"Research article" DOI: 10.30495/JVCP.2023.1981208.1398

The effect of aerobic training and administration of sertoli cell conditioned media on the antioxidant status and histomorphometry of testis following caffeine consumption in adult male rats

Rahimi, D.[1], Bashiri, J.[2*], Noor Azar, M.A.[3], Pouzesh Jadidi, R.[4], Mohajeri, D.[5]

1- Ph.D. Student of Exercise Physiology, Department of Sport Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Associate Professor of Exercise Physiology, Department of Sport Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
4- Assistance Professor of Exercise Physiology, Department of Sport Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
5- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
*Corresponding author's email: bashiri.jabbar@gmail.com
(Received: 2023\5\10 Accepted: 2023\8\23)

Abstract

Considering the consumption of caffeine as a favorite supplement by athletes and the proof of its detrimental long-term effects on male fertility, the aim of this study was to determine the effect of aerobic exercise combined with Sertoli cell conditioned medium on testicular damage caused by caffeine consumption in adult male rats. For this purpose, 30 adult male Wistar rats were evaluated in 5 equal groups. Rats in the control group only received distilled water while rats in the 4 treatment groups consisting of group without treatment, treatment with aerobic exercise, treatment with conditioned medium and treatment with aerobic exercise combined with conditioned medium received caffeine at the dose of 200 mg/kg orally. Forty two days later, the conditioned medium of Sertoli cells was injected into the efferent ducts of the rats in the treatment groups. After 8 weeks, testicular tissue samples were taken from the rats and studied by histomorphometry. Also, the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) and the amount of malondialdehyde (MDA) in the testicular tissue and serum total antioxidant capacity (TAC) were measured. In the rats of the caffeine-damaged group compared to the healthy group, the diameter of the seminiferous tubules, the height of the epithelium of the seminiferous ducts, the thickness of the interstitial tissue of the testis, the activity of SOD and GPX enzymes, and the amount of TAC were significantly lower and the amount MDA was higher (p<0.01). Rats of all treatment groups affected by caffeine had higher values of the diameter of seminiferous tubules, the height of the epithelium of seminiferous ducts, the thickness of the interstitial tissue of the testis, and the activity of SOD and GPX enzymes and the amount of TAC and had lower MDA values compared to the group affected by caffeine. In the group treated with condition media combined with aerobic exercise, the amount of decrease and increase in the mentioned parameters was higher compared to the other two treatment groups and there was a significant statistical difference (p<0.05). The results of the present study showed that consumption of Sertoli cell condition media and simultaneous performance of aerobic exercise, synergistically improves the antioxidant defense indicators and reduces the destructive effects of caffeine in the testicular tissue of rats.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Aerobic training, Caffeine, Media conditioning, Rat testis, Sertoli cells.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2023.1981208.1398

تأثیر تمرین هوازی و کاندیشن مدیای سلول‌های سرتولی بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی و هیستومورفومتری در آسیب بیضه ناشی از مصرف کافئین در موش‌های صحرایی نر بالغ

داوود رحیمی[۱]، جبار بشیری[۲*]، میرعلیرضا نورآذر[۳]، رقیه پوزش جدیدی[۴]، داریوش مهاجری[۵]

۱- دانشجوی دکترای فیزیولوژی ورزشی، گروه علوم ورزشی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی و تربیتی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۴- استادیار گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی و تربیتی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۵- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: bashiri.jabbar@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۲۰ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۶/۱)

چکیده

با توجه به مصرف کافئین به عنوان مکمل مورد اقبال ورزشکاران و اثبات اثرات سوء مصرف طولانی‌مدت آن بر باروری افراد مذکر، هدف از مطالعه حاضر، تعیین تأثیر تمرین هوازی توأم با کاندیشن مدیای سلول‌های سرتولی بر آسیب بیضه ناشی از مصرف کافئین در موش‌های صحرایی نر بالغ بود. بدین منظور ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به‌طور تصادفی در ۵ گروه برابر مورد آزمون واقع شدند. موش‌های گروه شاهد فقط آب مقطر و موش‌های چهار گروه دیگر شامل: گروه‌های بدون انجام تیمار، تیمار با تمرین هوازی، تیمار با کاندیشن مدیوم و تیمار با تمرین هوازی توأم با کاندیشن مدیا، به مدت ۴ هفته کافئین را با دوز ۲۰۰ mg/kg به‌صورت خوراکی دریافت کردند. ۴۲ روز بعد، کاندیشن مدیای سلول‌های سرتولی به درون مجاری وابران موش‌های گروه‌های تیمار تزریق شد. پس از ۸ هفته، از بیضه موش‌ها نمونه بافتی اخذ شده و مورد مطالعه هیستومورفومتری قرار گرفت. همچنین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و مقدار مالوندی‌آلدئید (MDA) در بافت بیضه و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم موش‌ها مورد سنجش قرار گرفت. در موش‌های گروه آسیب‌دیده با کافئین نسبت به گروه سالم، قطر لوله‌های منی‌ساز، ارتفاع اپیتلیوم مجاری منی‌ساز و ضخامت بافت بینابینی بیضه و فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX و میزان TAC به‌طور معنی‌داری کمتر و مقدار MDA بالاتر بود ($p<۰/۰۱$). همه گروه‌های آسیب‌دیده باکافئین توأم با دریافت تیمار، نسبت به گروه آسیب‌دیده با کافئین دارای مقادیر بالاتری از قطر لوله‌های منی‌ساز، ارتفاع اپیتلیوم مجاری منی‌ساز و ضخامت بافت بینابینی بیضه و فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX و میزان TAC بودند و مقادیر MDA پایین‌تری داشتند. در گروه تیمارشده با کاندیشن مدیا توام با تمرین هوازی، میزان کاهش و افزایش در پارامترهای ذکرشده، در مقایسه با دو گروه تیماری دیگر، بیشتر بوده و تفاوت آماری معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). نتایج مطالعه نشان داد مصرف کاندیشن مدیای سلول‌های سرتولی و انجام هم‌زمان تمرین هوازی، با اثرات هم‌افزایی باعث بهبود شاخص‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش اثرات مخرب کافئین در بافت بیضه موش‌های صحرایی می‌شود.

کلیدواژه‌ها: کافئین، کاندیشن مدیا، تمرین هوازی، بیضه موش، وضعیت آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

در سال‌های اخیر، ناباروری و مشکلات فردی و اجتماعی ناشی از آن به عنوان یکی از مسایل مهم زوج‌ها مطرح است (Agarwal *et al*., 1994). در حدود ۸-۱۲ درصد از زوج‌ها بدون فرزند هستند که در حدود ۳۵ درصد از ناباروری آنان مربوط به مردان می‌باشد (Afzalpour *et al*., 2015). یکی از عوامل ایجاد ناباروری، عوامل محیطی همچون مصرف مکمل‌های غذایی می‌باشد که از این دست می‌توان به کافئین اشاره کرد. کافئین پرمصرف‌ترین داروی روان فعال کننده در جهان و یکی از محرک‌های رایج در ورزش است. کافئین (۷،۳،۱ – تری‌متیل گزانتین)، آلکالوئیدی محرک است که روزانه توسط بیش از ۸۰ درصد مردم با اشکال متفاوت استفاده می‌شود (Streese *et al*., 2018). مصرف کافئین در مردان با مقادیر تستوسترون و گلوبولین متصل به هورمون جنسی ارتباط دارد (Svartberg *et al*., 2003) و این فرضیه مطرح شده که کافئین باعث تغییر سلول‌های سرتولی در شاخص‌های گلیکولیتیک و اکسیداتیو می‌شود و این امر در پتانسیل تولید مثل مردان تداخل ایجاد می‌کند (Dias *et al*., 2015). عقیده بر این است که مقادیر بالای مصرف کافئین می‌تواند پروفایل گلیکولیتیک و اکسیداتیو سلول‌های سرتولی را تغییر داده و در پتانسیل تولید مثل مردان تداخل ایجاد کند (Ricci *et al*., 2017). علی‌رغم مطالب ذکرشده، درمان قطعی و کاملی برای درمان ناباروری مردان، به عللی چون عوارض جانبی حاصله، پیشنهاد نشده‌است (Mora-Esteves and Shin, 2013).

