

The Effect of Low, Moderate and High Intensity Exercise Trainings on Apoptotic Indices of Testicular Tissue in Male Rats

Yousef Saberi ¹, Javad Tolouei Azar ², Mazdak Razi ³, Asghar Tofighi ⁴

1. Department of Exercise Physiology and Corrective Exercises, Faculty of Sports Sciences, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: saberiyousef@yahoo.com

2. Corresponding Author: department of Exercise Physiology and Corrective Exercises, Faculty of Sports Sciences, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: j.toloueiazar@urmia.ac.ir

3. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. E-Mail: m.razi@urmia.ac.ir

4. Department of Exercise Physiology and Corrective Exercises, Faculty of Sports Sciences, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: a.tofighi@urmia.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received:

1 February 2022

Received in revised form:

5 March 2022

Accepted:

22 April 2022

Published online:

22 September 2022

ABSTRACT

Introduction: The effect of sports training with different intensities on the induction or inhibition of mitochondria-dependent apoptosis process in testicular tissue has remained unknown. This study aimed to investigate the effect of continuous training with low intensity (LICT), moderate (MICT), and high intensity (HICT) on the apoptosis process in the testicular tissue of rats.

Methods: For this purpose, 24 male Wistar rats were randomly divided into LICT, MICT, HICT, and Control groups. The LICT, MICT, and HICT groups were trained with an intensity of 50-60%, 65-70%, and 80-85% of the maximum velocity, respectively. Protein and gene expression of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 were measured by Western Blot and quantitative PCR methods. The research data were analyzed by ANOVA and Tukey's post hoc test.

Results: The LICT and MICT groups showed no significant statistical changes in the Bcl-2, Bax, and Caspase-3 expression levels compared to the control group ($P > 0.05$). However, in the HICT group, the expression of Bcl-2 decreased significantly ($P = 0.01$) and the expression of Bax and Caspase-3 increased significantly ($P < 0.05$). Also, the number of apoptotic cells in LICT and MICT did not show a significant change, but it increased significantly in the HICT group ($P = 0.001$).

Conclusion: It seems that eight weeks of LICT and MICT has no significant effect on the occurrence or induction of mitochondria-dependent apoptosis process in testicular tissue. While the HICT group induces the apoptosis process by decreasing the expression of Bcl-2 and increasing the expression of Bax and Caspase-3 and increasing the number of apoptotic cells in the testicular tissue.

Keywords:

Exercise Trainings,
Intrinsic Apoptosis Pathway,
Testicular tissue,
Wistar rats

Cite this article: Saberi, Y.; Tolouei Azar, J.; Razi, M.; Tofighi, A. (2022). The Effect of Low, Moderate and High Intensity Exercise Trainings on Apoptotic Indices of Testicular Tissue in Male Rats. *Journal of Sport Biosciences*, 14 (2), 173-188. DOI: <http://doi.10.22059/JSB.2022.338392.1510>.



Extended Abstract

Introduction

Sperm DNA health is another vital factor for success in conception and fertility, as endogenous and exogenous factors can lead to DNA damage and reduce fertility success. On the other hand, the effect of sports training with different intensities on the induction or inhibition of the mitochondrial-dependent apoptosis process in the testicular tissue has remained unknown. The purpose of this study was to investigate the effect of continuous training with low (LICT), moderate (MICT), and high (HICT) intensity on the process of apoptosis in the testicular tissue of rats.

Methods

For this purpose, 24 Wistar male rats were randomly divided into four groups: LICT, MICT, HICT, and control. The LICT group trained with an intensity of 50-60% of maximum velocity, the MICT group trained with an intensity of 65-70% of maximum velocity, and the HICT group trained with an intensity of 80-85% of maximum velocity. Protein and gene expression of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 were measured by Western Blot and quantitative PCR methods. The research data were analyzed by ANOVA and Tukey's post hoc test.

Results

The results showed that the mRNA expression of Bcl2, Bax, and Caspase-3 in the LICT and MICT groups did not change significantly compared with the control group ($P > 0.05$). In the HICT group, the mRNA expression of Bcl-2 decreased significantly ($P = 0.01$) and the mRNA expression of Bax and Caspase-3 increased significantly ($P = 0.001$) (Figure 1). The observations showed that the apoptotic index in the testicular tissue of the low and moderate-intensity exercise groups did not show a significant change compared with the control group ($p < 0.05$). While this amount was significantly increased in the high-intensity exercise group compared with the other experimental groups and the control group ($P = 0.001$) (Figure 2).

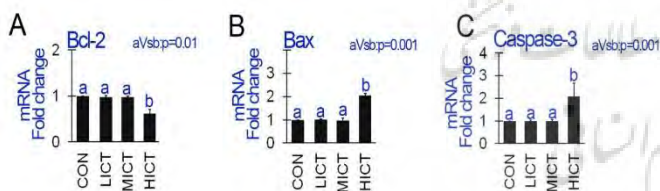


Figure 1. Changes related to mRNA expression of (A) Bcl-2, (B) Bax, and (C) Caspase-3 in different groups after 8 weeks of LICT, MICT, and HICT training. All data are expressed as mean \pm standard deviation, and unlike letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups. LICT: low-intensity continuous training, MICT: moderate-intensity continuous training, HICT: high-intensity continuous training.

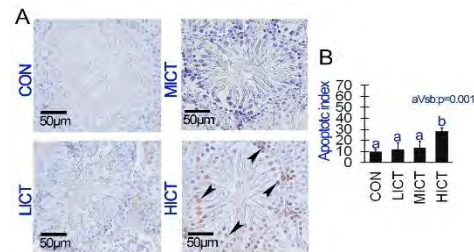


Figure 2. (A) TUNEL staining to show apoptotic germ cells in the seminiferous tubules in different groups indicated by arrowheads. The number of apoptotic cells in the HICT group shows a significant increase compared with the other groups. (B) The average changes of the apoptotic index in different groups after 8 weeks of LICT, MICT, and HICT. All data are expressed as mean \pm standard deviation, and unlike letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups. LICT: low-intensity continuous training, MICT: moderate-intensity continuous training, HICT: high-intensity continuous training.

Conclusion: It seems that HICT can reduce the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and increase the expression of apoptosis-inducing proteins with the mitochondrial pathway such as Bax, by different mechanisms in testicular tissue. As a result of the physiological overexpression of Bax protein and in contrast to the reduction of Bcl-2 protein expression, the release of cytochrome c from the mitochondria into the cytoplasm occurs, which in turn can stimulate the apoptosis process by stimulating the expression of Caspase-3 protein. Meanwhile, LICT and MICT do not disturb the normal spermatogenesis process by inducing a balance in the expression of apoptosis inhibiting and stimulating proteins with the internal pathway.

Ethical Considerations: The present study was conducted according to the instructions of the Ethical Committee of Laboratory Animals of Urmia University (N: IR.UU.AEC.849/DP/3), which is based on the Helsinki guidelines for animal model studies.

Funding: All financial resources are provided by the authors.

Authors' contribution: All authors equally contributed to the design, implementation of the exercise protocol, experimental measurement methods, data analysis, and writing.

Conflict of interest: No conflict of interest is declared by the authors.

Acknowledgments: The current research is taken from the doctoral thesis on sports physiology of Urmia University. We would like to express our gratitude to the Department of Exercise Physiology and Corrective Exercises of the Faculty of Sports Sciences, and the Department of Basic Sciences of the Faculty of Veterinary Medicine of Urmia University for their financial and scientific support, and to the Rasta Research Group for their laboratory assistance in the implementation of this research.

تأثیر تمرینات ورزشی با شدت کم، متوسط و زیاد بر شاخص‌های آپوپتوز بافت بیضه موش‌های صحرائی نر

یوسف صابری^۱ ID، جواد طلوعی آذر^۲ ID، مزدک رازی^۳ ID، اصغر توفیقی^۴ ID

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی و حرکات اصلاحی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران رایانامه: saberiyousef@yahoo.com
۲. نویسنده مسئول. گروه فیزیولوژی ورزشی و حرکات اصلاحی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران رایانامه: j.toloueiazar@urmia.ac.ir
۳. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران رایانامه: m.razi@urmia.ac.ir
۴. گروه فیزیولوژی ورزشی و حرکات اصلاحی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران رایانامه: a.tofighi@urmia.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	مقدمه: تأثیر تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف بر القا و یا مهار فرایند آپوپتوز وابسته به میتوکندری در بافت بیضه تاکنون ناشناخته مانده است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر تمرین تداومی با شدت کم (LICT)، متوسط (MICT) و زیاد (HICT) بر فرایند آپوپتوز در بافت بیضه موش‌های صحرائی نر بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۲	روش پژوهش: بدین منظور، ۲۴ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به چهار گروه LICIT، MICT، HICT و کنترل تقسیم شدند. گروه LICIT با شدت ۵۰-۶۰ درصد حداکثر سرعت، گروه MICT با شدت ۶۵-۷۰ درصد حداکثر سرعت و گروه HICT با شدت ۸۰-۸۵ درصد حداکثر سرعت تمرین کردند. بیان پروتئین و ژن Bax، Bcl-2، کاسپاز ۳- با روش وسترن بلات و PCR کمی اندازه‌گیری شد. داده‌های پژوهش با آزمون آماری ANOVA و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شد.
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۲/۱۴	یافته‌ها: نتایج نشان داد که در گروه LICIT و MICT بیان Bcl2، Bax و کاسپاز ۳- تغییر معناداری در مقایسه با گروه کنترل نداشت ($P > 0/05$). در گروه HICT بیان Bcl-2 کاهش معنادار ($P = 0/01$) و بیان Bax و کاسپاز ۳- افزایش معناداری ($P = 0/05$) داشت. همچنین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در LICIT و MICT تغییر معناداری را نشان نداد، ولی در گروه HICT افزایش معناداری داشت ($P = 0/001$).
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۲	نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد هشت هفته تمرین LICIT و MICT هیچ تأثیر معناداری در بروز یا القای فرایند آپوپتوز وابسته به میتوکندری در بافت بیضه ندارد. در حالی که گروه HICT با کاهش بیان Bcl2 و افزایش بیان Bax و کاسپاز ۳-، فرایند آپوپتوز را القا می‌کند و تعداد سلول‌های آپوپتوتیک را در بافت بیضه افزایش می‌دهد.
تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۶/۳۱	
کلیدواژه‌ها: بافت بیضه، تمرینات ورزشی، مسیر داخلی آپوپتوز، موش صحرائی.	

