



اولین کنگره ملی رویکردهای نوآورانه در سیستم بیولوژی و داروسازی و صنایع غذایی

تهران، دی ۱۴۰۰

بررسی اثرات همزمانی انتی اکسیدان کورکومین و نانوذره Fe_3O_4 ، بر بیان ژنهای Bad و Bclx مسیر آپوپتوز میتوکندری در رت های مبتلا به ایسکمی بیضه

شب‌نم زرعی مرادی^۱، سید عبدالحمید انگ‌جی^۲، میترا صالحی^۳، مهرداد هاشمی^{۴،۵}.

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲. گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۴. گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فنون پیشرفته، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۵. مرکز تحقیقات علوم همگرایی پزشکی فرهیختگان، بیمارستان فرهیختگان، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[*mhashemi@iautmu.ac.ir](mailto:mhashemi@iautmu.ac.ir)

*Shabnam Zarei Moradi 1, Seyed Abdolhamid Angaji2, Mitra Salehi3, Mehrdad Hashemi4

1. Department of Genetics, Faculty of Biosciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
2. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Biosciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
4. Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Farhikhtegan Medical Convergence Sciences Research Center, Farhikhtegan Hospital Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Mehrdad Hashemi, Farhikhtegan Medical Convergence Sciences Research Center, *
Farhikhtegan Hospital Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email: mhashemi@iautmu.ac.ir,

Telephone number: +982122006664, +98 912 6037351

چکیده

زمینه و اهداف: پیچش یا ایسکمی/ریپرفیوژن بیضه (Ischemia/Reperfusion) یکی از جدی‌ترین موارد اورژانسی اورولوژی است که به طور کلی در مردان، نوجوانان و نوزادان شناسایی می‌شود. این امر باعث صدمه به بیضه می‌شود که در صورت تشخیص نادرست و درمان نامناسب منجر به ایجاد ناباروری در مردان می‌گردد. در مطالعه کنونی، اثرات کورکومین و نانوذره Fe_3O_4 بر میزان آپوپتوز و بیان ژنهای BAD، BCL-X مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها: ۴۸ رت بالغ با سن ۲۰ هفته و وزن ۲۵۰ گرم در دو گروه کنترل و ایسکمی/ریپرفیوژن (I/R) بیضه وارد مطالعه شدند. پس از القاء I/R بیضه در گروه آزمون، هر دو گروه با کورکومین و نانوذره آهن در دوز LD50 به مدت ۱۰ روز و به صورت زیرصفاقی تیمار شدند. سپس بیضه‌ها خارج گردیده و میزان زنده ماندی و آپوپتوز سلول‌ها با آزمون MTT و فلوسایتومتری ارزیابی گشته و بیان ژن‌های BAD و BCLX اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** افزایش آپوپتوز در سلول‌های بافت بیضه رت‌های دچار آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن مشاهده شد. مواجهه با نانوذره آهن، افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک BAD و کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوتیک BCLX را به همراه داشت. هم‌زمانی مصرف کورکومین و نانوذره آهن اثرات سوء نانوذره را جبران نمود. ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که تجویز همزمان نانوذره Fe_3O_4 همراه با کورکومین در کاهش آسیب‌های ناشی از پیچش بیضه به علت خصوصیات آنتی‌اکسیدانی مؤثر بوده و باعث کاهش نکروز می‌شود.

کلمات کلیدی: BAD، BCLX، پیچش بیضه، بیان ژن، آپوپتوز، نانوذره آهن

مقدمه

باروری به معنای توانایی برای ایجاد بارداری بالینی است (۱). در مقابل، اصطلاح ناباروری به ناتوانی یک زوج در باردار شدن پس از یک سال رابطه جنسی محافظت نشده اشاره دارد. پیچش یا تورشن/دتورشن بیضه یکی از جدی‌ترین موارد اورژانسی اورولوژی است که به طور کلی در مردان، نوجوانان و نوزادان شناسایی می‌شود (۲). این امر باعث صدمه به بیضه می‌شود که در صورت تشخیص نادرست و درمان نامناسب منجر به ایجاد ناباروری در مردان می‌شود. چرخش طناب اسپرماتیک و ساختارهای اسپرماتیک در اطراف خود منجر به تغییرات بیوشیمیایی، بافت شناسی و در نهایت، ایجاد اختلال عملکرد بیضه می‌شود. به دلیل پیچش بیضه، جریان خون در بافت‌های بیضه قطع شده و این وقفه منجر به ایسکمی شده که در طی آن فسفات‌های غنی از انرژی (ATP) تخلیه میشوند و سطح محصولات تخریب آنها مانند هیپوزانتین افزایش می‌یابد (۳). بدنبال دتورشن بیضه، بافتها مجدداً تحت جریان خون مجدد قرار می‌گیرند و آسیب شدیدتری نسبت به آنچه توسط ایسکمی ایجاد می‌شود، وارد می‌گردد. آسیب ایسکمی -خون‌رسانی مجدد هنگامی اتفاق می‌افتد که گردش خون پس از یک دوره ایسکمی حاد برقرار شود (۴). تورشن (ایسکمی) و دتورشن (خون‌رسانی مجدد) بیضه پدیده مهمی است که از دیدگاه مسیرهای سیگنالینگ به طور کامل شناخته نشده است. I/R^۱ با فعال شدن نوتروفیل‌ها، سیتوکین‌های التهابی و مولکولهای چسبندگی با افزایش ترومبوژنیک، آزاد شدن مقادیر بالایی از کلسیم داخل سلول و تولید رادیکالهای آزاد حاصل از اکسیژن در ارتباط است. I/R بیضه همچنین منجر به تحریک سیتوکین‌های پیش‌التهابی، ترشح فاکتور نکروز تومور آلفا^۲ و اینترلوکین ۱^۱ و بتا^۳ و فعال سازی نیتریک اکسید سنتاز^۴ میشود. از

¹ Ischemic/Reperfusion

² Tumor Necrosis Factor α (TNF α)

³ Interleukin 1 β (IL1 β)

⁴ Nitric Oxide Synthase (NOS)

