ایران)، فرمالین (مرک، آلمان)، آب مقطر، کلروفرم (مرک، آلمان)، گلیسرول، کربنات لیتیم، پارافین، روغن سدر، کیت ستونی استخراج RNA (سینا کلون، ایران)، کیت سنتز cDNA (سینا کلون، ایران)، پرایمرهای ژن (ژن فن آوران)، کیت سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (آرسام فرازیست، ایران)، کیت سنجش GSSG، کیت سنجش GPX، Lpo (نوند سلامت)، کیت لاکتات (پارس آزمون)، کیت LDH پادکو، آنتی بادی اولیه (Glut^۱) ژن فن آوران، آنتی بادی اولیه (Elabskienences (Glut^۳، آنتی بادی اولیه (Elabskienences (Mct^۴،

تجهیزات

ترازو دیجیتالی با حساسیت ۰/۰۰۰۱ گرم برای توزین مواد (کیا- آلمان)، ترازو دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم جهت توزین موش ها (تجهیز طب، ایران)، انکوباتور (ریحان طب- ایران)، میکروسکوپ نوری (الیمپوس- ژاپن)، هموژنایزر (نوند سلامت، ایران)، pH متر (نیکون- ژاپن)، دستگاه یخ ساز، دستگاه الایزا ریدر (بایوتک، آمریکا)، سانتریفیوژ (سنتوریون- انگلستان)/ (سیگما- آلمان)، دستگاه نانو دراپ (ترمو- آمریکا)، اسپکتروفتومتر (انگلند بیو ویو- انگلیس)، دستگاه ورتکس (لابینکو- هلند)، انواع سمپلر (اپندورف، آلمان)، هود لامینار، اتوکلاو (پویش طب، ایران)، میکروسانتریفیوژ (پارس آزما، ایران)، دستگاه Real time PCR (ABI) استپ وان- آمریکا، فریزر ۸۰- و ۲۰- درجه سانتی گراد (نوآوران، ایران)، میکروتیوپ های مخصوص (micro ti- ABI) Real time PCR، بن ماری (واتر بس آداک- آلمان).

وسایل

ماسک، سینی و ست تشریح (قیچی جراحی، پنس، تیغ، اسکالپل و...)، رک، ارلن، بشر، بالن، پیپت، ارلن، لام و لامل، استوانه مدرج، انواع سر سمپلر، لوازم متداول آزمایشگاهی شامل لوله آزمایش، ظرف نمونه گیری، میکروتیوپ معمولی در حجم های مختلف، فویل آلومینیومی، استوانه مدرج، دماسنج، آکواریوم، هیتز

حیوانات مورد مطالعه

۱۸ سر موش صحرایی نر بالغ صحرایی نژاد ویستار در محدوده وزنی 20 ± 250 گرم از خانه حیوانات گروه زیست شناسی دانشگاه ارومیه برای انجام تحقیق استفاده می شود که به ۳ گروه ۱۲ تایی تقسیم شد. موش ها در طول مدت آزمایش در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد و رژیم نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با جیره استاندارد تغذیه خواهند شد. به مدت ۱۴ روز بدون انجام هرگونه آزمایش و گاوژ، موش ها به صورت گروه بندی قرار خواهند گرفت تا به شرایط محیط عادت کرده و احتمال تاثیر هر گونه استرس محیطی روی نتایج آزمایشات به صفر برسد. بعد از آداپتاسیون تیمارهای مورد نظر به شرح زیر انجام خواهند شد.

گروه بندی حیوانات

۱- گروه کنترل

- ۲- گروه دریافت دمای حمام آب ۳۷ درجه سانتی گراد + کنترل ۳۷ درجه سانتی گراد
 - ۳- گروه دریافت دمای حمام آب ۴۰ درجه سانتی گراد + کنترل ۴۰ درجه سانتی گراد
- طول مدت تیمار ۴۲ روز در نظر گرفته شد

نمونه برداری:

بعد از اتمام طول دوره تیمار (۴۲) روز، موش های به میزان 3 mg/kg زایلازین ۲٪ و 75 mg/kg کتامین ۱۰٪ به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و توسط جابه جایی مهره های گردنی آسان کشی شدند. ابتدا پوست ناحیه شکمی موش ها را به وسیله اتانول ۷۰٪ استریل و برشی در ناحیه شکمی ایجاد گردید و در نهایت بیضه ها با رعایت شرایط استریل از داخل شکم جدا شدند. بیضه سمت چپ بعد از توزین، جهت تثبیت به محلول فرمالین ۱۰٪ انتقال داده شد جهت بررسی بافت شناسی و ایمونوهیستوشیمی و بیضه سمت راست داخل فویل در یخچال ۸۰- به منظور بررسی های اکسیداتیو، ارزیابی های مولکولی و سترن بلات انتقال داده شد.



