**Complementary Medicine Journal**
**Volume 13, Issue 3, Autumn 2023**

**Research Article**

# The Effect of Date Pollen Extract/Testosterone and Resistance Training on Gene Expression and Synthesis Rate of Occludin and Cadherin Proteins of Blood-Spinal Cord Barrier in Male Rats

Nilofer Eskandari Goodarzi [1,*], Mohammad Ali Azarbayjani [1], Hasan Matinhomaee [1], Hoseyn Fatolahi [2]

[1] Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Physical education, Pardis Branch, Islamic Azad University, Pardis, Iran

*** Corresponding author:** Nilofer Eskandari Goodarzi, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: m_azarbayjani@iauctb.ac.ir

**DOI: 10.61186/cmja.13.3.11**

**How to Cite this Article:**
Eskandari Goodarzi N, Azarbayjani MA, Matinhomaee H, Fatolahi H. The Effect of Date Pollen Extract/Testosterone and Resistance Training on Gene Expression and Synthesis Rate of Occludin and Cadherin Proteins of Blood-Spinal Cord Barrier in Male Rats. *Complement Med J*. 2023;**13**(3):11-20. DOI: 10.61186/cmja.13.3.11

**Received:** 24 Jul 2023
**Accepted:** 11 Sep 2023
**Keywords:**
Blood-Spinal Barrier
Tight Junction Protein
Adherens Junction Protein
Resistance Training
Date Pollen Extract.
Testosterone

© 2023 Arak University of Medical Sciences

**Abstract**

**Introduction:** Changes in gene expression and protein expression of the spinal-blood barrier play an important role in the transmission and development of neuro-inflammatory responses. In order to increase the knowledge related to the role of environmental interventions affecting the tight junction and adhesive proteins of this barrier, this study investigated the effect of four weeks of resistance training and date pollen/testosterone extract on gene expression and protein expression of occludin and cadherin in male rats.

**Methods:** In an experimental design, 30 male Wistar rats randomly divided into 6 groups: Control; Resistance training; DPP extract; Testosterone; DPP extract+ resistance training; Testosterone+ resistance training. The amount of 100 mg/kg date pollen extract was fed to mice by gavage for 4 weeks. Also, synthetic testosterone with a dose of 2 mg/kg was used subcutaneously as a positive control. Resistance training consisted of a four-week increasing training period on a 50-step ladder with 8 to 12 repetitions per session. After the intervention, gene expression was measured by RT-PCR method and protein expression was measured by western blot method.

**Results:** Four weeks of resistance training caused a significant increase in occludin gene expression (P=0.010) and cadherin (P=0.015); While it had no significant effect on the protein expression of occludin (P=0.404) and cadherin (P=0.647). Also, the gene expression level of two proteins increased significantly under the influence of date pollen extract and testosterone (P<0.05).On the other hand, the protein synthesis rate of occludin (P=0.016) and cadherin (P=0.012) was increased only in the group receiving synthetic testosterone. Despite the fact that the highest level of gene expression of two proteins was observed when the interventions were combined simultaneously, there was no statistically significant difference between their synergistic effects (P=0.059). However, the highest expression of occludin and cadherin protein occurred when resistance training was combined with testosterone supplementation (P<0.05).

**Conclusions:** The results of this study showed that DPP extract is superior to other interventions for increasing the gene expression of occludin and cadherin proteins of the blood-spinal barrier and testosterone for increasing the expression of these proteins. The combination of these interventions with the double promotion of the signaling process of gene and protein expression will maintain the integrity and reduce the permeability of the blood-spinal cord barrier in healthy male animal samples.

***Copyright ©*** *2023 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

## INTRODUCTION

The brain-blood barrier (BBB) and spinal cord-blood barrier (BSCB) play an important role in protecting the central nervous system against external factors such as hormones, toxins, and pathogens. The regular functioning of both barriers is regulated by a combination of protein structures called tight junctions (TJs) and adherens junctions (AJs). The most important of these proteins include occludin and claudin 1, 2, 5, 8, 13 and binding adhesive molecules. Apparently, a wide range of signaling processes including PKC and GTPases and cytokine activation are involved in the regulation of occludin and cadherin. Changes in gene expression and protein expression of the spinal-blood barrier play an important role in the transmission and development of neuro-inflammatory responses. In order to increase the knowledge related to the role of environmental interventions affecting the tight junction and adhesive proteins of this barrier, this study investigated the effect of four weeks of resistance training and date pollen/testosterone extract on gene expression and protein expression of occludin and cadherin in male rats.

## METHODS

In an experimental design, 30 male Wistar rats randomly divided into 6 groups: Control; Resistance training; DPP extract; Testosterone; DPP extract+ resistance training; Testosterone+ resistance training. The amount of 100 mg/kg date pollen extract was fed to mice by gavage for 4 weeks. Also, synthetic testosterone with a dose of 2 mg/kg was used subcutaneously as a positive control. Resistance training consisted of a four-week increasing training period on a 50-step ladder with 8 to 12 repetitions per session. After the intervention, the expression level of occludin and cadhin genes in spinal cord tissue was evaluated using Real-time PCR method according to the steps of preparation, opening of RNAs, reverse transcriptase reaction, PCR reaction and product analysis. Also, the amount of expression of occludin and cadherin proteins was measured using western blot method according to the instructions of Tatsuta et al. in three stages of separation based on the size of proteins, transfer to paper membrane and labeling of target proteins using primary and secondary antibodies. Central tendency and dispersion indices were used to describe the collected data. Also, two-way analysis of variance was used to investigate the main effect of exercise, synthetic testosterone/palm pollen extract and the interactive effect of exercise and drug on dependent variables. The results are reported at a significance level of 0.05 with figures and graphs obtained from Excel and SPSS software.

## RESULTS

Histological staining showed an increase in the amount of lipolysis, a decrease in the number and size of inflammatory cells in the nervous tissue of the testosterone and interaction groups. A summary of the effects of resistance training, date pollen/testosterone extract and their interactive effect on gene expression and protein expression of occludin and cadherin in male rats is presented in Tables 1 and 2. The protein synthesis rate of occludin (P=0.016) and cadherin (P=0.012) was increased only in the group receiving synthetic testosterone. However, the highest expression of occludin and cadherin protein occurred when resistance training was combined with testosterone supplementation (P<0.05).

**Table 1.** The results of the two-way analysis of variance test in relation to gene expression and protein expression of occludin

| Factor | Gene Expression | | | Protein Expression | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | F | sig | Es | F | sig | Es |
| **Resistance training** | 10.081 | 0.010 | 0.373 | 0.951 | 0.404 | 0.096 |
| **Drug** | 13.002 | 0.005 | 0.430 | 5.296 | 0.021 | 0.261 |
| **Resistance training* Drug** | 13.992 | 0.001 | 0.672 | 8.318 | 0.001 | 0.839 |

**Table 2.** The results of the two-way analysis of variance test in relation to gene expression and protein expression of cadherin

| Factor | Gene Expression | | | Protein Expression | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | F | sig | Es | F | sig | Es |
| **Resistance training** | 6.408 | 0.015 | 0.265 | 0.783 | 0.647 | 0.079 |
| **Drug** | 9.700 | 0.004 | 0.441 | 5.088 | 0.033 | 0.252 |
| **Resistance training* Drug** | 15.082 | 0.001 | 0.728 | 8.624 | 0.001 | 0.862 |

## CONCLUSION

The findings of this research showed the amount of reversible physiological change in gene expression and protein expression of occludin and cadherin in BSCB barrier after four weeks of resistance training and consumption of DPP/testosterone extract. Apparently, these interventions have a greater effect on the gene expression of tight junction proteins than adhesive junctions. However, their effects on the expression of occludin and cadherin proteins are completely similar. In spite of the fact that DPP extract can be a suitable alternative for increasing the gene expression of proteins

compared to testosterone and resistance training, the separate consumption of testosterone is superior in terms of increasing the expression of occludin and cadherin proteins. In order to increase the synergistic effect, it is more important to combine resistance training with testosterone.

**Compliance with Ethical Guidelines**

This article is taken from a research project with ethics code IR.UT.SPORT.REC.1397.028 which has been registered in the University Islamic Azad University, Central Tehran Branch.

**Funding**

The paper was extracted from the PhD. dissertation of the first authorat the Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

**Authors' Contributions**

All authors have participated in the design, implementation and writing of sections of the present study.

**Conflicts of Interest**

The authors declared no conflict of interest.

**Acknowledgements**

The authors would like to thank all the contributors who contributed to this research.