محیط کشت شرایطی‌شده (کاندیشن مدیوم)، محیطی برگرفته از سلول‌های کشت شده می‌باشد. این ماده شامل متابولیت‌ها، فاکتورهای رشد و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی است که توسط سلول‌های کشت شده به داخل محیط ترشح می‌شوند. از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی که امروزه توجه اکثر محققان را به خود جلب کرده است، می‌توان به سلول‌های مزانشیمی اشاره کرد. این سلول‌ها جمعیتی از سلول‌های بنیادی سوماتیک چندتوان هستند که در بافت‌هایی نظیر مغزاستخوان، عضلات اسکلتی، مغز، بافت چربی، خون بندناف، خون محیطی و بافت‌های پیوندی پوست، شناسایی شده‌اند (Monfared *et al*., 2016). از این میان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به دلیل توان تمایزی بالا، رشد سریع و آسان در محیط کشت و روش‌های ساده و ایمن برای بدست آوردن این بافت، برای درمان‌های ترمیمی و ناباروری مورد توجه قرار گرفته‌اند (Monfared *et al*., 2016). برخی از مطالعات نشان داده‌اند که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از بافت چربی به بافت بیضه موش‌های نابارورشده با مصرف بالای کافئین، موجب بازگشت باروری آن‌ها شده‌است (Monfared *et al*., 2016).

سلول‌های سرتولی که در غشاء پایهٔ لوله‌های منی‌ساز مستقر هستند، وظیفه حمایت از اسپرماتوگونی‌ها را عهده‌دار بوده و در واقع مسئولیت تغذیه و حمایت ساختاری، فاگوسیته کردن سلول‌های زایای آسیب دیده و تنظیم فرآیند اسپرماتوژنز توسط تولید پروتئین‌ها و فاکتورهای رشد را برعهده دارند (Rato *et al*., 2012)، همچنین سلول‌های مذکور، قادر

به تولید انواع مختلف سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد، از جمله ترکیبات شبه انسولینی، فیبروبلاستی، تغییرشکل‌دهنده و فاکتور نروتروفیک مشتق از سلول‌های گلیال هستند و سبب حمایت از تکثیر سلول‌های موردنظر در کاندیشن مدیوم می‌شوند (Shamekh *et al*., 2008).

در بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که تمرین هوازی موجب بهبود سیستم تولید مثلی می‌شود و حتی میزان اسپرم و تستوسترون بدن را افزایش دهد (Mombeyni *et al*., 2018). همچنین به‌نظر می‌رسد که تمرین هوازی تأثیر مفیدی بر عملکرد بیضه، از جمله غلظت اسپرم و سطح سرمی هورمون‌های جنسی و نیز افزایش در سطح سرمی تستوسترون تام و آزاد، تعداد اسپرم، تحرک و مورفولوژی در ورزشکاران دارد (Grandys *et al*., 2009; Vaamonde *et al*., 2012; Gaskins *et al*., 2015; Priskorn *et al*., 2016).

با توجه به اثرات ضعیف مصرف مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی در باروری (Mora-Esteves and Shin, 2013) و عوارض جانبی مصرف داروهای شیمیایی (Sohrabvand *et al*., 2006) و نیز عدم انجام مطالعه همزمان در خصوص اثر محیط کشت شرایطی‌شده (کاندیشن مدیم) سلول‌های سرتولی به همراه تمرین هوازی بر آسیب بیضه ناشی از مصرف کافئین با دوز بالا، لذا مطالعه حاضر بدین منظور انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی آزمایشگاهی حاضر، در سال ۱۴۰۱ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تبریز انجام شد که در طی انجام آن، کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی، مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تبریز با کد اخلاق IR.IAU.TABRIZ.REC.1400.118 بود. بدین منظور از تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰±۲۵۰ گرم، تهیه‌شده از مرکز پرورش و نگه‌داری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، استفاده شد. شرایط تغذیه و نگه‌داری برای تمام گروه‌ها یکسان و به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی و در دمای ۲±۲۱ درجه سلسیوس بود. جیره غذایی یکسان و آب نیز به‌طور آزاد در دسترس همه موش‌ها قرار گرفته و پس از یک هفته عادت به شرایط جدید، آزمایش شروع شد.

جهت انجام آزمایش، ابتدا موش‌ها به‌طور تصادفی به ۵ گروه (شاهد سالم، آسیب دیده با کافئین، آسیب دیده با کافئین به همراه تیمار با تمرین هوازی، آسیب دیده با کافئین به همراه تیمار با کاندیشن مدیوم و آسیب دیده با کافئین به همراه تمرین هوازی توام با تیمار با کاندیشن مدیوم) تقسیم شدند. در ادامه همه موش‌های گروه‌های آسیب‌دیده و تیمار، به مدت ۴ هفته کافئین (با کد ۱۰۲۵۸۴، شرکت مرک، کشور آلمان) را که به شکل پودر بود بعد از اندازه‌گیری توسط ترازوی مخصوص، با دوز ۲۰۰ mg/kg وزن بدن، جهت القاء آسیب در بافت بیضه به شکل گاواژ دریافت نموده و موش‌های گروه شاهد سالم نیز به همان میزان آب مقطر را به‌صورت خوراکی دریافت کردند (Oluwole *et al*., 2016).

- **تهیهٔ کاندیشن مدیای سلول‌های سرتولی:** جهت استخراج سلول‌های سرتولی از تعداد ۱۰ سر موش صحرایی نوزاد نر نژاد ویستار ۱۸ روزه ا تهیه‌شده از مرکز پرورش و نگه داری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، استفاده شد. برای این منظور جهت برداشت و جداکردن سپید پرده اطراف هر بیضه و انجام روش‌های هضم آنزیمی بر روی سلول‌های سرتولی، این سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbeco Modified Eagle Medium) کشت داده شدند (Salem *et al.*, 2017).

استخراج و کشت سلول‌های سرتولی: در این مطالعه برای استخراج و کشت سلول‌های سرتولی از بیضه موش‌های نوزاد ۱۴ روزه ویستار به تعداد ۱۰ عدد استفاده شد. برای این منظور بعد از برداشتن و جداکردن سپیدپرده اطراف هر بیضه و انجام روش‌های هضم آنزیمی بر روی سلول‌های سرتولی، این سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium) کشت داده شدند. پس از گذشت دو روز از کشت، سلول‌ها به کف ظرف چسبیدند. همچنین سلول‌های آزاد و نچسبیده با تعویض پی در پی محیط کشت خارج شدند. یک هفته پس از کشت که جمعیت خالص‌تری از سلول‌های سرتولی شکل گرفت، هر دو روز یک‌بار محیط کشت سلول‌ها خارج شده، فیلتر گردیده و به عنوان محیط کشت شرایطی‌شده استفاده شدند. جهت اثبات حضور سلول‌های سرتولی از نشانگر اختصاصی ویمنتین و روش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد.

مراحل کشت سلول: محیط کشت مورد استفاده در این مطالعه محیط کشت DMEM Low Glucose 1، FBS (Fetal Bovin Serum) و Strip –Pen (۰/۲۵ درصد) با غلظت ۸۰/۲۰، FBS/DMEM بود که به صورت محلول بوده و از شرکت Gibco تهیه شده بود. این محیط حاوی ال-گلوتامین و فاقد بیکربنات سدیم می‌باشد.