این رو، این آسیب I/R با تولید بیش از حد گونه های فعال اکسیژن^۵ و RNS همراه است (۵). در شرایط عادی، رادیکالهای آزاد تولید میشوند و اثرات آنها توسط سیستم آنتی اکسیدان درون زا متعادل میشود. هنگامی که تولید ROS از توانایی مکانیسمهای دفاعی برای کنترل بیشتر شود، استرس اکسیداتیو ایجاد میشود و به آسیب سلول برگشت پذیر یا غیرقابل برگشت منجر می شود. از جمله عوامل مهم در درمان ناباروری مردان تغذیه مناسب و مصرف آنتی اکسیدان ها است که نقش بسیار مهمی در رشد و توسعه سیستم تولید مثلی دارد. مطالعات نشان داده که مصرف آنتی اکسیدان ها ناباروری مردان را کاهش، پارامترهای مایع منی را بهبود داده و نرخ باروری را ۱/۴ برابر افزایش می دهد (۶). کورکومین از گیاه زردچوبه گرفته می شود و در گیاه پزشکی برای درمان بسیاری از بیماری ها کاربرد گسترده ای دارد. این ترکیب می تواند عامل حفاظتی قدرتمندی در برابر آسیبهای اکسیداتیو سلولی بوده و از آن جلوگیری نماید همچنین می تواند آتروفی بافت را بهبود ببخشد (۷). داروهای احیا کننده یک زمینه پیشگام است که هدف آن بازگرداندن و بازسازی عملکرد سلولها، اندامها و بافتهای آسیب دیده برای ایجاد عملکرد طبیعی است. فناوری نانو در توسعه تحقیقات پایه ای منجر به درمان های بالینی نقش مهمی ایفا کرده است. نانوذرات دارای ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی هستند، به طوری که حتی این خصوصیات در موادی که از نانوذرات مشتق میشوند، دیده نمیشود. اندازه کوچک و مساحت سطحی بالای نانوذرات، سبب افزایش فعالیت شیمیایی آنها گردیده و اجازه میدهد که به عنوان یک کاتالیست با کارایی بالا عمل نمایند. این افزایش فعالیت شیمیایی و فیزیکی در بسیاری از نانوذرات منجر به کاربردهای گسترده آنها در فرآیندهایی نظیر انتقال داروها، واکنش، تشخیص یا درمان انواعی از بیماریها، بازسازی بافتی و غیره گردیده است. با توجه به توانایی عبور نانوذرات از غشای سلولی، این مواد در دوزهای کم خاصیت آنتی اکسیدانی و در دوزهای بالا خاصیت سمی پیدا میکنند. علاوه بر این مطالعات نشان داده اند که مصرف همزمان نانوپارسیکل ها با آنتی اکسیدان ها باعث اثرات هم افزای نانو پارسیکل ها و بهبود عملکرد آن ها شده و این مواد میتوانند در غلظت های پایین اثرات آنتی اکسیدانی داشته و باعث کاهش آسیب سلولی شوند (۳). در مطالعه حاضر، اثرات همزمانی آنتی اکسیدانی نانوذره آهن با کورکومین را بر کاهش ضایعات ایسکمی رپرفیوژن بیضه ارزیابی نموده و بیان ژنهای دخیل در آپوپتوز میتوکندری بررسی شد.

مواد و روش ها

نخستین گام در هر پژوهش رعایت موازین اخلاقی است. تحقیق تجربی حاضر با رعایت توصیه های کمیته اخلاق شامل به کارگیری حداقل حیوانات، وارد نمودن حداقل شوک به حیوانات، رعایت اصول و پرورش حیوانات و با کسب مجوز اخلاق به کد IR.IAU.TNB.REC.1399.021 انجام شد.

⁵ Reactive Oxygen Species

در تحقیق حاضر مدلینگ حیوانی در دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی و بخش ملکولی در بیمارستان امام خمینی (ره) تهران انجام شد.

بدین منظور ابتدا نانوذرات آهن (خلوص 97٪) را از شرکت Sigma Aldrich (ساخت کشور آلمان) و هم چنین کورکومین را از شرکت مرک (ساخت کشور آلمان) خریداری نموده و دوز LD50 نانوذرات را تعیین نمودیم. دوز LD50 غلظتی است که باعث مرگ نیمی از موشها شد. بر این اساس، غلظت های 0,05، 0,1، 0,2، 0,3، 0,4 و 0,5 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به موش ها داده شد و در نهایت، دوز LD50 معادل 0,4 میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تعیین شد.

برای انجام مطالعه کنونی، 48 رت نر بالغ 20 هفته با وزن تقریبی 250-300 گرم از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد 12 ساعت نور و 12 ساعت تاریکی در دمای 25 ± 2 درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 50 ± 10 ٪ قرار داده شدند. کلیه حیوانات از نسبت یکسان ذرت، گندم و جو تغذیه شدند و تحت شرایط تغذیه ای یکسان و دسترسی آزاد به آب قرار گرفتند و برای انجام آزمایشات و سازگاری با محیط 10 روز در حیوان خانه نگهداری شدند.

پس از 10 روز سازگاری با محیط حیوان ها به دو دسته آزمون و کنترل تقسیم شدند. سپس موشها با کتامین (10 میلیگرم در میلی لیتر) و زایلازین (20 میلیگرم بر میلی لیتر) بیهوش شدند. در هر دو گروه برش در ناحیه اسکروئال داده شد. در گروه آزمون با پیچاندن بیضه ها به میزان 720 درجه در خلاف جهت عقربه های ساعت و به مدت 1,5 ساعت و سپس برگشت بیضه ها به وضعیت اول تورشن - دتورشن انجام شد. در گروه کنترل صرفاً جراحی انجام شد و تورشن - دتورشن صورت نپذیرفت. پس از تایید پاتولوژیک الیگواستنوتراتوزوسپرمی شدید، رت ها در دو دسته به مدت 10 روز با دوز LD50 از نانو ذرات تیمار شدند (8). هر دسته شامل 4 گروه و هر گروه شامل 6 موش بود.

گروه ها عبارت بودند از:

(1) گروه کنترل، (2) گروه کنترل دریافت کننده نانوذره آهن (3) گروه کنترل دریافت کننده کورکومین (4) گروه کنترل دریافت کننده نانوذره آهن و کورکومین (5) گروه تورشن - دتورشن (6) گروه تورشن - دتورشن دریافت کننده نانوذره آهن (7) گروه تورشن - دتورشن دریافت کننده کورکومین (8) گروه تورشن - دتورشن دریافت کننده نانوذره آهن و کورکومین

بعد از 10 روز تیمار با نانو ذره آهن و کورکومین موش ها را با استفاده از کتامین 10٪ و زایلزین 2٪ بیهوش نموده، سپس در شرایط استریل با ایجاد برش در ناحیه تحتانی شکم، اپیدیدیم و بافت بیضه را خارج نمودیم و

در شرایط استریل در محیط کشت RPMI-1640 حاوی آنتی بیوتیک از خون و چربی عاری و شستشو داده شد. (۹).