استناد: صابری، یوسف؛ طلوعی آذر، جواد؛ رازی، مزدک؛ توفیقی، اصغر (۱۴۰۱) تأثیر تمرینات ورزشی با شدت کم، متوسط و زیاد بر شاخص‌های آپوپتوز بافت بیضه موش‌های صحرائی نر. *نشریه علوم زیستی ورزشی*، (۲) ۱۴، ۱۷۳-۱۸۸.

DOI: <http://doi.10.22059/JSB.2022.338392.1510>



مقدمه

تقریباً ۵۰ درصد ناباروری در بین زوج‌های جوان مربوط به عوامل مردانه است. عمده‌ترین علل ناباروری در مردان استرس اکسیداتیو، جهش‌های ژنتیکی، بیماری‌های عفونی، انسداد مجرا، واریکوسل، شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و اختلال‌های انزالی گزارش شده است (۱). درصد شیوع ناباروری بنا به علل مورد اشاره در مناطق مختلف جهان متفاوت گزارش شده است، به طوری که این میزان در جنوب آسیا، آفریقا، خاورمیانه، اروپای مرکزی و شرقی و آسیای مرکزی شیوع بیشتری دارد (۲). در اتیولوژی ناباروری عوامل متعددی نقش دارند که موجب نقص در عملکرد تولید مثل در مردان و زنان می‌شود (۳). این عوامل، شامل اختلالات مادرزادی و هورمونی، شیوه زندگی، خطرهای زیست‌محیطی و وضعیت روانی است. تمام موارد یادشده می‌توانند به اختلال در سلول‌های جنسی منجر شوند (۴، ۵). مسئله شایان توجه در این میان مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع در غشای اسپرمی انسان است که در سطح بالایی مستعد پراکسیداسیون لیپیدی در نتیجه رادیکال‌های آزاد تشکیل شده متعاقب هر کدام از اختلالات یادشده است. در حقیقت پراکسیداسیون اسیدهای چرب به از دست دادن سیالیت غشای اسپرم و کاهش آنزیم‌های غشایی منجر می‌شود. بنابراین، قدرت باروری اسپرم کاهش می‌یابد و توان باروری مردان دچار اختلال می‌شود (۵). سلامت DNA اسپرم، یکی دیگر از فاکتورهای حیاتی برای موفقیت در لقاح و باروری است که عوامل درون‌زاد و برون‌تنی می‌توانند به آسیب DNA منجر شوند و موفقیت در باروری را کاهش دهند. مطالعات بالینی اخیر معتقدند که تقریباً ۶۰ درصد مردان مراجعه‌کننده به مراکز کمک باروری و حدود ۸۰ درصد مردان نابارور ایدیوپاتیک، با آسیب شدید یا متوسط DNA اسپرم مواجه‌اند (۶، ۷). DNA به‌طور مداوم مورد حمله گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS) قرار می‌گیرد که می‌تواند بر ساختار و عملکرد آن تأثیر بگذارد. تغییرات ساختاری در دو رشته DNA اغلب به دلیل آسیب‌های وارده به بازها متعاقب قرار گرفتن در معرض گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن رخ می‌دهد (۷). آسیب وارده به ساختار DNA، ارتباط بین بازهای DNA را دچار تغییر می‌کند که باید طی روند ترمیم DNA اصلاح شوند (۸). افزایش سطح مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو از مهم‌ترین عوامل آسیب‌دهنده DNA در اسپرم است که در بیشتر انواع ناباروری‌های مردان به‌عنوان مهم‌ترین عامل شناسایی شده است (۹). بدین ترتیب که استرس اکسیداتیو از طریق گونه‌های واکنشی اکسیژن می‌تواند موجب القای آپوپتوز وابسته و غیروابسته به میتوکندری شود. اهمیت این موضوع در این است که ایجاد چنین آسیبی در DNA قادر است تا فرایند آپوپتوز را القا یا تسریع کند و در نهایت به کاهش تعداد و کیفیت اسپرم در مردان منجر شود (۱۰). آپوپتوز، در حقیقت فرایندی فیزیولوژیک است که به منظور حذف سلول‌های آسیب‌دیده به‌طور فیزیولوژیک در بافت بیضه و سایر بافت‌ها رخ می‌دهد و اغلب نقش مهمی در سازگاری بافتی دارد (۷). در حقیقت، فرایند آپوپتوز در دو مسیر داخلی (وابسته به میتوکندری) و خارجی (غیروابسته و لیگاند‌محور) رخ می‌دهد. در مسیر داخلی آپوپتوز، خانواده پروتئین Bcl-2 به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های بالادست آپوپتوز شامل پروتئین‌های Bax و Bcl-2 است که به‌عنوان پروتئین‌های کلیدی در شکل‌گیری کانال‌های آپوپتوزی در غشای میتوکندریایی و تنظیم پیام‌های ضد و تحریک‌کننده آپوپتوز وابسته به میتوکندری نقش ایفا می‌کنند (۱۱). از دیگر عوامل دخالت‌کننده در فرایند آپوپتوز، کاسپازها هستند. کاسپازها، اجرایی‌ترین عضو این مجموعه هستند که نقش مهمی در پیشبرد مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی یا آپوپتوز دارند (۱۲). در بین تمامی اعضای خانواده کاسپازی، نقش کاسپاز-۳ به‌عنوان پروتئین نهایی در فرایند آپوپتوز در بافت بیضه به‌خوبی نشان داده شده است (۱۳).

فعالیت‌های ورزشی تأثیرات شناخته‌شده‌ای دارند که از گذشته‌های دور به‌منظور تقویت سلامتی و به تأخیر انداختن تعدادی از عوامل پاتولوژیک هم چون کاهش خطر چاقی، سرطان و برخی بیماری‌های دیگر همواره توصیه شده‌اند. در کنار این موضوع، فعالیت‌ها و تمرینات ورزشی به‌عنوان عوامل مؤثر در پیشگیری و درمان معضلات ناباروری نیز توصیه می‌شوند (۱۴). پژوهشگران نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی استقامتی از طریق کاهش استرس‌های اکسایشی در بیضه می‌تواند نقش مهمی در باروری داشته باشد (۱۵). همچنین فعالیت ورزشی از طریق تنظیم و تعدیل ژن‌های مؤثر در باروری می‌تواند در حفظ و بهبود توان باروری مردان بسیار تأثیرگذار باشد (۱۵، ۱۶)، چراکه ناباروری ناشی از بی‌حرکی امروزه یکی از نگرانی‌های شایان توجه محافل پزشکی محسوب

می‌شود (۱۷). از طرفی، نکته شایان توجه دیگر تأثیر تمرین ورزشی منظم بر سیستم آنتی‌اکسیدانی در بافت بیضه است که این موضوع مانند شمشیر دولبه است که می‌تواند از یک طرف تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و از طرفی توان آنتی‌اکسیدانی بافت را افزایش دهد (۱۸). با این حال، سؤال این است که آیا تمرینات ورزشی با شدت و مدت‌های متفاوت قادرند با القا یا مهار آپوتوز وابسته به میتوکندری روند اسپرماتوژنز و در نهایت توان باروری مردان را تحت تأثیر قرار دهند؟ بنابراین تحقیق حاضر برای نخستین بار با هدف بررسی تأثیر تمرینات ورزشی تداومی با شدت کم (LICT)، متوسط (MICT) و زیاد (HICT) بر میزان بیان پروتئین‌های دخیل در فرایند آپوتوز وابسته به میتوکندری صورت پذیرفت. برای این منظور، تغییرات مربوط به بیان ژن و پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ به همراه ارزیابی تعداد سلول‌های زایای آپوتوتیک، متعاقب القای تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف ارزیابی شد.

روش‌شناسی پژوهش

در تحقیق حاضر، ۲۴ موش صحرایی نر (با سن هشت هفته، با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم) از مؤسسه پاستور ایران خریداری و به مرکز حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. پس از سازگاری یک‌هفته‌ای (۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی، رطوبت ثابت، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، آب و غذا)، موش‌های صحرایی در چهار گروه شش‌تایی تقسیم شدند. تمامی آزمایش‌ها مطابق با دستورالعمل کمیته اخلاقی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه ارومیه (N: IR.UU.AEC.849/DP/3) انجام گرفت که براساس دستورالعمل هلسینگی برای مطالعات مدل حیوانی تنظیم شده است. پس از یک هفته سازگاری با شرایط نگهداری، حیوانات به گروه‌های کنترل و تجربی در قالب گروه‌های تمرین تداومی با شدت کم، متوسط و زیاد تقسیم شدند.

ارزیابی شدت تمرین [حداکثر سرعت دویدن (Vmax)]

موش‌های گروه‌های تمرین ورزشی به مدت پنج روز در هفته با سرعت ۱۵ متر در دقیقه، به مدت پنج دقیقه (روز اول) تا ۲۰ دقیقه (روز پنجم) با تمرین ورزشی بر روی تردمیل آشنا شدند (۱۹). در پایان یک هفته سازگاری، برای تعیین شدت تمرینات ورزشی، از آزمون حداکثر سرعت دویدن (Vmax) استفاده شد (۲۰). موش‌های صحرایی در گروه‌های LICT، MICT و HICT روی تردمیل قرار گرفتند (تردمیل آزمایشگاهی پنج‌کاناله ویژه موش صحرایی؛ دانش یاخته، ایران) و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ تا ۱۵ متر در دقیقه به‌منظور گرم کردن تمرین کردند. در ادامه، سرعت تردمیل هر ۳ دقیقه به میزان ۵ متر در دقیقه افزایش یافت، تا زمانی که موش‌ها با وجود تحریک خفیف با یک خط کش چوبی دیگر قادر به ادامه اجرای تمرین ورزشی نبودند.