**مجله طب مکمل**
**دوره ۱۳، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲**

**مقاله پژوهشی**

# اثر عصاره گرده خرما/تستوسترون و تمرین مقاومتی بر بیان ژن و میزان سنتز پروتئین‌های اوکلودین و کادهرین سد خونی– نخاعی رت‌های نر

نیلوفر اسکندری گودرزی [۱،*]، محمدعلی آذربایجانی [۱]، حسن متین همایی [۱]، حسین فتح اللهی [۲]

[۱] گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] گروه تربیت بدنی، واحد پردیس، دانشگاه آزاد اسلامی، پردیس، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** نیلوفر اسکندری گودرزی، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ایمیل: m_azarbayjani@iauctb.ac.ir

**DOI: 10.61186/cmja.13.3.11**

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۲/۰۵/۰۲
**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۶/۲۰
**واژگان کلیدی:**
سد خونی- نخاعی
پروتئین اتصال محکم
پروتئین اتصال چسبنده
تمرین مقاومتی
عصاره گرده خرما
تستوسترون

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

**چکیده**

**مقدمه:** تغییر در بیان ژن و پروتئین‌های سد خونی- نخاعی نقش مهمی در انتقال و توسعه پاسخ‌های التهابی- عصبی دارد. جهت افزایش دانش مربوط به نقش مداخلات محیطی تأثیرگذار بر پروتین های اتصال محکم و چسبنده این سد، این پژوهش اثر چهار هفته تمرین مقاومتی و عصاره گرده خرما/ تستوسترون را بر بیان ژن و بیان پروتئین اوکلودین و کادهرین موش‌های نر صحرایی بررسی کرده است.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی ۳۰ سر رت نر ویستار بصورت تصادفی در ۶ گروه: کنترل؛ تمرین مقاومتی؛ عصاره گرده خرما (DPP)؛ تستوسترون؛ عصاره DPP+ تمرین مقاومتی؛ تستوسترون+ تمرین مقاومتی تقسیم شدند. مقدار ۱۰۰ mg/kg عصاره DPP به صورت گاواژ در مدت ۴ هفته به موش‌ها خورانده شد. همچنین از تستوسترون سنتتیک با دوز ۲ mg/kg به صورت زیر جلدی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. تمرین مقاومتی شامل یک دوره تمرین فزاینده چهار هفته‌ای روی یک نردبان ۵۰ پله‌ای بصورت ۸ تا ۱۲ تکرار در جلسه بود. بعد از پایان مداخلات میزان بیان ژن به روش RT-PCR و میزان بیان پروتئین به روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** چهار هفته تمرین مقاومتی سبب افزایش معنادار بیان ژن اوکلودین (P=۰/۰۱۰) و کادهرین (P=۰/۰۱۵) شد؛ در حالیکه اثر معناداری بر بیان پروتئین اوکلودین (P=۰/۴۰۴) و کادهرین (P=۰/۶۴۷) نداشت. همچنین سطح بیان ژن دو پروتئین تحت تأثیر عصاره گرده خرما و تستوسترون به طور معنی داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). از طرفی میزان سنتز پروتئین اوکلودین (P=۰/۰۱۶) و کادهرین (P=۰/۰۱۲) تنها در گروه دریافت کننده تستوسترون سنتتیک افزایشی بود. علی رغم اینکه بیشترین میزان بیان ژن دو پروتئین هنگام ترکیب همزمان مداخلات مشاهده شد، از نظر آماری بین میزان اثر سینرژیک آن‌ها تفاوت معنی داری وجود نداشت (P=۰/۰۵۹). با اینحال، بیشترین میزان نمود پروتئین اوکلودین (P=۰/۰۲۶) و کادهرین (P=۰/۰۱۷) هنگام ترکیب تمرین مقاومتی با مکمل تستوسترون اتفاق افتاد.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد عصاره DPP جهت افزایش بیان ژن پروتئین‌های اوکلودین و کادهرین سد خونی- نخاعی و تستوسترون جهت افزایش بیان این پروتئین‌ها نسبت به سایر مداخله‌ها دارای برتری است. ترکیب این مداخلات با ارتقای مضاعف روند سیگنالینگ بیان ژن و پروتئین، موجب حفظ یکپارچگی و کاهش نفوذپذیری سد سد خونی- نخاعی در نمونه‌های سالم حیوانی جنس نر خواهد داشت.

## مقدمه

در انسان و پستانداران ارتباط کنترل شده رگ‌های خونی با اجزای سیستم عصبی مرکزی از الگوی تقریباً یکسانی پیروی می‌نمایید. در این ارتباط فیزیولوژیکی، سه رابط تخصصی امکان ورود انتخابی مواد مغذی، ویتامین‌ها، یون‌ها، لیپیدها و مولکول‌های کوچک را از جریان خون به مغز (سد خونی- مغزی؛(BBB، مایع مغزی نخاعی (BCSFB) و سد خونی- طناب نخاعی (BSCB) ممکن می‌سازند (۱). این سدهای فیزیکی نقش مهمی در حفاظت سیستم عصبی در برابر عوامل خارجی مانند هورمون‌ها، سموم و پاتوژن ها دارند. بنابراین، هرگونه تغییر ناشی از جهش یا مکانیسم سیگنال دهی مستقیماً منجر به جابجایی پاسخ‌های التهابی- عصبی و تغییر انسجام این سدها می‌شود (۲).

با اینکه ترتیبات آناتومیکی سد خونی- نخاعی مشابه با سد خونی- مغزی است؛ وجود چند اختلاف ساختاری مانند تعداد کم پری سیت ها، ترکیب پروتئینی مویرگ‌ها همراه با نفوذپذیری بیشتر سیتوکین هایی مانند IFN-α/γ و TNF-αاز دلایل نفوذپذیری و جذب بیشتر بافت نخاع نسبت به مغز محسوب می‌شود (۳). بر این اساس، پاسخ‌های ایمنی نخاع هنگام اختلال از نظر بالینی متفاوت از پاسخ‌های مغزی خواهد بود. این پدیده در بیماری‌های مختلف مرتبط با نخاع مانند

*Copyright © 2023 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

اختلال تهاجم پری عصبی، اختلال عملکرد مفصل ساکروایلیاک و آسیب طناب نخاعی دیده می‌شود (۴). وجود این تفاوت‌ها ضرورت مطالعه و بررسی بیشتر سد خونی- نخاعی را در تحقیقات بالینی نشان می‌دهد.

سد پویای BSCB توسط بافت های مختلف و بسیاری از ماتریس‌های خارج سلولی حمایت می‌شود. در این مجموعه منظم، عمکرد توسط ترکیبی از ساختارهای پروتئینی شامل اتصالات محکم (TJs) و اتصالات چسبنده (AJs) تنظیم می‌شود. پروتئین‌های موجود در سیستم TJ که عمدتاً شامل اوکلودین و کلودین ۱، ۲، ۵، ۸، ۱۳ می‌شوند، در تنظیم ارتباطات بین سلولی و حمل و نقل پاراسلولی نقش اساسی دارند (۵). اوکلودین به عنوان اولین پروتیین غشایی انتگرال مجموعه یکپارچه سلول‌های اپیتلیال و اندوتلیال اهمیت فراوانی در ایجاد متاستاز سلول‌های سرطانی دارد. با اینکه مکانیسم عمل این پروتئین به روشنی مشخص نیست، ظاهراً طیف وسیعی از فرآیندهای سیگنالینگ از جمله فعالسازی پروتئین کیناز سی، GTPases و فعال شدن سایتوکاین ها در تنظیم آن نقش دارند (۶). با اینحال اهمیت اوکلودین در کاهش نفوذپذیری سد خونی- نخاعی در مدل‌های مختلف آزمودنی براساس میزان التهاب مزمن و عدم یکپارچگی آن نشان داده شده است (۷). از طرفی مولکول چسبنده یا اتصالی کادهرین با اتصال به اسکلت سلولی علاوه بر تشکیل بافت های منجمد نقش مهمی در ایجاد پشتیبانی و تمایز عملکرد گیرنده‌های عصبی و مسیرهای سیگنالی تنظیم ژن دارد. این پروتئین که برای عملکرد خود به یون کلسیم (Ca2+) وابسته است، با تنظیم سطح تماس و پایداری نقش مهمی در مورفوژنز و هوموستاز بافت دارد. این شرایط نمایانگر این است که تغییر خصوصیات کادهرین ها مستقیماً با طیف گسترده‌ای از بیماری‌های خود ایمن و مجامع چند سلولی مرتبط است (۴, ۸). بنابراین تجزیه و تحلیل دقیق الگوهای بیان این پروتئین اجازه بررسی فرضیه‌های مربوط به بهبود عملکرد CNS را خواهد داد.

اگرچه بررسی تغییرات سازه‌ای سد BBB تحت تأثیر اختلالات مولتیپل اسکلروزیس (MS)، بیماری آلزایمر و پارکینسون بینش‌های ارزنده‌ای در مورد چگونگی یکپارچگی و عملکرد این اتصالات ارائه داده است، تحقیقات عملکردی مربوط به نقش سد BSCB در آسیب‌های تروماتیک و غیر تروماتیک مرتبط با افزایش سن و سرطان محدود است (۹). از طرفی راهکارهای تقویت سازی این ساختارها در مدل‌های انسانی و حیوانی سالم با محدودیت‌های پژوهشی زیادی همراه است. در واقع نقش مداخلات به عنوان مهم‌ترین عامل محیطی غیرتهاجمی پیشگیری کننده بر مدولاسیون مسیرهای خاص یا اجزای مولکولی/ پروتئینی این سد مشخص نیست (۹, ۱۰). در این راستا درخت نخل با محصولاتی مانند گرده خرما، میوه و سلول‌های بنیادی سرشار از انواع ترکیبات مؤثر مانند آلکالوئیدها، تانن ها، فلاونوئیدها، ترپن ها و قند است. عصاره گرده خرما (DPP) مخلوط گیاهی سلول‌های زایای نر گل‌های نخل است که به طور سنتی به عنوان یک مکمل غذایی تقویت کننده قدرت باروری دو جنس مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). گزارش شده است که دانه‌های این گرده حاوی مقادیر قابل توجهی ویتامین، انواع مواد معدنی و اسیدهای آمینه به علاوه ترکیبات استروژنن، کلسترول و استرادیول است (۱۲). اگرچه استفاده از مکمل این گیاه قادر به بهبود شاخص‌های التهابی ناشی از کوفتگی عضلانی نبوده است (۱۳)، عصاره آبی آن با متعادل سازی سطوح هورمونی و گلوکز، خنثی کردن سموم و بهبود عملکرد کبد قادر به کاهش میزان فشار اکسایشی است (۱۴). بنابراین از نقطه نظر تئوری منطقی به نظر می‌رسد میزان کارایی این عصاره در ارتقای عملکرد پروتئین‌های بافت نخاع مورد بررسی قرار گیرد.