ارزیابی زنده مانی با رنگ آمیزی MTT

برای این منظور ۵ میلی گرم MTT (۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم بروماید) (سیگما آلدریچ) در ۱ میلی لیتر بافر فسفات حل شد و محلول با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه و برای استفاده در یخچال نگهداری شد. ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از بافت بیضه در بافر PBS توسط هموژنایزر لیز شد و سپس در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰ میکرو لیتر محلول MTT به لوله ها اضافه شد. لوله ها سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از ۲ ساعت انکوباسیون، ۵۰۰ میکرو لیتر DMSO به هر لوله اضافه شد و به خوبی تکان داده شد تا تمام کریستال های فرمازون حل شوند. سپس محلول به چاهک های ۹۶ تایی انتقال و ۱ ساعت بعد جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر و طول موج رفرانس ۶۳۰ نانومتر با کالیبرسیون ۱/۹۹ به وسیله Multi plate reader قرائت گردید (۱۰).

ارزیابی نکروز و آپوپتوز با فلوسایتومتری

در این روش از رنگ آمیزی Annexin V-FITC برای نشان دادن آپوپتوز و رنگ آمیزی همزمان با پروپیدیم دیدید (PI) به عنوان نشانگر برای تمایز بین نکروز و آپوپتوز استفاده شد. بدین منظور ۱۰۰ میکرو لیتر بافر اتصال به سلول های تیمار شده اضافه نموده پس از شستشو با PBS و سانتریفیوژ با ۵ میکرو لیتر Annexin V-FITC (شرکت سیگما آلدریچ) به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از شستشو و سانتریفیوژ مجدد ۱۰ میکرو لیتر PI (۱۰ میلی لیتر / ۱۰۰ میلی لیتر PBS) (شرکت سیگما آلدریچ) به رسوب سلولی اضافه شد و فلوسیتومتری با استفاده از فلوسیتومتر Partec GmbH (Partec PA S، آلمان) انجام شد (۱۰).

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از بافت بیضه و سنتز cDNA توسط کیت استخراج RNA (یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) و کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. لازم به ذکر است که RNA استخراج شده توسط نانودراپ (شرکت آرتین آزما مهر) مورد ارزیابی قرار گرفته سپس cDNA سنتز شد.

ارزیابی بیان ژن

ابتدا جهت ژن های هدف Bad و Bcl-x پرایمرهای مربوطه طراحی شدند (۱۱). توالی پرایمر در جدول ۱ ارائه شده است. به منظور بررسی تغییرات بیانی، Real Time PCR با استفاده پرایمرهای فوق و از ژن ساختمانی β -Actin جهت کنترل داخلی و با روش سایبرگرین (شرکت تاکارا) انجام شد.

تحلیل آماری

داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون توکی با سطح معنی دار $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

۱- ارزیابی زنده مانی

بیشترین میزان زنده مانی در گروههای نرمال دریافت کننده آنتی اکسیدان کورکومین و نرمال بدون دریافت کورکومین بود. آنتی اکسیدان کورکومین به طور معنی داری زنده مانی را نسبت به گروه نرمال افزایش داد ($p < 0.05$). تیمار با نانو ذره دی اکسید آهن به طور معنی داری در گروه نرمال و همچنین گروه ایسکمی زنده مانی را کاهش داد ($p < 0.05$). اما افزودن کورکومین به این گروه آسیب سلولی را جبران نموده باعث افزایش زنده مانی گردید. ملاحظه می گردد که در موارد آسیب سلولی مانند ایسکمی بیضه آنتی اکسیدان کورکومین باعث بهبود تاثیر نانوذره دی اکسید آهن شده و مرگ سلولی را کاهش می دهند و متعاقباً باعث افزایش زنده مانی میشود.

۲- ارزیابی میزان نکروز و آپوپتوز

جهت ارزیابی میزان نکروز و آپوپتوز از داده های فلوسایتومتری استفاده گردید. شواهد حاکی از افزایش معنی دار میزان نکروز در سلول های بیضه رت های مبتلا به ایسکمی بیضه بود ($P < 0.001$). نانو ذره دی اکسید آهن در گروه ایسکمی باعث کاهش و در گروه نرمال باعث افزایش نکروز در این سلول ها شد. همچنین، آنتی اکسیدان کورکومین تأثیر معنی دار و قوی در کاهش نکروز سلول های بیضه بعد از فرآیند ایسکمی رپرفیوژن نشان داد. تجویز همزمان نانو ذره آهن همراه با آنتی اکسیدان کورکومین باعث کاهش مرگ سلول های بیضه به علت نکروز در گروه ایسکمی بیضه شد ($P < 0.001$). می توان چنین نتیجه گیری نمود که نانو ذره فوق در دوز LD50 با خاصیت آنتی اکسیدانی باعث هدایت مرگ سلولی از نکروز به سمت آپوپتوز شده است.

همچنین نتایج حاصل از فلوسایتومتری تایید کننده افزایش آپوپتوز در گروه نرمال و کاهش آپوپتوز در گروه ایسکمی رپرفیوژن متعاقب تیمار با نانوذره آهن بود. بر اساس نمودارهای زیر مشخص گردید که تیمار هم زمان نانوذره آهن با آنتی اکسیدان کورکومین باعث کاهش آپوپتوز شده است (نمودارهای ۲-۹).

۳- ارزیابی بیان ژن های BAD و BCLX

نتایج این بررسی نشان داد که کمترین میزان بیان ژن *BAD* و بیشترین میزان بیان ژن *BCLX* در گروه رت های سالم دریافت کننده آنتی اکسیدان کورکومین و بیشترین میزان بیان ژن *BAD* و کمترین میزان بیان ژن *BCLX* در گروه ایسکمی بیضه بود. تیمار رت های نرمال و ایسکمیک با نانو ذره آهن باعث افزایش بیان ژن *BAD* و کاهش بیان ژن *BCLX* شد. تجویز کورکومین در گروه ایسکمی به طور معنی داری بیان ژن *BAD* را کاهش و *BCLX* را افزایش داد. هم زمانی مصرف کورکومین و نانو ذره آهن به طور معنی داری منجر به کاهش *BAD* و افزایش *BCLX* در هر دو گروه شد. ($P = 0.0000$).

هم چنین بیشترین نسبت بیان ژن *BAD/BCL-X* در گروه ایسکمی بیضه دریافت کننده نانوذره آهن و کمترین آن در گروه نرمال دریافت کننده کورکومین بود. تیمار همزمان با نانوذره آهن و کورکومین منجر به کاهش نسبت بیان *BAD/BCL-X* در رت های ایسکمی رپرفیوژن بیضه و رت های سالم شد (نمودارهای ۱۰-۱۲).

