Jundishapur
Scientific Medical Journal

Research Paper

Regulating Increased Expression of Genes Involved in Mitochondrial Dynamics of Testicular Tissue (PGC1-α and OPA1) in Azoospermia Model Rats in Interventions based on Laser and Physical Activity

Amir Shapouri[1], *Habib Asgharpour[2], Parvin Farzanegi[3], Neda Aghaei Bahmanbeglo[2]

1. PhD student, Department of Physical Education & Sports Sciences, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran.
2. Assistant professor, Department of Physical Education & Sports Sciences, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran.
3. Associated professor, Department of Physical Education & Sports Sciences, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Shapouri A, Asgharpour H, Farzanegi P, Aghaei Bahmanbeglo N. [Regulating Increased Expression of Genes Involved in Mitochondrial Dynamics of Testicular Tissue (PGC1-α and OPA1) in Azoospermia Model Rats in Interventions based on Laser and Physical Activity (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2024; 23(1):89-102. 10.32592/JSMJ.23.1.89

https://doi.org/10.32592/JSMJ.23.1.89

ABSTRACT

Background and Objectives The underlying molecular mechanisms and the effects of physical exercise on azoospermia are not well understood. The purpose of this research is to investigate the effect of cell therapy, laser, and activity on the expression of genes involved in mitochondrial biogenesis in azoospermia model rats.

Subjects and Methods Forty 8-week-old rats were randomly selected, and then the azoospermia model was induced using the drug busulfan at a dose of 40 mg, and after one month, the rats were divided into 8 groups. One month after the creation of a one-time model, stem cells were transplanted in the vas deferens, equaling one million cells for each rat. After a week of cell transplantation, a laser with a wavelength of 632.8 nm, a power of 10 milliwatts, and energy level of 3 joules was applied three times during the entire study period with an interval of one week. After healing of the wound in the cell transplant area on the abdomen, they performed swimming exercises daily for 30 minutes, 5 days per week, continued for 8 weeks.

Results Induction of azoospermia model decreased the expression of PGC1α gene and increased the expression of OPA1 gene, and the implementation of each of the interventional methods of laser, exercise, laser-activity and cell-activity reversed these changes.

Conclusion It can be argued that in azoospermia model rats, the simultaneous use of interventional methods of activity and laser therapy has the best effectiveness.

Keywords Azoospermia, Mitochondrial dynamics, Cell therapy, Laser therapy, Swimming training

Received: 17 Sep 2023
Accepted: 06 Feb 2024
Available Online: 20 May 2024

Corresponding Author:
Habib Asgharpour
Address: Department of Physical Education & Sports Sciences, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran.
Tel: 09113922124
E-Mail: habibasgharpour@gmail.com

Extended Abstract

Introduction

Non-obstructive azoospermia (NOA) is a type of male infertility caused by spermatogenic dysfunction in testicular tissue. Patients with NOA cannot produce sperm or can produce only a very small amount of sperm. In patients with NOA, the structure of the spermatogenic tubules in the testis is disordered, while the maturation of spermatogenic cells is blocked, and the meiosis of spermatogenic cells is stopped (2). It is known that genetic and environmental factors have an effective role in the level of spermatogenesis. Exercise is one of the effective factors in improving the performance of parameters related to sperm, testicular tissue damage, and the process of spermatogenesis in laboratory animals. Some researchers have reported that exercise has a positive effect on these parameters and the signaling related to spermatogenesis (8, 9). However, some results have reported the negative effect of sports training on spermatogenesis performance (10). This highlights the need for the investigation of the effect of exercise training on the molecular pathways affecting spermatogenesis in order to determine the mechanisms underlying the effect of sports training on spermatogenesis. Another non-invasive treatment method is laser therapy. Low-power laser therapy uses light radiation with low intensity in the light range of 540-830 nm. The therapeutic effects of this method are achieved by photochemical reactions that change the permeability of the cell membrane, followed by an increase in the production of mRNA and cell proliferation (division) (14). Low-power laser therapy with low-intensity light radiation causes a change in the permeability of the cell membrane, and then it causes the production of mRNA and cell division. Research results show that ultrasound waves with a mechanical index of 0.40 have a greater effect on the proliferation and colonization of spermatogonial stem cells (14, 15). According to the literature, exercise training can have a potential role in the treatment of infertility. However, the underlying mechanisms are not well defined, which indicates the need for more research in this regard. It has also been stated that (OPA1) OPA1 (22) and PGC-1α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivators 1α) (23) are important mitochondrial factors involved in spermatogenesis. Therefore, these genes can be considered as effective factors in infertility. The aim of this study was to investigate the effect of regular aerobic exercises along with laser and cell therapy on the expression of genes involved in the mitochondrial dynamics of testicular tissue (OPA1 and PGC-1α) in azoospermia model rats.

Methods

In this experimental research, 40 8-week-old rats were randomly selected, and then the azoospermia model was induced with busulfan at a dose of 40 mg. One month later, the rats were divided into 8 groups: 1) healthy control, 2) azoospermia, 3) sham, 4) azoospermia + laser therapy, 5) azoospermia + activity, 6) azoospermia + cell therapy, 7) azoospermia + laser therapy + activity and 8) azoospermia + cell therapy + exercise. One month after the creation of a one-time model, stem cells were transplanted in the vas deferens region, equaling one million cells for each rat. One week after cell transplantation, a laser with a wavelength of 632.8 nanometers, a power of 10 mW, and energy level of 3 joules was applied in three repetitions during the entire study period with an interval of one week. After healing of the wound in the cell transplant area on the abdomen, they performed swimming exercises daily for 30 minutes, 5 days per week, continued for 8 weeks. Tissue sampling was done from testicular tissue of the rats under completely similar conditions and in basic conditions (two days after the end of the training period). In order to eliminate the acute effect of training, sampling of animals was done 48 hours after the last swimming training program. For this purpose, the animals were first anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (30-50 mg/kg) and xylazine (3-5 mg/kg) and then sacrificed. Then, the transplanted tissues were evaluated for genetic studies. To check the expression of the studied genes in each group, real time PCR technique was used to examine the tissues. To analyze the findings of this research, Kolmogorov-Smirnov test, one-way analysis of variance, and Tukey's test were used to compare different groups. All calculations were done using SPSS ver.22 and at a significant level of $P \leq 0.05$.

Results

The results of our research showed that induction of azoospermia model decreased the expression of PGC-1α gene in testicular tissue of rats. The implementation of each of the intervention methods of laser therapy, exercise, laser therapy+exercise, and cell therapy+exercise significantly increased the expression of this gene in testicular tissue compared to the patient group. Also, the induction of the azoospermia model caused a significant increase in the expression of the OPA1 gene in the testicular tissue of rats, and only the combination of laser therapy+exercise and cell therapy+exercise intervention methods caused a significant decrease of this gene in the testicular tissue compared to the azoospermia group.