در کنار مکمل گرده خرما، افزایش سطح فعالیت بدنی یکی از عوامل مطرح در هوموستاز هورمون‌ها، میزان تراکم بافت چربی، بهبود عملکرد قلب و کبد، کنترل سطح کلسترول و گلوکز خون است. در واقع فعالیت بدنی منظم یک استراتژی غیردارویی امیدوارکننده برای تعدیل ردوکس، بهبود متابولیسم و افزایش ترشح آدیپوکین محسوب می‌شود (۱۵). از این منظر، یکی از جنبه‌های مبهم کنونی ارتباط فعالیت‌های بدنی براساس متغیرهای شکل و مدت تمرین با میزان نفوذپذیری BSCB است (۹). در این راستا تمرینات مقاومتی شامل تمرینات با وزنه و تمرینات توانی موجب سازگاری‌های فیزیولوژیکی متفاوتی می شود. این تمرینات با سرکوب فاکتورهای التهابی TNF α، IL 6، IL1 β، و MCP 1 و افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو یک اثر پیشگیرانه دارند (۱۳, ۱۶). اینکه تمرینات مقاومتی بواسطه مکانیسم‌های ذکر شده همراه با کاهش گلوتاتیون سبب چه تغییراتی در پروتین هـای اتصال محکم و اتصال چسبنده سد خونی- نخاعی می‌شود، نیاز به بررسی دارد. از طرفی، مصرف مکمل‌های آنابولیک- آندروژنی (AAS) عموماً هنگام تمرینات مقاومتی مجاز است. چنین تصور می‌شود که تستوسترون از طریق الزام گیرنده‌های خاص آندروژنی بر عروق نخاعی اثرگذار باشد (۱۷). با اینحال میزان اثرگذاری آن بر سایر پروتئین‌های سد نخاعی- خونی مشخص نیست. لذا لزوم بررسی اثرات همزمان مصرف تستوسترون بر تغییرات ژنتیکی و ظرفیت سنتز مولکولی این سد قابل توجیه است.

در مجموع، با توجه به فقدان داده‌های مربوط به اثر تستوسترون/ مکمل گرده خرما و تمرین مقاومتی بر میزان تغییرات پروتئین‌های TJ و AJ سد نخاعی- خونی، لزوم شناسایی میزان اثر یا تداخل این مداخلات ضروری به نظر می‌رسد. در این رابطه ارزیابی موردی میزان بیان ژن یا میزان سنتز پروتئین‌های ویژه نخاعی یکی از محدودیت‌های پژوهشی حوزه تجزیه و تحلیل سلولی تلقی می‌شود (۱۸). بر این اساس در این مطالعه اثر چهار هفته مصرف عصاره گرده خرما، تستوسترون و تمرین مقاومتی بر میزان بیان ژن و بیان پروتئین‌های اوکلودین و کادهرین بافت نخاع مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج این مطالعه اطلاعات با ارزشی در رابطه با میزان نفوذپذیری سد BSCB در اختیار متخصصان علوم ورزشی، پزشکی، تغذیه و سایر گروه‌های حوزه درمان آسیب‌های نخاعی قرار خواهد داد.

## روش کار

در یک مگاپروژه تجربی با طرح پس آزمون/گروه کنترل تعداد ۳۰ رت نر نژاد ویستار با دامنه سنی ۸ تا ۱۰ هفته و وزن ۲۲۰- ۲۰۰ گرم از انستیتو پاستور تهران تهیه گردید. این آزمودنی‌ها پس از انتقال به پانسیون آزمایشگاه هیستوژنوتک در قفس‌هایی با سایز استاندارد و چرخه روشنایی ۱۲ ساعته با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه در ۶ گروه کنترل؛ تمرین مقاومتی؛ عصاره گرده خرما (DPP)؛ تستوسترون سـنتتیک؛ عصاره DPP و تمرین مقاومتی؛ تستوسترون و تمرین

مقاومتی در محیطی با دمای ۳ ±۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. کلیه مراحل آزمایشگاهی براساس دستورالعمل تشکیل، سطح‌بندی و شرح وظایف کمیته‌های اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی با کد IR.UT.SPORT.REC.1397.028 انجام شد.

در گروه تمرین مقاومتی چهار هفته تمرین فزاینده بر روی نردبان ۱۱۰ سانتی متری دو کاناله با مشخصات پنجاه پله ۵۰ سانتی متری با فواصل ۲ سانتی متری و شیب ۸۰ درجه انجام گردید. در این پروتکل از وزنه‌های سربی ماهی گیری چسبیده شده به دم رت ها (۲-۱ سانتی متر بعد از محل رویش مو)، به عنوان مقاومت استفاده شد. در این راستا پس از دو هفته آموزش و آشناسازی، تمرین در هفته اول با وزنه ۴۰ درصد وزن حیوانات شروع و سپس تا ۷۵ درصد وزن آن‌ها در پایان هفته چهارم ادامه یافت. بدین منظور رت ها ابتدا در پایین پله قرار گرفته و سپس توسط ضربات بسیار آهسته یا لمس دم آن‌ها جهت بالا رفتن برانگیخته می‌شدند. از اینرو، در این مطالعه از هیچگونه پاداش و تحریک غیرطبیعی مانند تحریک الکتریکی، آب سرد یا فشار هوا استفاده نشد. یک تکرار موفق زمانی بود که حیوان بتواند در زمان ۸ ثانیه به صورت کامل تمام پله‌ها را بالا برود. تعداد تکرارها در هر جلسه ۸ تا ۱۲ تکرار در نظر گرفته شد. وقتی آزمودنی به بالای نردبان می رسید بعد از ۲ دقیقه استراحت برای تکرار بعدی آماده می‌شد. به منظور گرم کردن و سرد کردن حیوانات از فرمول ۵ بار بالا رفتن بدون وزنه از نردبان استفاده شد (۱۳, ۱۹).

جهت تهیه عصاره DPP مقادیر کافی از پودر گرده نخل‌های نر شهر شهداد استان کرمان تهیه و تا زمان استفاده در یخچال‌های پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی استان البرز نگهداری شد. در فرآیند عصاره گیری ابتدا ۲۵۰ گرم از گرده مورد نظر در دستگاه پرکولاتور (مدل 10lit، شرکت فناوران بایامد) ریخته شد. سپس در سه بار تکرار محلولی به میزان ۶۷۰ میلی لیتر در ترکیب با اتانول ۹۰ درصد بدست آمد. این عصاره‌ها توسط دستگاه تقطیر در خلأ تغلیظ و حلال آن بطور کامل حذف گردید. میزان بازده عصاره گیری ۸۵/۲۵ درصد بدست آمد که به صورت گاواژ در ۵ روز در هفته در مدت ۴ هفته با دوز mg/kg ۱۰۰ به گروه‌های هدف داده شد. همچنین از تستوسترون سنتتیک با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ساخت شرکت ایران هورمون به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در این مداخله رت ها پنج روز در هفته mg/kg ۲ تستوسترون سنتتیک را به صورت زیر جلدی دریافت نمودند (۲۰).

به منظور حذف اثر حاد تمرین، ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه و پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، نمونه گیری خونی از گروه‌های پژوهش در حالت بیهوشی انجام شد. در ادامه با قربانی شدن حیوان، نخاع به دقت از بدن خارج و در محلول فرمالین ۱۰ درصد و بافر فسفات به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس مراحل آب گیری با استفاده از الکل‌های درجه بندی شده انجام و با پارافین قالب گیری شد. در نهایت برش‌های ۵ میکرونی ایجاد شده با دستگاه میکروتوم (مدل DS9502، شرکت دید سبز) روی لام شیشه‌ای آغشته به چسب سیلان جهت رنگ آمیزی H&E قرار گرفت (۲۱). میزان بیان ژن‌های اوکلودین و کادهرین بافت نخاع با استفاده از کیت‌های شرکت دنا-زیست آسیا طبق روش Real-time PCR ارزیابی شد. در این روش چون اسیدنوکلئیک هدف از نوع RNA بود، به یک مرحله اضافی تبدیل RNA به DNA با استفاده از آنزیم نسخه بردار معکوس ۱ یا Real-time نیاز داشتیم. در مرحله آماده‌سازی، ابتدا کل RNA موجود در نمونه بافت استخراج شد. سپس پرایمرهایی برای ژن اوکلودین و کادهرین از شرکت پارس توس سفارش داده شد. در مرحله بازکردن RNA با افزایش دما تا ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ساختارهای ثانویه و پیچوتاب‌های RNA های نمونه از همدیگر باز شد. همچنین غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری تعیین و با استفاده از آنزیم کپی برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. در نهایت cDNA حاصل، جهت حذف مقادیر ژنومی با آنزیم DNase I تیمار و به مرحله تکثیر رسید (جدول ۱). از طرفی میزان بیان پروتئین‌های اوکلودین و کادهرین با استفاده از روش وسترن بلات مطابق با دستورالعمل تاتسوتا و همکاران (۲۰۱۵) توسط سازمان مشاوره تحقیقاتی RCO با برند تجاری هیستوژنوتک صورت گرفت. در این تکنیک برای شناسایی یک پروتئین از مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌های استخراج شده از سلول و بافت استفاده می‌شود. سه مرحله جداسازی براساس اندازه پروتئین‌ها توسط ژل SDS-PAGE، انتقال به غشای کاغذی و نشاندار کردن پروتئین‌های هدف با استفاده از آنتی‌بادی های اولیه و ثانویه فرآیند کلی این روش محسوب می‌شوند (۲۲).