کشت سلول:

وسایل مورد نیاز برای کشت سلول:

-هود لامینار

-انکوباتور با قابلیت تنظیم غلظت CO_2

-میکروسکوپ نوری اینورت

-سانتریفیوژ مخصوص فالکون

-اتوکلاو

-فلاسک مخصوص کشت سلولی به اندازه‌های T25و T75

-فالکون‌های ۱۵ و ۵۰ میلی‌لیتری و میکروتیوب

-سمپلر و سرسمپلر با سه سایز متفاوت ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتری

مواد مورد نیاز برای کشت سلول:

-محیط کشت DMEM

-سرم جنین گاوی FBS

-آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و پنی‌سیلین

-بافر فسفاتسالین PBS

-دی‌متیل‌سولفوکساید DMSO

-آنزیم تریپسین

-محیط کشت سلولی پایه

روش تهیّه محیط کشت DMEM: ابتدا ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل درون یک بشر استریل ریخته شد و یک مگنت درون آن قرار داده شد. دستگاه استیرر با دور پائین فعال گردید تا مگنت شروع به چرخش کند. سپس ۶/۷ گرم پودر به آرامی به آب مقطر اضافه گردیده و پس از

حل شدن کامل محیط، یک گرم پودر سدیم بیکربنات (۱/۸۵ گرم) به آن اضافه شد. بعد از حل‌شدن کامل پودر، در حالی‌که مگنت در حال چرخش بود، pH محیط به کمک اسید کلریدریک بر روی ۷/۲ تا ۷/۴ تنظیم گردید و در مرحله آخر حجم محیط به ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. بلافاصله محیط به زیر هود لامینار که تمامی وسایل آن توسط نور UV به مدّت ۲۰ دقیقه استریل شده بود، منتقل گردید و در کنار شعله چراغ الکلی با فیلتر سرسرنگی، استریل شده و درون ظرف درب‌پیچدار ریخته شد و این محیط به عنوان استوک اصلی محیط کشت پایه، در دمای ۴+ درجه سانتی گراد به مدّت یک ماه نگه‌داری شد.

آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین: از آنتی بیوتیک‌ها برای جلوگیری از آلودگی محیط کشت توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها استفاده می‌شود. محیط کشت DMEMقبل از استفاده، توسط آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین تیمار گردید. آنتی‌بیوتیک شرکت Gibco با غلظت ۱۰۰۰۰ Units/mL تهیّه شده و به هنگام استفاده به نسبت یک به ۱۰۰ (۵۰۰ میکرولیتر در ۵۰ میلی‌لیتر محیط) رقیق گردید.

سرم جنین گاوی (FBS; Fetal Bovin Serum): سرم جنین گاوی به منظور تأمین فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و میتوژن‌های مورد نیاز سلول‌ها، استفاده می‌شود. بدون وجود این فاکتورهای رشد، سلول‌ها قادر به رشد و تکثیر نخواهند بود. میزان استاندارد FBS مورد استفاده برای تحریک رشد سلول‌ها ۱۰ درصد حجمی - حجمی (V\V) در محیط کشت می‌باشد. قبل از اضافه شدن سرم به محیط کشت، کمپلمان سرم باید غیرفعّال گردد. غیرفعّال کردن کمپلمان می‌تواند خطر آلودگی‌های ویروسی را کاهش دهد، چرا که بعضی از ویروس‌ها در اثر افزایش دما غیرفعّال می‌شوند.

روش تهیّه‌ی محیط کشت کامل: برای استفاده از محیط کشت پایه، باید به مقدار کافی به آن FBS اضافه گردد. برای کشت سلول‌ها در فلاسک از محیط DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد استفاده شد. برای تهیّه محیط حاوی FBS ۱۰ درصد، مقدار ۴۴/۵ میلی‌لیتر محیط، درون فالکون ۵۰ میلی‌لیتر ریخته شد و پنج میلی‌لیتر FBSغیرفعّال‌شده به آن اضافه گردید و در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک اضافه شد تا حجم نهایی به ۵۰ میلی‌لیتر برسد. محیط کشت حاوی FBS را محیط کشت کامل می نامند.

محلول PBS (Phosphate-Buffered Saline): از محلول PBSجهت شستشوی سلول‌ها و حذف سلول‌های مرده استفاده شد. برای تهیّه محلول PBS از قرص‌های آماده استفاده شد. بدین منظور یک قرصPBS ، طبق پروتکل شرکت در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل و اتوکلاو گردید.

آنزیم تریپسین: از این آنزیم برای جدا کردن سلول‌های چسبنده به ته ظرف کشت استفاده می‌شود. سلول‌ها با پیوندهای گلیکوپروتئینی به ته ظروف می‌چسبند. آنزیم تریپسین با شکستن پیوند آمینی پروتئین‌های بعد از آمینواسید تریپسین، باعث جدا شدن سلول‌ها می‌شود.

تهیه کاندیشن مدیوم از سلول‌های سرتولی: زمانی‌که ۹۵ درصد از سطح محیط کشت توسط سلول‌های سرتولی پر شد و فاصله‌ای بین سلول‌ها نبود، محیط بدون FBS اضافه شده و ۴۸ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. پس از انتقال به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌متری، داخل یخچال منفی ۸۰ نگه‌داری شده و بعد از عبوردادن

سلول‌های سرتولی از فیلتر، کاندیشن مدیوم حاصل از آنها به دست آمد.

جداسازی، تایید و کشت سلول‌های سرتولی: بافت بیضه از یک موش صحرایی ۱۴ روزه نابالغ نمونه‌برداری شد و در داخل محیط DMEM حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پن‌استرپ قرار داده شد و در مجاورت یخ به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل گردید. سپس نمونه بافت بیضه به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درجه قرار داده شد. در مرحله بعد بافت بیضه به داخل یک پتری‌دیش حاوی DMEM به همراه پن‌استرپ منتقل گردید و بخش اپیدیدیم آن جدا شد و بافت بیضه توسط تیغ جراحی به قطعات بسیار ریز برش داده شد سپس با PBS شست و شو داده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و با دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی دور ریخته شد و روی رسوب‌باقی مانده، محیطی حاوی DMEM، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تریپسین ، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیالورونیداز و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلاژناز اضافه شد و در انکوباتور قرار داده شد. بعد از ۱۵ دقیقه به مدت ۴ دقیقه Pipetting انجام شد تا هضم انزیمی به خوبی انجام شود. سپس مجدداً این مرحله تکرار شد، درنهایت به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ گردید و محیط رویی دور ریخته شد و روی رسوب باقی‌مانده محیط حاوی DMEM به همراه آنتی‌بیوتیک پن‌استرپ اضافه شد. این مرحله نیز ۲ بار تکرار شد. سپس سوسپانسیون به دست‌آمده حاوی سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونیال و سلول‌های بینابینی بود.

تهیه کاندیشن مدیوم (Conditioned medium) از سلول‌های سرتولی: بعد از پاساژ دوم، زمانی که تعداد سلول‌ها به حدی رسید که تقریباً کف فلاسک را پر کرد، تهیه کاندیشن مدیوم از آن آغاز شد. بدین ترتیب که ابتدا محیط روی سلول‌ها خارج گردیده و با ۲۵ میلی لیتر PBSبه مدت ۳۰ ثانیه شست و شو داده شد، سپس به میزان ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM بدون FBS حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک به سلول‌ها افزوده شد و فلاسک سلولی به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور دی‌اکسیدکربن قرار گرفت. بعد از گذشت مدت زمان مذکور، تمامی محیط روی سلول‌ها جمع‌آوری شده و در میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری تقسیم‌بندی گردید و برای انجام آزمایشات بعدی در فریزر ۸۰- نگه‌داری شد.

برای جداسازی سلول‌های سرتولی از سوسپانسیون تهیه‌شده به مدت ۲ الی ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسیدکربن در فلاسک‌های پوشیده‌شده از ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لکتین داچوراستوامونیوم الگوتین در بافر فسفات انکوبه گردید. پس از گذشت زمان مذکور سلول‌هایی که شناور بودند به آرامی خارج شدند و ۵ میلی‌لیتر محیط حاوی DMEM، FBS ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک پن‌استرپ به سلول‌های چسبیده به کف فلاسک که همان سلول‌های سرتولی بودند اضافه گردید.

در بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی سلول‌های سرتولی از آنتی‌بادی ویمنتین استفاده شد که رنگ سبز نشان‌دهنده وجود ویمنتین در سیتوپلاسم سلول‌ها و رنگ آبی هسته‌ها را نشان داد (Salem *et al*., 2017).