Conclusion

In line with this research, Kochaki et al. showed that induction of azoospermia model reduced the expression level of PGC-1α, and performing 8 weeks of low-intensity aerobic training increased these indicators (21). Exercise training can improve fertility through mechanisms related to improving mitochondrial function (24). PGC-1α regulates the genetic program that adapts cells to respond to energy needs (3). In this study, swimming training alone and in combination with cell therapy and laser therapy significantly increased the levels of PGC-1α gene in testicular tissue of azoospermic model rats, which may be used in the treatment of infertility in these rats. Regarding the expression levels of the OPA1 gene in the testicular tissue of azoospermic rats, swimming exercise alone could not cause significant changes, but in combination with cell therapy and laser therapy, the expression of this gene

Jundishapur
Scientific Medical Journal

decreased significantly, which can be another mechanism to increase fertility in rats. Since OPA1 is involved in maintaining the structure of the middle plates inside the mitochondria, mutations of the OPA1 gene and incomplete protein production lead to the destruction of the structure of these plates. This structural defect in the mitochondria does not allow correct attachment of the mitochondrial DNA to these blades, and their replication is not correct, finally leading to the destruction of the oxidative phosphorylation reactions and energetic deficiency (28, 29). Another function attributed to the OPA1 protein in the cell is the anti-apoptotic effect, which actually prevents the release of cytochrome C and the occurrence of apoptosis by controlling the coherent structure of the inner membrane of the mitochondria and the middle plates (30). Another result of this research was the increase in the expression of the PGC-1α gene in the testicular tissue of azoospermic rats in the laser therapy and laser therapy+exercise groups and the decrease in the expression of the OPA1 gene in the laser therapy+exercise group. Due to the effects of quality stimulation, laser radiation strengthens sperm motility (31). According to the results of the research, each of the interventional methods of swimming training, cell therapy and laser therapy had a significant effect on the expression of the PGC-1α gene in the testicular tissue of azoospermic rats, while in case of the expression of the OPA1 gene, only the combined use of exercise intervention with cell therapy and laser therapy made a significant change. Therefore, it is possible that the combination of swimming exercise with cell therapy and laser therapy can make the rats fertile by making a change in the mitochondrial dynamics of the testicular tissue of experimental azoospermia rats, but a definitive statement requires more research in this regard.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All steps of the present research have been approved by the Research Ethics Committee of Islamic Azad University, Sari branch (IR.IAU.SARI.REC.1398.149).

Funding

This article has no financial sponsor and was done at the personal expense of the authors.

Authors contributions

All authors have contributed equally in writing this article.

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was conducted in the form of a doctoral thesis at the Islamic Azad University, Aliabad Katoul Branch.Hereby, the authors express their gratitude to this academic unit.

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

مقاله پژوهشی

تنظیم افزایش بیان ژن های درگیر در پویایی میتوکندریایی بافت بیضه (PGC1-α و OPA1) در رت‌های مدل آزواسپرمی در مداخلات مبتی بر لیزر و فعالیت جسمانی

امیر شاپوری[۱]، *حبیب اصغرپور[۲]، پروین فرزانگی[۳]، ندا آقائی بهمن بگلو[۲]

۱. دانشجوی دکتری، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، واحد علی‌آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی‌آباد کتول، ایران.
۲. استادیار، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، واحد علی‌آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی‌آباد کتول، ایران.
۳. دانشیار، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Shapouri A, Asgharpour H, Farzanegi P, Aghaei Bahmanbeglo N. [Regulating Increased Expression of Genes Involved in Mitochondrial Dynamics of Testicular Tissue (PGC1-α and OPA1) in Azoospermia Model Rats in Interventions based on Laser and Physical Activity (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2024; 23(1):89-102. 10.32592/JSMJ.23.1.89

https://doi.org/10.32592/JSMJ.23.1.89

CC BY NC

چکیده

زمینه و هدف مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی و تأثیر ورزش بدنی بر آزواسپرمی به خوبی شناخته نشده است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر سلول درمانی، لیزر و فعالیت بر بیان ژن‌های درگیر در بیوژنز میتوکندریایی در رت‌های مدل آزواسپرمی می‌باشد.

روش بررسی ۴۰ سر رت ۸ هفته‌ای به‌صورت تصادفی انتخاب، و سپس مدل آزواسپرمی با داروی بوسولفان با دوز ۴۰ میلی‌گرم القاء و پس از گذشت یک‌ماه در هر گروه رت‌ها به گروه‌های ۱) کنترل سالم، ۲) بیمار، ۳) شم، ۴) بیمار+لیزر، ۵) بیمار+فعالیت، ۶) بیمار+سلول، ۷) بیمار+ لیزر+فعالیت و ۸) بیمار+سلول+تمرین تقسیم بندی شدند. یک‌ماه بعد از ایجاد مدل یک‌بار سلول‌های بنیادی به‌صورت پیوند در ناحیه مجرای دفران به میزان یک میلیون سلول برای هر رت پیوندزده شد، پس از گذشت یک هفته از پیوند سلول، لیزر با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر و توان ۱۰ میلی‌وات و انرژی ۳ ژول به‌صورت سه تکرار در کل دوره مطالعه با فاصله هر هفته یک‌بار اعمال شد و پس از بهبود زخم ناحیه پیوند سلولی بر روی شکم، به‌صورت روزانه ۳۰ دقیقه، ۵ روز در هفته و به‌مدت ۸ هفته تمرینات شنا اجرا نمودند.

یافته‌ها القای مدل آزواسپرمی بیان ژن PGC1-α را کاهش و بیان ژن OPA1 را افزایش داد، که اجرای هر کدام از روش‌های مداخله‌ای لیزر، تمرین، لیزر-فعالیت و سلول-فعالیت این تغییرات رو معکوس نمودند.

نتیجه گیری بهترین تغییرات در گروه تمرین+لیزر مشاهده شد. لذا می‌توان گفت در رت‌های مدل آزواسپرمی استفاده هم‌زمان از روش‌های مداخله‌ای فعالیت و لیزردرمانی دارای بهترین اثربخشی است.