**جدول ۱.** توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت سنجش بیان ژن‌های اوکلودین و کادهرین

| توالی پرایمر/ ژن | TM |
|---|---|
| **اوکلودین** | |
| Forward: 5´GGTGATCGGTCCCAACAAGGA -3´ | ۵۷,۱ °c |
| Reverse: 5´-CACGCTGGCACAGCCACTC -3´ | ۵۶,۴ °c |
| **کادهرین** | |
| Forward: 5´-CACGGCCTTCCCTACTTCAC- 3´ | ۶۳,۵ °c |
| Reverse: 5´-TGCAAGTGCATCATCGTTGT- 3´ | ۶۲,۲ °c |

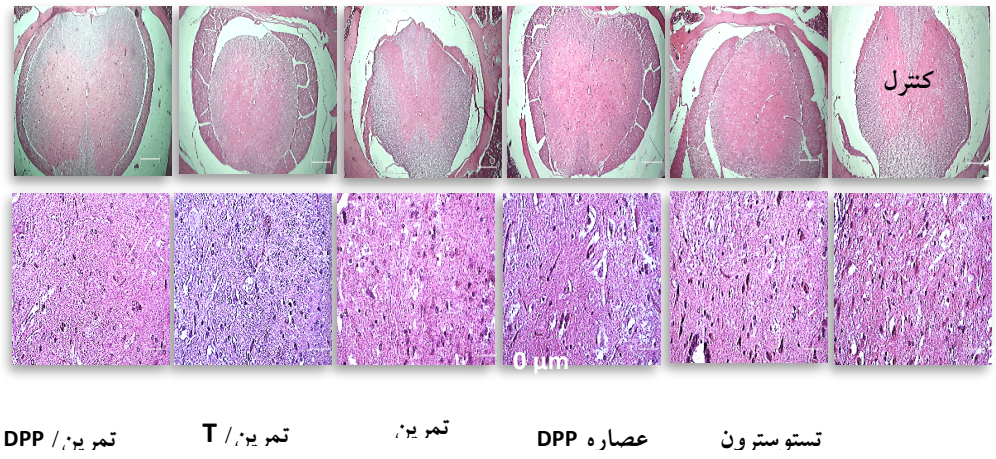
به منظور توصیف داده‌های جمع آوری شده از شاخص‌های گرایش مرکزی و پراکندگی و جهت بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو- ویلک استفاده شد. جهت آزمون اثر اصلی تمرین، تستوسترون سنتتیک/ عصاره گرده خرما و اثر تعاملی تمرین و دارو بر متغیرهای وابسته از تحلیل واریانس دو طرفه استفاده گردید. در صورت مشاهده تفاوت معنادار، محل تفاوت توسط آزمون تعقیبی بونفرونی مشخص شده است. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۲۳ انجام و نتایج در سطح معناداری ۰/۰۵ همراه با اشکال و گراف‌های حاصل از نرم افزار اکسل گزارش شده است.

## یافته‌ها

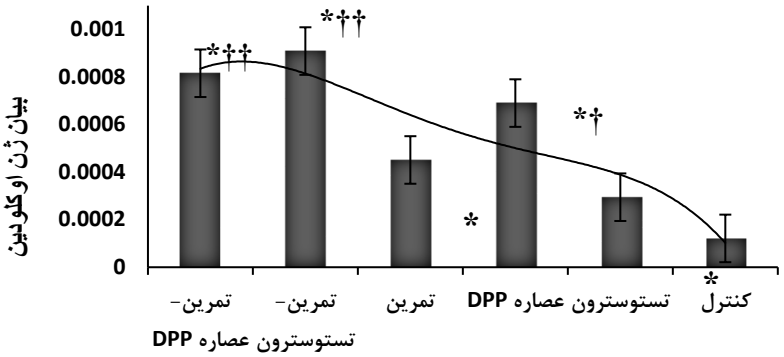
نتایج حاصل از رنگ آمیزی بافتی به روش H&E بیانگر تغییرات بارز در بافت نخاعی گروه‌های تستوسترون و تعاملی شامل افزایش لیپولیز، کاهش تعداد و اندازه آدیپوست ها بود. همچنین تعداد سلول‌های التهابی سیستم عصبی این گروه‌ها بصورت معناداری کاهش داشت (P<۰/۰۵) (شکل ۱). چهار هفته تمرین مقاومتی (η=۰/۳۷۳, ۰/۰۱۰ , F=۱۰/۰۸P)، دریافت تستوسترون و گرده خرما (η=۰/۴۳۰, ۰/۰۰۵ , F=۱۳/۰۰P=) موجب افزایش معنادار بیان ژن اوکلودین شد. با اینحال میزان افزایش بیان این ژن درگروه DPP به طور قابل توجهی بیشتر از گروه تستوسترون سنتتیک بود (P=۰/۰۰۱). همچنین تعامل تمرین مقاومتی و دارو (DPP و تستوسترون) اثر سینرژیکی بر میزان بیان این ژن داشت (F=۱۳/۹۹, P=۰/۰۰۱, η=۰/۶۷۲). با وجودی که بیشترین میزان بیان ژن اوکلودین هنگام استفاده ترکیبی از تستوسترون سنتتیک قابل مشاهده بود، اما از نظر آماری بین میزان اثرگذاری آن با ترکیب عصاره DPP تفاوت معناداری وجود نداشت (P=۰/۰۵۹) (شکل ۲).

در رابطه با بیان ژن کادهرین نخاعی، تمرین مقاومتی (η=۰/۲۶۵ , F=۶/۴۰, P=۰/۰۱۵)، دریافت تستوسترون و گرده خرما (η=۰/۴۴۱ , F=۹/۷۰, P=۰/۰۰۴η=) سبب افزایش معنادار بیان این ژن شد. با اینحال بین میزان اثرگذاری این سه مداخله تفاوت معناداری دیده نشد (P=۰/۸۶۶). همچنین تعامل تمرین مقاومتی و دارو (DPP وتستوسترون) دارای اثر سینرژیکی بر بیان ژن این پروتئین بود (F=۱۵/۰۸, P=۰/۰۰۱, η=۰/۷۲۸). بیشترین میزان بیان ژن کادهرین در هنگام ترکیب همزمان تمرین مقاومتی و عصاره گرده خرما قابل مشاهده بود. با اینحال از نظر آماری بین اثر هم افزایی عصاره DPP و تستوسترون تفاوت معناداری وجود نداشت (P=۰/۰۶۶) (شکل ۳).

در نهایت، تمرین مقاومتی سبب تغییر معنادار میزان سنتز پروتئین اوکلودین (F=۰/۹۵۱, P=۰/۴۰۴, η=۰/۰۹۶) و کادهرین (η=۰/۰۷۹ , F=۰/۷۸۳, P=۰/۶۴۷η=) نشد. با اینحال دریافت داروها (η=۰/۲۶۱ , F=۵/۲۹, P=۰/۰۲۱η=)؛ (F=۵/۰۸, P=۰/۰۳۳, η=۰/۲۵۲) و تعامل تمرین مقاومتی با داروها (F=۸/۳۱۸, P=۰/۰۰۱, η=۰/۸۳۹)؛ (F=۸/۶۲۴, P=۰/۰۰۱, η=۰/۸۶۲) بیان این پروتئین‌ها را به ترتیب افزایشی کرد. نتایج آزمون بن فرونی نشان داد اثرگذاری مداخله دارو تنها مربوط به تستوسترون سنتتیک بوده است. از این رو، بین میزان اثرگذاری گرده خرما و تستوسترون بر بیان پروتئین اوکلودین (P=۰/۰۱۶) و کادهرین (P=۰/۰۱۲) نخاعی تفاوت معناداری وجود داشت. در هر دو پروتئین علی رغم قابل مشاهده بودن اثر سینرژیک تمرین مقاومتی و مکمل DPP در بیان پروتئین‌ها؛ بیشترین میزان سنتز اوکلودین (P=۰/۰۲۶) و کادهرین (P=۰/۰۱۷) هنگام تعامل تمرین مقاومتی و مکمل تستوسترون مشاهده شد (شکل ۴).