برنامه‌های تمرین ورزشی

برنامه‌های تمرین ورزشی (LICT، MICT و HICT) به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته براساس تحقیقات منتشرشده قبلی (۲۱-۲۳) با سازگاری‌های زیر انجام گرفت: برنامه تمرینات LICT، MICT و HICT پس از محاسبه آزمون حداکثر سرعت دویدن (Vmax) اجرا شد. در ابتدا، موش‌ها ۱۰ دقیقه مرحله گرم کردن را با شدت ۴۰-۴۵ درصد Vmax انجام دادند. گروه‌های LICT، MICT و HICT به ترتیب با ۵۰ تا ۶۰ درصد Vmax، ۶۰ تا ۷۵ درصد Vmax و ۸۰ تا ۸۵ درصد Vmax به مدت ۲۰ تا

۴۵ دقیقه با شیب صفر درجه تمرین کردند (جدول ۱). در پایان هر جلسه، مرحله سرد کردن به مدت پنج دقیقه با ۳۵-۴۰ درصد Vmax انجام گرفت.

جدول ۱. پروتکل تمرینات ورزشی با شدت کم، متوسط و زیاد

سرد کردن	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	گرم کردن	هفته
										گروه
شدت (درصدی از حداکثر سرعت دویدن (Vmax))										
۴۰-۳۵	۶۰-۵۰	۶۰-۵۰	۶۰-۵۰	۶۰-۵۰	۶۰-۵۰	۶۰-۵۰	۶۰-۵۰	۶۰-۵۰	۴۵-۴۰	LICT
۴۰-۳۵	۷۵-۶۰	۷۵-۶۰	۷۵-۶۰	۷۵-۶۰	۷۵-۶۰	۷۵-۶۰	۷۵-۶۰	۷۵-۶۰	۴۵-۴۰	MICT
۴۰-۳۵	۸۵-۸۰	۸۵-۸۰	۸۵-۸۰	۸۵-۸۰	۸۵-۸۰	۸۵-۸۰	۸۵-۸۰	۸۵-۸۰	۴۵-۴۰	HICT
مدت زمان (دقیقه)										
۵	۴۵	۴۵	۳۵	۳۵	۳۰	۳۰	۲۵	۲۰	۱۰	

نمونه گیری بافتی

نمونه برداری موش های صحرایی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی صورت پذیرفت. به منظور جمع آوری نمونه ها، موش ها با تزریق داخل صفاقی مخلوط زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم، آلفاسون، هلند) و کتامین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، آلفاسون، هلند) بی هوش شدند. سپس بافت بیضه با ایجاد برش در ناحیه میانی بدن با رعایت شرایط استاندارد برداشته و با سالی ن نرمال شسته شد. نیمی از نمونه ها در محلول بوئن ثابت شدند و بقیه در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد برای ارزیابی های مولکولی ذخیره شدند.

ایمونوهیستوشیمی

برای بررسی تأثیر فعالیت های ورزشی بر بیان پروتئین های ضد و القاکننده آپوپتوز در بافت بیضه، از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. به طور خلاصه، مقاطع بافتی (۵-۶ میکرومتر) متعاقب پاساژ بافتی و تهیه بلوک های پارافینی تهیه و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد (۲۵ دقیقه) از قبل حرارت داده شدند و سپس در زایلین (۲ بار هر بار ۵ دقیقه) پارافین زدایی و در اتانول آبدی شدند. پس از آن، بازایی آنتی ژن با استفاده از محلول بافر سیترات (حاوی اسید سیتریک، سیترات سدیم، آب مقطر، PH 7.2) و به دنبال آن انکوبه با آب اکسیژنه ۳ درصد (۵ دقیقه) برای حذف فعالیت پراکسیدازی درون زاد انجام گرفت. در ادامه فرایند مسدود کردن آنتی ژن توسط معرف سوپر بلوک (Cat N: 237QK100037)، انجام پذیرفت و مقاطع با آنتی بادی های اولیه Cat anti-Bcl-2، Cat N: E-AB-60788، N: E-AB-60788؛ ۱:۳۰۰؛ anti-Bax، Cat N: E-AB-13814؛ ۱:۳۵۰؛ آنتی کاسپاز-۳، Cat N: E-AB-30756؛ ۱:۵۰۰، Elabsciences، ایالات متحده آمریکا) در ۴ درجه سانتی گراد (۱۸ ساعت) انکوبه شدند. متعاقب ۱۸ ساعت، مقاطع بافتی با بافر فسفات (PBS، PH 7.2) شست و شو داده شدند و در ادامه با آنتی بادی ثانویه (Goat anti-rabbite IgG، Cat N: E-AB1003)، (۱۰۰۱) انکوبه شدند. پس از شست و شوی مقاطع بافتی با PBS، مقاطع با کروموژن دی آمینو بنزیدین (DAB) به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و با محلول هماتوکسیلین رنگ آمیزی تفریقی (۳ دقیقه) انجام گرفت. در نهایت، سلول های با واکنش مثبت در برابر پروتئین های Bcl-2، Bax و کاسپاز-۳ شمارش شدند. شایان ذکر اینکه، لوله های اسپرم ساز با معیارهای بافتی یکسان برای آنالیز انتخاب شدند. بر این اساس، ۲۰ لوله اسپرم ساز از هر مقطع (۶ مقطع به ازای یک گروه) در نظر گرفته شد.

ارزیابی وسترن بلات

ارزیابی وسترن بلات بر اساس روش‌های قبلاً تأیید شده، انجام گرفت (۲۴). به‌طور خلاصه، برای استخراج پروتئین، بافت‌های بیضه در ترکیب هضم‌کننده RIPA و مهارکننده پروتئاز (Sigma-Aldrich S8820) همگن شدند. سپس غلظت تام محتوای پروتئینی نمونه‌ها با روش Lowry اندازه‌گیری شد. سپس محتویات پروتئین در بافر بارگیری رقیق شده و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه) حرارت داده شد. سپس پروتئین‌ها با الکتروفورز با استفاده از الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) برای هر پروتئین در ولتاژ ۱۲۰ ولت جدا شدند و به غشای پلی وینیلیدین فلوراید (PVDF) در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۱-۲ ساعت منتقل شدند. به‌منظور مسدود کردن پراکسیدازهای درون‌زاد، غشاهای PVDF با بافر شیر بدون چربی ۵ درصد (یک شبه) انکوبه شدند. در مرحله بعد، غشا با سالین بافر تریس (pH 7.2، حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰، ۳×، هر بار ۱۵ دقیقه) شست‌وشو داده شد و در ادامه به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی‌های اولیه Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ و بتا اکتین انکوبه شد. متعاقباً، آنتی‌بادی‌های متصل‌نشده با بافر شست‌وشو حذف شده و سپس غشاها با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با پراکسیداز (۱ ساعت) انکوبه شدند. باندهای نشان‌دهنده بیان پروتئین با استفاده از کیت تشخیص نورتابی شیمیایی پیشرفته (ECL؛ Thermo Scientific) مشاهده شدند (۲۴). میزان بیان هر پروتئین با استفاده از نرم‌افزار در برابر پروتئین بتا اکتین اندازه‌گیری و بین گروه‌ها مقایسه شد.

رنگ‌آمیزی تانل به‌منظور ارزیابی شاخص آپوپتوز

برای ارزیابی اثر فعالیت‌های ورزشی مختلف بر شاخص آپوپتوز، رنگ‌آمیزی تانل با استفاده از کیت تجاری تشخیص مرگ سلولی در محل (روش، آلمان، کد UNSPSC: 12352200) انجام گرفت. اسلایدهای بافتی (۵-۶ میکرون) تهیه و مشابه با روش ایمنوهیستوشیمی برای رنگ‌آمیزی آماده شدند. مرحله هضم با استفاده از غلظت مناسب پروتئیناز K (۱۰-۲۰ میکروگرم در میلی لیتر در ۱۰ میلی‌مولار Tris/HCL، pH 7.4-8) به مدت ۱۵ دقیقه آغاز شد. اسلایدها با فسفات بافر (۱×) شست‌وشو داده شده و به مدت یک ساعت در محلول تانل (تهیه‌شده طبق توصیه شرکت سازنده) انکوبه شدند. پس از تکرار فرایند شست‌وشو، اسلایدهای بافتی با POD (۳۰ دقیقه) انکوبه و پس از آن با محلول DAB (۶۰ ثانیه) پوشانده شدند. متعاقباً، از رنگ هماتوکسیلین به‌منظور تفکیک رنگی هسته‌ها استفاده شد. در نهایت، شاخص آپوپتوتیک (۲۵) ارزیابی و بین گروه‌ها مقایسه شد.

استخراج mRNA سنتز cDNA و qRT-PCR

محتوای mRNA تام نمونه‌ها با استفاده از روش مبتنی بر محلول ترايزول استخراج شد و غلظت و کیفیت mRNA استخراج شده در ۲۶۰ نانومتر و ۲۶۰/۲۸۰=۱/۸-۲/۰ تجزیه و تحلیل شد. محتوای mRNA کل (۱ میکروگرم) برای سنتز cDNA در مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱ میکرولیتر اولیگو (dT) آغازگر، ۴ میکرولیتر بافر واکنش ۵×، ۱ میکرولیتر بازدارنده RNase، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار) استفاده شد. ۱ میکرولیتر M-MuLV Reverse Transcriptase و RNA تثبیت‌شده با آب مقطر) استفاده شد. برای اجرای واکنش PCR، الگوهای cDNA (مخلوط ۰/۵ میکرولیتر حاوی ۵-۱۰ نانوگرم cDNA)، X SYBR GREEN Master Mix (۱۰ میکرولیتر؛ High ROX، نوآوران طب بین‌الملل، ایران)، ۰/۶ میکرو لیتر پرایمر معکوس و ۰/۶ پرایمر پیشرو هر ژن مورد نظر مخلوط شدند (حجم مخلوط ۲۰ میکرو لیتر در نظر گرفته شد). شرایط PCR برای مراحل دناتوراسیون (یک سیکل)، اتصال و طولی شدن (۴۵ سیکل) به ترتیب ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۶۰۰ ثانیه)، ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۲۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه) تنظیم شد. در نهایت، یک سیکل (۶۰۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) برای طولی

شدن در نظر گرفته شد. توالی پرایمرها در جدول ۲ ارائه شده است. هر نمونه سه تکرار داشت و آنالیز با مقادیر سیکل آستانه GAPDH (CT) نرمال شد (۲۶). در نهایت، تغییر بیان ژنی با معادله $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ محاسبه شد.