شکل ۱-۳ تشریح بافت بیضه

بررسی بافت شناسی

جهت انجام آزمایش های هیستوپاتولوژیک، موش ها کشته و سپس تشریح شدند. پس از شکافتن شستشوی آنها با سرم پوست و خارج کردن بیضه ها، فیزیولوژی انجام شد و با استفاده از فرمالین بافر ۱۰ درصد فیکس شدند. مراحل آماده سازی بافت شامل آب گیری با استفاده از الک های با درجه صعودی انجام شد، پس از خارج کردن آن مرحله شفاف سازی با استفاده از گزیلول و الک انجام شد. نهایتاً مرحله آغشتگی و قالب گیری با استفاده از پارافین مذاب صورت گرفت. پس از تهیه برش های ۴ تا ۵ میکرونی از قالب ها، رنگ آمیزی پاس داده ها میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیم Lactat

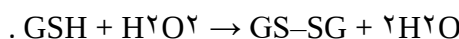
فعالیت آنزیم لاکتات- دهیدروژناز (LDH) توسط دستگاه اتوآنالایزر مدل ۳۰۰۰ BT- ساخت شرکت بیوتکنیکا کشور ایتالیا، با استفاده از کیت های پارس آزمون انجام شد (Thomas et al., ۱۹۸۰).

تعیین غلظت GSH

سنجش میزان گلوتاتیون بافت ها از روش Tietze استفاده شد (Burtis and Ashwood, ۱۹۹۱). ۲۰ میکرولیتر از نمونه هموزنه رقیق شده با اسید-۵-سولفوسالیسیلیک ۵ درصد (غلظت نهایی ۵ درصد) مخلوط شد. نمونه در دمای ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۸۱۰ میکرولیتر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرولیتر معرف DTNB ۰/۰۴ درصد در سیترات سدیم ۰/۱ درصد واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در ۴۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوتاتیون ۱ ml/mg منحنی استاندارد رسم و غلظت گلوتاتیون نمونه ها محاسبه گردید

تعیین غلظت GSSG

سنجش گلوتاتیون اکسید GSSG: بعد از تهیه سرم برای اندازه گیری GSSG: ۱۰۰ میکرولیتر سرم، به مقدار ۳۰ میکرولیتر از محلول داخل کیت گلوتاتیون اکسید اضافه و سنجش خواهد می شود (Habig and Jakoby., ۱۹۸۱).

**تعیین غلظت MDA**

مالون دی آلدئید کاربردی ترین شاخص برای ارزیابی استرس اکسیداتیو است. برای اندازه گیری این فاکتور از روش پلیسر و همکاران استفاده شد (Baluchnejadmojarad et al., ۲۰۱۳). براساس این روش ابتدا معرف کار-HCL-TBA (HCL-TBA) تهیه گردید. بدین صورت که تریکلرواستیک اسید به میزان ۱۵ درصد وزن حجمی و تیوباربیتورک اسید به میزان ۰/۳۷۵ درصد وزن حجمی، درون ۰/۲۵ HCL نرمال حل شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر از معرف کار مخلوط شده و ۱۵ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. نمونه ها پس از خنک شدن به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و میزان جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد. جهت اندازه گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از کیت تجاری رنسل ساخت شرکت رندوکس انگلستان استفاده شد.

جداسازی RNA

بعد از جمع آوری نمونه های بافت بیضه و انتقال به یخچال ۸۰- درجه سانتی گراد استفاده گردید. استخراج RNA براساس دستورالعمل کیت انجام گرفت. در ابتدا از بافت بیضه به میزان ۵۰ میلی گرم برداشته سپس داخل لوله آزمایش انتقال داده شد بعد به میزان ۱ میلی لیتر DR^۱ اضافه شد. بافت به خوبی ورتکس گردید. لوله آزمایش حاوی مواد به مدت ۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه انکوبه شد. محتویات لوله آزمایش به داخل میکروتیوب ۱/۵ منتقل شد. میکروتیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ rmp سانتریفیوژ شد. به هر میلی لیتر DR^۱ ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد. ۱۵ ثانیه ورتکس شد و در دمای آزمایشگاه به مدت ۳ دقیقه انکوبه شد. میکروتیوب ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. محلول رویی RNA به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر در داخل میکروتیوب ستونی انتقال داده شد سپس ۲۵۰ میکرولیتر اتانول به آن اضافه گردید. محلول جمع شده در میکروتیوب را دور انداخته سپس ستون به داخل میکروتیوب جدید انتقال داده شد. از بافر DR^۲ به میزان ۷۰۰ میکرولیتر به ستون اضافه گردید. لوله جمع کننده منتقل گردید و لوله جمع کننده ۳ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. در انتها ستون به داخل میکروتیوب انتقال داده شد در این مرحله از بافر DR^۳ به میزان ۵۰ اضافه شد و بعد از ۲ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm محلول جمع شده

در داخل لوله را بعد از ۲ دقیقه انکوباسیون، با سرعت ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد محول ها داخل میکروتیوب نیم انتقال داده شد نامگذاری نموده و به داخل فریزر ۲۰- انتقال داده شد.