- **طرح آزمایش:** ۴۲ روز پس از دریافت آخرین دوز خوراکی کافئین، کاندیشن مدیوم سلول‌های سرتولی به مقدار ۰/۰۱ میلی‌لیتر به همراه ۰/۰۱ میلی‌لیتر تریپان‌بلو (شرکت Merck، آلمان) به درون بیضه موش‌های گروه

تیمار تزریق شد. پس از گذشت ۸ هفته از تزریق کاندیشن مدیوم، تمام موش‌ها با دوز ۱۰ میلی‌لیتر/کیلوگرم کتامین و ۵ میلی‌لیتر/کیلوگرم زایلازین (هردو ساخت شرکت آلفاسان، کشور هلند) به‌صورت تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند. در ادامه خونگیری از موش‌ها انجام شده و بیضه‌ها و سپس اپیدیدیم آن‌ها جدا گردید. سپس نمونه‌ها در محلول فسفات بافر سالین (Aldrich USA, St Louic, MOE200) به نسبت ۱ به ۱۰ هموژنه شدند و در سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفیوژ (۱۶ شاخه شرکت بهداد، ایران) شدند و در نهایت محلول بالایی حاصله، جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های SOD (Superoxid Desmutase) (Marklund and Marklund, 1974) و GPX (Glutation Peroxidase) (Rotruck *et al.*, 1973) و مقدار MDA (Malondialdehyde) (Ozdemir *et al.*, 2009) بافت بیضه و TAC (Total antioxidant capacity) (Erel, 2004) سرم مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای تعیین میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز، ارتفاع اپیتلیوم مجاری منی‌ساز و ضخامت بافت بینابینی بیضه‌ها، ۱۰ میدان میکروسکوپی از هر برش بافتی به‌صورت تصادفی انتخاب و اندازه آن‌ها بر اساس میکرون توسط میکرومتر چشمی توسط میکروسکوپ نوری نیکون (مدل ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد.

-**تحلیل آماری داده‌ها:** داده‌های کمی جمع‌آوری‌شده به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه گردید و برای واکاوی آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد. برای بررسی اختلافات بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) استفاده به عمل آمد. همچنین مقدار $p<۰/۰۵$، معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی میزان شاخص‌های اکسیداتیو شامل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) سرم، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) و همچنین شاخص پراکسیداسیون لیپیدی یعنی مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و مقایسه آن‌ها بین گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه گردیده است. در گروه تحت تأثیر کافئین، میزان TAC و فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد سالم کاهش نشان دادند ($p<۰/۰۱$)، و میزان MDA در این گروه نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۱$). در گروه‌های آسیب‌دیده با کافئین بعلاوه تیمار با کاندیشن مدیوم و آسیب‌دیده با کافئین بعلاوه تمرین هوازی، میزان TAC و فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه آسیب‌دیده با کافئین افزایش نشان دادند ($p<۰/۰۵$) و مقدار MDA نیز در این گروه‌ها نسبت به گروه آسیب‌دیده با کافئین کاهش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری از لحاظ پارامترهای ذکرشده مشاهده نشد.

در گروه آسیب‌دیده با کافئین بعلاوه تیمار با کاندیشن مدیوم و تمرین هوازی ، میزان TAC و فعالیت آنزیم‌های SOD و GPx به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه آسیب‌دیده با کافئین افزایش بیشتری

(نسبت بـه دو گـروه قبلـی) نشـان دادنـد ($p<۰/۰۱$) و میزان MDA نیز در این گروه در مقایسه با گروه آسیب-دیـده بـا کـافئین کـاهش معنـی‌دار بیشـتری داشـت ($p<۰/۰۱$). از لحاظ تمامی پارامترهای ذکرشده، بین این گروه با دو گروه قبلی تیمار نیز تفاوت معنی‌داری برقرار بود ($p<۰/۰۵$). تفاوت معنی‌داری از لحاظ فراسنجه‌های مذکور بین ایـن گـروه بـا گـروه شـاهد سـالم مشـاهده نگردید.

جدول ۱- مقایسه شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه بین گروه‌های مورد مطالعه (میانگین± انحراف معیار)

گروه‌ها	شاخص‌های اکسیدانی	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (mmoles/L)	سوپراکسید دیسموتاز (U/mg protein)	گلوتاتیون پراکسیداز mmoles GSH/) (min/mg protein	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/mg protein)
شاهد سالم		۰/۶۲±۰/۰۵	۱/۵۵±۰/۳۱	۰/۴۰±۰/۰۸	۰/۴۳±۰/۰۴
آسیب‌دیده با کافئین		۰/۳۳±۰/۰۲*#	۰/۷۳±۰/۱۱*#	۰/۱۹±۰/۰۳*#	۰/۸۹±۰/۲۱*#
آسیب‌دیده با کافئین بعلاوه تیمار با کاندیشن مدیوم		۰/۴۶±۰/۰۳*#	۱/۰۱±۰/۲۴*#	۰/۲۸±۰/۰۵*#	۰/۷۱±۰/۱۵*#
آسیب‌دیده باکافئین بعلاوه تمرین هوازی		۰/۴۹±۰/۰۴*#	۱/۰۸±۰/۲۹*#	۰/۳۰±۰/۰۷*#	۰/۶۸±۰/۱۷*#
آسیب‌دیده با کافئین بعلاوه تیمار با کاندیشن مدیوم و تمرین هوازی		۰/۶۰±۰/۰۵##	۱/۴۹±۰/۳۳##	۰/۳۹±۰/۷##	۰/۴۹±۰/۰۶.##

* ($p<۰/۰۵$) و ** ($p<۰/۰۱$) اختلاف از گروه شاهد سالم را نشان می‌دهد و # ($p<۰/۰۵$) و ## ($p<۰/۰۱$) اختلاف از گروه آسیب‌دیده با کافئین را نشان می‌دهد (۶ =n).

نتایج حاصل از ارزیـابی هیسـتومورفولوژی بافـت بیضـه و مقایسـه پارامترهـای آن بـین گروه‌هـای مـورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. قطر لوله‌هـای منی‌ساز و ارتفاع اپیتلیوم این لوله‌ها در گروه تحت تأثیر کافئین در مقایسه بـا گـروه شـاهد بـه‌طـور معنـی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۱$) ولی ضخامت بافت بینـابینی در این گروه افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ($p<۰/۰۱$).

در گروه‌های آسیب‌دیده با کافئین بعلاوه تیمـار بـا کاندیشن مدیوم و آسیب‌دیده با کـافئین بعـلاوه تمـرین هوازی ، اندازه قطر و ارتفاع اپیتلیوم لولـه‌هـای منی‌سـاز به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه آسیب‌دیـده بـا کـافئین افزایش نشـان داد ($p<۰/۰۵$) و انـدازه ضـخامت بافـت بینابینی نیز در این گروه‌ها نسبت به گروه آسیب‌دیده بـا کافئین کاهش معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$). بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری از لحاظ پارامترهـای ذکرشـده مشاهده نشد.

در گروه آسیب‌دیـده بـا کـافئین بعـلاوه تیمـار بـا کاندیشن مدیوم و تمرین هوازی، انـدازه قطـر و ارتفـاع اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز به‌طور معنی‌داری در مقایسه بـا گروه آسیب‌دیده با کافئین افزایش بیشتری (نسبت به دو گروه قبلی) نشـان دادنـد ($p<۰/۰۱$) و ضـخامت بافـت بینابینی نیز در این گروه در مقایسه با گروه آسیب‌دیده با کافئین کـاهش معنـی‌دار بیشـتری داشـت ($p<۰/۰۱$). از لحاظ کلیه پارامترهای ذکرشـده، بـین ایـن گـروه بـا دو گروه قبلـی تیمـار نیـز تفـاوت معنـی‌داری برقـرار بـود ($p<۰/۰۵$).

تفاوت معنی‌داری از لحاظ فراسنجه‌های مذکور بین این گروه و گروه شاهد سالم مشاهده نگردید.