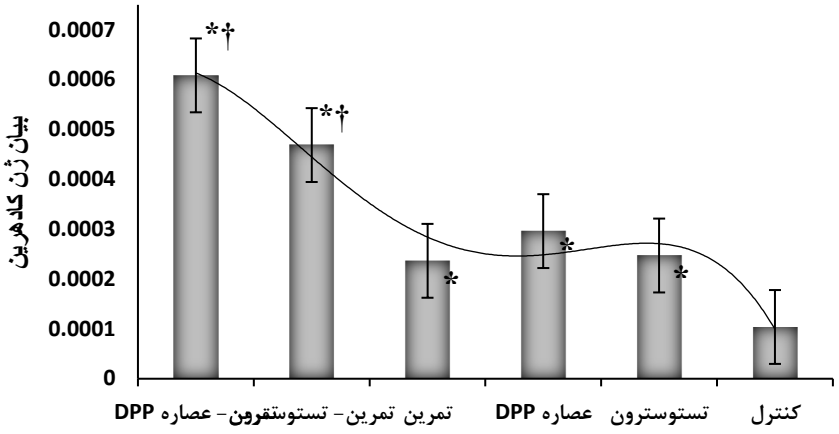



**شکل ۱.** فتومیکروگراف نوری بافت نخاع گروه‌ها با رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین با بزرگ نمایی ×۱۰۰ (100 µm)

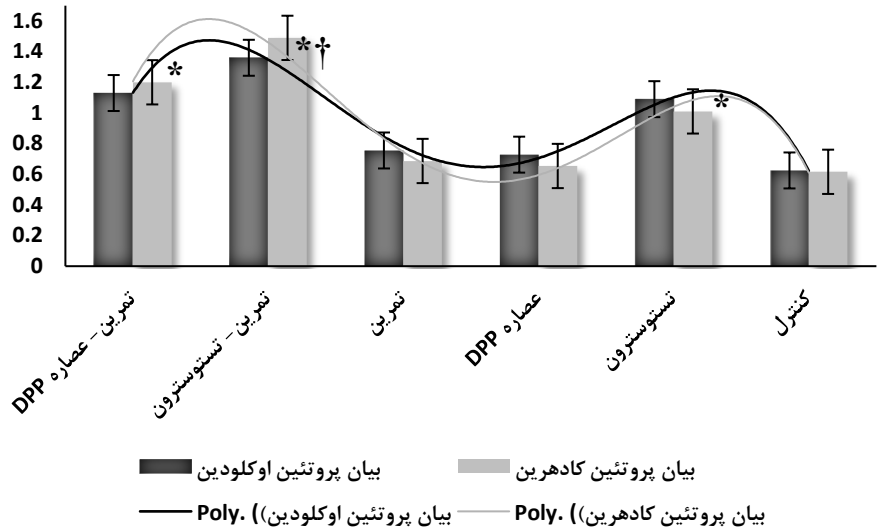



**شکل ۲.** اثرات تمرین مقاومتی، تستوسترون و عصاره گرده خرما بر بیان ژن اوکلودین سد نخاعی- خونی رت های نر

* نشانه افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل، †* نشانه افزایش معنادار نسبت به گروه تمرین و تستوسترون، ††* نشانه افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل، تستوسترون، عصاره DPP و تمرین مقاومتی




**شکل ۳**. اثرات تمرین مقاومتی، تستوسترون و عصاره گرده خرما بر بیان ژن کادهرین سد نخاعی- خونی رت های نر
* نشانه افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل، †* نشانه افزایش معنادار نسبت به گروه تمرین، عصاره DPP و تستوسترون




**شکل ۴**. اثر تمرین مقاومتی، تستوسترون و عصاره گرده خرما بر بیان پروتئین اوکلودین و کادهرین سد نخاعی- خونی رت های نر.
در هر دو پروتئین: * افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل، عصاره DPP و تمرین مقاومتی †* افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل، تستوسترون، عصاره DPP، تمرین مقاومتی و تمرین- عصاره DPP

## بحث

هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثرات مستقل و تعاملی تمرین مقاومتی، تستوسترون سنتتیک و عصاره گرده خرما بر بیان ژن و سنتز پروتئین‌های اوکلودین و کادهرین سد نخاعی- خونی موش‌های صحرایی نر جوان بود. در این راستا ارزیابی بافت شناسی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین نشان داد میزان نفوذپری سد BSCB رت های گروه تستوسترون و ترکیبی نسبت به سایر گروه‌ها کاهش و یکپارچگی اتصالات اندوتلیال آن‌ها افزایش یافته است. احتمالاً یکی از علل این اثر، کاهش حضور سلول‌های التهابی در بافت سیستم عصبی و عدم توانایی آن‌ها در مهاجرت از سدها باشد (۲۳). همچنین براساس نتایج ما افزایش یکپارچگی سد خونی- نخاعی می‌تواند ناشی از افزایش بیان پروتئین‌های اتصالات محکم و اتصالات چسبنده باشد. در واقع یکپارچگی این سد وابسته به اتصالات محکمی است که پروتئین‌های تخصصی آن (ZO-1، ZO-2، کلودین- ۵ و اوکلودین) مسئول حفظ ساختار سه بعدی هستند (۲۴). از طرفی اختلال در تولید و میزان بیان کادهرین به عنوان یکی از اتصالات چسبنده سد از علل مهم بروز بیماری‌های متابولیکی و سرطان است. از اینرو وجود این پروتئین‌های تخصصی در بافت ضروری بوده و اختلال در عملکرد ژنی آن‌ها با ایجاد اختلال در سنتز نوع پروتئین نقش مهمّی در عفونت باکتریایی، التهاب، آپوپتوز و پیشرفت تومورها دارند (۲۵). بر مبنای ادبیات موجود، استفاده از مکمل‌های گیاهی یا فعالیت‌های ورزشی احتمالاً راهکارهای مؤثری در تنظیم سطوح این پروتئین‌ها هستند. این شواهد نشان می‌دهد که انتخاب سبک زندگی قادر به تنظیم سد BSCB از لحاظ ساختاری و عملکردی است.

نتایج ما نشان داد چهار هفته تمرین مقاومتی، میزان بیان ژن پروتین اوکلودین سد خونی- نخاعی را نسبت به گروه کنترل افزایش داده است. این پژوهش اوّلین مطالعه‌ای است که افزایش بیان ژن پروتئین‌های تخصصی سد نخاعی آزمودنی‌های سالم متعاقب تمرین مقاومتی نشان می‌دهد؛ زیرا قبلاً تنها اثر این تمرینات در بیماران عصبی ارزیابی شده

است. الجنگی و همکاران در یک بررسی علمی نشان دادند تمرینات قدرتی و استقامتی علاوه بر حفظ پروتئین‌های TJ بافت نخاع، از طریق محدود کردن ورود سلول‌های خودواکنشی T به CNS، یکپارچگی BBBبیماران MS را ارتقا می‌دهند (۲۶). اینکه فعالیت‌های هوازی از طریق تنظیم آنزیم‌های فسفوریلاسیون پروتئین‌های کلودین-۱ و اوکلودین نقش مهمّی در جلوگیری از آپوپتوز سلول‌های سالم روده یا افزایش آپوپتوز سلول‌های سرطانی دارند، کاملاً مشخص است (۲۷). از طرفی فعالیت‌های قدرتی احتمالاً از طریق بهبود سطح تماس عروق مغزی و افزایش عملکرد متابولیک سلول‌های اندوتلیال، میزان استرس اکسیداتیو نورون‌های عصبی را کاهش می‌دهند. به علاوه این تمرینات با افزایش سطح فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و فاکتور رشد شبه انسولین منجر به افزایش غلظت سایتوکین های ضد التهابی و کاهش سایتوکین های پیش التهابی می‌شوند (۲۸). این نتایج در راستای تحقیقاتی هستند که نشان داده‌اند استرس اکسیداتیو با تغییر ساختار و موقعیت کلودین ها انسجام سدها را مختل می‌کنند. همچنین براساس نتایج جمع بندی شده مالکیویچ و همکاران، فعالیت بدنی از طریق کنترل عواملی از جمله سیستم رنین- آنژیوتانسین و نورآدرنرژیک مغز، عملکرد اتونوم مرکزی و مسیر کینورنینین سد BBB را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۹). این نتایج نشان دهنده نقش بالقوه شرطی سازی تمرینات ورزشی بر مؤلفه‌های اتصالات محکم است که در نهایت منجر به بهبود عملکرد اندوتلیال و افزایش تراکم مویرگ‌های سیستم عصبی می‌شود. اینکه کدامیک از سایتوکین های ضد التهابی با تنظیم بیان اوکلودین میزان اختلال اتصالات محکم مغز را کاهش و عملکرد سد خونی- نخاعی را بهبود می‌بخشند، باید در مطالعات آینده بررسی شود. از سوی برخی محققان معتقدند فقط ورزش اجباری از جهت امکان دستکاری شدت، مدت و تعداد تکرار، پروتکل مفیدی در محافظت عصبی و تغییر متابولیسم مغز است (۱۶, ۲۱). با اینحال یعقوبی و همکاران نشان دادند هر دو تمرین ورزش اجباری و اختیاری ابزار مفیدی برای CNS از جهت افزایش بیان ژن دو پروتئین اوکلودین و کلودین ۵ هستند (۳۰).