بحث

مطالعه کنونی با هدف یافتن رویکردهای درمانی *IR* بیضه با استفاده از کورکومین و نانوذره آهن در غلظتی که انتظار می رفت اثرات آنتی اکسیدانی را نشان دهند انجام شد. نتایج حاکی از این بود که در بافت بیضه رت های ایسکمی/ریپرفیوژن شده مرگ سلولی بیشتر ناشی از نکرز سلول ها است. با این حال، کورکومین و نانوذره Fe_3O_4 توانستند به مقدار زیادی منجر به کاهش نکرز و پیشرفت به سمت آپوپتوز در سلولهای بیضه شوند. به عبارت دیگر دیدیم که در بافت های آسیب دیده مثل بافت ایسکمیک نانوذره آهن در دوز *LD50* همزمان با آنتی اکسیدان کورکومین باعث بهبودی پارامترهای مورد مطالعه شده و مرگ سلولی را از نکرز به سمت آپوپتوز میبرد.

آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن بیضه به دلیل قطع خون‌رسانی به بیضه ایجاد میشود که به سرعت باعث مرگ و آسیب سلول‌ها می‌شود (۱۲). فاکتورهای زیادی مثل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، رادیکالهای آزاد، پراکسیداسیون لیپید، افزایش سیتوکین‌های التهابی و آسیب به رگ‌های خونی در مرگ سلولی ناشی از آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن دخیل هستند (۱۳). در مطالعه‌ای گزارش شده است که کاهش یا توقف جریان خون در بیضه‌ها باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن در بیضه‌ها میشود (۱۴). بنابراین تهاجمات ROS منجر به کاهش باروری مردان می‌شود. مرگ سلولی به دنبال آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن با تولید رادیکالهای آزاد و پراکسیداسیون اسیدهای چرب ناشی از آن ارتباط نزدیک دارد (۱۵). رادیکالهای آزاد علاوه بر آسیب رساندن به دیواره‌های اندوتلیال عروق و آسیب اکسیداتیو به بافت، منجر به ترشح سیتوکین‌ها نیز میشوند. سیتوکین‌ها پیش‌سازهای التهابی هستند که در نهایت باعث آسیب کلی و سیستمیک میشوند (۱۶). اگرچه درمان قطعی برای جلوگیری از این آسیب یافت نشده است، اما برخی مداخلات اخیر برای کاهش آسیب، مانند مسدود کردن مسیرهای تولید رادیکالهای آزاد، استفاده از داروهای ضد التهاب، استفاده از مهارکننده‌های آنزیم میدل آنژیوتانسین و موادی مانند آدنوزین، مورفین و استاتین‌ها پیشنهاد شده است (۱۷). مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و مهارکننده رادیکالهای آزاد اثرات محافظتی بر آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن دارند (۲). آنتی‌اکسیدان‌ها عامل دفاعی مهمی در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکالهای آزاد هستند. کورکومین به دلیل ساختار منحصر به فرد دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی است. ساختار ویژه آن از طریق زنجیره آنتی‌اکسیدانی، توانایی به دام انداختن رادیکالهای آزاد را داشته و دارای اثرات محافظتی در برابر آسیب اکسیداتیو به DNA و سلول‌های تک‌هسته‌ای انسان است (۱۸). بنابراین، کورکومین ممکن است به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی در پیشگیری از ناهنجاریهای عمده ناشی از استرس اکسیداتیو در بیضه‌ها مفید باشد. کمالی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در بررسی سمیت سلولی نانو ذرات بیان داشتند که اثرات منفی نانو ذرات چشمگیرتر از اثرات مثبت آن‌ها است. ولی به طور کلی صرف نظر از اثرات دوگانه نانو ذرات، عملکرد آن‌ها تا حدودی مشابه بنظر می‌رسد. در جنبه‌های منفی به عنوان افزایشنده و در جنبه‌های مثبت به عنوان کاهشنده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند (۱۹). نانوذرات مغناطیسی یکی از مهمترین و پرکاربردترین انواع نانومواد می‌باشند که ویژگیهای منحصر به فردشان موجب ایجاد کارایی‌های خاص آنها نسبت به سایر نانو ساختارها میشود. اکسید آهن در دو فرم اصلی مگنتیت Fe_3O_4 و ماگمیت Fe_2O_3 میباشد. نانوذرات اکسید آهن به دلیل خواص مغناطیسی منحصر به فردش برای استفاده در امکانات تشخیصی داخل بدن (*in vivo*)، استفاده در پزشکی، داروسازی و مهندسی زیستی دارای پتانسیل بالایی است (۲۰). در سالهای اخیر، سنتز سبز نانوذرات توسط گیاهان توجه بسیاری را به خود جلب کرده و به عنوان جایگزینی برای روشهای شیمیایی سنتز نانوذرات در نظر گرفته شده است (۲۱). در مطالعه‌ای از کورکومین برای پوشش ذرات نقره استفاده شد. سپس اثرات نانوذرات نقره تولید شده به روش سبز بر القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی روده A2780 مورد بررسی قرار گرفت و طبق نتایج مشخص گردید که

نانوذرات با پوشش گیاهی قادر به مهار تکثیر سلولی سلولهای سرطانی هستند که ممکن است به دلیل وجود کورکومین بر سطح نانوذرات و متعاقباً افزایش اثرگذاری نانوذرات باشد ولی این فرضیه نیاز به بررسی های بیشتر دارد چرا که آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی روند مهمی در جهت کنترل تکثیر سلول ها، حفظ هوموستاز طبیعی بدن و از بین بردن سلول های مضر و سرطانی میباشد (۲۲). کاسپازها از واسطه های مهم در فرآیند آپوپتوز هستند. در طی فرآیند مرگ سلولی برنامه ریزی شده ابتدا کاسپاز ۳ فعال میشود سپس این کاسپاز با شکست های پروتئولیتیک منجر به فعال شدن کاسپاز ۸ و ۹ میشود که این کاسپاز ها مسئول آغاز فعالیت عوامل ملکولی دیگر برای پیشرفت روند آپوپتوز هستند (۲۳). نتایج مطالعات تولید نانوذرات با پوشش گیاهی، مهار تکثیر و افزایش میزان آپوپتوز در سلول های سرطانی را نشان میدهد که از طریق مسیر درونی میتوکندری آپوپتوز انجام میشود (۲۴-۲۵).