جدول ۲- مقایسه فراسنجه‌های هیستومورفولوژی بیضه بین گروه‌های مورد مطالعه (میانگین± انحراف معیار)

فراسنجه‌های بافتی / گروه‌ها	قطر لوله‌های منی‌ساز (mμ)	ارتفاع اپیتلیوم لوله‌های منی‌ساز (mμ)	ضخامت بافت بینابینی (mμ)
شاهد سالم	۳۶۳/۴۶±۲۸/۱۲	۱۰۲/۵۷±۹/۲۵	۳۹/۶۴±۷/۵۱
آسیب‌دیده با کافئین	۲۵۵/۸۱±۲۳/۱۴**	۶۳/۵۱±۷/۴۸**	۷۲/۲۵±۱۰/۱۳**
آسیب‌دیده با کافئین بعلاوه تیمار با کاندیشن مدیوم	۲۹۸/۷۶±۲۰/۴۵*#	۸۰/۴۷±۸/۱۵*#	۵۴/۶۹±۸/۷۰*#
آسیب‌دیده با کافئین بعلاوه تمرین هوازی	۲۹۱/۳۱±۱۸/۷۶*#	۸۵/۳۳±۹/۶۴*#	۵۸/۱۱±۶/۹۵*#
آسیب‌دیده با کافئین بعلاوه تیمار با کاندیشن مدیوم و تمرین هوازی	۳۵۷/۹۴±۲۲/۷۰##	۹۸/۸۴±۸/۶۱##	۳۷/۲۸±۵/۷۴##

* ($p<۰/۰۵$) و ** ($p<۰/۰۱$) اختلاف از گروه شاهد سالم را نشان می‌دهد و # ($p<۰/۰۵$) و ## ($p<۰/۰۱$) اختلاف از گروه آسیب‌دیده با کافئین را نشان می‌دهد (۶ =n).

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه استفاده از کافئین باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) در بافت بیضه موش‌های صحرایی شد و از سویی دیگر مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) بافت بیضه این موش‌ها را به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی به‌طور معنی-داری افزایش داد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) سرم موش‌ها نیز در اثر مصرف کافئین به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. استفاده از کاندیشن مدیای سلول‌های سرتولی و تمرین هوازی به‌طور جداگانه باعث بهبود و افزایش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و GPx بیضه‌ها و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم در موش‌های صحرایی دریافت‌کننده کافئین شدند و میزان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) بافت بیضه این موش‌ها را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند، لکن هرگز نتوانستند مقادیر آن‌ها را تا حد نرمال خود تغییر دهند. همچنین، این تیمارها مقادیر کاهش‌یافته قطر و ارتفاع اپیتلیوم مجاری منی‌ساز موش‌های مذکور را به‌طور معنی‌داری افزایش و پهنای افزایش‌یافته فضای بینابینی بیضه‌ی آن‌ها را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند. تیمار موش‌های صحرایی دریافت‌کننده کافئین با کاندیشن مدیا و انجام همزمان تمرین بدنی، تمامی مقادیر تغییریافته پارامترهای مورد مطالعه را به‌طور معنی‌دار و تا نزدیک به حالت طبیعی خود بهبود داد، طوری که تفاوت معنی‌داری از این لحاظ بین موش‌های گروه مذکور با موش‌های گروه شاهد سالم برآورد نشد. طی مشاهدات ریزبینی در مطالعه حاضر، کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم مجاری منی‌ساز، کاهش قطر توبول‌ها و افزایش پهنای فضای بینابینی در بیضه موش‌های صحرایی دریافت کننده کافئین دیده شد. همچنین در آسیب‌شناسی بافتی، پرخونی رگ‌های خونی بینابینی و زیر کپسولی متعاقب مصرف کافئین بیضه موش‌ها نیز مشاهده گردید که می‌تواند ثانویه به افزایش فعالیت سلولی در پاسخ به کافئین باشد و بیشتر به این دلیل است که مصرف کافئین با افزایش متابولیسم مرتبط

است (Huang *et al*., 2005). طی گزارشی کافئین به‌طور خاصی منجر به کاهش قابل توجه وابسته به دوز در وزن بیضه، قطر لوله‌های منی‌ساز، ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال، سطح تستسترون و کیفیت اسپرم فرزندان می‌شود (Dorostghoal *et al*., 2012). علاوه بر این، یک مطالعه *in vivo* با موش‌های Sprague-Dawley نشان داده که مصرف خوراکی دوز بالای ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کافئین، بر ساختار بافتی لوله‌های منی‌ساز بیضه تأثیر منفی می‌گذارد و باعث از بین رفتن گسترده سلول‌های اسپرم‌ساز و کاهش وزن بیضه‌ها می‌شود (Bassey *et al*., 2011). همچنین، یک مطالعه جدیدتر با همان دوز کافئین (۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، کاهش وزن بیضه و اپیدیدیم و همچنین تغییرات بافتی، یعنی سلول‌های آتروفیک همراه با نکروز و دژنراسیون بیش از حد اسپرماتیدها و تقریباً عدم وجود اسپرم را گزارش کرده است (Ekaluo *et al*., 2014). شاید بتوان نتیجه گرفت علاوه بر این که کافئین بر ساختار بافتی بیضه تأثیر می‌گذارد، سلول‌های زایای تناسلی نرینه را نیز کاهش می‌دهد و موجب ناباروری می‌گردد.

مطالعات روی مدل‌های حیوانی نشان می‌دهد که قرار گرفتن طولانی مدت در معرض کافئین ممکن است متابولیسم سلولی را تحت تاثیر قرار دهد و هومئوستاز سلولی را به مخاطره بیندازد (Yokogoschi *et al*., 1983). در داخل بیضه، سلول‌های سرتولی لاکتات را با سرعت بالا تولید می‌کنند و هرگونه تنظیم‌زدایی از این فرآیندها ممکن است منجر به سطوح بالای استرس اکسیداتیو و در نتیجه ناباروری یا ناباروری مردان شود (Aitken *et al*., 2010). از میان بسیاری از علل ناباروری مردان، استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از عوامل موثر بر وضعیت باروری شناخته شده است (Makker *et al*., 2009). افزایش سطح گونه های فعال اکسیژن (reactive oxygen species; ROS) با کاهش تعداد و تحرک اسپرم در ارتباط است (Agarwal *et al*., 1994; Armstrong *et al*., 1999). با این حال، مکانیسم دقیقی که از طریق آن ROS باعث کاهش در تعداد و تحرک اسپرم می شود، شناخته نشده است (Makker *et al*., 2009).

جالب توجه است که کافئین به عنوان یک ماده محافظ در برابر آسیب سلولی با اثرات آنتی‌اکسیدانی مفید گزارش شده است (Grucka-Mamczar *et al*., 2009). مکانیسم‌های دقیق اثر کافئین در متابولیسم سلول‌های سرتولی هنوز آشکار نشده است و شواهدی دال بر ارتباط بین کافئین، استرس اکسیداتیو و باروری مردانه وجود ندارد. لکن فرض بر این است که کافئین می‌تواند پروفایل گلیکولیتیک و اکسیداتیو سلول‌های سرتولی را تغییر دهد و با پتانسیل تولیدمثلی نرینه تداخل ایجاد کند. مطالعات قبلی نیز گزارش کردند که کافئین میزان فعالیت متابولیکی انسان (Nehlig *et al*., 1992) و سطح گلوکز خون را افزایش می‌دهد (Pizziol *et al*., 1998). اسپرماتوژنز هم به شدت به متابولیسم گلوکز در سلول‌های سرتولی وابسته است، زیرا که گلوکز منبع لاکتات بوده و سوبسترای متابولیک ترجیحی سلول‌های زایای در حال رشد است (Rato *et al*., 2014). علاوه بر این، گزارش شده است که آدنوزین باعث افزایش عرضه لاکتات به سلول‌های زایا می‌شود (Galardo *et al*., 2010). نتایج مطالعه دیاس و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده که کمترین غلظت

کافئین به طور قابل توجهی متابولیسم سلول‌های سرتولی بیضه انسان را تغییر می‌دهد (Dias *et al.*, 2015). قابل توجه اینکه، در مطالعه ایشان قرار گرفتن سلول‌های سرتولی بیضه انسان در معرض ۵ میکرومولار و ۵۰ میکرومولار کافئین باعث افزایش تولید لاکتات توسط این سلول‌ها شده است، بدون این‌که تغییر قابل توجهی در مصرف گلوکز ایجاد کند. این نتایج با مطالعات قبلی که نشان می‌دهد کافئین می‌تواند متابولیسم گلوکز را تنظیم کند، همراستا است (Ojuka *et al.*, 2002).