جدول ۲. توالی پرایمرها، دمای اتصال و اندازه محصولات

نام	پرایمر	اندازه (bp) و دمای اتصال (AT)
Bax	Forward: TGGCGATGAACTGGACAACAAC	AT : 56
	Reverse: CCCGAAGTAGGAAAGGAGGC	bp: 301
BCL-2	Forward: CTGGTGGACAACATCGCTCTG	AT: 56
	Reverse: GGTCTGCTGACCTCACTTGTG	bp: 228
Caspase-3	Forward: GTGGAAGTACGATGATATGGC	AT : 53
	Reverse: CGCAAAGTGATGGATGAACC	bp: 135
GAPDH	Forward: AAGGTCATCCATGACAACCTT	AT : 58
	Reverse: GGCCATCCACAGTCTTCTGG	bp: 20

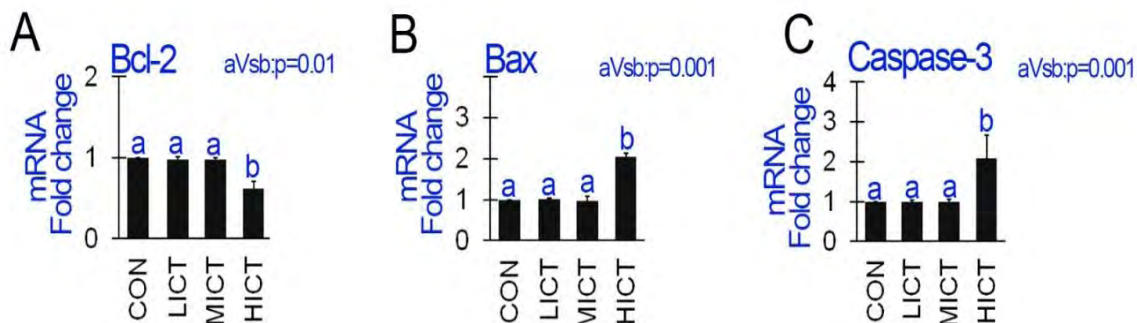
روش‌های تصویربرداری و آماری

برای ارائه تصاویر، از نرم‌افزار Adobe Photoshop CC (نسخه ۲۰۱۸) استفاده شد. تصاویر بافتی به کمک میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین SONY (Cyber-Shot, Zeiss) تهیه شدند. برای بررسی توزیع طبیعی داده‌ها و همگنی واریانس‌ها از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف و آزمون لون استفاده شد. تمام نتایج کمی به کمک نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۱,۰۰، کالیفرنیا، ایالات متحده) با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شد. در نهایت ($P < 0.05$) برای تفاوت‌های آماری معنادار در نظر گرفته شد و همه داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شدند.

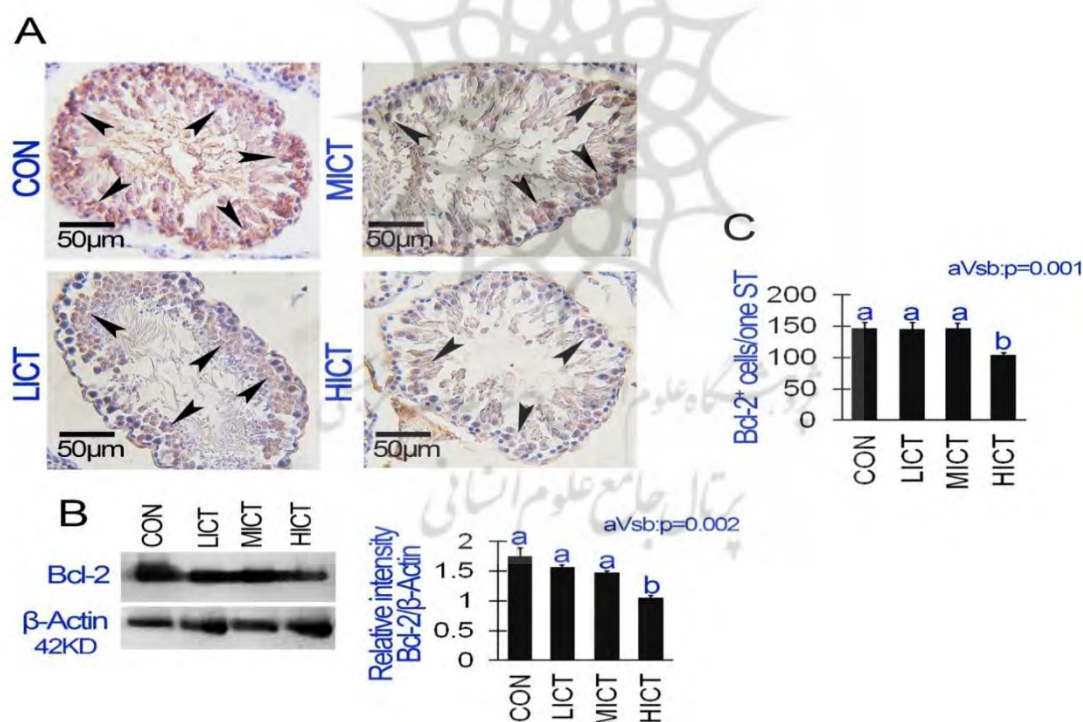
یافته‌های پژوهش

تغییرات مربوط به بیان mRNA و پروتئین Bcl-2 در بافت بیضه متعاقب تمرینات ورزشی

به منظور بررسی تأثیر تمرینات ورزشی با شدت متفاوت بر میزان بیان Bcl-2 در بافت بیضه مقادیر بیان mRNA و پروتئین Bcl-2 به کمک تکنیک‌های PCR کمی، ایمنو‌هیستوشیمی و وسترن بلات ارزیابی شد. در همین زمینه مقادیر mRNA Bcl-2 در بافت بیضه متعاقب تمرینات ورزشی با شدت کم و متوسط در مقایسه با گروه کنترل تغییر زیادی را نشان نداد ($P > 0.05$). این در حالی است که میزان mRNA Bcl-2 در گروه تمرین ورزشی با شدت بالا در مقایسه با گروه کنترل در سطح معناداری کاهش یافته بود ($P < 0.05$). مشابه با یافته‌های مربوط به تغییرات mRNA، میزان بیان پروتئین Bcl-2 در گروه‌های تمرینات ورزشی با شدت کم و متوسط در مقایسه با گروه کنترل تغییر معناداری را نشان نداد. در ارزیابی ایمنو‌هیستوشیمی نیز یافته‌های مشابه ملاحظه گردید. به طوری که تعداد سلول‌های بیان‌کننده پروتئین Bcl-2 در مقاطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های تمرینات ورزشی با شدت کم و متوسط در مقایسه با گروه کنترل نیز تغییر محسوسی را نشان نداد ($P > 0.05$). این در حالی است که هم تعداد سلول‌های بیان‌کننده پروتئین Bcl-2 و هم مقادیر این پروتئین در ارزیابی وسترن بلات در گروه تمرین ورزشی با شدت بالا در مقایسه با سایر گروه‌های تجربی و گروه کنترل در سطح معناداری ($P < 0.05$) کاهش نشان داد (شکل‌های ۱ و ۲).



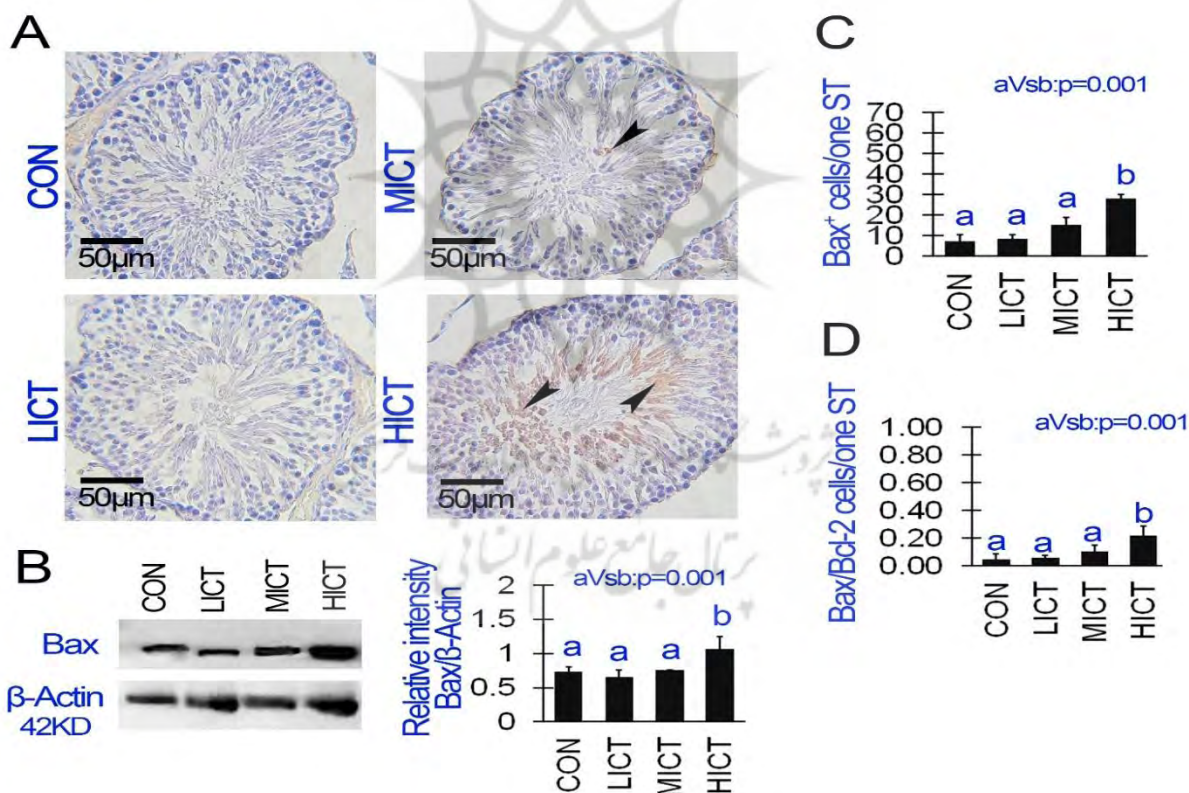
شکل ۱. تغییرات مربوط به بیان mRNA *Bcl-2* (A)، *Bax* (B) و کاسپاز-۳ (C) در گروه‌های مختلف پس از هشت هفته تمرین *LICT* و *HICT*. تمامی داده‌ها براساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند و حروف نامشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنادار ($P < 0.05$) بین گروه‌هاست. *LICT*: تمرین تداومی با شدت کم، *MICT*: تمرین تداومی با شدت متوسط، *HICT*: تمرین تداومی با شدت بالا.