از آن جا که آپوپتوز فرآیندی فعال و وابسته به انرژی است و اعمالی نظیر فعالیت آنزیم ها، تراکم کروماتین و تشکیل وزیکول های آپوپتوتیک کاملاً تنظیم شده و نیازمند صرف انرژی است لذا انتظار می رود در طی فرآیند آپوپتوز کاهش شدید در میزان ATP درون سلولی مشاهده نگردد. محققین عنوان می کنند که میزان انرژی درون سلولی، عامل مهم و تعیین کننده نوع مرگ سلولی می باشد. به طوری که در آپوپتوز گرچه میزان ATP کاهش می یابد و لیکن انرژی مورد نیاز فرآیندهایی که فعالانه در طی آن رخ می دهد کماکان در سلول موجود است و در صورتی که کاهش شدید انرژی صورت گیرد، سلول علائم نکروز را نشان خواهد داد (۲۶). مطالعات انجام شده روی تاثیر نانوذرات بر لوله های اسپرم ساز نشان داده است که این ذرات در دوزهای معینی باعث تغییرات بافت بیضه و وارد شدن آسیب به سلولهای زایا شده و با القاء مسیر استرس اکسیداتیو سبب کاهش شدید بیان برخی از ژن ها میشوند (۲۷).

پروتئین های Bcl-2 در پاسخ به آپوپتوز نقش دارند. این خانواده به سه زیر خانواده تقسیم میشود:

۱- زیر خانواده pro-survival شامل BCL2 و BCLX

۲- زیر خانواده BH3 شامل BAD و BIM

۳- زیر خانواده واسطه پروآپوپتوتیک شامل BAX و BAK (۲۸)

همانطور که اشاره شد، برخی از این پروتئین ها (مانند Bcl-2 و Bcl-XL) ضد آپوپتوز هستند، در حالی که برخی دیگر (مانند Bad، Bax یا Bid) پروآپوپتوز هستند. حساسیت سلول ها به محرک های آپوپتوتیک می تواند به تعادل پروتئین های پرو و آنتی آپوپتوتیک خانواده Bcl-2 بستگی داشته باشد (۲۹).

در مطالعه کنونی افزایش بیان ژن Bad و کاهش بیان Bcl-X بعد از آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن بیضه مشاهده شد. نشان داده شده است که Bad میتواند با میل بیشتری به Bcl-xL نسبت به Bax متصل شود و دایمر شدن

Bad با Bcl-xL منجر به جابجایی Bax از Bcl-xL میشود. کاهش قابل توجه سطح Bad در شرایط آسیب I/R بیضه و دریافت کننده کورکومین نشان می دهد که کورکومین اثر مهارى بر بیان Bad دارد (۳۰). با تجویز کورکومین، Bcl-xL به طور قابل توجهی افزایش یافت که حاکی از اثرات ضد آپوپتوز کورکومین به علت خاصیت آنتی اکسیدانی است. بنابراین، احتمالاً افزایش سطح Bcl-xL ناشی از اثرات محافظتی کورکومین بر روی اسپرماتوسیت ها و اسپرماتیدها به حساب می آید. آگونیست مرتبط با مرگ سلولی (BAD) عضوی پرو آپوپتوز از خانواده ژنهای Bcl-2 است که در شروع آپوپتوز نقش دارد. BAD عضوی از خانواده BH3 است (۳۱). اعتقاد بر این است که Bax/Bak با تشکیل منافذ در غشای خارجی میتوکندری باعث میشود سیتوکروم C بتواند به داخل سیتوپلاسم رها شود و آبشار کاسپاز pro-apoptotic را فعال و آپوپتوز را آغاز کند. پروتئین های ضد آپوپتوتیک Bcl-2 و Bcl-xL از انتشار سیتوکروم C از طریق منافذ میتوکندری جلوگیری کرده و همچنین از فعال شدن آبشار کاسپاز سیتوپلاسمی توسط سیتوکروم C جلوگیری میکنند. دفسفوریل شدن BAD با Bcl-2 و Bcl-xL یک هتروداایمر تشکیل میدهد و آنها را غیرفعال میکند، بنابراین اجازه میدهد تا آپوپتوز ناشی از Bax/Bak ایجاد شود. هنگامی که BAD توسط Akt/پروتئین کیناز B فسفریله می شود، هتروداایمر پروتئین BAD تشکیل شده که این امر Bcl-2 را آزاد می کند تا آپوپتوز ناشی از Bax را مهار کند (۳۲). بنابراین فسفوریلاسیون BAD ضد آپوپتوز است و دفسفوریلاسیون BAD منجر به فعالیت پرو آپوپتوز می شود.

در مطالعه حاضر، تیمار با کورکومین افزایش قابل توجهی در بیان Bcl-x، یک فاکتور مهم ضد آپوپتوتیک، در بافت بیضه موش را نشان داد. این امر حاکی از اثرات ضد آپوپتوزی کورکومین میباشد. آنالیز بیان ژنهای Bad و Bcl-X حاکی از این بود که بیان ژن Bad در رت های مبتلا به آسیب I/R بیضه به شدت افزایش ولی از میزان بیان Bcl-X کاسته شد که نشانگر افزایش مرگ سلولی در بافت بیضه است. با این حال، کورکومین منجر به افزایش بیان Bcl-X و کاهش بیان Bad شد که حاکی از اثرات آنتی آپوپتوتیک کورکومین است و این اثر به خاصیت آنتی اکسیدانی ترکیب کورکومین نسبت داده شد. همچنین نانوذرات آهن خصوصیت افزایش بیان BAD و کاهش بیان BCLX را نشان دادند که حاکی از این است که نانوذرات مرگ سلولی بر اثر نکرور را افزایش داده و با تجویز همزمان کورکومین خاصیت آنتی اکسیدانی را نشان دادند.

در تحقیق حاضر با القا آسیب I/R بیضه، کورکومین همراه با نانوذره Fe₃O₄ میتواند باعث بهبود پارامترهای مورد نظر و کاهش آپوپتوز در بافت بیضه شود. از این رو، آزمایشات بالینی بیشتری بر اساس کاربرد همزمان این دو ماده توصیه می شود. با توجه به اینکه سنتز سبز نانوذرات بسیار مقرون به صرفه است، سنتز سبز نانوذرات Fe₃O₄ و استفاده همزمان از کورکومین در بیماران مبتلا به ایسکمی بیضه توصیه می شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله قسمتی از پایان نامه مقطع دکتری دانشگاه آزاد اسلامی در رشته ژنتیک مولکولی میباشد. بدین وسیله از ریاست گروه و کلیه همکاران حوزه معاونت پژوهشی واحد تهران شمال کمال تشکر را داریم.