کلیدواژه‌ها آزواسپرمی، پویایی میتوکندری، سلول‌درمانی، لیزردرمانی، تمرینات شنا

تاریخ دریافت: ۲۶ شهریور ۱۴۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۷ بهمن ۱۴۰۲
تاریخ انتشار: ۳۱ اردیبهشت ۱۴۰۳

نویسنده مسئول:
حبیب اصغرپور
نشانی: گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، واحد علی‌آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی‌آباد کتول، ایران.
تلفن: ۰۹۱۱۳۹۲۲۱۲۴
رایانامه: habibasgharpour@gmail.com

مقدمه

حدود ۱۵-۱۰٪ افراد در سنین باروری در جهان نابارور(infertility) هستند که حدود ۵۰٪ از این ناباروری ها متعلق به مردان است. ناباروری مردان با اختلال عملکرد جنسی (sexual dysfunction)، واریکوسل (varicocele)، عفونت سیستم تولید مثل (reproductive system infection)، غدد درون ریز، آزواسپرمی انسدادی (obstructive azoospermia-OA)، آزواسپرمی غیر انسدادی (non-obstructive azoospermia-NOA) و غیره ارتباط نزدیکی دارد. میزان بروز NOA در مردان حدود ۱٪ است که ۱۵-۱۰٪ مردان نابارور را تشکیل می دهد و این یکی از مهمترین دلایل ناباروری مردان است [۱]. آزواسپرمی غیر انسدادی نوعی ناباروری در مردان است که در اثر اختلال عملکرد اسپرماتوژنیک در بافت بیضه ایجاد می شود. بیماران مبتلا به NOA نمی توانند اسپرم تولید کنند یا فقط می توانند مقدار بسیار کمی اسپرم تولید کنند. در بیماران مبتلا به NOA ، ساختار توبول های اسپرم ساز(seminiferous tubules) در بیضه بی نظم است، در حالی که بلوغ سلول‌های اسپرماتوژن مسدود شده و میوز سلول های اسپرماتوژن متوقف می شود [۲].

گیرنده-گاما فعال کننده تکثیر پراکسی زوم یک-آلفا(Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1-α- PGC-1α) یک فعال‌کننده رونویسی است که به‌عنوان یک تنظیم کننده اصلی بیوژنز و عملکرد میتوکندری، از جمله فسفوریلاسیون اکسیداتیو و سم‌زدایی گونه های اکسیژن فعال توصیف می‌شود [۳]. PGC-1α بیان ژن‌های آنتی-اکسیدانی میتوکندری را تنظیم می‌کند، از جمله سوپراکسید دیسموتاز منگنز، کاتالاز، پراکسیردوکسین ۳ و ۵، پروتئین جداکننده ۲، تیوردوکسین ۲، و تیوردوکسین ردوکتاز و در نتیجه از آسیب اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندری جلوگیری می‌کند. اختلال در تنظیم PGC-1α هموستاز ردوکس را در سلول‌ها تغییر می‌دهد و پاسخ التهابی را تشدید می‌کند [۳، ۴]. در طول التهاب، سطوح پایین PGC-1α بیان ژن آنتی‌اکسیدانی میتوکندری را کاهش می‌دهد، استرس اکسیداتیو را القاء می‌کند و باعث فعال شدن فاکتور هسته ای کاپا B می‌شود. در سندرم متابولیک، که با التهاب مزمن درجه پایین مشخص می‌شود، اختلال در تنظیم PGC-1α با تغییر عملکرد میتوکندری و ترویج تجمع گونه‌های اکسیژن فعال، خواص متابولیک بافت‌ها را اصلاح می‌کند. در نتیجه، PGC1α به‌عنوان یک گره ضروری اتصال‌دهنده تنظیم متابولیک، کنترل ردوکس و مسیرهای التهابی عمل می‌کند و یک هدف درمانی جالب است که ممکن است مزایای قابل توجهی برای تعدادی از بیماری‌ها داشته باشد [۵]. فرایند هم-جوشی(fusion) غشای داخلی و حفظ ساختار تیغه‌های میانی درون میتوکندری(Cristae) (فرایندی مهم در حفظ پویایی و تمامیت عملکرد میتوکندری) را پروتئینی به نام آتروفی اپتیک نوع ۱(optic atrophy type 1-OPA1) به عهده دارد. این پروتئین متعلق به خانواده پروتئین‌های داینامین است که دارای فعالیت GTPase بوده و به‌وسیله یک ژن هسته‌ای کد می‌شود [۶]. ژن OPA1 به‌طور دائمی و با سطح بیان mRNA بالا در بافت‌های مغز، کبد، قلب و پانکراس بیان می‌شود. در سطح پروتئین نیز، فرم پیش‌ساز آن و فرم‌های کوتاه و بلند آن در هر بافتی به‌صورت اختصاصی بیان می‌شود [۷].

مشخص شده است که عوامل ژنتیک و محیطی نقش موثر بر سطح اسپرماتوژنز دارد؛ یکی از عوامل موثر بر بهبود عملکرد پارامترهای مرتبط با اسپرم، آسیب های بافت بیضه، و فرآیند اسپرماتوژنز در حیوانات آزمایشگاهی فعالیت ورزشی می باشد و برخی تحقیقات گزاش کرده اند که تمرینات ورزشی نقش مثبت بر این پرامترها و سیگنالینگ مرتبط با اسپرماتوژنز دارد [۸، ۹] ولی برخی نتایج اثر منفی تمرینات ورزشی بر عملکرد اسپرماتوژنز گزاش کرده‌اند [۱۰]. که نشان‌دهنده بررسی اثر تمرینات ورزشی بر مسیرهای ملکولی موثر بر اسپرماتوژنز برای مشخص شدن مکانیسم‌های مسئول در خصوص اثر تمرین ورزشی بر اسپرماتوژنز دارد.

در دهه اخیر، زمینه ظهور سلول‌های بنیادی درمانی به سرعت به دوره جدیدی از پزشکی احیا تبدیل شده است. پتانسیل متنوع سلول‌های بنیادی مرکز توجه تحقیقات بسیاری از دانشمندان در زمینه زیست‌شناسی مولکولی، مهندسی ژنتیک و حتی پزشکی عمومی برای ایجاد رویکردهای جدید در درمان تعدادی از بیماری‌ها است که همیشه برای پزشکان یک چالش بوده است [۱۱]. سلول‌های بنیادی سلول‌هایی هستند که در طول زندگی یک موجود زنده خودپایدار هستند و قادر به تمایز به سلول‌های مختلف هستند. انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی در بافت‌های انسان وجود دارد. در میان آنها ، سلول‌های بنیادی استرومایی مزانشیمی (mesenchymal stromal/stem cells-MSC) مشتق شده از بافت‌های مختلف از جمله مغز استخوان و بافت چربی، از نظر کاربرد در سلول درمانی، امیدوار کننده‌ترین ماده در نظر گرفته شده‌اند. MSC ها به دلیل پتانسیل تمایز چند خطی (multilineal differentiation)، ایمنی‌زایی کم و مشارکت فعال در ترمیم بافت و بازسازی پس از مهاجرت به مکان‌های آسیب دیده، در بین دانشمندان و پزشکان محبوب هستند. به طور کلی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبت به سایر سلول‌های بنیادی برای استفاده بالینی در درمان‌های مبتنی بر سلول دارای مزایایی هستند. این مزایا شامل در دسترس بودن، جداسازی و گسترش آسان، تمایز چند خطی، سرکوب کننده سیستم ایمنی، و هر دو پیوند خودکار و آلوگرافت، فارغ از مسائل اخلاقی و طول عمر تکراری محدود امکان پذیر است [۱۲]. ژانکینا و همکاران (۲۰۲۱) عنوان کردند که استفاده سلول‌های بنیادی نقش

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

موثری در بهبود توبولهای اسپرم‌ساز دارند و اگزوزوم‌های ترشح شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادر به ایجاد فرآیند اسپرماتوژنز در بیضه مدل‌های حیوانی نابارور هستند ولی علی رغم پیشرفت‌های بیشمار در زمینه درمان بیماری‌های تولید مثل در مردان و زنان با کمک سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا اگزوزوم‌های آنها، هیچ آزمایش بالینی در مورد درمان NOA خاتمه نیافته است [۱۳] که نشان دهنده نیاز به تحقیقات بیشتر در این خصوص می‌باشد.