شکل ۲. تغییرات مربوط به پروتئین *Bcl-2* در گروه‌های مختلف: (A) رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی پروتئین *Bcl-2* که واکنش‌های مثبت *Bcl-2* با نوک پیکان نمایش داده شده‌اند. بیان پروتئین *Bcl-2* در گروه تمرین ورزشی *HICT* در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش واضحی را نشان می‌دهد، (B) تصویر وسترن بلات مربوط به نوارهای نشان‌دهنده بیان پروتئین *Bcl-2* و β -Actin به همراه نمودار تغییر بیان این پروتئین در برابر β -Actin در گروه‌های مختلف و (C) تعداد سلول‌های *Bcl-2*⁺ به ازای یک لوله اسپرم‌ساز در گروه‌های مختلف پس از ۸ هفته تمرین *LICT*، *MICT* و *HICT*. تمامی داده‌ها براساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند و حروف نامشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنادار ($p < 0.05$) بین گروه‌هاست. *LICT*: تمرین تداومی با شدت کم، *MICT*: تمرین تداومی با شدت متوسط، *HICT*: تمرین تداومی با شدت بالا.

تغییرات مربوط به بیان mRNA و پروتئین Bax در بافت بیضه متعاقب تمرینات ورزشی

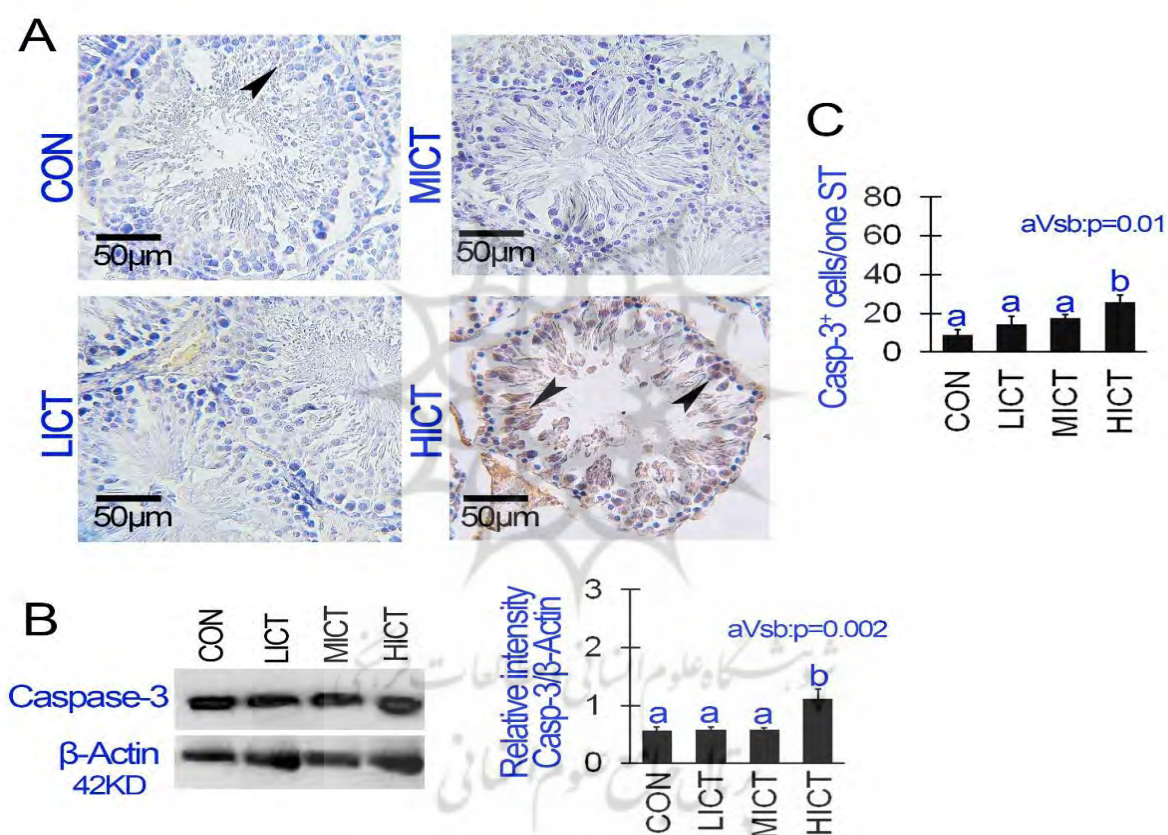
به منظور بررسی تأثیر تمرینات ورزشی با شدت متفاوت بر میزان بیان Bax در بافت بیضه مقادیر بیان mRNA و پروتئین Bax به کمک تکنیک‌های PCR کمی، ایمنوهیستوشیمی و وسترن بلات ارزیابی شد. مقادیر بیان mRNA Bax در گروه‌های تمرینات ورزشی با شدت کم و متوسط در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان نداد ($P > 0.05$). این در حالی است که بیان mRNA Bax در گروه با تمرین ورزشی شدت بالا در مقایسه با گروه‌های تمرینی با شدت کم و متوسط و همچنین گروه کنترل در سطح معناداری ($P < 0.05$) افزایش یافته بود. در ادامه، بررسی ایمنوهیستوشیمی نشان داد که تعداد سلول‌های زیای بیان‌کننده پروتئین Bax در گروه‌های تمرینی با شدت کم و متوسط در مقایسه با گروه کنترل تغییر قابل توجهی نداشته است. این در حالی است که در گروه تمرین ورزشی با شدت بالا تعداد سلول‌های بیان‌کننده پروتئین Bax در مقایسه با سایر گروه‌های تمرین ورزشی و گروه کنترل در سطح معناداری ($P < 0.05$) افزایش یافته است. در نهایت در ارزیابی وسترن بلات نیز گروه تمرین ورزشی با شدت بالا در مقایسه با گروه‌های تمرین ورزشی با شدت کم و متوسط و همچنین گروه کنترل افزایش چشمگیری را در بیان پروتئین Bax نشان داد (شکل‌های ۱ و ۳).



شکل ۳. تغییرات مربوط به پروتئین Bax در گروه‌های مختلف: (A) رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی پروتئین Bax که واکنش‌های مثبت Bax با نوک پیکان نمایش داده شده‌اند. بیان پروتئین Bax در گروه تمرین ورزشی HICT در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش واضحی را نشان می‌دهد، (B) تصویر وسترن بلات مربوط به نوارهای نشان‌دهنده بیان پروتئین Bax و β-Actin به همراه نمودار تغییر بیان این پروتئین در برابر β-Actin در گروه‌های مختلف، (C) تعداد سلول‌های Bax⁺ به ازای یک لوله‌ی اسپرم‌ساز در گروه‌های مختلف و (D) نسبت Bax به Bcl-2 در گروه‌های مختلف پس از هشت هفته تمرین LICT، MICT و HICT. تمامی داده‌ها براساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند و حروف نامشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنادار ($P < 0.05$) بین گروه‌هاست. LICT: تمرین تداومی با شدت کم، MICT: تمرین تداومی با شدت متوسط، HICT: تمرین تداومی با شدت بالا.