کافئین به عنوان یک ماده محافظ در برابر آسیب سلولی با اثرات آنتی اکسیدانی مفید گزارش شده است (Grucka-Mamczar *et al.*, 2009; Ofluoglu *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای که آکومولاف و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام دادند، نشان دادند که کافئین در مقادیر مصرف پایین (۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) آسیب اکسیداتیو را در بیضه و اپیدیدیم موش‌های تحت درمان با اسکوپولامین کاهش داده و کیفیت اسپرم را بهبود می‌بخشد و همچنین فعالیت آنزیم‌های استروئیدوژنیک را افزایش می‌دهد (Akomolafe *et al.*, 2019). شواهد قانع‌کننده نشان داده است که گیرنده‌های کافئین و آدنوزین می‌توانند وضعیت اکسیدان سلولی را تعدیل کنند (Gołembiowska and Dziubina, 2012; Prasanthi *et al.*, 2010). طبق نظر دیاس و همکاران کافئین در غلظت‌های بالا (۵۰۰ میکرومولار)، باعث ایجاد یک محیط پرواکسیدانی در سلول‌های سرتولی می‌شود و بنابراین نیاز به سازگاری‌های متابولیکی به منظور حفظ تولید لاکتات را توجیه می‌کند. علاوه بر این سلول‌های سرتولی که در معرض این غلظت کافئین قرار گرفته‌اند، به طور قابل‌توجهی اکسیداسیون پروتئین بالاتری را نشان داده‌اند (Dias *et al.*, 2015).

اثر کافئین در چندین عملکرد سلولی، مانند گونه‌های فعال اکسیژن، گزارش شده است (Tiwari *et al.*, 2014). اگرچه کافئین به طور کلی به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و کارآیی خود به عنوان یک پاک‌کننده رادیکال‌های هیدروکسیل در شرایط آزمایشگاهی شناخته شده است (Shi *et al.*, 1991)، لکن نتایج مطالعه دیاز و همکاران نشان داده است که کافئین در غلظت ۵۰۰ میکرومولار، یک محیط پرواکسیدانی را در سلول‌های سرتولی ایجاد می‌کند که با افزایش اکسیداسیون پروتئین‌ها همراه است. در مطالعه ایشان کمترین دوز کافئین آزمایش‌شده (۵ میکرومولار) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌های سرتولی را تغییر نداده، با این حال، افزایش اکسیداسیون پروتئین وجود داشته است که نشان‌دهنده افزایش استرس اکسیداتیو است. سلول‌های سرتولی که در معرض ۵۰ میکرومولار کافئین قرار گرفتند، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به سلول‌های بدون مواجهه و سلول‌هایی که ۵ میکرومولار کافئین داشتند، نشان دادند. با این حال، سلول‌های سرتولی مواجهه‌یافته با ۵۰ میکرومولار کافئین، پراکسیداسیون لیپیدی کمتری نسبت به سلول‌های بدون مواجهه و اکسیداسیون پروتئین کمتری نسبت به سلول‌های سرتولی در معرض ۵ میکرومولار کافئین نشان دادند (Dias *et al.*, 2015). این نتایج نشان می‌دهد که اثرات کافئین در استرس اکسیداتیو وابسته به غلظت است. غلظت متوسط کافئین (۵۰ میکرومولار)، که به عنوان مصرف منظم در نظر گرفته می‌شود، به نظر می‌رسد برخی از اثرات محافظتی در برابر استرس

اکسیداتیو را واسطه کند. همانطور که بحث شد، کافئین می‌تواند به عنوان یک آنتاگونیست غیرانتخابی گیرنده‌های آدنوزین عمل کند، که گزارش شده است تشکیل رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو سلول‌ها را کنترل می‌کند (Gołembiowska and Dziubina, 2012). بنابراین، اثرات کافئین در استرس اکسیداتیو ممکن است توسط گیرنده‌های آدنوزین نیز واسطه شود که با تغییرات شناسایی‌شده در متابولیسم سلول‌های سرتولی نیز همراه است. نتایج مطالعه حاضر اثرات کافئین با دزهای بالا را در ایجاد استرس اکسیداتیو از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی مورد تایید قرار می‌دهد.

در سال‌های اخیر، برخی از مطالعات با استفاده از شاخص‌های استرس اکسیداتیو، تأثیر ورزش و تمرینات بدنی را بر عملکرد تولیدمثلی بیضه‌ها بررسی کرده‌اند (Matos *et al*., 2019). اگرچه مطالعات در این زمینه هنوز کافی نیست، اما اغلب اشاره بر آن دارند که ورزش نقش مهمی در بهبود شاخص‌های عملکرد بیضه‌ها در افراد سالم و نابارور، به‌ویژه با کاهش شاخص‌های التهابی و استرس اکسیداتیو دارد (Hajizadeh Maleki and Tartibian, 2020). هومئوستاز در سلول و به‌ویژه اندام‌ها، به‌مفهوم تعادل بین تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن (reactive nitrogen species; RNS) و واکنش‌های آنتی‌اکسیدانی برای حفظ سطح مناسب ROS و به حداقل رساندن واکنش‌های خاص آن‌ها با مولکول‌های بیولوژیکی حیاتی است. این آنتی‌اکسیدان‌ها به سه دسته تقسیم می‌شوند: یک نوع آن آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز (superoxide dismutase; SOD)، کاتالاز (catalase; CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (glutathione peroxidase; GPx) هستند. دسته دیگر شلاتورهای فلزی بیولوژیکی هستند. در نهایت، مواد مولکولی آبدوست یا آبگریز کم‌وزن مانند گلوتاتیون، اسید اسکوربیک (ویتامین C)، اسید اوریک، توکوفرول‌ها (ویتامین E)، کاروتنوئیدها، کوآنزیم Q، بیلی‌روبین و برخی اسیدهای آمینه (مانند سیستئین، متیونین، یا تیروزین) می‌باشند. این ترکیبات اغلب به عنوان "زداینده رادیکال‌های آزاد" نامیده می‌شوند. با این حال، حداقل برخی از این ترکیبات محافظ‌های موثری در برابر رادیکال‌های غیر ROS/RNS مانند پراکسی نیترات یا هیپوکلریت نیز هستند. کل فعالیت آنتی‌اکسیدانی این مجموعه "غیراختصاصی" از آنتی‌اکسیدان‌ها اغلب به عنوان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (total antioxidant capacity; TAC) نامیده می‌شود (Bartosz, 2003).

در راستای نتایج مطالعه حاضر، تحقیقات کلانتری و همکاران بر روی موش‌های سالم نشان داد که چهار هفته تمرین شنا به تنهایی نمی‌تواند سطح MDA در بافت بیضه موش‌های نر را کاهش دهد و سطح MDA با تمرین همزمان و استفاده از آلفا توکوفرول به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد (Kalantari *et al*., 2017).