منابع:

1. ZEGERS-HOCHSCHILD, F., ADAMSON, G. D., DYER, S., RACOWSKY, C., DE MOUZON, J., SOKOL, R., RIENZI, L., SUNDE, A., SCHMIDT, L., COOKE, I. D., SIMPSON, J. L. & VAN DER POEL, S. 2017. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril*, 108, 393-406.
2. UNAL, D., YENI, E., EREL, O., BITIREN, M. & VURAL, H. Antioxidative effects of exogenous nitric oxide versus antioxidant vitamins on renal ischemia reperfusion injury. *Urological research*, 2002. 30, 190-194.
3. ELSHAARI, F., ELFAGIH, R., SHERIFF, D. & BARASSI, I. Oxidative and antioxidative defense system in testicular torsion/detorsion. *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India*, 2011.27, 479.
4. AKBAS, H., OZDEN, M., KANKO, M., MARAL, H., BULBUL, S., YAVUZ, S., OZKER, E. & BERKI, T. Protective antioxidant effects of carvedilol in a rat model of ischaemia-reperfusion injury. *Journal of international medical research*, 2005.33, 528-536.
5. CUZZOCREA, S., RILEY, D. P., CAPUTI, A. P. & SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological reviews*, 2001.53, 135-159.
6. MORA-ESTEVEZ, C. & SHIN, D. Nutrient supplementation: improving male fertility fourfold. *Semin Reprod Med*, 2013.31, 293-300.
7. Ono T, Takada S, Kinugawa S, Tsutsui H. Curcumin ameliorates skeletal muscle atrophy in type 1 diabetic mice by inhibiting protein ubiquitination. *Exp Physiol*. 2015;100(9):1052–63.
8. Hussain M, Ceccarelli R, Marchisio D, Fino D, Russo N, Geobaldo F. Synthesis, characterization, and photocatalytic application of novel TiO₂ nanoparticles. *CEJ*. 2010;157(1):45-51.
9. Mirzaei, M., Shahrooz, R., Shalizar-Jalali, A., Sarrafzadeh-Rezaei, F., Mosaffa, N., The Effects of Fibroblast and MacropHage Separated and Co-Culture Conditioned Medium on Sperm Parameters Disorders Induced by Testicular Torsion-Detorsion in Adult Rats, *J Fasa Univ Med Sci*, 2019, 9 (3), 1564-1576.
10. Wang H, Zhou W, Zhang J, Li H. Role of JNK and ERK1/2 MAPK signaling pathway in testicular injury of rats induced by di-N-butyl-phthalate (DBP). *Biol Res*. 2019 Aug 6;52(1):41.
11. Entezari M, Sharifi ZN, Movassaghi S, Atabi F, Jamali Z, Salimi A. Neuroprotective Effects of *Cyperus rotundus* Rhizome Extract on Ischemic Brain Injury: Expression profile of Bax, Bcl2, Bad and Bclx1 Genes. *DASJ [Internet]*. 2019Aug.11(1):25-30.
12. MALLICK, I. H., YANG, W., WINSLET, M. C. & SEIFALIAN, A. M. Ischemia—reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Digestive diseases and sciences*2004., 49, 1359-1377.

13. CARDEN, D. L. & GRANGER, D. N. Pathophysiology of ischemia–reperfusion injury. *The Journal of pathology*, 2000.190, 255-266.
14. POWER, R. E., SCANLON, R., KAY, E. W., CREAGH, T. A. & BOUCHIER-HAYES, D. J. Long-term protective effects of hypothermia on reperfusion injury post-testicular torsion. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 2003.37, 456-460.
15. PALLER, M. S., HOIDAL, J. & FERRIS, T. F. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *The Journal of clinical investigation*, 1984.74, 1156-1164.
16. FELLSTRÖM, B., AKÜYREK, L., BACKMAN, U., LARSSON, E. & MELIN, J. Postischemic reperfusion injury and allograft arteriosclerosis. *Transplantation proceedings*, 1998. 4278-4280.
17. OLDENBURG, O., QIN, Q., KRIEG, T., YANG, X.-M., PHILIPP, S., CRITZ, S. D., COHEN, M. V. & DOWNEY, J. M. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2004.286, H468-H476.
18. CHAN, W. H. & WU, H. J. Protective effects of curcumin on methylglyoxal-induced oxidative DNA damage and cell injury in human mononuclear cells. *Acta pharmacologica sinica*, 2006.27, 1192-1198.
19. Kamali, M., Rostami, A. A. & Mohseni, K. H., *In vitro* cytotoxicity effects of nanoparticles. *NEW CELLULAR & MOLECULAR BIOTECHNOLOGY JOURNAL* 2013, 3 , 12; 65 - 72.
20. Choudhary, R., Chawala, V., Soni, N., Kumar, J. & Vyas, R., Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility, *Pakistan Journal of PHysiology*, 2010,6, 54-59.
21. IRAVANI, S. 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13, 2638-2650.
22. Ramezani, T, Nabiuni, M, Baharar, J, Parivar, K, Namvar, F, Anti-cancerous effects of silver nanoparticles coated with curcmin on A2780 ovarian cancerous cells. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*, 2017.7,3, 213-222
23. Vaskivue TE, Stenback F., Tapanainen JS . Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor- α , and NF- κ B in human endometrial hyperplasia and carcinoma *Cancer* [Internet]. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2002;95(7):1463-71
24. Govender R, Phulukdaree of *Alibizia adianthifolia*: the induction of apoptosis in human lung carcinoma cell line. *Journal of nanobiotechnology*. 2013; 11(1):5-17
25. Hekmat A, Saboury AA, Divsalar A. The Effects of Silver Nanoparticles and Doxorubicin Combination on DNA Structure and Its Antiproliferative Effect Against T47D and MCF7 Cell Lines. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [Internet]. American Scientific Publishers; 2012; 8(6): 968–82.
26. Hona A, Kujoth C, Seo Y., Evaluation of sex differences on mitochondrial bioenergetics and apoptosis in mice, *Experimental Gerontology*, 2006,75, 1-10.
27. KRAUSZ, C., DEGL'INNOCENTI, S., NUTI, F., MORELLI, A., FELICI, F., SANSONE, M., VARRIALE, G. & FORTI, G. Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. *Human molecular genetics*, 2006. 15, 2673-2681.

28. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the Bcl-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 5:49–63.
29. ZHANG, Z., LAPOLLA, S. M., ANNIS, M. G., TRUSCOTT, M., ROBERTS, G. J., MIAO, Y., SHAO, Y., TAN, C., PENG, J. & JOHNSON, A. E. Bcl-2 homodimerization involves two distinct binding surfaces, a topographic arrangement that provides an effective mechanism for Bcl-2 to capture activated Bax. *Journal of Biological Chemistry*, 2004.279, 43920-43928.
30. KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., SHABAIK, A., WANG, H.-G., IRIE, S., FONG, L. & REED, J. C. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Research*, 1994.54, 5501-5507.
31. KORSMEYER, S. J. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer research*, 1999. 59, 1693s-1700s.
32. DOWNWARD, J. How BAD phosphorylation is good for survival. *Nature cell biology.* 1999. 1, E33-E35.