هم‌چنین لیزردرمانی یکی از شیوه‌های درمانی غیرتهاجمی است. یکی از شاخه‌های لیزر، لیزردرمانی کم‌توان است، این روش درمانی که از تابش نور با شدت پایین در محدوده‌ی نور ۸۳۰–۵۴۰ نانومتر استفاده می‌گردد. به نظر می‌رسد اثرات درمانی این روش توسط واکنش‌های فتوشیمیایی که باعث تغییر نفوذپذیری غشاء سلولی و به دنبال آن افزایش ساخته شدن mRNA و پرولیفراسیون (تقسیم) سلولی می‌شود حاصل می‌گردد [۱۴]. لیزردرمانی کم‌توان یک روش درمانی هست که از تابش نور با شدت پایین استفاده می‌کند و باعث تغییر در نفوذپذیری غشاء سلولی و به دنبال آن ساخته شدن mRNA و تقسیم سلولی می‌شود. نتایج مطالعات نشان داد که امواج فراصوت با شاخص مکانیکی ۰/۴۰ تأثیر بیشتری بر روی میزان تکثیر و کلونی‌زایی سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی دارد [۱۴، ۱۵].

تحقیقات قبلی نشان دهنده اثرات مثبت تمرینات ورزشی بر متغیرهای متابولیکی و سلولی ملکولی و نقش بالقوه تمرینات ورزشی منظم در بهبود برخی بیماری‌ها می‌باشد [۱۶، ۱۷]. مطالعات متعدد از فعالیت ورزشی به‌عنوان یک استراتژی برای برعکس کردن آثار اختلالات میتوکندری‌ها و پیشگیری و یا درمان بیماری‌ها حمایت کرده‌اند [۱۸، ۱۹]. اما اینکه چه نوع فعالیت ورزشی و از طریق چه مکانیسم‌های سلولی و مولکولی می‌تواند بهترین اثربخشی را داشته باشد، هنوز به‌طور کامل و دقیق شناخته نشده است [۱۹]. مطالعات نشان می‌دهد که تمرین هوازی با شدت پایین می‌تواند با ایجاد مکانیسم حفاظتی منجر به کاهش بیان سایتوکاین‌های التهابی، استرس اکسیداتیو در بافت بیضه، التهاب سیستمیک و در نتیجه بهبود پاسخ‌های ایمنی شود [۲۰]. از میان تمرین هوازی، تمرین هوازی شنا با شدت پایین از جمله تمریناتی است که در شرایط مختلف فیزیولوژیک، ایمن و قابل استفاده بوده و به‌دلیل عدم تحمل وزن در آب نسبت به ورزش‌های غیرآبی در اکثر مطالعات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و واکنش‌های مولکولی به‌کار می‌رود [۲۰، ۲۱]. فعالیت ورزشی سبک تا متوسط به‌علت افزایش جریان خون به‌تدریج سبب بهبود فعالیت متابولیکی می‌شود. اما فعالیت شدید به‌دلیل تغییر جهت جریان خون به‌سمت عضلات در حال فعالیت سبب کاهش آن می‌شود. فعالیت‌بدنی می‌تواند باعث افزایش مقدار هورمون‌های جنسی، اسپرم‌زایی و باروری و نیز جلوگیری از کوچک‌ترشدن بیضه و افزایش مقدار منی شود [۲۰]. کوچکی و همکاران گزارش دادند که که آزواسپرمی به طور معنی‌داری سطح بیان ژن‌های PGC-1α را نسبت به گروه کنترل سالم کاهش داد و ۸ هفته تمرین هوازی با شدت کم باعث افزایش معنی‌داری در گروه آزواسپرمی + تمرین نسبت به گروه آزواسپرمی شد [۲۱].

با توجه به پیشینه تحقیقات تمرینات ورزشی می‌تواند نقش بالقوه در درمان ناباروری داشته باشد با این وجود مکانیسم‌های مرتبط به خوبی مشخص نشده است که نشان دهنده نیاز به تحقیقات بیشتر در این خصوص می‌باشد. از طرف دیگر مشخص شده است که OPA1 [۲۲] و PGC-1α [۲۳] از عوامل مهم میتوکندرایی دخیل در اسپرماتوژنز می‌باشند. بنابراین این ژن ها را می توان به عنوان عوامل موثر در ناباروری مورد بررسی قرار داد.

با توجه به مطالب گفته شده هدف پژوهش حاضر بررسی اثر تمرینات منظم هوازی در کنار لیزر و سلول درمانی بر بیان ژن‌های درگیر در پویایی میتوکندریایی بافت بیضه (OPA1 و PGC-1α) در رت‌های مدل آزواسپرمی بود.

روش بررسی

در پژوهش تجربی حاضر که با طرح تحقیق پس آزمون انجام شد. رت‌های آزمایشگاهی نر نژاد ویستار

با دامنه سنی ۸ هفته از مرکز پژوهش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی تهران خریداری و پس از انتقال آزمودنی‌ها به محیط آزمایشگاه و پس از یک هفته سازگاری با محیط جدید، به‌صورت گروه‌های ۵ تایی در قفس‌های پلی کربنات شفاف در محیطی با میانگین دمای ۱/۴± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و چرخه‌ی تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگه‌داری شدند.

نگه‌داری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی بین‌المللی سلامت و پروتکل‌های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد. هم‌چنین حیوانات در طی پژوهش از غذای پک ساخت شرکت بهپرور کرج روزانه به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن (با توجه به وزن کشی هفتگی) تغذیه شدند و به‌صورت آزاد از طریق بطری‌هایی به آب مصرفی دسترسی داشتند.