جدیدترین یافته ما نشان داد تمرین مقاومتی علاوه بر افزایش بیان ژن پروتئین‌های اتصالات محکم سد نخاعی- خونی باعث افزایش بیان ژن مولکول چسبنده یا اتصالی کادهرین می‌شود. انتظار می‌رود ضمن این اتفاق سطوح RNA طیفی از پروتئین‌های دیگر سد افزایش یافته باشد که طبیعتاً سبب افزایش ناقلین برون ریز ژن از جمله MDR1 خواهد شد (۳۱). علیرغم این نتایج دلگرم کننده، چندین مطالعه اثرات منفی ورزش طولانی مدت بر میزان نفوذپذیری BBB را گزارش کرده‌اند. از نظر این پژوهشگران فعالیت بدنی شدید و طولانی مدت با افزایش آنزیم‌های کلیدی فسفوریلاسیون، عملکرد پروتئین‌های اتصالی را با اختلال مواجه می‌کند (۹). اگرچه هنوز الگو و معیار مناسبی برای مقایسه این یافته‌ها وجود ندارد، احتمالاً علت تفاوت در نتایج مربوط به تفسیر نادرست تغییرات بیان ژن و پروتئین و ارتباط آن با میزان نفوذپذیری باشد. در این زمینه برخی از پژوهشگران افزایش بیان ژن را معادل کاهش نفوذپذیری تفسیر کرده‌اند (۳۲)؛ در حالیکه در این زمینه باید افزایش سنتز پروتئین را معیار قرار داد. نتایج ما نشان می‌دهد ۴ هفته تمرین مقاومتی منحصراً می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن پروتئین‌های اوکلودین و کادهرین شود. در واقع اثرگذاری این مداخله به مرحله بیان پروتئین یا مرحله بالفعل کاهش نفوذپذیری سد نرسیده است. از طرفی خدادوست و همکاران به این نتیجه رسیدند که تمرینات ورزشی تنها بر نشانگرهای نفوذپذیری سد خونی- مغزی و وضعیت فاکتور نوروتروفیک آزمودنی‌های نر دارای وزن طبیعی تأثیرگذار است (۳۳). همچنین شواهد روز افزونی مبنی بر افزایش قابلیت نفوذ سد خونی- نخاعی در شرایط متغیر توأم با افزایش گرما وجود دارد (۳۴). این داده‌ها حاکی از این است افزایش گرما مستقل از علت آن اثرات قابل توجهی بر سلول‌های عصبی، گلیال، اندوتلیال و کارکرد سدها دارد. هرچند در این پژوهش دمای بدن رت های گروه تمرینی اندازه گیری نشده است؛ می‌توان فرض کرد شدت ۴ هفته تمرین مقاومتی به اندازه‌ای بوده است که باعث افزایش دما و کنترل بیان پروتئین‌های اوکلودین و کادهرین شده است.

در خصوص مکمل تستوسترون سنتتیک یافته‌های این مطالعه نشان داد ۴ هفته مصرف آن موجب تغییرات افزایشی میزان بیان ژن اوکلودین و کادهرین در مقایسه با گروه کنترل شده است. با اینحال، این مکمل برخلاف گرده خرما و تمرین مقاومتی قادر به افزایش معنادار نمود پروتئین‌های اتصال محکم و چسبنده نخاعی نیز شده است. این یافته نشان دهنده این است که مکمل تستوسترون می‌تواند جایگزین مناسبی برای افزایش سنتز پروتئین‌های سد خونی- نخاعی و کاهش نفوذپذیری آن در آزمودنی‌های سالم باشد. تا امروز پژوهش‌های محدودی اثرات هورمون‌های استروئیدی را بر عملکرد عروق مغزی بررسی کرده‌اند. براساس داده‌های موجود تستوسترون قادر به تحریک بیان پروتئین‌های کلودین،ZO-1 و JAM-A سد خونی- مغزی و سد بیضه- خون (BTB) موش‌های نر از طریق مکانیسم‌های ژنی و غیرژنی سلول‌های اندوتلیال عروقی است (۳۵). از طرفی طی دوران یائسگی یا در آستانه آن کاهش انسجام سد خونی- مغزی با تغییر هورمون‌های جنسی پلاسمای خون ارتباط معناداری نشان می‌دهد (۳۶). با اینکه از نظر محققان تأثیر نهایی تستوسترون بر عروق عصبی احتمالاً ناشی از قابلیت متابولیک بیشتر دهیدروتستوسترون (DHT) است؛ ظاهراً اثر تستوترون سنتتیک بر اندوتلیال های خونی- نخاعی وابسته به افزایش هورمون‌های در گردش یا ایجاد پیوند موضعی است (۳۷). رحمتی و همکاران در بررسی اثر مداخلات نشان دادند کاهش نفوذپذیری سد خونی- مغزی ناشی از کاهش بیان مقادیر مولکول‌های چسبان (ICAM-1 و VCAM-1) است (۳۸). از سویی در سد خونی- نخاعی پروتئین P-gp یک پمپ انتشار مهم برای تعدادی از هورمون‌های استروئیدی است. در این زمینه برخی محققان معتقدند هورمون‌های پروژسترون و استرادیول باعث افزایش ظهور P-gp از طریق قاعده نسخه برداری می‌شوند. بر این اساس امکان دارد تنظیم بالای این پروتئین علامتی برای کاهش قابلیت نفوذپذیری سد BSCB موش‌های نر سالم باشد (۳۵, ۳۷). با اینحال در این پژوهش میزان تنظیم پروتئین P-gp سد نخاعی- خونی گروه‌های آزمایشی مورد بررسی قرار نگرفته است.

یافته‌های قبلی نشان می‌دهد تزریق دوزهای بیش از حد تستوسترون میزان نمود پروتئین‌های اندوتلیال سیستم اعصاب مرکزی و به همین نسبت عملکرد سد خونی- مغزی را تحت تاثیرگذار قرار می‌دهد (۳۵). بنابراین اثر این مکمل احتمالاً وابسته به دوز مصرفی است. در این رابطه، نیروینسکا و همکاران با بررسی اثر تمرین استقامتی (۶ هفته به

مدت ۶۰-۴۰ دقیقه، ۵ بار در هر هفته) و مکمل تستوسترون (۸۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن) گزارش دادند تستوسترون سطوح کلودین- ۵، اوکلودین و کادهرین سد خونی- نخاعی را صرف نظر از تمرین استقامتی کاهش می‌دهد (۳۲). بنابراین تغییرات واقعی پروتئین‌های تحلیل شده سد نخاعی- خونی پیچیده‌تر از آنچه چیزی است که قبلاً تصور می‌شد. تا آنجا که می دانیم، هنوز دلایل معتبری برای رفع تناقض‌های مربوط به بینش‌های مولکولی و بالینی وجود ندارد. در این راستا برای نتیجه گیری بهتر و جهت گیری مطالعات آینده یک بررسی فراتحلیلی از حوزه‌های مختلف تحقیقات پزشکی مورد نیاز است. اینکه عامل تعیین کننده در این زمینه نوع بافت مورد بررسی است یا خیر و تداخل ایجاد شده در مسیرهای سنتز پروتئین‌های اوکلودین و کادهرین ناشی از نوع مداخله بوده است، باید در کارآزمایی های بالینی دقیق مورد بررسی قرار گیرد.

دیگر یافته مطالعه حاضر نشان داد عصاره گرده خرما اثرگذاری بیشتری نسبت به تمرین مقاومتی و تستوسترون در تقویت بیان ژن پروتین های سد نخاعی- خونی موش‌های نر دارد. این اثر افزایشی در رابطه با بیان ژن اوکلودین معنادار و در رابطه با بیان ژن کادهرین غیرمعنادار بوده است. بنابراین فرضیه استفاده از گرده نـر نخـل خرمـا بـه عنوان یک ترکیب طبیعی جایگزین تقویـت می‌شود (۳۹). از سویی این عصاره اثر معناداری بر بیان پروتئین‌های اوکلودین و کادهرین نداشت. از آنجایکه مطالعات مشابهی در این زمینه یافت نشد، تبیین نتایج ما براساس مکانیسم‌های دقیق سلولی و مسیرهای بیان ژن دشوار است. با اینحال، عابدی و همکاران با بررسی مطالعات مروری مربوط به عصاره گرده خرما گزارش کردند این عصاره با دارا بودن انواع اسید آمینه‌ها و ویتامین‌های مفید، اثرات مثبتی بر هورمون‌های جنسی نمونه‌های انسانی و حیوانی دارد (۴۰). از طرفی نشان داده شده است رادیکال‌های آزاد باعث اختلال در عملکرد اتصالات محکم می‌شوند. بنابراین، تقویت سیستم آنتی اکسیدانی بدن یکی از مکانیسم‌های توجیه کننده اثر این مداخله بر بیان ژن پروتئین‌های سد است. احتمالاً اثرات مفید این گرده بروی مارکرهای التهابی و استرس اکسیداتیو به درصد بالای آلکالوئیدها، تانن ها، فلاونوئیدها، تـرپن هـا و قنـدها مربوط است. همچنین ترکیباتی نظیر روی و کادمیوم می‌توانند از طریق افزایش بیوسنتز ۱۷- بتا هیدورکسی دهیدروژناز باعث افزایش متابولیسم استروئیدها و پروتئین‌ها گردند (۴۱). اینکه کدام یک از ترکیبات گرده خرما مسئول تنظیم بیان ژنی پروتئین‌های سد نخاعی- خونی موش‌های نر است، باید در مطالعات بعدی مشخص شوند. از نظر بعضی محققان بیان پروتئین و ژن‌های مرتبط با آپوپتوز در پاسخ به مصرف گرده نخل کاهش پیدا خواهد کرد (۴۱, ۴۲). بنابراین افزایش بیان ژنی پروتئین‌ها متعاقب استفاده از عصاره DPP شاید مکانیسمی عمل کننده علیه آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال سد نخاعی- خونی باشد. در این راستا اندازه گیری سیتوکین های التهابی و شاخص‌های آپوپتوز همراه با تعیین ارتباط آن‌ها با پروتئین‌های اتصال محکم و چسبنده به یافتن مکانیسم‌های اثرگذار گرده نخل خرما کمک شایانی خواهد کرد.