تغییرات مربوط به mRNA و پروتئین کاسپاز-۳ متعاقب تمرینات ورزشی

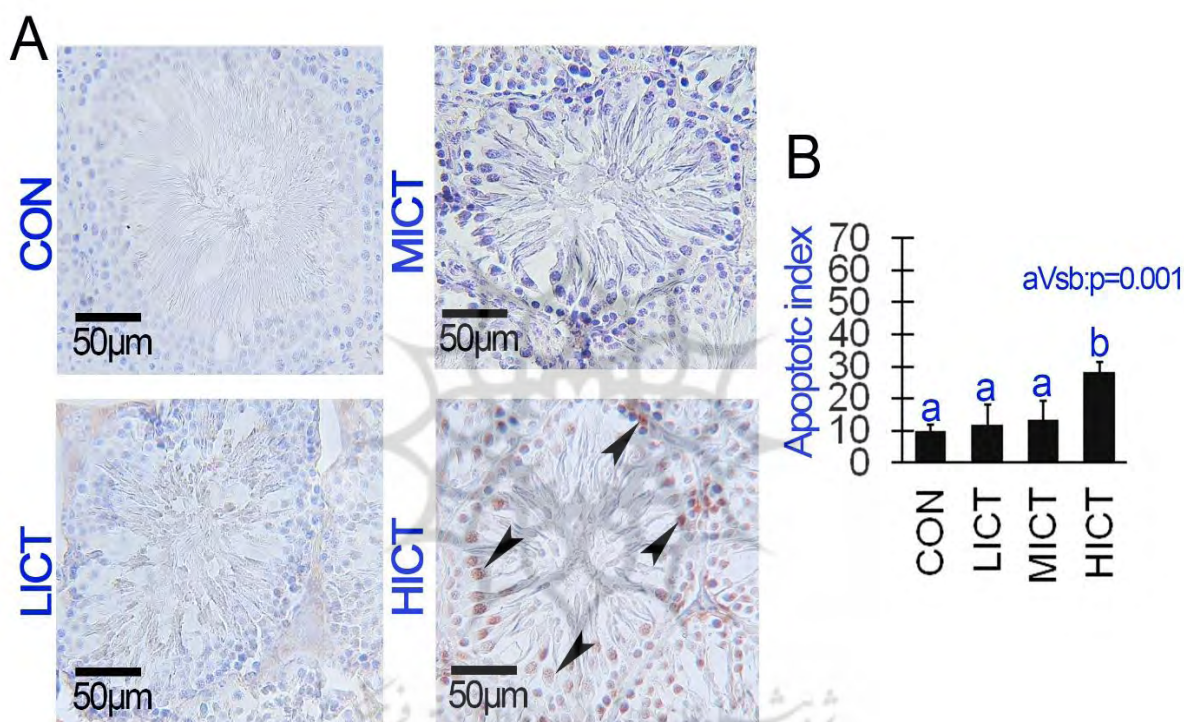
مشابه با پروتئین‌های یادشده، میزان بیان mRNA و پروتئین کاسپاز-۳ در گروه‌های مختلف ارزیابی و مقایسه شد. مشاهدات نشان داد که بیان mRNA و پروتئین کاسپاز-۳ در گروه‌های تمرین ورزشی با شدت کم و متوسط در مقایسه با گروه کنترل تغییر محسوسی ($P < 0.05$) نداشته است. این در حالی است که میزان بیان mRNA و پروتئین کاسپاز-۳ در گروه تمرین ورزشی با شدت بالا در مقایسه با گروه‌های تمرینی دیگر و همچنین گروه کنترل در سطح معناداری ($P < 0.05$) افزایش یافته بود (شکل‌های ۱ و ۴).



شکل ۴. تغییرات مربوط به پروتئین کاسپاز-۳ در گروه‌های مختلف: (A) رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی پروتئین کاسپاز-۳ که واکنش‌های مثبت کاسپاز-۳ با نوک پیکان نمایش داده شده‌اند. بیان پروتئین کاسپاز-۳ در گروه تمرین ورزشی HICT در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش واضحی را نشان می‌دهد، (B) تصویر وسترن بلات مربوط به نوارهای نشان دهنده بیان پروتئین کاسپاز-۳ و β -Actin به همراه نمودار تغییر بیان این پروتئین در برابر β -Actin در گروه‌های مختلف و (C) تعداد سلول‌های کاسپاز-۳ مثبت به ازای یک لوله اسپرم‌ساز در گروه‌های مختلف پس از هشت هفته تمرین LICT، MICT و HICT. تمامی داده‌ها بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند و حروف نامشابه بیانگر وجود تفاوت معنادار ($P < 0.05$) بین گروه‌هاست. LICT: تمرین تداومی با شدت کم، MICT: تمرین تداومی با شدت متوسط، HICT: تمرین تداومی با شدت بالا.

تغییرات مربوط به شاخص آپوپتوز در بافت بیضه متعاقب تمرینات ورزشی با شدت متفاوت

به منظور بررسی تأثیر نهایی تغییرات القاشده در بیان پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ در بافت بیضه، میزان و شدت آپوپتوز با بررسی شاخص آپوپتوزی ارزیابی شد. مشاهدات نشان داد که شاخص آپوپتوزی در بافت بیضه گروه‌های تمرینی ورزشی با شدت کم و متوسط در مقایسه با گروه کنترل تغییر زیادی را نشان نداد ($P > 0.05$). این در حالی بود که این میزان در گروه تمرین ورزشی با شدت بالا در مقایسه با سایر گروه‌های تجربی و گروه کنترل در سطح معناداری افزایش ($P < 0.05$) یافته بود (شکل ۵).



شکل ۵. (A) رنگ‌آمیزی تانل به منظور نمایش سلول‌های زایای آپوپتوتیک در لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های مختلف که با نوک پیکان نمایش داده شده‌اند. تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه تمرین ورزشی HICT در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد، (B) میانگین تغییرات مربوط به شاخص آپوپتوتیک در گروه‌های مختلف پس از هشت هفته تمرین LICT، MICT و HICT. تمامی داده‌ها براساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند و حروف نامشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنادار ($P < 0.05$) بین گروه‌هاست. LICT: تمرین تداومی با شدت کم، MICT: تمرین تداومی با شدت متوسط، HICT: تمرین تداومی با شدت بالا.

بحث و نتیجه‌گیری

با اینکه تمام زوایای ناباروری مردان هنوز کاملاً شناخته نشده، یکی از سازوکارهای اصلی بروز ناباروری در مردان ایجاد استرس اکسیداتیو و متعاقباً حذف سلول‌های زایا توسط فرایند آپوپتوز گزارش شده است (۷، ۲۷). استرس اکسیداتیو حاصل تولید بیش از حد گونه‌های اکسایشی اکسیژن (ROS) یا ناتوانی دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت‌های مختلف بدن است. علاوه بر این، استرس اکسیداتیو با افزایش آسیب به DNA سلول‌های زایا، اسپرم و همچنین پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلولی ارتباط مستقیم دارد (۷، ۲۸). در این میان، فعالیت ورزشی نوعی استرس فیزیولوژیکی است که بر تعداد زیادی از عوامل رشدی، هورمون‌ها، سایتوکاین‌ها و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر دارد (۲۹). بدیهی است که اثر فعالیت‌ها و تمرینات ورزشی بر این عوامل می‌تواند روند مرگ سلولی و

اختلال در حذف بقایای سلول را به همراه داشته باشد. بنابراین سازوکارهای سلولی آپوپتوز ناشی از فعالیت یا تمرینات ورزشی در سطح قابل توجهی به شدت و مدت فعالیت ورزشی وابسته است که این دو مؤلفه به طور مستقل یا همزمان بر تعادل بین عوامل درون سلولی القاکننده و مهارکننده آپوپتوز اثر می‌گذارند (۲۹). از این رو در تحقیق حاضر سعی شده است تأثیر تمرینات ورزشی تداومی با شدت کم (LICT)، متوسط (MICT) و زیاد (HICT) بر بیان ژن و پروتئین‌های دخیل در فرایند آپوپتوز با مسیر داخلی (وابسته به میتوکندری) با استفاده از مدل موشی، ارزیابی و بررسی شود.

یکی از یافته‌های تحقیق حاضر، افزایش بیان ژنی و مقادیر پروتئین Bax، کاسپاز-۳ و کاهش بیان ژنی و مقادیر پروتئین Bcl-2 و همچنین نسبت بالای Bax به Bcl-2 بعد از تمرین HICT در بافت بیضه بود. این در حالی بود که تمرینات ورزشی LICT و MICT چنین الگویی را نشان ندادند. اگرچه تحقیقات در مورد تأثیر فعالیت ورزشی بر سازوکارهای آپوپتوزی بافت بیضه بسیار محدود است و در بیشتر مطالعات به بررسی بافت‌های دیگر پرداخته شده است، این مهم با توجه به یافته‌های یادشده نشان می‌دهد که تمرینات ورزشی با شدت بالا می‌توانند تأثیرات مشابهی را در بافت بیضه نیز ایجاد کنند. این یافته با مطالعات یزدان پرست و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت دارد (۳۰)، چراکه یزدان پرست و همکاران افزایش پروتئین Bax را پس از فعالیت ورزشی شدید در بافت قلب موش‌های صحرائی پیر گزارش کردند.

فرایند آپوپتوز سلولی در مسیر داخلی توسط برخی پروتئین‌های میتوکندریایی شامل پروتئین‌های ضدآپوپتوز (Bcl-2) و القاکننده آپوپتوز (Bax) تنظیم می‌شود (۳۰). به طور کلی، عواملی که بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوز و نسبت بیان پروتئین Bcl-2 به ازای Bax را افزایش می‌دهند، به عنوان عوامل بازدارنده آپوپتوز وابسته به میتوکندری در نظر گرفته می‌شود (۳۰). در همین زمینه چندین فرضیه برای توضیح تأثیرات مضر فعالیت ورزشی شدید بر بافت بیضه بیان شده است. یکی از این فرضیه‌ها، تأثیر آسیب‌زای استرس اکسیداتیو ناشی از فعالیت ورزشی است (۳۱-۳۴). طی سال‌های اخیر مشخص شده است که ROS در ایجاد بخش عمده‌ای از انواع مختلف ناباروری مردان نقش بسزایی دارد و عامل آن تولید بیش‌ازحد گونه‌های اکسایشی اکسیژن یا کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی دستگاه تناسلی نر و محتوای اسپرمی است (۹). فعالیت ورزشی شدید، موجب افزایش تولید ROS در بافت بیضه و در نهایت استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۵، ۳۶). این در حالی است که همانند سایر بافت‌های بدن، استرس اکسیداتیو سازگاری آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه را نیز دچار اختلال می‌کند (۳۶، ۳۷). نکته شایان توجه اینکه استرس اکسیداتیو از عوامل بروز آپوپتوز با مسیر داخلی نیز به حساب می‌آید. ایجاد آسیب در DNA از طریق استرس اکسیداتیو موجب تسریع و تحریک روند آپوپتوز می‌شود (۳۸). در خصوص این موضوع، افزایش تولید گونه‌های اکسایشی اکسیژن ناشی از فعالیت‌های ورزشی شدید را می‌توان به افزایش مصرف اکسیژن ربط داد، زیرا هنگام فعالیت ورزشی با شدت بالا به دلیل افزایش انقباضات عضلانی، اکسیژن‌رسانی به سایر بافت‌ها کاهش می‌یابد، در نتیجه تخلیه با تأخیر گونه‌های فعال اکسیژن را در پی خواهد داشت که می‌تواند به القای آغاز فرایند آپوپتوز منجر شود (۳۸، ۳۹). علاوه بر این، افزایش مقادیر کنترل‌نشده ROS می‌تواند از طریق سرکوب سیستم آنتی‌اکسیدانی ساختار محتوای پروتئینی و DNA سلول را دچار آسیب کند (۴۰). در کنار این موضوع، این احتمال افزایش می‌یابد که مقادیر بالای ROS متعاقب تمرین ورزشی با شدت بالا از طریق پراکسیداسیون لیپیدی غشای میتوکندری، نفوذپذیری غشا را افزایش دهد و رهاسازی سیتوکروم c را از درون میتوکندری به سیتوپلاسم سلول القا کند. این نکته به خوبی مشخص شده است که سیتوکروم c می‌تواند به نوبه خود با فعال کردن آبشار کاسپازی سبب القای مسیر میتوکندریایی آپوپتوز شود (۴۱). با توجه به افزایش بیان ژن‌های مرتبط با هایپوکسی متعاقب تمرین ورزشی با شدت بالا احتمال آغاز و تشدید فرایند آپوپتوز در بافت‌ها بالا می‌رود (۴۲)، چراکه در پاسخ به شرایط هایپوکسی، آبشار کاسپازی القا شده و کاسپاز-۹ به طور مستقیم موجب فعال شدن کاسپاز-۳ و ۱۲ می‌شود (۴۳، ۴۴) که در نهایت می‌توانند فرایند آپوپتوز القا شده را به اتمام برسانند (۴۵). با توجه به اینکه هایپوکسی یکی از سازوکارهای محرک آپوپتوز است، احتمالاً این فرایند در بافت بیضه موش‌های گروه HICT از طریق افزایش رادیکال‌های آزاد موجب افزایش