حسینی و سومانیدر سال ۱۹۹۸ اثر شش و نیم هفته فعالیت را بر استرس اکسیداتیو ناشی از اتانول بر بافت بیضه موش فیشر بررسی کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که اتانول باعث افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد و تمرین بدنی با افزایش فعالیت SOD و CAT و کاهش MDA همراه بود

(Husain and Somani, 1998) که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. اخیراً گزارش شده است که تمرینات تناوبی با شدت بالا (High Intensity Interval Training; HIIT) در مقایسه با تمرینات استقامتی معمولی اثرات محافظتی قابل توجهی بر روی بافت‌های مختلف دارند (Alihemmati *et al*., 2019). همچنین، حاجی زاده ملکی و ترتیبیان در سال ۲۰۲۰ طی مطالعه‌ای نشان دادند که انجام ۲۴ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا منجر به بهبود قابل توجهی در شاخص‌های التهاب و استرس اکسیداتیو در مایع منی، پارامترهای مایع منی و یکپارچگی DNA اسپرم در مردان نابارور شد (Hajizadeh Maleki and Tartibian, 2020). مطالعات نتایج متناقضی از بروز استرس اکسیداتیو متعاقب شدت‌های مختلف تمرین در بافت بیضه و تغییر در پارامترهای آن به دست آورده‌اند. برخی از مطالعات نشان می‌دهند که انجام تمرین تناوبی با شدت بالا، تولید رادیکال‌های آزاد را بیش از فعالیت مداوم افزایش می‌دهد و حتی می‌تواند عملکرد تولید مثل را در بافت بیضه مختل کند (Matos *et al*., 2019). با این وجود، پیس و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که با برابرکردن حجم در پروتکل تمرین هوازی و دستکاری شدت، انجام تمرین تناوبی با شدت بالا نه تنها رادیکال‌های آزاد بیشتری نسبت به تمرینات با شدت متوسط تولید نمی‌کند، بلکه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تولید آنتی‌اکسیدان SOD و GPx را نیز افزایش می‌دهد (Paes *et al*., 2020). مطالعات حاجی زاده ملکی و همکاران در سال ۲۰۱۷ و حاجی زاده ملکی و ترتیبیان در سال ۲۰۲۰ نیز اثر محافظتی بیشتری را در تمرین تناوبی با شدت بالا بر تولید رادیکال‌های آزاد، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و پارامترهای باروری مردان نابارور نشان دادند (Hajizadeh Maleki *et al*., 2017; Hajizadeh Maleki and Tartibian, 2020). تحقیقات نشان داده که انجام ورزش، انواع سیستم‌های دفاعی/بازسازی سلولی و میتوکندری را ارتقاء می‌دهد که ممکن است مرجعی برای فعال‌سازی بازسازی/پاکسازی (regeneration/clearance) اشکال اتوفاژیک باشد (Marques-Aleixo *et al*., 2018). نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که تمرین بدنی همراه با مصرف کاندیشن مدیای سلول‌های سرتولی با کاهش سطح MDA، اثرات مخرب کافئین بر بافت بیضه را تعدیل کرده است. همچنین تأثیر متقابل تمرین و مصرف کاندیشن مدیا بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی SOD و GPx و میزان TAC نیز معنی‌دار بود که نشان‌دهنده تأثیر هم‌افزایی تمرین و مصرف کاندیشن مدیا بر این متغیرها است. سازگاری در بازسازی شبکه میتوکندری از جمله مکانیسم‌های سیگنال‌دهی مربوط به هومئوستاز ردوکس (redox homeostasis)، فعال یا غیرفعال‌کردن مسیر مرگ آپوپتوز، دینامیک میتوکندری (زیست‌زایی، همجوشی و شکافت)، و کنترل کیفیت تحریک‌شده با فعالیت ممکن است نشان‌دهنده فرآیندهای حیاتی وابسته یا غیروابسته در کاهش اثرات سوء کافئین در مطالعه حاضر باشد.

برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با اثرات نامطلوب رادیکال‌های آزاد مقابله کنند، اما اثر آنها در همزمانی با فعالیت هنوز در هاله‌ای از ابهام قرار دارد. می‌دانیم که ROS در طول فعالیت بدنی هوازی افزایش می‌یابد و میزان افزایش آن بستگی به شدت فعالیت دارد. رابطه بین فعالیت بدنی و ROS با بهبود

عملکرد رابطه معکوس دارد، به این معنی که مقدار مشخصی از فعالیت می‌تواند مقادیری از ROS را تولید کند که منجر به بهبود عملکرد و حداکثر سازگاری شود. مکمل قبل از اینکه ROS به سطحی برسد که بتواند به حداکثر پاسخ های تطبیقی دست یابد، پاسخ های فیزیولوژیکی را متوقف می‌کند. از سوی دیگر، اگر مکمل‌ها زمانی مصرف شوند که غلظت ROS با کاهش پاسخ فیزیولوژیکی (تمرین بیش از حد) به دلیل افزایش فعالیت یا فعالیت بدنی همراه باشد، می‌تواند خستگی را برای بهبود عملکرد و سازگاری‌های ناشی از آن به تاخیر بیندازد (Radak *et al*., 2017).

با توجه به نتایج این مطالعه، میزان استرس اکسیداتیو متعاقب مصرف کافئین و تمرین هوازی، پاسخی سازگار به مصرف کاندیشن مدیا داشت که باعث شد تا تعامل تمرین و مصرف کاندیشن مدیا به پاسخ‌های فیزیولوژیکی مؤثر به استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی دست یابد.

سپاسگزاری

اطلاعات مقاله حاضر، مستخرج از پایان‌نامه دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی دانشکده علوم انسانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز (کد پایان‌نامه: ۱۰۲۴۸۱۵۳۰۸۰۲۷۱۷۱۴۰۰۱۶۲۳۶۱۵۶۰) می‌باشد.

بدین وسیله از معاونت پژوهش و فن‌آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز و نیز کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های فیزیولوژی و پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تبریز، قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافع ندارند.

منابع

- Afzalpour, M.E., Chadorneshin, H.T., Foadoddini, M. and Eivari, H.A. (2015). Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. Physiology Behavior, 147(1): 78-83.
- Agarwal, A., Ikemotom I. and Loughlin, K.R. (1994). Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. Journal of Urology, 152(1): 107-110.
- Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., Hedges, A. and McLachlan, R.I. (2010). Analysis of the relationships between oxidative stresses, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. Human Reproduction, 25(10): 2415-2426.
- Akomolafe, S.F., Olasehinde, T.A., Ogunsuyi, O.B., Oyeleye, S.I. and Oboh, G. (2019). Revealed that caffeine (5 and 25 mg/kg) improved sperm quality, increased steroidogenic enzyme activities and attenuated oxidative damage in testis and epididymis of rats treated with scopolamine. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 71(10): 1565-1575.