در نهایت نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر اثرات سینرژیک تمرین مقاومتی/ تستوسترون و عصاره گرده خرما/ تمرین مقاومتی در افزایش بیان ژن و بیان پروتئین اوکلودین و کادهرین سد نخاعی خونی بود. نکته جالب توجه عدم وجود تفاوت معنادار بین میزان تأثیرگذاری ترکیب این دو مداخله بر بیان ژن‌ها و برتری ترکیب تمرین مقاومتی/ تستوسترون در بیان یا سنتز پروتئین‌ها بود. هم راستا با این نتایج، تحقیقات همسویی در رابطه با اثرات اثر هم افزای ترکیب عصاره گرده خرما با تمرین قدرتی بر سطوح گیرنده‌های هورمون لوتئینی و بیان ژن سایر پروئین های اتصال محکم مانند کلودین ۱ وجود دارد (۱۳, ۱۹). به نظر می‌رسد مکانیسم عمل این مداخله بواسطه تعدیل اختلال در نشانگرهای حیاتی یا ارتقای سطوح پروتئین‌های کارکردی باشد. از طرفی بیشترین افزایش بیان پروتئین اوکلودین و کادهرین و متعاقباً آن بیشترین کاهش نفوذپذیری سد نخاعی- خونی هنگام ادغام تمرین مقاومتی با مکمل تستوسترون، تنها براساس تأثیر قابل توجه تستوسترون قابل توجیه است. در این زمینه نیروینسکا و همکاران نشان دادند تمرین استقامتی در مقایسه با دو دوز تستوسترون اثر معناداری بر سطح پروتئین‌های اندوتلیال بافت نخاعی موش‌ها ندارد (۳۲). همچنین نظریان و همکاران با بررسی اثر عصاره گرده نخل (۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، تستوسترون سـنتتیک (۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و تمرین مقاومتی (۵ روز در هفته به مدت چهار هفته) بر پروتئین‌های عامل اتصالات محکم بافت پروستات موش‌های صحرایی نر نشان دادند استفاده همزمان از تمرین و تستوسترون/ گرده نخل اثر هم افزایی بر بیان پروتئین اوکلودین دارد (۲۰). اربطی و همکاران (۲۰۲۱) مکانیسم اثرگذاری این مداخلات را در بافت چربی قهوه‌ای موش‌های صحرایی نر مربوط به افزایش بیان ژن‌های آدیپونکتین، افزایش فعالیت SOD و کاهش فعالیت MDA دانسته‌اند. در این شرایط احتمالاً سطوح فعالیت GPx و GSH نیز کاهشی می‌شود (۱۹). اگرچه این نتایج برای بیماری‌های مرتبط با نفوذپذیری سد نخاعی- خونی دارای اهمیت کاربردی است، بررسی سایر پروتئین‌های مجموعه سد در پژوهش‌های آینده ضروری است. مرور تحقیقات نشان می‌دهد میزان تغییر بیان ژن و سنتز پروتئین سدهای عصبی عموماً متفاوت از یکدیگر است. از طرفی بررسی نمود پروتئین‌های سد نخاعی- خونی با روش وسترن بلات تنها موقعیت نسبی آن‌ها را در یک ترکیب همگن مشخص می‌کند. از این رو، باید میزان تغییر پروتئین‌های غیرسدی بافت نیز در ارزیابی‌های سلولی مد نظر قرار گیرد. با توجه به اینکه BSCB معادل عملکردی BBB است، جهت تفسیر منطقی و تأیید این نتایج به پژوهش‌هایی درباره نقـش کمکـی تمرینات ورزشی و دوزهای عصاره DPP در کاهش نفوذپذیری دو سد نیاز داریم.

## نتیجه گیری

یافته‌های پژوهش حاضر میزان تغییر فیزیولوژیکی قابل برگشت بیان ژن و بیان پروتین های اوکلودین و کادهرین سد BSCB را پس از چهار هفته تمرین مقاومتی و مصرف عصاره DPP/ تستوسترون نشان داد. ظاهراً این مداخلات اثرگذاری بیشتری بر بیان ژن پروتئین‌های اتصال محکم نسبت به اتصالات چسبنده دارند. با اینحال روند اثرگذاری آن‌ها بر بیان پروتئین‌های اوکلودین و کادهرین کاملاً مشابه است. علی رغم اینکه عصاره DPP می‌تواند جایگزین مناسبی برای افزایش بیان ژن پروتئین‌ها نسبت به تستوسترون و تمرین مقاومتی باشد، مصرف مجزای تستوسترون از لحاظ افزایش بیان پروتئین‌های اوکلودین و کادهرین دارای برتری است. بنابراین استفاده منفرد از تستوسترون با

دوز ۲ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن باعث کاهش نفوذپذیری سد نخاعی- خونی نمونه‌های نر سالم حیوانی می‌شود. با اینحال، جهت افزایش اثر سینرژیک، ترکیت تمرین مقاومتی با تستوسترون اولویت بیشتری دارد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از نتایج رساله دکتری با شماره طرح ۱۴۸۰۰۰۶۰۲۹۱۳۷۰۰۰۱۷۱۶۲۷۰۳۵۷۱ و کد اخلاق IR.UT.SPORT.REC.1397.028 در سال ۱۴۰۱ بوده که به تأیید معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد واحد تهران مرکزی رسیده است. مراتب قدردانی خود را از همکاران و اساتید محترم اعلام می‌داریم.