پروتئین‌های القاکننده آپوپتوز شده است. از فرضیات دیگر که می‌توان به آن اشاره کرد، تأثیرات مضر تمرین HICT در القای کمبود ریبوز است که به نوبه خود عملکرد بیضه را دچار اختلال می‌کند. کاهش سطح ریبوز در بیضه موش‌ها با نشان دادن کاهش گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز (G6PDH) تأیید شده است که کمبود آن می‌تواند در سطح قابل ملاحظه‌ای توان آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه را کاهش دهد (۳۴). در همین زمینه پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تجویز ریبوز خوراکی در موش‌های صحرایی ویستار، توان آنتی‌اکسیدانی، سطح سرمی تستوسترون و LH را افزایش داده است (۳۴، ۵). در نهایت اینکه، کاهش پروتئین شوک حرارتی -۷۰ (HSP-70) متعاقب تمرین HICT می‌تواند در سطح قابل توجهی در روند اسپرماتوژنز و القای نابرابوری به واسطه القای آپوپتوز مؤثر باشد (۴۶، ۴۷). آنچه به‌عنوان یافته اصلی تحقیق حاضر می‌تواند در نظر گرفته شود، این است که تمرین HICT، با وجود موارد یادشده، بیان فاکتورهای القاکننده آپوپتوز میتوکندریایی (Bax و کاسپاز ۳) را افزایش و بیان فاکتورهای ضدآپوپتوزی (Bcl-2) را کاهش می‌دهد که به نوبه خود می‌تواند سبب افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در بافت بیضه شود.

از یافته‌های دیگر تحقیق حاضر می‌توان به افزایش بیان ژنی، و مقدار پروتئین Bcl-2 و نسبت Bcl-2 به Bax و کاهش بیان ژنی، و مقدار پروتئین Bax و کاسپاز ۳ پس از تمرینات LICT و MICT در بافت بیضه اشاره کرد. ساتانا و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که ۱۳ هفته تمرین ورزشی هوازی موجب افزایش پروتئین‌های ضدآپوپتوزی می‌شود (۴۸). صمدیان و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که فعالیت ورزشی با شدت متوسط (MICT) موجب افزایش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوزی (Bcl-2) و کاهش بیان پروتئین‌های القاکننده آپوپتوز (Bax و کاسپاز ۳) در بافت بیضه موش‌های دیابتی می‌شود (۴۹). مارکز و همکاران (۲۰۱۵) پس از ۱۲ هفته تمرین هوازی روی تردمیل کاهش آپوپتوز را در قشر مغز مشاهده کردند (۵۰). نتایج پژوهش حاضر، با نتایج تحقیق قبلی همخوانی مناسبی دارد. از یافته‌های حاضر می‌توان نتیجه گرفت که تمرین LICT و MICT تأثیر چشمگیری در بیان پروتئین‌های ضد و القاکننده آپوپتوزی ندارند. انجام تمرینات ورزشی با شدت متوسط می‌تواند موجب افزایش بایوژنز میتوکندریایی، افزایش پروتئین‌های ضدآپوپتوزی درون سلولی مانند نیتریک اکساید (NO)، پروتئین تنظیم‌شده توسط گلوکز (GRP78)، اینترلوکین -۸ و افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها شود (۵۱، ۵۲). تمرین ورزشی با افزایش سطوح Bcl-2 موجب هموآلیگومریزه شدن آن و کاهش نفوذپذیری غشای خارج میتوکندری می‌شود و در نتیجه رهاسازی سیتوکروم C، Smac/DIABLO و کاسپازها را ممانعت می‌کند (۵۳). همچنین تحقیقات در مورد کاسپاز ۳- نشان داده است که پنج هفته تمرینات شنا موجب کاهش بیان و فعالیت کاسپاز ۳- در قلب موش‌های نر ویستار سالم می‌شود (۵۴). لو و همکاران (۲۰۱۷) طی پژوهشی روی موش‌های صحرایی، نشان دادند که هفت هفته تمرینات شنا، میزان فعالیت کاسپاز ۳- و Bax را کاهش و Bcl-2 را افزایش می‌دهد (۵۵). از طرفی کولومبو و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که پنج هفته تمرینات هوازی موجب افزایش غیرمعتادار کاسپاز ۳-، pAkt و کاهش غیرمعتادار Bax/Bcl-2 می‌شود (۵۶). از دلایل تفاوت این تحقیق با پژوهش‌های همسو با تحقیق حاضر می‌توان به مدت و شدت پروتکل تمرینی اشاره کرد. از سازوکارهای احتمالی که سبب شده است تا نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق کولومبو همسو نباشد، می‌توان به افزایش سطوح XIAP (مهارکننده قوی کاسپاز ۳-) و افزایش سطوح Smac (مهارکننده XIAP) در تحقیق کولومبو اشاره کرد (۵۷). شایان ذکر است که رابطه بالقوه دیگری بین استرس اکسایشی و آپوپتوز، در کنترل کاسپازها وجود دارد. کنترل کاسپاز ۳- فرایند پیچیده‌ای است و چندین مسیر پیام‌رسانی آپوپتوزی را در برمی‌گیرد. مشخص شده است که کاسپاز ۳- به‌وسیله فعال شدن کاسپاز ۱۲- از طریق مسیر آزادسازی کلسیم یا به‌وسیله فعال شدن کاسپاز ۹- در مسیر داخلی یا با افزایش TNF- α در مسیر خارجی فعال و نقش آفرینی می‌کند (۵۸). از طرفی، فعالیت کاسپاز ۳- پس از تمرینات ورزشی ممکن است برای سایر اعمال سلولی، مانند تغییر حالت ناشی از فعالیت ورزشی و تفکیک سلول‌های ماهواره‌ای مورد نیاز باشد (۵۹) و با توجه به بررسی ما پژوهشی در این زمینه انجام نگرفته است. در مجموع، با توجه به کمبود تحقیقات در زمینه تأثیر انواع مختلف فعالیت‌های ورزشی در بافت بیضه پیشنهاد

می‌شود که برای رسیدن به جمع‌بندی کلی، تمامی فاکتورهای سلولی دخیل در مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز و ارتباط متقابل این مسیر با مسیرهای اتوفازی، التهاب و استرس اکسیداتیو بررسی شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر، تمرین ورزشی با شدت بالا قادر است با سازوکارهای مختلف در بافت بیضه، بیان پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 را کاهش و در مقابل بیان پروتئین‌های القاکننده آپوپتوز با مسیر میتوکندریایی مانند Bax را افزایش دهد. در نتیجه بیان بیش‌ازحد فیزیولوژیک پروتئین Bax و در مقابل کاهش بیان پروتئین Bcl-2، خروج سیتوکروم c از میتوکندری به درون سیتوپلاسم اتفاق می‌افتد که به نوبه خود قادر است تا با تحریک بیان پروتئین کاسپاز ۳ فرایند آپوپتوز را تحریک کند. این در حالی است که تمرینات ورزشی LICT و MICT با القای توازن در بیان پروتئین‌های مهارکننده و تحریک‌کننده آپوپتوز با مسیر داخلی، روند اسپرماتوژنز طبیعی را دچار اختلال نمی‌کنند.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر برگرفته از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی دانشگاه ارومیه است. بدین‌وسیله از گروه فیزیولوژی ورزشی و حرکات اصلاحی دانشکده علوم ورزشی، و گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه برای حمایت‌های مالی و علمی، و از مجموعه تحقیقاتی رستا برای کمک‌های آزمایشگاهی و فنی در اجرای این پژوهش، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Treede R-D, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*. 2019;160(1):19-27.
2. Pai MO, Venkatesh S, Gupta P. The role of infections in infertility: A review. *International Journal of Academic Medicine*. 2020;6(3):189.
3. Ruggeri M, Cannas S, Cubeddu M, Mollicotti P, Piras GL, Dessole S, et al. Bacterial agents as a cause of infertility in humans. *New Microbiol*. 2016;39(3):206-9.
4. Turner KA, Rambhatla A, Schon S, Agarwal A, Krawetz SA, Dupree JM, et al. Male infertility is a women's health issue—research and clinical evaluation of male infertility is needed. *Cells*. 2020;9(4):990.
5. Hauser R, Paz G, Botchan A, Yogev L, Yavetz H. Varicocele and male infertility: part II: varicocele: effect on sperm functions. *Human reproduction update*. 2001;7(5):482-5.
6. Ribeiro AS, Deminice R, Schoenfeld BJ, Tomeleri CM, Padilha CS, Venturini D, et al. Effect of resistance training systems on oxidative stress in older women. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*. 2017;27(5):439-47.
7. Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2009;26(8):427-32.
8. Jacobs AL, Schär P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma*. 2012;121(1):1-20.
9. Fanaeei H, Azizi Y, Khayat S. The role of stress oxidative in infertility male. A review *Fasa Medical University Journal (FMUJ)*. 2014;2:93-103.
10. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology*. 2020;81:1133-43.