نتز cDNA

سنتز cDNA، بر اساس کیت مورد استفاده، انجام گرفت. مواد مورد استفاده در جدول زیر ذکر گردیده. محصول حاصل را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید سپس بعد از سرد شدن محلول ۲x Rtpimer به آن اضافه شده و بعد از ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. در مرحله نهایی نیز به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. cDNA بدین ترتیب سنتز شد و جهت انجام PCR در فریزر نگهداری شد.

جدول ۱-۳ مواد سنتز cDNA

مقدار (ul)	مواد
۲	RNA Total
۱	رندوم هگزامر
۷	آب مقطر

پرایمرهای مورد استفاده

در جدول ۲-۳ پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش های در بافت بیضه را نشان می دهد

نام ژن	Perimer	AT	Refrence
MCT-۴	F: GCTGGCTATGCAGTATGGC R: TTGAGAGCCAGACCCAAGC	۶۰	Cao et al., ۲۰۱۷
GLUT-۱	F: TGTGCAACCCATGAGCTAA R: CCTGGTCTCATCTGGATTCT	۶۰	Krzeslak et al., ۲۰۱۲
GLUT-۳	F: TTCGTCTCTAGCCTGCACTG R: ACACAACCTTCTCCGGGTGAC	۶۰	Krzeslak et al., ۲۰۱۲
GAPDH	F: CTGCACCACCAACTGCTT R: GCCATCCACAGTCTTCTGR	۶۰	Balukoff et al., ۲۰۲۰

وسترن بلات

برای استخراج پروتئین کل از بافتهای توموری مثانه، ابتدا حدود ۱۰ میلیگرم از بافتهای مورد نظر توزین و سپس 9 RIPA از بافر میکرولیتر ۳۰۰ حدود 10 PMSF از میکرولیتر ۱ به علاوه $^{10} \times 200$ به هر نمونه اضافه گردید. در ادامه بافت به وسیله یکنواخت ساز 11 دستی به مدت حداقل ۵ دقیقه روی یخ یکنواخت شد. برای تهیه عصاره سلولی از رده سلولی، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول RIPA به ازاء هر یک میلیون سلول استفاده و غلظت پروتئین استخراج شده به وسیله روش بردفورد 12 تعیین گردید. ضمن آنکه الکتروفورز نمونه ها با ژل کوچک $10 \text{ cm} \times 8 \text{ cm}$ پلی اکریل آمید ۱۲/۵٪ و ولتاژ ۸۰-۱۰۰ ولت (به مدت حدود ۲/۵ ساعت) انجام شد. سپس پروتئینها به وسیله الکتروفورز به غشاء 13 PVDF از نوع هیبندی (Amersham) (P-Hyband) انتقال یافته و به مدت ۱ ساعت و طبق توصیه شرکت سازنده در محلول مسدود کنند هکیت ECL (Advance ECL Blocking Agent; Amersham Bioscience) برای مهار واکنش زمینه انکوبه شدند. پس از دو بار شستشو در محلول بافر فسفات سالین توین (T-PBS)، بلات (Blot) مربوطه در دمای اتاق و همراه حرکت مداوم در پادتن های اولیه بر علیه، با رقت ۱/۲۰۰۰ و به مدت ۳ ساعت و ی با ر ۱/۲۰۰۰ و به مدت ۱ ساعت و در پادتن های ثانویه متصل به با رقت ۱/۴۲۰۰۰ و به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. سرانجام پروتئینهای متصل به بلات به وسیله کیت آشکارسازی گردید.

ایمنو هیستوشیمی

اسلایدهای بافت شناسی توسط کوره در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد (۲۵ دقیقه) پیش گرم شده و در سری گرادیان اتانول (۱۰۰، ۹۰، ۸۰، ۷۰) مجدداً آبگیری شد. به منظور القای فرآیند بازبایی آنتی ژن، از بافر سیترات سدیم (۱۰ میلی مولار، pH ۷/۲) استفاده شد. محلول پراکسید هیدروژن ۰/۰۳٪ برای مسدود کردن پراکسیداز درونزا استفاده شد. در مرحله بعد، مقاطع با سالین بافر فسفات (PBS، pH ۷/۲) شسته و سپس با آنتی بادی های اولیه [آنتی بادی Anti-GLUT-۱ (USA، Elabsciences) و آنتی بادی Anti-GLUT-۳ (USA، Elabsciences) ایالات متحده) انکوبه شدند. آنتی بادی Anti-MCT-۴ (USA، Elabsciences) Cat N: E-AB-۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی-گراد، اسلایدها شسته و با آنتی بادی ثانویه IgG کونژوگه شده با پراکسیداز/HRP انکوبه شدند. کروموزن دیامینوبنزیدین-بستر (DAB) برای نشان دادن واکنش مثبت برای پروتئین های هدف استفاده شد. هماتوکسیلین مایر برای رنگ آمیزی اسلایدها استفاده شد. واکنشهای مثبت در کانونهای قهوه ای رنگ نشان داده شد که با یک معاینه کننده حرفه ای کور مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به طور تفصیلی، تعداد کل سلول و سلولهای زایای GLUT-۱ و GLUT-۳ در هر لوله ای با معیارهای یکسان شمارش و مقایسه شد بین همه گروه ها با توجه به این که تعداد کل سلول ها در هر لوله ای می تواند قابلیت اطمینان داده ها را تحت تأثیر قرار دهد، تعداد سلول ها GLUT-۱، GLUT-۳ و MCT-۴ نسبت به تعداد کل سلول ها در هر لوله نیز مورد بررسی قرار گرفت. IgG طبیعی به جای آنتی بادی اولیه برای کنترل منفی استفاده شد.