## References


1. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010;**468**(7323):562-566. **doi:** 10.1038/nature09513
2. Verheggen ICM, de Jong JJA, van Boxtel MPJ, Gronenschild EHBM, Palm WM, Postma AA, et al. Increase in blood–brain barrier leakage in healthy, older adults. *GeroScience*. 2020;**42**(4):1183-1193. **doi:** 10.1007/s11357-020-00211-2
3. Wilhelm I, Nyúl-Tóth Á, Suciu M, Hermenean A, Krizbai IA. Heterogeneity of the blood-brain barrier. *Tissue Barriers*. 2016;**4**(1):e1143544. **doi:** 10.1080/21688370.2016.1143544
4. Sauer R-S, Kirchner J, Yang S, Hu L, Leinders M, Sommer C, et al. Blood–spinal cord barrier breakdown and pericyte deficiency in peripheral neuropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017;**1405**(1):71-88. **doi:** https://doi.org/10.1111/nyas.13436
5. Kuo W-T, Odenwald MA, Turner JR, Zuo L. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2022;**1514**(1):21-33. **doi:** https://doi.org/10.1111/nyas.14798
6. Sun R, Yu D. [Inhibitory effect of miR-429 on expressions of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 proteins to improve the permeability of blood spinal cord barrier in vitro]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2020;**34**(9):1163-1169. **doi:** 10.7507/1002-1892.202001097 **pmid:** 32929911
7. Lv J, Hu W, Yang Z, Li T, Jiang S, Ma Z, et al. Focusing on claudin-5: A promising candidate in the regulation of BBB to treat ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*. 2018;**161**:79-96. **doi:** https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.12.001
8. Yu W, Yang L, Li T, Zhang Y. Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Frontiers in Oncology*. 2019;**9**. **doi:** 10.3389/fonc.2019.00989
9. Chopra N, Menounos S, Choi JP, Hansbro PM, Diwan AD, Das A. Blood-Spinal Cord Barrier: Its Role in Spinal Disorders and Emerging Therapeutic Strategies. *NeuroSci*. 2022;**3**(1):1-27. **pmid:** doi:10.3390/neurosci3010001
10. Kumar H, Jo M-J, Choi H, Muttigi MS, Shon S, Kim B-J, et al. Matrix Metalloproteinase-8 Inhibition Prevents Disruption of Blood–Spinal Cord Barrier and Attenuates Inflammation in Rat Model of Spinal Cord Injury. *Molecular Neurobiology*. 2018;**55**(3):2577-2590. **doi:** 10.1007/s12035-017-0509-3
11. Tahvilzadeh M, Hajimahmoodi M, Rahimi R. The Role of Date Palm (Phoenix dactylifera L) Pollen in Fertility: A Comprehensive Review of Current Evidence. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2016;**21**(4):320-324. **doi:** 10.1177/2156587215609851 **pmid:** 26438718
12. Waly M. Health Benefits and Nutritional Aspects of Date Palm Pollen. *Canadian Journal of Clinical Nutrition*. 2020;**8**:1-3. **doi:** 10.14206/canad.j.clin.nutr.2020.01.01
13. Mousaei M, Azarbayjani MA, Peeri M, Hosseini SA. The Effects of Resistance Training with Palm Pollen on Scleraxis Protein and Gene Expression Levels in the Tendon Tissue of Male Adult Rats. *Jorjani Biomedicine Journal*. 2019;**7**(4):30-39. **doi:** 10.29252/jorjanibiomedj.7.4.30
14. Saleh M, Kokoszyński D, Mousa MA-A, Abuoghaba AA-K. Effect of Date Palm Pollen Supplementation on the Egg Production, Ovarian Follicles Development, Hematological Variables and Hormonal Profile of Laying Hens. *Animals*. 2021;**11**(1):69. **pmid:** doi:10.3390/ani11010069
15. Polito R, Monda V, Nigro E, Messina A, Di Maio G, Giuliano MT, et al. The Important Role of Adiponectin and Orexin-A, Two Key Proteins Improving Healthy Status: Focus on Physical Activity. *Front Physiol*. 2020;**11**:356. **doi:** 10.3389/fphys.2020.00356 **pmid:** 32390865
16. Macêdo Santiago LÂ, Neto LGL, Borges Pereira G, Leite RD, Mostarda CT, de Oliveira Brito Monzani J, et al. Effects of Resistance Training on Immunoinflammatory Response, TNF-Alpha Gene Expression, and Body Composition in Elderly Women. *Journal of Aging Research*. 2018;**2018**:1467025. **doi:** 10.1155/2018/1467025
17. Sun JN, Hou B, Ai M, Yu XY, Cai WW, Qiu LY. [The effect of different types of exercise on the intestinal mechanical barrier and related regulatory factors in type 2 diabetic mice]. *Sheng Li Xue Bao*. 2022;**74**(2):237-245. **pmid:** 35503071
18. Bakhsheshian J, Strickland BA, Mack WJ, Zlokovic BV. Investigating the blood-spinal cord barrier in preclinical models: a systematic review of in vivo imaging techniques. *Spinal Cord*. 2021;**59**(6):596-612. **doi:** 10.1038/s41393-021-00623-7 **pmid:** 33742118
19. Arbati A, Matinhomaee H, Azarbayjani MA, Rahmati-Ahmadabad S. Effect of Resistance Training, Testosterone, and Phoenix dactylifera on Gene Expression of Adiponectin and GLUT4 and Oxidative Stress Markers in Adipose Tissue of Rats. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2021;**31**(203):39-49.
20. Nazarian A, Azarbayjani MA, Atashak S, Peeri M. The effect of palm pollen extract, testosterone enanthate and resistance training on tight junction proteins in the prostate tissue of male rats. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*. 2022;**26**(5):501-509.
21. Mokhtarzade M, Motl R, Negaresh R, Zimmer P, Khodadoost M, Baker JS, et al. Exercise-induced changes in neurotrophic factors and markers of blood-brain barrier permeability are moderated by weight status in multiple sclerosis. *Neuropeptides*. 2018;**70**:93-100. **doi:** 10.1016/j.npep.2018.05.010 **pmid:** 29880392
22. Tatsuta M, Kan-o K, Ishii Y, Yamamoto N, Ogawa T, Fukuyama S, et al. Effects of cigarette smoke on barrier function and tight junction proteins in the bronchial epithelium: protective role of cathelicidin LL-37. *Respiratory Research*. 2019;**20**(1):251. **doi:** 10.1186/s12931-019-1226-4
23. Galea I. The blood-brain barrier in systemic infection and inflammation. *Cell Mol Immunol*. 2021;**18**(11):2489-2501. **doi:** 10.1038/s41423-021-00757-x **pmid:** 34594000
24. Montague-Cardoso K, Malcangio M. Changes in blood-spinal cord barrier permeability and neuroimmune interactions in the underlying mechanisms of chronic pain. *Pain Rep*. 2021;**6**(1):e879. **doi:** 10.1097/PR9.0000000000000879 **pmid:** 33981925
25. Ronaldson PT, Davis TP. Regulation of blood-brain barrier integrity by microglia in health and disease: A therapeutic opportunity. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020;**40**(1_suppl):S6-S24. **doi:** 10.1177/0271678X20951995 **pmid:** 32928017
26. Alajangi HK, Kaur M, Sharma A, Rana S, Thakur S, Chatterjee M, et al. Blood–brain barrier: emerging trends on transport models and new-age strategies for therapeutics intervention against neurological disorders. *Molecular Brain*. 2022;**15**(1):49. **doi:** 10.1186/s13041-022-00937-4
27. Wang Q, Zhou W. Roles and molecular mechanisms of physical exercise in cancer prevention and treatment. *J Sport Health Sci*. 2021;**10**(2):201-210. **doi:** 10.1016/j.jshs.2020.07.008 **pmid:** 32738520
28. Arazi H, Babaei P, Moghimi M, Asadi A. Acute effects of strength and endurance exercise on serum BDNF and IGF-1 levels in older

men. *BMC Geriatr*. 2021;**21**(1):50. **doi:** 10.1186/s12877-020-01937-6 **pmid:** 33441099

29. Małkiewicz MA, Szarmach A, Sabisz A, Cubała WJ, Szurowska E, Winklewski PJ. Blood-brain barrier permeability and physical exercise. *Journal of Neuroinflammation*. 2019;**16**(1):15. **doi:** 10.1186/s12974-019-1403-x
30. Yaghoubi M, Kordi M, Gaeini A. The Effect of Forced and Voluntary Exercise before Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis on the Integrity of the Blood-Brain Barrier and Gene Expression of Some of Tight Junction Proteins. *Journal of Applied Exercise Physiology*. 2020;**16**(32):87-101. **doi:** 10.22080/jaep.2020.19365.1961
31. Wolff G, Davidson SJ, Wrobel JK, Toborek M. Exercise maintains blood-brain barrier integrity during early stages of brain metastasis formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;**463**(4):811-817. **doi:** 10.1016/j.bbrc.2015.04.153 **pmid:** 26056010
32. Nierwińska K, Nowacka-Chmielewska M, Bernacki J, Jagsz S, Chalimoniuk M, Langfort J, et al. The effect of endurance training and testosterone supplementation on the expression of blood spinal cord barrier proteins in rats. *PLOS ONE*. 2019;**14**(2):e0211818. **doi:** 10.1371/journal.pone.0211818
33. Khodadoost M, Negaresh R, Mokhtarzade M, Rabjbar R. Investigation of the relationship between fitness and physical activity level with serum levels of nerve growth factor and markers of blood-brain permeability in people with multiple sclerosis: the role of body composition. *MEDICAL SCIENCES JOURNAL*. 2019;**29**(3):222-231. **doi:** 10.29252/iau.29.3.222
34. Tiscornia GC, Moretta R, Argenziano MA, Amorena CE, Garcia Gras EA. Inhibition of connexin 43 in cardiac muscle during intense physical exercise. *Scand J Med Sci Sports*. 2014;**24**(2):336-344. **doi:** 10.1111/sms.12017 **pmid:** 23206241
35. Atallah A, Mhaouty-Kodja S, Grange-Messent V. Chronic depletion of gonadal testosterone leads to blood-brain barrier dysfunction and inflammation in male mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;**37**(9):3161-3175. **doi:** 10.1177/0271678X16683961 **pmid:** 28256950
36. Dion-Albert L, Bandeira Binder L, Daigle B, Hong-Minh A, Lebel M, Menard C. Sex differences in the blood–brain barrier: Implications for mental health. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2022;**65**:100989. **doi:** https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2022.100989
37. Santos HO, Haluch CEF. Downregulation of Androgen Receptors upon Anabolic-Androgenic Steroids: A Cause or a Flawed Hypothesis of the Muscle-Building Plateau? *Muscles*. 2022;**1**(2):92-101. **pmid:** doi:10.3390/muscles1020010
38. Rahmati MR, Kordi MR, Ravasi AA. Effect of six weeks forced and voluntary training before EAE induction on the expression of some adhesive molecules affecting the blood-brain barrier permeability. *Journal of Sport and Exercise Physiology*. 2022;**15**(1):57-68. **doi:** 10.52547/joeppa.15.1.57
39. Salomón-Torres R, Krueger R, García-Vázquez JP, Villa-Angulo R, Villa-Angulo C, Ortiz-Uribe N, et al. Date Palm Pollen: Features, Production, Extraction and Pollination Methods. *Agronomy*. 2021;**11**(3):504. **pmid:** doi:10.3390/agronomy11030504
40. Abdi F, Roozbeh N, Mortazavian AM. Effects of date palm pollen on fertility: research proposal for a systematic review. *BMC Res Notes*. 2017;**10**(1):363. **doi:** 10.1186/s13104-017-2697-3 **pmid:** 28764804
41. Abdollahi S, Azarbayjani MA, Peeri M, Rahmati-Ahmadabad S. The Health-Related Biological Effects of Date Palm Pollen (DPP) along with Physical Activity: A Narrative Mini-Review. *Jorjani Biomedicine Journal*. 2022;**10**(4):83-91.
42. Lin PY, Stern A, Peng HH, Chen JH, Yang HC. Redox and Metabolic Regulation of Intestinal Barrier Function and Associated Disorders. *Int J Mol Sci*. 2022;**23**(22). **doi:** 10.3390/ijms232214463 **pmid:** 36430939