Abstract:

Simultaneous effects of curcumin and Fe₃O₄ nanoparticles on expression of Bad and Bclx genes in mitochondrial apoptosis in rats with testicular ischemia

Shabnam Zarei Moradi, Ph.D. student. ¹, Seyed Abdolhamid Angaji, ph.D ², Mitra Salehi, ph.D.³, Mehrdad Hashemi^{*4,5}

1- Department of Genetics, faculty of biosciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

2 - Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of biosciences, Kharazmi university, Tehran, Iran.

3- Department of Microbiology, faculty of biosciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.

4- Department of Genetics, faculty of Advanced science and Technology, Islamic Azad University, Tehran Medical Sciences, Tehran, Iran

5-Farhikhtegan Medical Convergence Sciences Research Center, Farhikhtegan Hospital Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding:

Mehrdad Hashemi

Farhikhtegan Medical Convergence Sciences Research Center, Farhikhtegan Hospital Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: mhashemi@iautmu.ac.ir

Tell: +982122006664

Background and Aims: Testicular ischemia / reperfusion is one of the most serious urological emergencies that is generally identified in men, adolescents and infants. This causes damage to the testicles which, if

misdiagnosed and treated improperly, can lead to infertility in men. In the present study, the effects of curcumin and Fe₃O₄ nanoparticles on the rate of apoptosis and expression of BAD, BCL-X genes were studied.

Materials and Methods: 48 adult rats aged 20 weeks and weighing 250 g in the control and ischemia / reperfusion (I / R) groups were included in the study. After induction of testicular torsion in the experimental group, both groups were treated with curcumin and iron nanoparticles at a dose of LD50 for 10 days and subcutaneously. Then the testes were removed and the survival and apoptosis of the cells were assessed by MTT and flow cytometry and the expression of BAD and BCLX genes was measured.

Results: Increased apoptosis was observed in testicular tissue cells of rats with ischemia / reperfusion injury. Exposure to iron nanoparticles increased BAD proapoptotic gene expression and decreased BCLX anti-apoptotic gene expression. Co-administration of curcumin and iron nanoparticles offset the adverse effects of nanoparticles. (P <0.05)

Discussion and Conclusion: It seems that co-administration of Fe₃O₄ nanoparticles with curcumin is effective in reducing the damage caused by testicular torsion due to its antioxidant properties and reduces necrosis. The synthesis of green nanoparticles can also be considered.

Keywords: BAD, BCLX, testicular torsion, gene expression, apoptosis, iron nanoparticles

جداول و نمودارها:

جدول ۱. زمان و دماهای بکار گرفته شده در Real Time PCR

Step	(°C)	زمان	تعداد سیکلها
Initial Denaturation	۹۵	دقیقه ۱۵	۱
Denaturation	۹۵	ثانیه ۱۵	۴۰
Annealing	۶۰	ثانیه ۳۰	

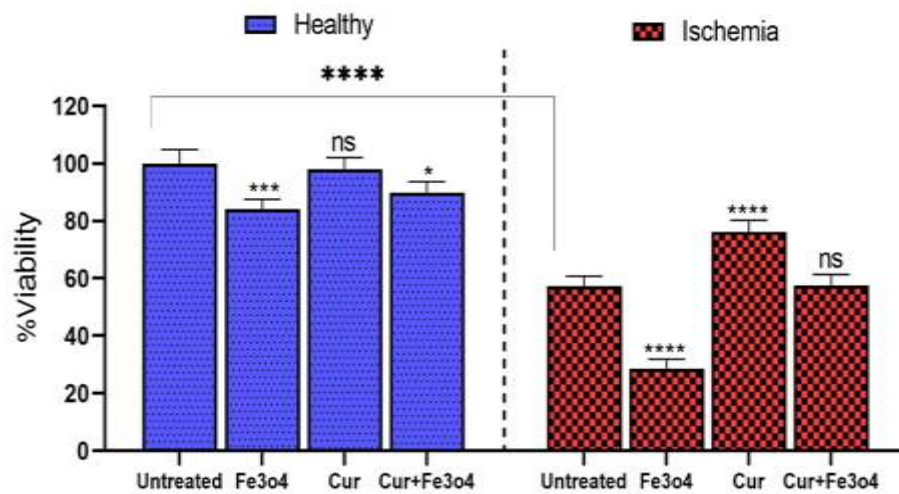


شکل ۱. A. بافت بیضه گروه کنترل B. بافت بیضه گروه ایسکمی. (H&E x 200).

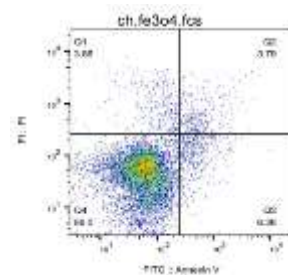
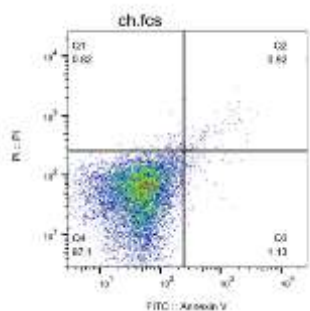
جدول ۲. توالی پرایمرها (Entezari, M et al, 2019)

Genes	Sequence [3'-5']
rat- <i>Bad</i> -F	GGAGCATCGTTCAGCAGCAG
rat- <i>Bad</i> -R	CCATCCCTTCATCTTCCTCAGTC
rat- <i>Bcl-x</i> -F	GCTGGTGGTTGACTTCTCTCC
rat- <i>Bcl-x</i> -R	GGCTTCAGTCCTGTTCTCTTCG

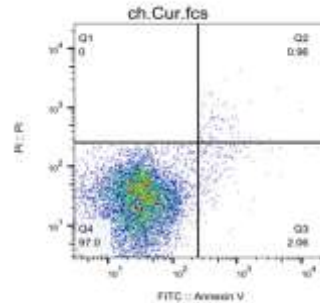
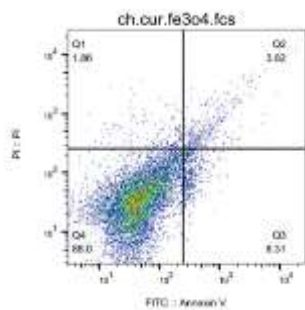
rat- β -Actin-F	CGGTCCGATGCCCTGAGGCTCTT
rat- β -Actin-R	CGTCACACTTCATGATGGAATTGA