نتایج

⁹ Radio Immunoprecipitation

¹⁰ Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride

¹¹ Homogenizer

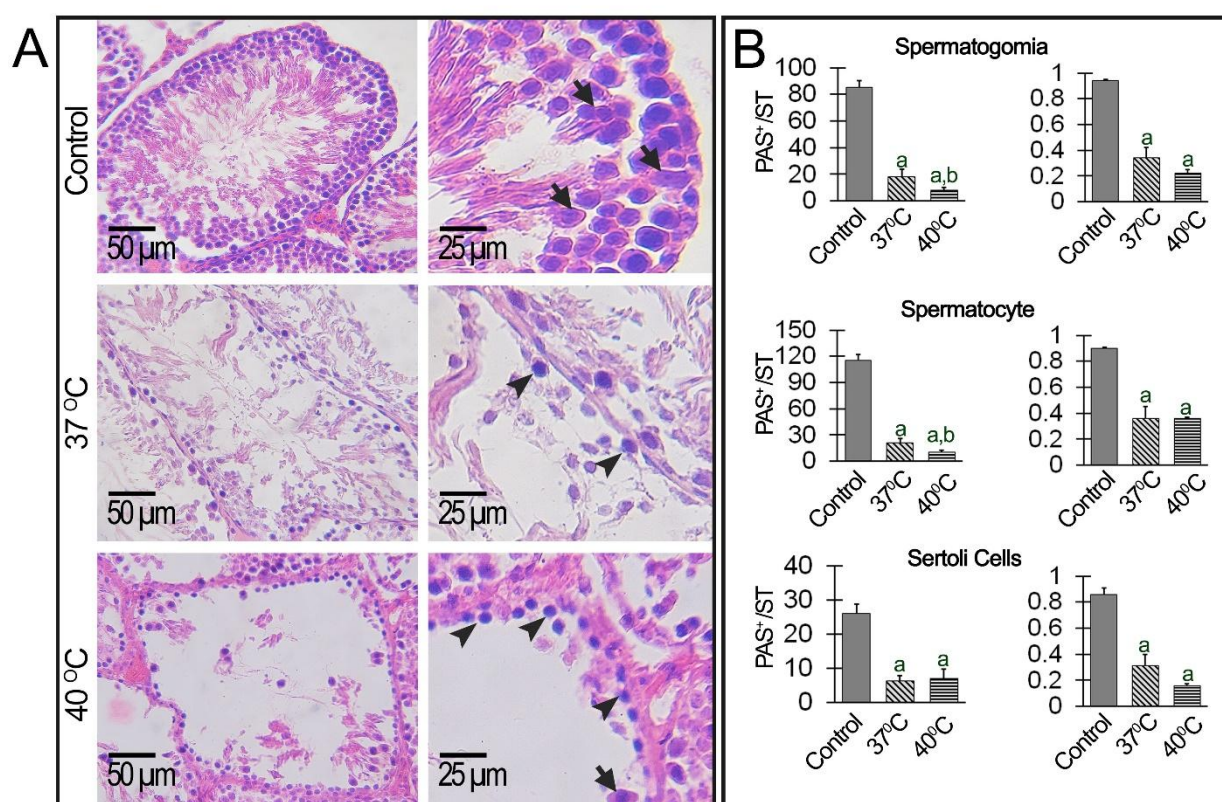
¹² Bradford

¹³ Fluoride Polyvinylidene

نتایج بافت شناسی

نتایج مربوط به شمارش سلول های زایا نشان داد که میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و سلول های سرتولی در گروه های تحت استرس حرارتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است ($p < 0.05$). اما در گروه استرس حرارتی ۴۰ به گروه استرس حرارتی ۳۷ کاهش یافته بود که از نظر آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$).