به منظور ایجاد مدل آزواسپرمی، ابتدا رت‌های بالغ ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. سپس داروی بوسولفان با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن رت‌ها به‌صورت داخل صفاقی برای هر رت تزریق گردید. پس از گذشت یک ماه از القا مدل، رت‌ها

به‌صورت زیر گروه بندی شدند:

۱) گروه کنترل سالم (به مدت ۸ هفته نگهداری شدند)، ۲) گروه شم، ۳) گروه بیمار (یک ماه بعد از ایجاد مدل تا پایان مطالعه باقی ماندند به مدت ۸ هفته)، ۴) گروه بیمار + لیزر کم توان (یک ماه بعد از ایجاد مدل، لیزر کم توان با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر و توان ۱۰ میلی وات و انرژی ۳ ژول به‌صورت سه تکرار در کل دوره مطالعه با فاصله هر هفته یک‌بار در ناحیه بیضه رت‌های آزواسپرمی اعمال شد [۲۱] و رت‌ها تا پایان مطالعه به مدت ۸ هفته نگهداری شدند)، ۵) گروه بیمار + تمرین (یک ماه بعد از ایجاد مدل، رت‌های آزواسپرمی به مدت ۸ هفته، به‌صورت روزانه به‌مدت ۳۰ دقیقه در روز و ۵ روز در هفته شنا انجام دادند [۲۱]، ۶) گروه بیمار+سلول (یک ماه بعد از ایجاد رت‌های آزواسپرمی یک‌بار سلول‌های بنیادی به‌صورت پیوند در ناحیه مجران دفران به میزان یک میلیون سلول برای هر رت در بیضه سمت راست پیوند زده شد و رت‌ها تا پایان مطالعه به مدت ۸ هفته نگهداری شدند [۲۱]، ۷) گروه بیمار + تمرین + لیزر (یک ماه بعد از ایجاد رت‌های آزواسپرمی، لیزر کم توان با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر و توان ۱۰ میلی وات و انرژی ۳ ژول به‌صورت سه تکرار در کل دوره مطالعه با فاصله هر هفته یک بار اعمال شد و پس از گذشت یک هفته رت‌ها به‌صورت روزانه به‌مدت ۳۰ دقیقه و ۵ روز در هفته شنا انجام دادند که این زمان به مدت ۸ هفته انجام گرفت) و ۸) گروه بیمار+سلول+تمرین (یک ماه بعد از ایجاد رت‌های آزواسپرمی یک بار سلول های بنیادی به‌صورت پیوند در ناحیه مجران دفران به میزان یک میلیون سلول برای هر رت پیوند زده شد و پس از گذشت یک هفته از پیوند سلول به‌صورت روزانه به مدت ۳۰ دقیقه در روز ۵ روز در هفته شنا انجام دادند که این زمان به مدت ۸ هفته انجام گرفت).

نمونه‌گیری بافتی از بافت بیضه رت‌ها با شرایط کاملا مشابه و در شرایط پایه (دو روز پس از پایان دوره تمرین) انجام شد. جهت حذف اثر حاد تمرین، نمونه‌برداری از حیوانات پس از ۴۸ ساعت بعد از آخرین برنامه تمرینی شنا انجام گرفت. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۳۰mg/kg– ۵۰) و زایلازین (۳ mg/kg– ۵) بی‌هوش و سپس کشته شدند و پس از کشتار بافت‌های پیوند شده جهت بررسی مطالعات ژنی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای بررسی بیان ژن های مورد مطالعه تحقیق در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک PCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت.

جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت‌ها در همه گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن، آلمان) انجام گرفت. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت.

برای تکنیک RT-qPCR، ابتدا با استفاده از محلول کیازول، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سیناژن استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض (DNase I Fermentas) قرار گرفت. سپس کیفیت RNAهای استخراج شده با دستگاه اسپکترفتومتری (,DPI-1 Kiagen) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از پرایمر(Oligodt (MWG-Biotech, Germany) و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Fermentas) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. هر واکنش PCR با استفاده از (PCR master mix Applied Biosystems) و SYBER Green در دستگاه (Applied Biosystems, Sequences .ABI Step One (Detection Systems Focter City, CA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت.

۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰–۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نمودار Melting جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده و به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تجزیه و تحلیل یافته‌های این پژوهش از آزمون‌های کالموگراف اسمیرنف، آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی برای مقایسه بین گروه‌های مختلف استفاده شد. کلیه محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS/22و در سطح معنی‌دار P≤ ۰/۰۵ انجام شد.

توالی پرایمرها

ژن		توالی پرایمر (´3→´5)
PGC-1α	Forward	CTAGAGGATGGCTGCACTAAACAC
	Reserve	AAGCAAACAGGGCCAATGTC
OPA1	Forward	ACGGGTTGTTGTGGTTGGAG
	Reserve	ACGCTGCAAGATCTTCCTCC

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

یافته ها

میانگین و انحراف معیار سطوح شاخصPGC-1α گروه‌های مختلف پژوهش در جدول ۱ ارائه شده است.

نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که بیشترین سطوح شاخص PGC-1α مربوط به گروه کنترل- سالم و کمترین سطوح آن متعلق به گروه بیمار بود. در جدول ۲ نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داده شده است.

نتایج تحلیل واریانس یک طرفه بر سطوح PGC-1α گروه های مختلف پژوهش نشان‌دهنده آن است که؛ ارزش F محاسبه شده (۱۱/۳۷۲) و معنی داری آن در سطح p = ۰/۰۰۰۱ حاکی از وجود تفاوت معنی داری بین سطوح PGC-1α در گروه های مختلف پژوهش است. در جدول ۳ نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داده شده است.

جدول ۱. شاخص‌های مرکزی و پراکندگی سطوح شاخصPGC1 در گروه‌های مختلف پژوهش

گروه	میانگین	انحراف معیار
کنترل-سالم	۰/۶۳۸	۰/۱۹۲
بیمار	۰/۱۵۰	۰/۰۷۳
شم	۰/۱۷۴	۰/۰۵۴
بیمار-سلول	۰/۳۶۱	۰/۰۳۲
بیمار-لیزر	۰/۴۱۱	۰/۱۳۸
بیمار-تمرین	۰/۴۳۵	۰/۱۳۳
بیمار-سلول-تمرین	۰/۵۸۲	۰/۰۹۴
بیمار-لیزر-تمرین	۰/۶۰۳	۰/۱۷۴

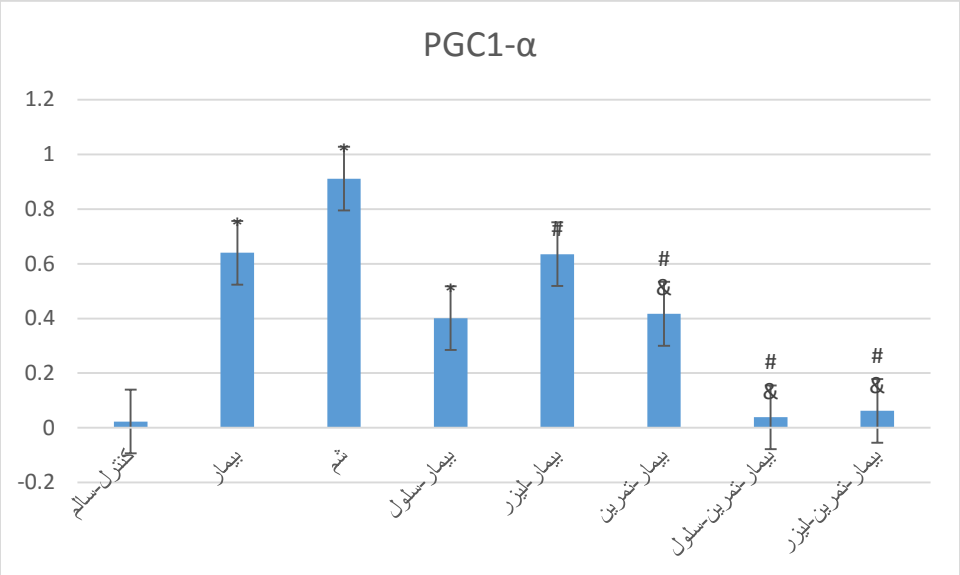
جدول ۲. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه سطوح PGC-1α در گروه‌های مختلف پژوهش