- Alihemmati, A., Ebadi, F., Moghadaszadeh, M., Asadi, M., Zare, P. and Badalzadeh, R. (2019). Effects of high-intensity interval training on the expression of microRNA-499 and pro-and anti-apoptotic genes in doxorubicin-cardiotoxicity in rats. Journal of Electrocardiology, 55(1): 9-15.
- Armstrong, J.S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W.J. and Sikka, S.C. (1999). Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. Free Radical Biology & Medicine 26(7-8): 869-880.
- Bassey, R.B., Yama, O.E., Osinubi, A.A., Noronha, C.C. and Okanlawon, A. (2011). Effects of Tahitian Noni dietary supplement on caffeine-induced testicular histo-pathological alterations in adult Sprague-Dawley rats. Middle East Fertility Society Journal, 16(1): 61-66.
- Bartosz, G. (2003). Total antioxidant capacity. Advances in Clinical Chemistry, 37(8): 219-229.
- Dias, T.R., Alves, M.G., Bernardino, R.L., Martins, A.D., Moreira, A.C., Silva, J., et al. (2015). Dose-dependent effects of caffeine in human Sertoli cells metabolism and oxidative profile: Relevance for male fertility. Toxicology, 328(3): 12-20.
- Dorostghoal, M., Majd, N.E. and Nooraei, P. (2012). Maternal caffeine consumption has irreversible effects on reproductive parameters and fertility in male offspring rats. Clinical and Experimental Reproductive Medicine, 39(4): 144-152.
- Ekaluo, U., Ikpeme, E., Etta, S., Erem, F. and Daniel, I. (2014). Protective role of soursop (Annona muricata L.) fruit on testicular toxicity induced by caffeine in albino rats. Journal of Life Sciences Research and Discovery, 22(1): 150-157.
- Galardo, M., Riera, M., Pellizzari, E., Sobarzo, C., Scarcelli, R., Denduchis, B., et al. (2010). Adenosine regulates Sertoli cell function by activating AMPK. Molecular and Cell Endocrinology, 330(1-2): 49-58.
- Gaskins, A.J., Mendiola, J., Afeiche, M., Jørgensen, N., Swan, S.H. and Chavarro, J.E., (2015). Physical activity and television watching in relation to semen quality in young men. British Journal of Sports Medicine, 49(4): 265-270.
- Gołembiowska, K. and Dziubina, A. (2012). The Effect of Adenosine A2A Receptor Antagonists on Hydroxyl Radical, Dopamine, and Glutamate in the Striatum of Rats with Altered Function of VMAT2. Neurotoxicity Research, 22(2): 150-157.
- Grandys, M., Majerczak, J., Duda, K., Zapart-Bukowska, J., Kulpa, J. and Zoladz, J.A. (2009). Endurance training of moderate intensity increases testosterone concentration in young, healthy men. International. Journal of Sports Medicine, 30(7): 489-495
- Grucka-Mamczar, E., Zalejska-Fiolka, J., Chlubek, D., Kasperczyk, S., Blaszczyk, U., Kasperczyk, A. (2009). The influence of sodium fluoride and caffeine on the activity of antioxidative enzymes and the concentration of malondialdehyde in rat liver. Fluoride, 42(2): 105-109.
- Hajizadeh Maleki, B., Tartibian, B. and Chehrazi, M. (2017). The effects of three different exercise modalities on markers of male reproduction in healthy subjects: a randomized controlled trial. Reproduction, 153(2): 157-74.
- Hajizadeh Maleki, B. and Tartibian, B. (2020). High-intensity interval training modulates male factor infertility through anti-inflammatory and antioxidative mechanisms in infertile men: A randomized controlled trial. Cytokine, 125(1): 154861.
- Huang, Z.L., Qu, W.M., Eguchi, N., Chen, J.N., Schwarzschild, M.A. and Fredholm, B.B. (2005). Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. Nature Neurosciense, 8(7): 858-859.
- Husain, K. and Somani, S.M. (1998). Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on testicular antioxidant system in rat. Journal of Applied Toxicology, 18(6): 421-9.
- Sohrabvand, F., Ansari, Sh. and Bagheri, M. (2006). Efficacy of combined metformin-letrozole in comparison with metforminclomiphenecitrate in clomiphene-resistant infertile women with polycystic ovarian disease. Human Reproduction, 21(6): 1432-1435.

- Kalantari, A., Saremi, A., Shavandi, N. and Foroutan Nia, A. (2017). Impact of four week swimming exercise with alpha-tocopherol supplementation on fertility potential in healthy rats. Urology Journal, 14(5): 5023-5026.
- Liu, A.G., Arceneaux, K.P., Chu, J.T., Jacob, G., Schreiber, A.L., Tipton, R.C., Yu, Y., Johnson, W.D., Greenway, F.L., Primeaux, S.D., 2015. The effect of caffeine and albuterol on body composition and metabolic rate. Obesity (Silver Spring Md), 23(9): 1830-1835.
- Makker, K., Agarwal, A. and Sharma, R. (2009). Oxidative stress and male infertility. Indian Journal of Medical Research, 129(4): 357-367.
- Marques-Aleixo, I., Santos-Alves, E., Oliveira, P.J., Moreira, P.I., Magalhães, J. and Ascensão, A. (2018). The beneficial role of exercise in mitigating doxorubicin-induced Mitochondrionopathy. Biochimical Biophysiology Acta(BBA) Reviews on Cancer, 1869(2): 189-199.
- Matos, B., Howl, J., Ferreira, R. and Fardilha, M. (2019). Exploring the effect of exercise training on testicular function. European Journal of Applied Physiology, 119(1): 1-8.
- Mombeyni, A., Bahmanzade, M., Sarami, A., Changizi-Ashtiyani, S. and Parastesh, M. (2018). The Effect of Increasing Resistance Training on Testicular Oxidative Stress and Quality of Spermatogenesis in Male Rats. Journal of Arak University Medical Sciense, 21(4): 86-97. [In Persian]
- Monfared, M.H., Minaee, B., Rastegar, T., Khrazinejad, E. and Barbarestani, M. (2016). Sertoli cell condition media can induce germ like cells from bone marrow derived mesenchymal stem cells. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 19(11): 1186-1192.
- Mora-Esteves, C. and Shin, D. (2013). Nutrient Supplementation: Improving Male Fertility Fourfold. Seminars in Reproductive Medicine, 31(4): 293-300.
- Nehlig, A., Daval, J.L. and Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. Brain Reserch, 17(2): 139-170.
- Ojuka, E.O., Jones, T.E., Nolte, L.A., Chen, M., Wamhoff, B.R., Sturek, M., et al. (2002). Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca2+. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, 282(5): 1008-1013.
- Oluwole, O.F., Salami, S.A., Ogunwole, E. and Raji, Y. (2016). Implication of caffeine consumption and recovery on the reproductive functions of adult male Wistar rats. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 27(5): 483-491.
- Pizziol, A., Tikhonoff, V., Paleari, C., Russo, E., Mazza, A., Ginocchio, G., et al. (1998). Effects of caffeine on glucose tolerance: a placebo-controlled study. European Journal of Clinical Nutriation, 52(11): 846-849.
- Priskorn, L., Jensen, T.K., Bang, A.K., Nordkap, L., Joensen, U.N., Lassen, T.H., et al. (2016). Is Sedentary Lifestyle Associated with Testicular Function? A Cross-Sectional Study of 1,210. American Journal of Epidemiology, 184(4): 284-294
- Radak, Z., Ishihara, K., Tekus, E., Varga, C., Posa, A. and Balogh, L. (2017). Exercise, oxidants, and antioxidants change the shape of the bell-shaped hormesis curve. Redox Biology, 12(1): 285-290.
- Rato, L., Alves, M.G., Socorro, S., Duarte, A.I., Cavaco, J.E. and Oliveira, P.F. (2012). Metabolic regulation is important for spermatogenesis. Nature Reviews. Urology, 9(6): 330-338.
- Ricci, E., Viganò, P., Cipriani, S., Somigliana, E., Chiaffarino, F., Bulfoni, A. and Parazzini, F. (2017). Coffee and caffeine intake and male infertility: a systematic review. Nutrition Journal., 16(1): 37.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science, 179(4073): 588-590.
- Salem, M., Mirzapour, T., Bayrami, A., Sagha, M. and Asadi, A. (2017). The Effects of Sertoli Cells Condition Media and Retinoic Acid on the Number of Colonies of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Journal of Ardabil University of Medical Scienses, 17(1): 7-21. [In Persian]
- Shi, X., Dalal, N. and Jain, A. (1991). Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. Food and Chemical Toxicology, 29(1): 1-6.

- Svartberg, J., Midtby, M., Bonaa, K., Sundsfjord, J., Joakimsen, R. and Jorde, R. (2003). The associations of age, lifestyle factors and chronic disease with testosterone in men: the Tromso Study. European Journal of Endocrinology. 149(2): 145-152.
- Tiwari, K.K., Chu, C., Couroucli, X., Moorthy, B. and Lingappan, K. (2014). Differential concentration-specific effects of caffeine on cell viability, oxidative stress, and cell cycle in pulmonary oxygen toxicity in vitro. Biochemical and Biophysical Research Communications, 450(4): 1345-1350.
- Vaamonde, D., Da Silva-Grigoletto, M.E., García-Manso, J.M., Barrera, N. and Vaamonde-Lemos, R. (2012). Physically active men show better semen parameters and hormone values than sedentary men. European Journal of Applied Physiology., 112(9): 3267-3273.
- Yokogoschi, H., Mochizuki, S., Takahata, M., Quazi, S. and Yoshida, A. (1983). Hypercholesterolemic effects of caffeine-containing beverages and xanthine-derivatives in rats. Food Additives and Contaminants, 28(12): 805-814.