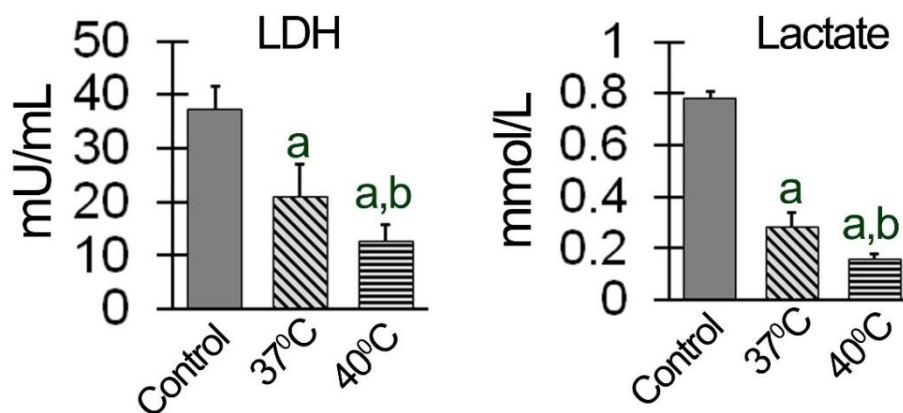
در رنگ آمیزی PAS مشاهده گردید که در گروه های تحت استرس حرارتی ۳۷ و ۴۰ سلول های لیدیگ و اپی تلیوم زایا به طور مشخصی کاهش نشان داد و همچنین واکنش PAS منفی بود (شکل ۴-۱).



نمودار ۴-۱ مقایسه تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و سلول سرتولی در رنگ آمیزی H&E در گروه های مختلف آزمایشی حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) می باشند.

نتایج ارزیابی بیوشیمیایی LDH و Lactate

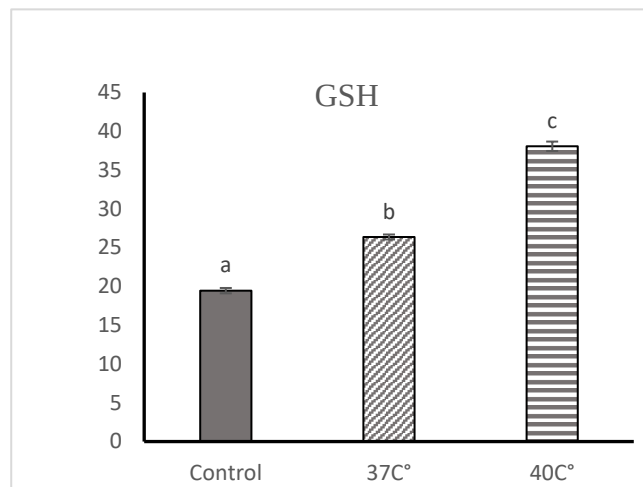
نمودار ۴-۲ نشان می دهد که در گروه های استرس حرارتی آنزیم LDH و لاکتات دهیدروژناز نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری یافته است ($p < 0.05$). در حالی که آنزیم در گروه استرس حرارتی ۴۰ نسبت به گروه استرس حرارتی ۳۷ کاهش یافته است اما از نظر آماری معنی دار نمی باشد ($p > 0.05$).



نمودار ۴-۲ مقایسه غلظت آنزیم بیوشیمیایی در گروه های مختلف آزمایشی حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشند. ($p < 0.05$)

نتایج GSH

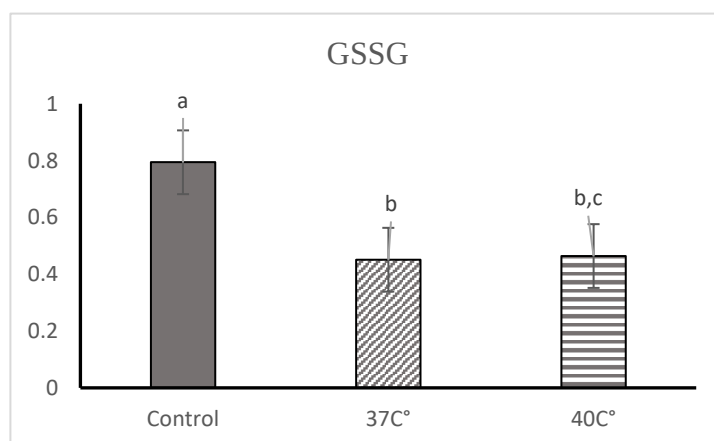
نمودار ۴-۳ نشان می دهد که در گروه های استرس حرارتی آنزیم GSH نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری یافته است ($p < 0.05$). آنزیم در گروه استرس حرارتی ۴۰ نسبت به گروه استرس حرارتی ۳۷ نیز افزایش یافته است ($p < 0.05$)



نمودار ۳-۴ مقایسه غلظت آنزیم بیوشیمیایی در گروه های مختلف آزمایشی حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) می باشند

نتایج GSSG

نمودار ۴-۴ نشان می دهد که در گروه های استرس حرارتی آنزیم GSSG نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری یافته است ($p < 0.05$). در حالی که آنزیم در گروه استرس حرارتی ۴۰ نسبت به گروه استرس حرارتی ۳۷ کاهش یافته است اما از نظر آماری معنی دار نمی باشد ($p > 0.05$).