منابع تغییر	مجموع مربعات SS	درجات آزادی df	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش p
بین گرو هی	۱/۲۲۰	۷	۰/۱۷۴	۱۱/۳۷۲	۰/۰۰۰۱
درون گروهی	۰/۴۹۱	۳۲	۰/۰۱۵		
جمع کل	۱/۷۱۱	۳۹			

*سطح معنی داری (P< ۰/۰۵)

جدول ۳. نتایج آزمون تعقیبی توکی سطوح PGC1 گروه های مختلف پژوهش

گروه	کنترل-سالم	بیمار	شم	سلول	لیزر	تمرین	سلول-تمرین	لیزر-تمرین
کنترل-سالم	---	M=۰/۴۸۷* P=۰/۰۰۰۱	M=۰/۴۶۴* P=۰/۰۰۰۱	M=۰/۲۷۶* P=۰/۰۲۵	M=۰/۲۲۶ P=۰/۱۰۸	M=۰/۲۰۳ P=۰/۱۹۵	M=۰/۰۵۵ P=۰/۹۹۶	M=۰/۰۳۵ P=۱
بیمار		---	M=-۰/۰۲۳ P=۱	M=-۰/۲۱۰ P=۰/۱۶۳	M=-۰/۲۶۰* P=۰/۰۴۰	M=-۰/۲۸۴* P=۰/۰۱۹	M=-۰/۴۳۱* P=۰/۰۰۰۱	M=-۰/۴۵۲* P=۰/۰۰۰۱
شم			---	M=-۰/۱۸۷ P=۰/۲۷۹	M=-۰/۲۳۷ P=۰/۰۷۹	M=-۰/۲۶۰* P=۰/۰۴۰	M=-۰/۴۰۸* P=۰/۰۰۰۱	M=-۰/۴۲۸* P=۰/۰۰۰۱
سلول				---	M=-۰/۵۰۳ P=۰/۹۹۸	M=-۰/۰۷۳ P=۰/۹۸۳	M=-۰/۲۲۰ P=۰/۱۲۵	M=-۰/۲۴۱ P=۰/۰۷۱
لیزر					---	M=-۰/۰۲۳ P=۱	M=-۰/۱۷۰ P=۰/۳۹۰	M=-۰/۱۹۱ P=۰/۲۵۷
تمرین						---	M=-۰/۱۴۷ P=۰/۵۷۱	M=-۰/۱۶۷ P=۰/۴۱۰
سلول-تمرین							---	M=-۰/۲۰۴ P=۱
لیزر-تمرین								---



نمودار ۱. مقایسه میانگین سطوح PGC1 در گروه های مختلف پژوهش؛ *تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل-سالم؛ #تفاوت معنی دار نسبت به گروه بیمار؛ &تفاوت معنی دار نسبت به گروه شم

نتایج جدول ۳ و نمودار ۱ حاکی از آن است که؛ در سطح اطمینان ۰/۰۵ گروه سالم با گروه بیمار، شم و سلول، گروه بیمار با گروه‌های لیزر، تمرین، سلول-تمرین و لیزر-تمرین و گروه شم با گروه‌های تمرین، سلول-تمرین و لیزر-تمرین اختلاف معنی‌دار دارند.

میانگین و انحراف معیار سطوح شاخص OPA1 گروه‌های مختلف پژوهش در جدول ۴ ارائه شده است.

نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که بیشترین سطوح شاخص OPA1 مربوط به گروه شم و کمترین سطوح آن متعلق به گروه کنترل-سالم بود.

در جدول ۵ نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داده شده است.

جدول ۴. شاخص‌های مرکزی و پراکندگی سطوح شاخص OPA1 در گروه‌های مختلف پژوهش

گروه	میانگین	انحراف معیار
کنترل-سالم	۰/۰۲۳	۰/۰۱۲
بیمار	۰/۶۴۰	۰/۲۵۵
شم	۰/۹۱۱	۰/۳۸۹
بیمار-سلول	۰/۴۰۱	۰/۲۲۰
بیمار-لیزر	۰/۶۳۵	۰/۲۳۰
بیمار-تمرین	۰/۴۱۷	۰/۲۲۹
بیمار-سلول-تمرین	۰/۰۳۹	۰/۰۱۴
بیمار-لیزر-تمرین	۰/۰۶۲	۰/۰۲۹

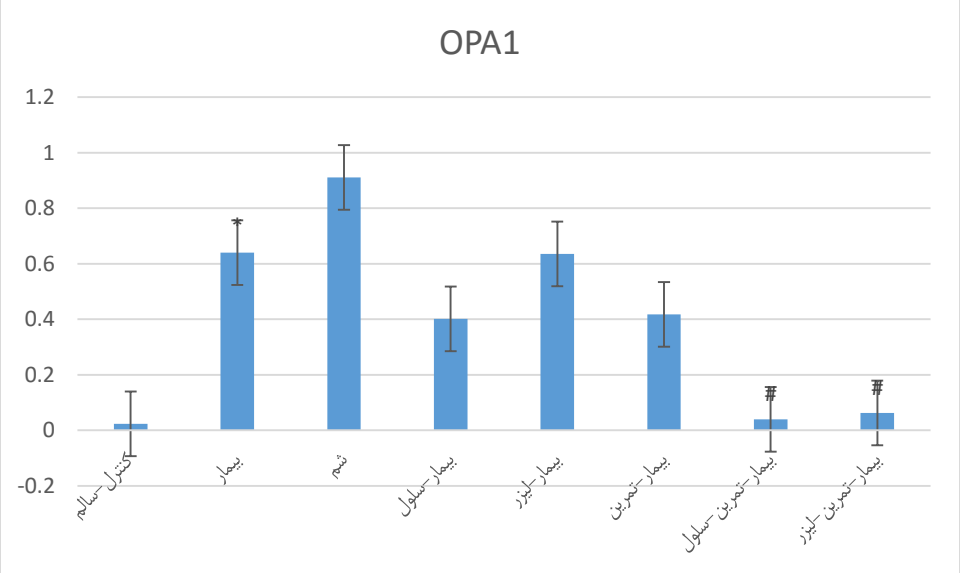
جدول ۵. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه سطوح OPA1 در گروه‌های مختلف پژوهش

منابع تغییر	مجموع مربعات SS	درجات آزادی df	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش p
بین گرو هی	۳/۸۰۵	۷	۰/۵۴۴	۲/۹۵۹	۰/۰۱۶
درون گروهی	۵/۸۷۷	۳۲	۰/۱۸۴		
جمع کل	۹/۶۸۲	۳۹			