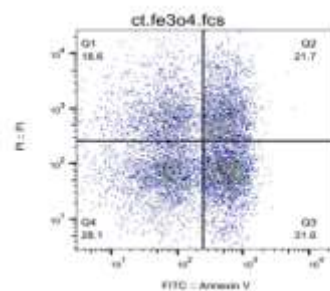
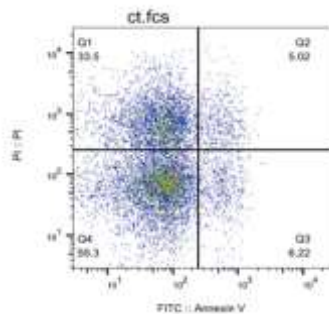
نمودار ۱. ارزیابی زنده ماتی در دو گروه نرمال و ایسکمی رپر فیوژن بیضه تیمار شده با نانو ذره دی اکسید آهن و آنتی اکسیدان کورکومین



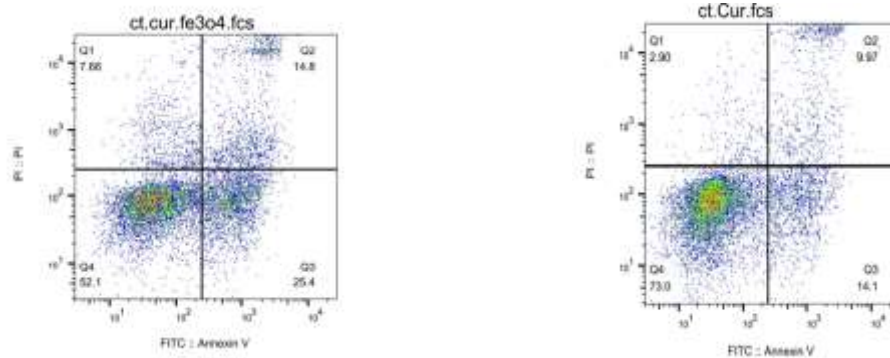
نمودار ۲: فلوسایتومتری در سلول های نرمال بافت بیضه تیمار شده با نانو ذره آهن. نمودار ۳: فلوسایتومتری در گروه سلول های نرمال بافت بیضه



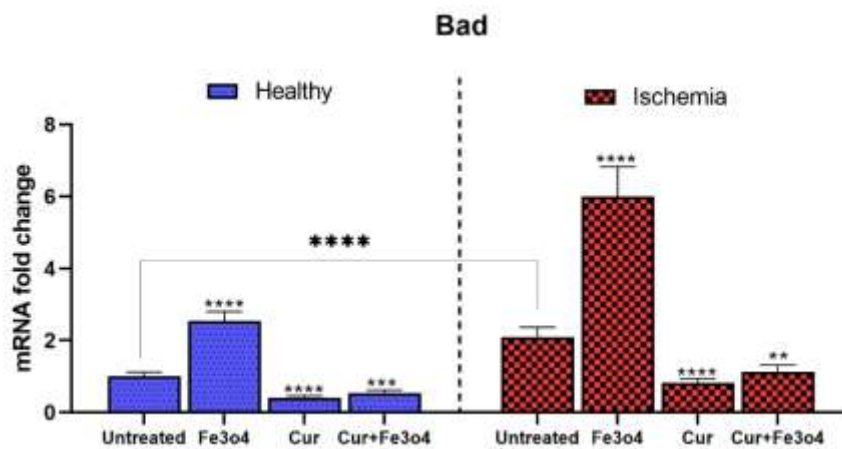
نمودار ۴: فلوسایتومتری در سلول های نرمال بافت بیضه تیمار شده با آنتی اکسیدان کورکومین نمودار ۵: فلوسایتومتری در سلول های نرمال بافت بیضه تیمار شده با نانو ذره آهن و کورکومین



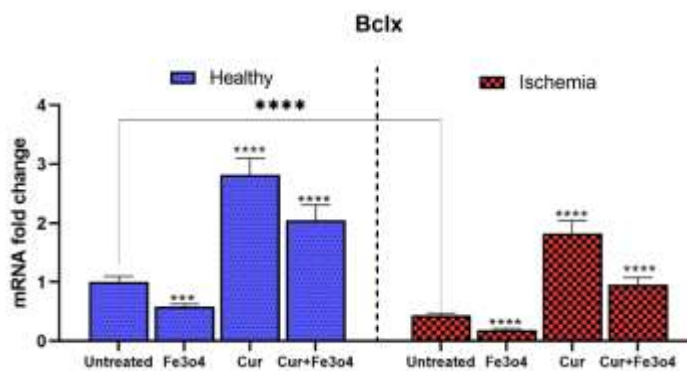
نمودار ۶: فلوسایتومتری سلول های ایسکمی رپرفیوژن تیمار شده با نانو ذره آهن نمودار ۷: فلوسایتومتری در سلول های ایسکمی رپرفیوژن بیضه



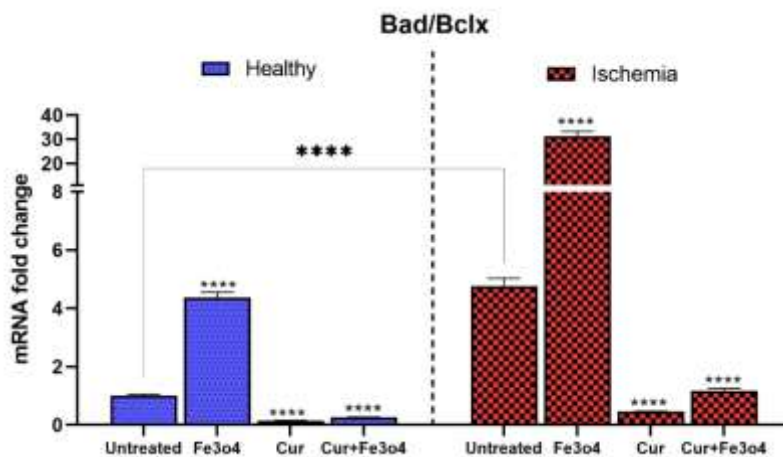
نمودار ۸: فلوسایتومتری در سلول های ایسکمی رپرفیوژن بیضه تیمار شده با کورکومین نمودار ۹: فلوسایتومتری در سلول های ایسکمی رپرفیوژن بیضه تیمار شده با نانو ذره آهن و کورکومین .



نمودار ۱۰. بیان ژن *BAD* در رت های سالم و مبتلا به ایسکمی رپرفیوژن بیضه تیمار شده با نانو ذرات آهن و کورکومین



نمودار ۱۱. بیان ژن *BCLX* در رت های سالم و مبتلا به ایسکمی رپرفیوژن بیضه تیمار شده با نانو ذرات آهن و کورکومین



نمودار ۱۲. بررسی مقایسه ای نسبت *BAD / BCLX* در رت های سالم و ایسکمی رپرفیوژن بیضه تیمار شده با نانوذره آهن و کورکومین