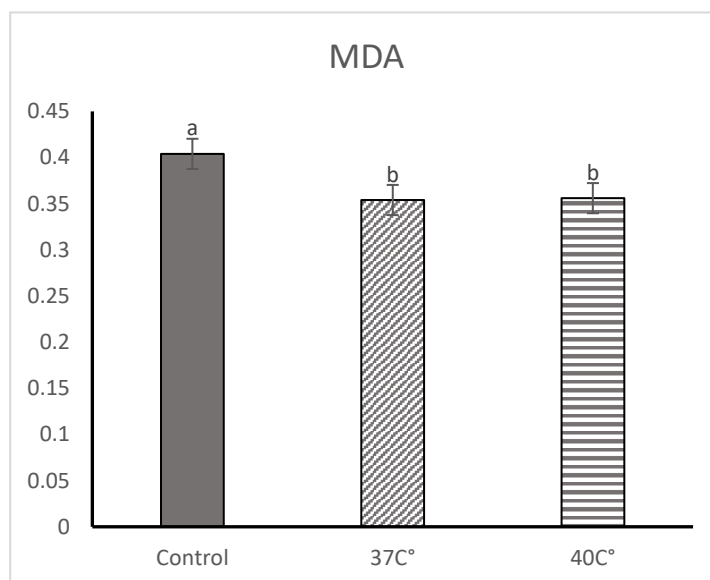
مقایسه غلظت آنزیم

نمودار ۴-۴

بیوشیمیایی در گروه های مختلف آزمایشی حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) می باشند

نتایج MDA

نمودار ۴-۵ نشان می‌دهد که در گروه‌های استرس حرارتی MDA نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافته است ($p < 0.05$). در حالی که آنزیم در گروه استرس حرارتی ۴۰ نسبت به گروه استرس حرارتی ۳۷ کاهش یافته است اما از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($p > 0.05$).



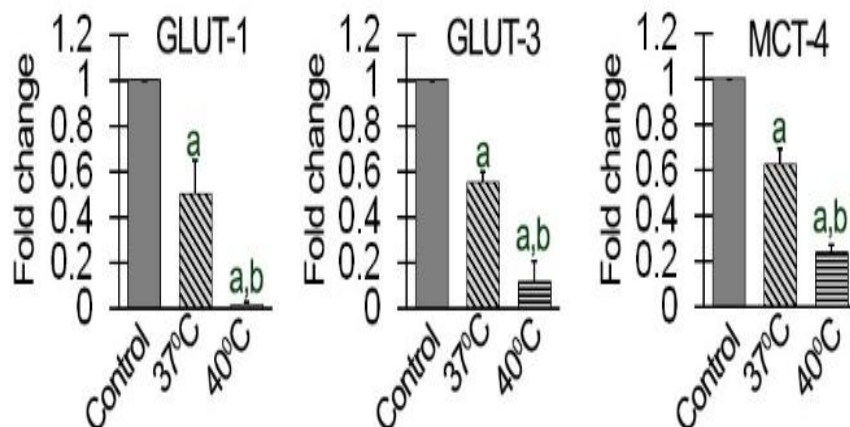
نمودار ۴-۴ مقایسه غلظت آنزیم بیوشیمیایی در گروه‌های مختلف آزمایشی حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) می‌باشند

نتایج PCR ژن‌های GLUT-۱، GLUT-۳ و MCT-۴

بررسی RT-PCR بیان mRNA نشان داد که GLUT-۱ در گروه استرس حرارتی ۴۰ نسبت به گروه استرس حرارتی ۳۷ کاهش یافته بود اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). اما نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافته بود ($p < 0.05$).

GLUT-۳ در گروه استرس حرارتی ۴۰ نسبت به گروه استرس حرارتی ۳۷ کاهش یافته بود اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). اما نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافته بود ($p < 0.05$).

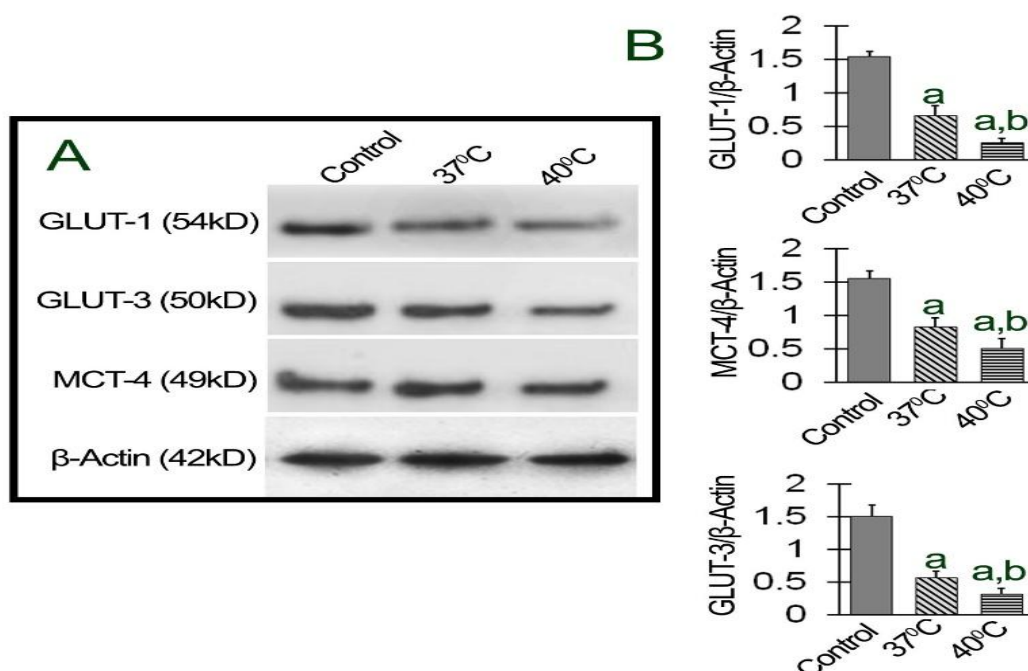
MCT-۴ در گروه استرس حرارتی ۴۰ نسبت به گروه استرس حرارتی ۳۷ کاهش یافته بود اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). اما نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافته بود ($p < 0.05$).