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

جدول ۶. نتایج آزمون تعقیبی توکی سطوح OPA1 گروه های مختلف پژوهش

گروه	کنترل-سالم	شم	بیمار	سلول	لیزر	تمرین	سلول-تمرین	لیزر-تمرین
کنترل-سالم	---	M=-۰/۶۱۷ P=۰/۳۳۶	M=-۰/۸۸۸* P=۰/۰۴۶	M=-۰/۳۷۷ P=۰/۸۵۳	M=-۰/۶۱۲ P=۰/۳۴۶	M=-۰/۳۹۴ P=۰/۸۲۵	M=-۰/۰۱۶ P=۱	M=-۰/۰۳۸ P=۱
بیمار		---	M=-۰/۲۷۱ P=۰/۹۷۱	M=۰/۲۳۹ P=۰/۹۸۶	M=۰/۰۰۴ P=۱	M=۰/۲۲۳ P=۰/۹۹۰	M=۰/۶۰۱ P=۰/۰۰۸*	M=۰/۵۷۸ P=۰/۰۰۸*
شم			---	M=۰/۵۱۰ P=۰/۵۷۱	M=۰/۲۷۵ P=۰/۹۶۸	M=۰/۴۹۴ P=۰/۶۱۰	M=۰/۸۷۲ P=۰/۰۵۳	M=۰/۸۴۹ P=۰/۰۶۴
سلول				---	M=-۰/۲۳۴ P=۰/۹۸۷	M=-۰/۰۱۶ P=۱	M=۰/۳۶۱ P=۰/۸۷۹	M=۰/۳۳۸ P=۰/۹۱۰
لیزر					---	M=۰/۲۱۸ P=۰/۹۹۲	M=۰/۵۹۶ P=۰/۳۷۸	M=۰/۵۷۳ P=۰/۴۲۷
تمرین						---	M=۰/۳۷۸ P=۰/۸۵۳	M=۰/۳۵۵ P=۰/۸۸۸
سلول-تمرین							---	M=-۰/۰۲۲ P=۱
لیزر-تمرین								---



نمودار ۲. مقایسه میانگین سطوح OPA1 در گروه های مختلف پژوهش؛ *تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل-سالم #تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه بیمار

نتایج تحلیل واریانس یک طرفه بر سطوح OPA1 گروه های مختلف پژوهش نشان‌دهنده آن است که؛ ارزش F محاسبه شده (۲/۹۵۹) و معنی داری آن در سطح p = ۰/۰۱۶ حاکی از وجود تفاوت معنی داری بین سطوح OPA1 در گروه های مختلف پژوهش است.

در جدول ۶ نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داده شده است.

نتایج جدول ۶ و نمودار ۲ حاکی از آن است که؛ در سطح اطمینان ۰/۰۵ گروه سالم با گروه شم و بیمار و همچنین گروه لیزر-تمرین و سلول-تمرین با گروه بیمار اختلاف معنی‌دار دارند.

بحث

نتایج پژوهش ما نشان داد القای مدل آزواسپرمی موجب کاهش بیان ژن PGC-1α بافت بیضه رت‌ها شد. اجرای هر کدام از روش‌های مداخله-ای لیزر، تمرین، لیزر-تمرین و سلول-تمرین بیان این ژن را در بافت بیضه نسبت به گروه بیمار افزایش معنی‌داری داد. همچنین القای مدل آزواسپرمی موجب افزایش بیان ژن OPA1 بافت بیضه رت‌ها شد، که تنها

اجرای ترکیبی از روش‌های مداخله‌ای لیزر–تمرین و سلول–تمرین بیان این ژن را در بافت بیضه نسبت به گروه بیمار کاهش معنی‌داری داد. هم‌راستا با این پژوهش کوچکی و همکاران نشان دادند القای مدل آزواسپرمی سطح بیان ژن‌های SIRT1 و PGC-1α را کاهش داد و انجام ۸ هفته تمرین هوازی با شدت پایین موجب افزایش این شاخص‌ها شد [۲۱]. تحقیقات دیگر نیز نشان داد که تمرین هوازی با توجه به بهبود شاخص‌های موثر در پویایی میتوکندری و بهبود سلول‌های اسپرماتوگونی، کیفیت اسپرم و باروری را افزایش می‌دهد [۲۴، ۲۵]. فعالیت ورزشی دارای قابلیت بازگرداندن باروری در نمونه‌های حیوانی هستند [۲۵]. تمرین هوازی باعث رهاشدن اکسید نیتریک(Nitric oxide) می‌شود [۲۶]، که به نوبه‌ی خود سبب فعال شدن آنزیم گوانیل سیکلاز شده که منجر به افزایش cGMP (cyclic guanosine monophosphate) می‌شود. این افزایش منجر به اتساع عروق دستگاه تناسلی شده و باعث افزایش جریان خون در آن می‌شود و متعاقب آن منجر به افزایش تولید اسپرم می‌گردد [۲۷]؛ بنابراین ورزش می تواند از مکانیسم های مرتبط با بهبود عملکرد میتوکندری موجب بهبود باروری شود [۲۴]. PGC-1α برنامه ژنتیکی را تنظیم می‌کند که سازگاری سلول‌ها را برای پاسخ‌گویی به نیازهای انرژی به ارمغان می‌آورد. بیان PGC-1α در میوتوب‌ها بیان ژن زنجیره تنفسی مانند سیتوکروم C و پویایی میتوکندری را افزایش می‌دهد [۳]. در این پژوهش نیز تمرین شنا به‌تنهایی و در ترکیب با سلول‌درمانی و لیزردرمانی سطوح ژن PGC-1α بافت بیضه رت‌های مدل آزواسپرمی را افزایش معنی‌داری داد، که ممکن است از این طریق در درمان ناباروری رت‌های آزواسپرمی موثر باشد. در خصوص سطوح بیان ژن OPA1 بافت بیضه رت‌های آزواسپرمی تمرین شنا به‌تنهایی نتوانست تغییرات معنی‌داری را ایجاد نماید، اما در ترکیب با سلول‌درمانی و لیزر درمانی بیان این ژن را با کاهش معنی‌داری روبرو کرد که می‌تواند دیگر مکانیسم افزایش باروری در رت‌ها باشد. از آن‌جایی که OPA1 در حفظ ساختار تیغه‌های میانی درون میتوکندری دخالت دارد، جهش‌های ژن OPA1 و تولید پروتئین ناقص منجر به تخریب ساختار این تیغه‌ها می‌شود؛ این عیب ساختاری در میتوکندری باعث عدم اتصال صحیح DNA میتوکندریایی به این تیغه‌ها و عدم همانندسازی صحیح آن‌ها و در نهایت تخریب واکنش‌های فسفریلاسیون اکسیداتیو و نقص انرژتیکی شود [۲۸، ۲۹]. عملکرد دیگری که در سلول به پروتئین OPA1 نسبت داده شده است اثر ضدآپوپتوزی است که در حقیقت با کنترل ساختار منسجم غشاء داخلی میتوکندری و تیغه‌های میانی از آزاد شدن سیتوکروم C و بروز آپوپتوز جلوگیری می‌کند [۳۰].