11. Garcia-Saez AJ. The BCL-2 family saga. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(10):564-5.
12. Allsopp TE, Wyatt S, Paterson HF, Davies AM. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell*. 1993;73(2):295-307.
13. Suleiman JB, Nna VU, Zakaria Z, Othman ZA, Eleazu CO, Bakar ABA, et al. Protective effects of bee bread on testicular oxidative stress, NF- κ B-mediated inflammation, apoptosis and lactate transport decline in obese male rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;131:110781.
14. Sadeghi F, Miri N, Barikani A, Hossein Rashidi B, Ghasemi Nejad A, Hojaji E, et al. Comparison of Food intake, physical activity and weight in infertile and healthy women aged 25-40 years. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*. 2015;18(173):32-40.
15. Chigurupati S, Son TG, Hyun D-H, Lathia JD, Mughal MR, Savell J, et al. Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice. *The Journal of endocrinology*. 2008;199(2):333.
16. Mirzaei M, Namiranian N, Bagheri-Fahraji B, Gholami S. Infertility and physical activity: A cross-sectional study of women living in Yazd aged 20-49 yr, 2014-2015. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 2020;18(9):795.
17. West DW, Phillips SM. Associations of exercise-induced hormone profiles and gains in strength and hypertrophy in a large cohort after weight training. *European journal of applied physiology*. 2012;112(7):2693-702.
18. Yi X, Tang D, Cao S, Li T, Gao H, Ma T, et al. Effect of different exercise loads on testicular oxidative stress and reproductive function in obese male mice. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020;2020.
19. Brown DA, Johnson MS, Armstrong CJ, Lynch JM, Caruso NM, Ehlers LB, et al. Short-term treadmill running in the rat: what kind of stressor is it? *Journal of applied physiology*. 2007;103(6):1979-85.
20. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2007;14(6):753-60.
21. Azar JT, Maleki AH, Moshari S, Razi M. The effect of different types of exercise training on diet-induced obesity in rats, cross-talk between cell cycle proteins and apoptosis in testis. *Gene*. 2020;754:144850.
22. Kim D-H, Kim S-H, Kim W-H, Moon C-R. The effects of treadmill exercise on expression of UCP-2 of brown adipose tissue and TNF- α of soleus muscle in obese Zucker rats. *Journal of exercise nutrition & biochemistry*. 2013;17(4):199.
23. Wang R, Tian H, Guo D, Tian Q, Yao T, Kong X. Impacts of exercise intervention on various diseases in rats. *Journal of sport and health science*. 2020;9(3):211-27.
24. Zhao Y, Tan Y, Dai J, Li B, Guo L, Cui J, et al. Exacerbation of diabetes-induced testicular apoptosis by zinc deficiency is most likely associated with oxidative stress, p38 MAPK activation, and p53 activation in mice. *Toxicology letters*. 2011;200(1-2):100-6.
25. Minas A, Najafi G, Jalali AS, Razi M. Fennel induces cytotoxic effects against testicular germ cells in mice; evidences for suppressed pre-implantation embryo development. *Environmental toxicology*. 2018;33(8):841-50.
26. Salmani S, Razi M, Sarrafzadeh-Rezaei F, Mahmoudian A. Testosterone amplifies HSP70-2a, HSP90 and PCNA expression in experimental varicocele condition: Implication for DNA fragmentation. *Reproductive Biology*. 2020;20(3):384-95.
27. Khosrowbaki A. The role of oxidative stress in male infertility: A review. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2013;15(9):94-103.
28. Khoshtabiat L, Mahdavi M. The role of oxidative stress in proliferation and cell death. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2015;25(127):130-45.

29. Mooren FC, Krüger K. Exercise, autophagy, and apoptosis. *Progress in molecular biology and translational science*. 2015;135:407-22.
30. Yazdanparast Chaharmahali B, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi Arkhazloo P. The Effect of Moderate and High Intensity Interval Trainings on Cardiac Apoptosis in the Old Female Rats. *Report of Health Care*. 2018;4(1):26-35.
31. Manna I, Jana K, Samanta P. Effect of intensive exercise-induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders in mature male Wistar strain rats: a correlative approach to oxidative stress. *Acta physiologica scandinavica*. 2003;178(1):33-40.
32. Manna I, Jana K, Samanta P. Effect of different intensities of swimming exercise on testicular oxidative stress and reproductive dysfunction in mature male albino Wistar rats. 2004.
33. Jana K, Samanta PK, Manna I, Ghosh P, Singh N, Khetan RP, et al. Protective effect of sodium selenite and zinc sulfate on intensive swimming-induced testicular gamatogenic and steroidogenic disorders in mature male rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2008;33(5):903-14.
34. Chigrinskiy E, Conway V. Protective effect of D-ribose against inhibition of rats testes function at excessive exercise. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2011;7(3).
35. Quadrilatero J, Hoffman-Goetz L. N-Acetyl-L-cysteine prevents exercise-induced intestinal lymphocyte apoptosis by maintaining intracellular glutathione levels and reducing mitochondrial membrane depolarization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;319(3):894-901.
36. Nieman DC. Exercise, infection, and immunity. *International journal of sports medicine*. 1994;15(S 3):S131-S41.
37. Simpson RJ, Lowder TW, Spielmann G, Bigley AB, LaVoy EC, Kunz H. Exercise and the aging immune system. *Ageing research reviews*. 2012;11(3):404-20.
38. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57.
39. Li NC, Wei XX, Hu YL, Hou X, Xu H. Aerobic exercise blocks interleukin-6 levels and germ cell apoptosis in obese rats. *Andrologia*. 2018;50(2):e12880.
40. Navalta J, Sedlock D, Park K-S. Effect of exercise intensity on exercise-induced lymphocyte apoptosis. *International journal of sports medicine*. 2007;28(06):539-42.
41. Delchev SD, Georgieva KN, Koeva YA, Atanassova PK. Bcl-2/Bax ratio, mitochondrial membranes and aerobic enzyme activity in cardiomyocytes of rats after submaximal training. *Folia medica*. 2006;48(2):50-6.
42. Greijer A, Van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology*. 2004;57(10):1009-14.
43. Sari-Sarraf V, Amirsasan R, Sheikholeslami-Vatani D, Faraji H. Effect of creatine supplementation on the factors involved in apoptosis-related process (Bax, Bcl-2) and their ratio (Bcl-2/Bax) during acute resistance exercise in middle-aged men. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 2016;21(4):17-28.
44. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis: cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(37):34287-94.
45. Young S, Marshall R, Hill R. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988;85(24):9533-7.
46. Koeva Y, Delchev S, Georgieva K, Atanassova P, editors. Heat Shock protein-70 expression in testis following endurance training of rats. *Proceedings of the Balkan scientific conference of biology, Plovdiv, Bulgaria*; 2005.
47. Feng HL, Sandlow JI, Sparks AE. Decreased expression of the heat shock protein hsp70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. *Fertility and sterility*. 2001;76(6):1136-9.

48. Santana ET, Serra AJ, Silva JA, Bocalini DS, Barauna VG, Krieger JE, et al. Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. *Motriz: Revista de Educação Física*. 2014;20:233-8.
49. Samadian Z, Azar JT, Moshari S, Razi M, Tofighi A. Moderate-intensity exercise training in sole and simultaneous forms with insulin ameliorates the experimental type 1 diabetes-induced intrinsic apoptosis in testicular tissue. *International journal of sports medicine*. 2019;40(14):909-20.
50. Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Balca M, Rizo-Roca D, Moreira P, Oliveira P, et al. Physical exercise improves brain cortex and cerebellum mitochondrial bioenergetics and alters apoptotic, dynamic and auto (mito) phagy markers. *Neuroscience*. 2015;301:480-95.
51. Majidi A, Poozesh Jadidi R, Azali Alamdari K, Bashiri J, Nourazar MAR. Effects of Aerobic Training and Curcumin Supplementation on Cardiomyocyte Apoptosis and MiRNAs Expression in Rats Exposed to Arsenic. *Sport Physiology*. 2020;12(48):39-60.
52. Yoo S-Z, No M-H, Heo J-W, Chang E, Park D-H, Kang J-H, et al. Effects of a single bout of exercise on mitochondria-mediated apoptotic signaling in rat cardiac and skeletal muscles. *Journal of exercise rehabilitation*. 2019;15(4):512.
53. Oláh A, Németh BT, Mátyás C, Horváth EM, Hidi L, Birtalan E, et al. Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model. *International journal of cardiology*. 2015;182:258-66.
54. Hasani S, Habibian M. The effect of regular high-intensity interval exercise on some apoptotic factors in the brain tissue of old female rats. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*. 2018;22(2):128-33.
- 55.. !!! INVALID CITATION !!!
56. Colombo R, Siqueira R, Conzatti A, Fernandes TRG, Tavares AMV, da Rosa Araújo AS, et al. Aerobic exercise promotes a decrease in right ventricle apoptotic proteins in experimental cor pulmonale. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2015;66(3):246-53.
57. Koçtürk S, Kayatekin B, Resmi H, Açıköz O, Kaynak C, Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solues muscle fibers in rats. *European journal of applied physiology*. 2008;102(5):515-24.
58. McMillan EM, Graham DA, Rush JW, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. *Journal of Applied Physiology*. 2012.
59. Liu W, He W, Li H. Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases Bcl-2/Bax ratio in rat skeletal muscle. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013;2013.