نمودار ۳-۴ مقایسه میزان بیان ژن GLUT-۱، GLUT-۳، و MCT-۴ در نسبت به GAPDH در بافت بیضه گروه های مختلف آزمایشی حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) می باشند.

نتایج وسترن بلات

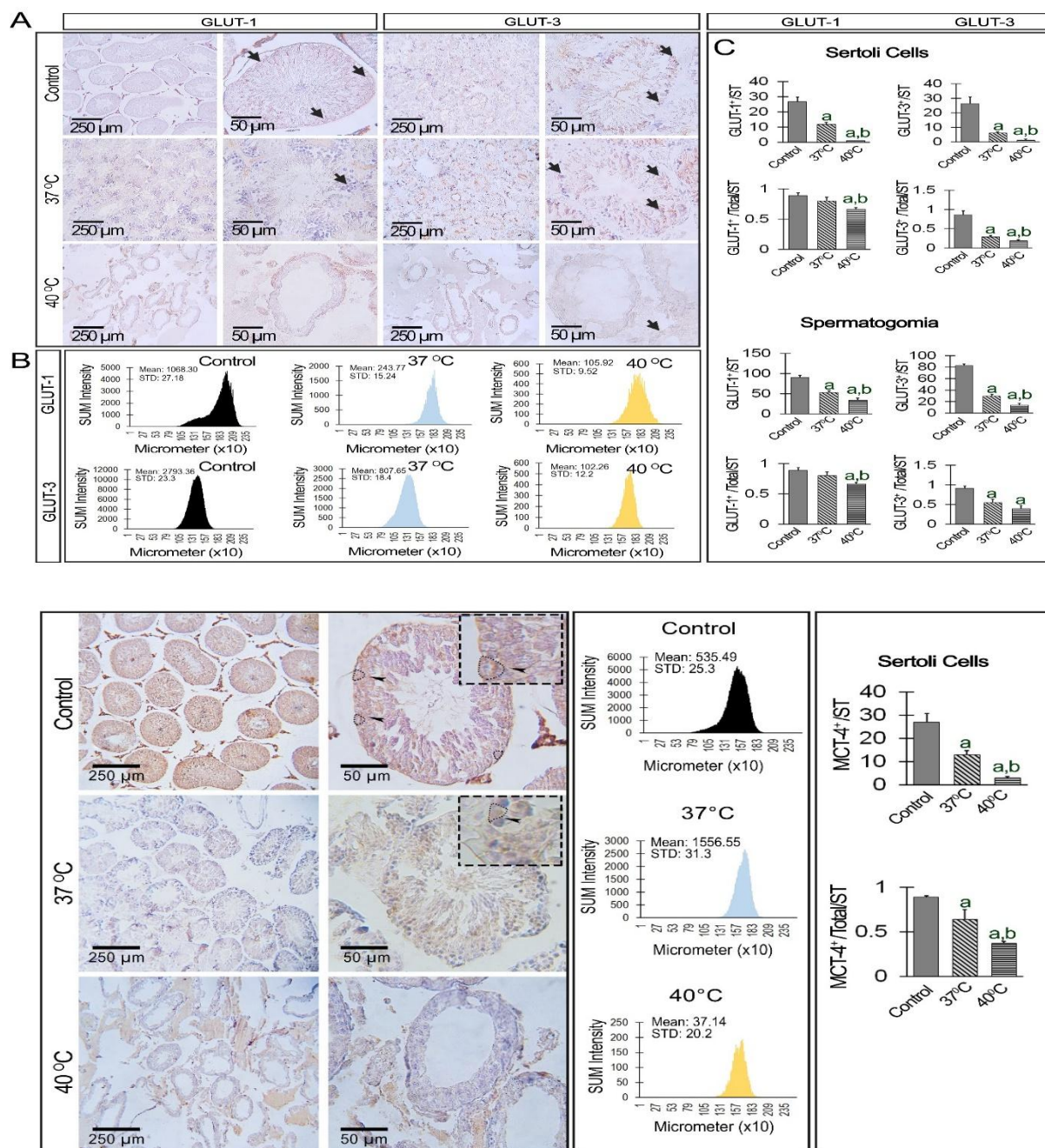
آنالیز وسترن بلات برای GLUT-۱-B-Actin، GLUT-۳-B-Actin و MCT-۴-B-Actin انجام دادیم. تجزیه و تحلیل داده ها نشان داد که سطوح پروتئین ها GLUT-۱-B-Actin، GLUT-۳-B-Actin و MCT-۴-B-Actin در گروه های استرس حرارتی ۳۷ و ۴۰ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری یافته بود ($p < 0.05$).



نمودار ۴-۴ وسترن بلات توصیفی که پروتئین نسبی GLUT-۱-B-Actin، GLUT-۳-B-Actin و MCT-۴-B-Actin را ارائه می‌دهد. گروه‌های مختلف آزمایشی حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) می‌باشند.

نتایج ایمنوهیستوشیمی

نمودار ۴-۵ نتایج ایمنوهیستوشیمی GLUT-۱، GLUT-۳ و MCT-۴ در سلول‌های سرتولی و اسپرماتوگونی گروه‌های دریافت‌کننده استرس حرارتی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافته بود ($p < 0.05$). در حالی که گروه استرس حرارتی ۴۰ میزان کاهش بیشتر از گروه استرس حرارتی ۳۷ بود اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$).



نمودار ۴-۵ مقایسه میزان ایمونو هیستوشیمی GLUT-۱، GLUT-۳ و MCT-۴ در سلول سرتولی و اسپرماتوگونی بافت بیضه در گروه های مختلف آزمایشی متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) می باشد.

نتیجه گیری

نتایج مقاله حاضر نشان می دهد که استرس حرارتی با توجه به میزان دمای اعمال شده موجب افزایش اثرات منفی بر روی بافت بیضه شده با القای آسیب در سطح اسپرماتوژنز و از طریق بر هم زدن تعادل اکسیداسیون - احیا موجب بروز تنش اکسیداتیو می گردد که باعث کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانتی کل و افزایش MDA، افزایش غلظت GSSG و همچنین کاهش معنی دار غلظت GSH می شود. سبب کاهش زن ها و تولیدها GLUT-۱، GLUT-۳ و MCT-۴ شد.

منابع

شیخ حسینی، نسرین، نیکویی، روح الله، امینایی، محسن. (۱۳۹۷). شیفت اکسیداتیو ناشی از تمرین در ایزوفرم های لاکتات دهیدروژناز A و B در مایع مغزی نخاعی رت های نر نژاد ویستار. *مجله دانشگاه علوم پزشکی / راک*, ۲۱(۱), ۵۲-۶۲.

Almroth, B. C., Albertsson, E., Sturve, J., & Förflin, L. (۲۰۰۸). Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, ۷۰(۳), ۳۷۰-۳۷۸.

Alves, M. G., Martins, A. D., Rato, L., Moreira, P. I., Socorro, S., & Oliveira, P. F. (۲۰۱۳). Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(۵), ۶۲۶-۶۳۵.

Ahmed-Farid, O. A., Salah, A. S., Nassan, M. A., & El-Tarabany, M. S. (۲۰۲۱). Effects of Chronic Thermal Stress on Performance, Energy Metabolism, Antioxidant Activity, Brain Serotonin, and Blood Biochemical Indices of Broiler Chickens. *Animals*, 11(۹), ۲۵۵۴.

Angulo, C., Rauch, M. C., Droppelmann, A., Reyes, A. M., Slebe, J. C., Delgado-López, F., ... & Concha, I. I. (۱۹۹۸). Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *Journal of cellular biochemistry*, 71(۲), ۱۸۹-۲۰۳.

Aslani, B. A., & Ghobadi, S. (۲۰۱۶). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life sciences*, 146, ۱۶۳-۱۷۳.

Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (۲۰۱۳). Investigations into mild electric foot shock stress-induced cognitive enhancement: possible role of angiotensin neuropeptides. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, ۱۴(۳), ۱۹۷-۲۰۳.

Balukoff, N. C., Ho, J. D., Theodoridis, P. R., Wang, M., Bokros, M., Llanio, L. M., ... & Lee, S. (۲۰۲۰). A translational program that suppresses metabolism to shield the genome. *Nature communications*, 11(۱), ۱-۱۵.

Baluchnejadmojarad, T., & Roghani, M. (۲۰۱۳). Coenzyme q₁₀ ameliorates neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy in rat. *Journal of Molecular Neuroscience*, 49(۱), ۱۹۴-۲۰۱.

Barekat, F., Tavalae, M., Deemeh, M. R., Bahreinian, M., Azadi, L., Abbasi, H., ... & Nasr-Esfahani, M. H. (۲۰۱۶). A preliminary study: N-acetyl-L-cysteine improves semen quality following varicocele. *International journal of fertility & sterility*, 10(۱), ۱۲۰.

Beal, M. F. (۱۹۹۸). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1366(۱-۲), ۲۱۱-۲۲۳.