از دیگر نتایج این پژوهش افزایش بیان ژن PGC-1α بافت بیضه رت‌های مدل آزواسپرمی در گروه لیزر و لیزر+تمرین و کاهش بیان ژن OPA1 در گروه لیزر+تمرین بود. تاباندن اشعه لیزر به به اسپرم‌های معیوب سبب افزایش غلظت کلسیم درون سلولی و میزان انرژی می‌شود که افزایش میزان تحرک و باروری را به‌همراه دارد. تعداد ناکافی اسپرم و وجود اسپرم‌های معیوب از عوامل اصلی ناباروری به حساب می‌آیند. گذشت زمان سبب کاهش تحرک اسپرم‌های ذخیره شده در فرایند لقاح خارج رحمی می‌شود و اشعه لیزر تابیده شده به ثابت ماندن حرکت آن‌ها با افزایش تحرکشان کمک شایانی می‌کند. ظهرابی و همکاران نشان دادند استفاده از لیزر کم‌توان در افزایش بیان ژن سلول‌های زایای نر موثر می‌باشد [۲۰]، اشعه لیزر به‌دلیل اثرات تحریک کیفیت، تحرک اسپرم‌ها را تقویت می‌کند [۳۱]. هنگام استفاده از لیزر کم‌توان از نوع پرتو مادون قرمز با فرکانس ۳۰۰ هرتز که یکی از فرکانس‌های متداول درمانی است؛ تغییرات شیمیایی در مولکول گیرنده‌های نوری و اجزاء زنجیره تنفسی مثل سیتوکروم اکسیداز C و NADH دهیدروژناز رخ می‌دهد. به‌علت تغییر در فعالیت بیوشیمیایی کروموفورها، آزاد شدن NO از وضعیت مهاری در مرکز سیتوکروم اکسیداز C، اتواکسیداسیون یک الکترون و تولید O^{2-}، H^2O^2 و O^2 رخ می‌دهد. آزاد شدن این عوامل پیامدهایی از جمله افزایش غلظت داخل سلولی کلسیم، افزایش PH (قلیایی شدن)، آزاد شدن آراشیدونات و فعال شدن آنتی به‌دنبال دارد [۳۲]. هنگامی‌که این دو طیف به‌صورت ترکیبی البته با فرکانس پایین با تمرین هوازی استفاده می‌شود؛ اثرات تحریکی بیشتر و موثرتری را نشان می‌دهد. دلیل آن می‌تواند به‌خاطر آن باشد که هر کدام از این طیف‌ها اثرات بیولوژیک خاصی را کنترل می‌نمایند. بنابراین استفاده ترکیبی از هر دو نوع طیف اثرات بیولوژیک وسیع‌تری را ایجاد می‌نمایند. برای مثال، پرتوهای لیزر کم‌توان علاوه بر تأثیر بر فسفوریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری‌ها و افزایش تولید ATP، گردش خون میکروسکوپی را افزایش می‌دهند. لیزر با آزادسازی مواد شیمیایی مانند هیستامین سبب انبساط عروقی می‌شود گه همراه با افزایش فسفریلاسیون اکسیداتیو سلول‌ها سبب افزایش متابولیسم سلولی می‌گردد [۲۰]. پرتو لیزر کم‌توان به‌سبب افزایش تولید تستوسترون با اثر بر روی سلول‌های لایدیگ می‌شود. تستوسترون و FSH برای اتصال اسپرماتید و اجزاء سلولی سرتولی ضروری است. اسپرماتوزوئیدهای در حال نمو توسط پل‌های سیتوپلاسمیک به هم متصل هستند. این شبکه سلولی، به‌طور فیزیکی توسط انشعابات سیتوپلاسمی وسیع سلول‌های سرتولی پشتیبانی می‌گردد [۳۰]. هم‌افزایی ترکیب تمرین با لیزردرمانی در این پژوهش مشهود بود و بهترین نتیجه در گروه تمرین+لیزر حاصل شد.

از دیگر نتایج این پژوهش افزایش بیان ژن PGC-1α بافت بیضه رت‌های مدل آزواسپرمی در سلول+تمرین و کاهش بیان ژن OPA1 در گروه سلول+تمرین بود. اما سلول‌درمانی به تنهایی نتوانست تغییرات

معنی‌داری ایجاد کند، که می‌توان گفت تمرین و سلول دارای اثر هم‌افزایی هستند. ژانکینا(Zhankina) و همکاران [۱۳] و هم‌چنین مظفر و همکاران [۳۳] بهبود قابل توجه فرایند اسپرماتوژنز و شاخص‌های بافتی بیضه در نمونه‌های تحت درمان با محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نسبت به گروه آزواسپرمیک القاشده را نشان دادند. هم‌راستا پژوهش‌های دیگری نیز در حیواناتی نظیر همستر و موش بیانگر بهبود قابل ملاحظه فرایند اسپرماتوژنز در اثر درمان با سلول بنیادی بود [۳۳، ۳۴]. سلول‌های بنیادی در بسیاری از موارد برای کاهش التهاب و عوارض ناشی از آن استفاده می‌شوند و به همین دلیل استفاده از این سلول‌ها برای مقابله با بیماری‌های خود ایمنی رو به افزایش است [۳۵]. سلول‌های بنیادی قابلیت ترمیم و تبدیل به بافت صدمه‌دیده را دارند و یا این که محیطی مناسب برای ترمیم این بافت‌ها را فراهم می‌کنند، محققین را بر آن داشته است تا با استفاده از محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی به بررسی اثرات آن بپردازند [۳۶].

تحقیقات انجام‌شده پیشین نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی فاکتورهای گوناگونی را در محیط کشت رها می‌کنند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای رشد استحال‌های بتا(Transforming growth factor beta(TGF-β))، هپاتوسیتی(Hepatocyte growth factor(HGF)) ، کراتینوسیتی((Keratinocyte growth factor(KGF))، فیبروبلاستی پایه((Basic fibroblast growth factor(bFGF))، اندوتلیال عروقی((Vascular endothelial growth factor(VEGF)) و سیتوکین‌ها اشاره نمود [۳۷]. تحقیقات متعددی نشان داده است که محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی حاوی فاکتورهای رشد و هم‌چنین سیتوکین‌های مختلفی است که در فرایند ترمیم می‌تواند مؤثر باشد [۳۸، ۳۹]. استفاده از محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی به‌دلیل سهولت در نگهداری، ذخیره و جابه‌جایی نسبت به سلول‌های بنیادی و هم‌چنین احتمال کمتر ایجاد واکنش‌های ایمنی می‌تواند گزینه مناسبی برای استفاده در ترمیم‌های بافتی باشد، به‌همین دلیل امروزه استفاده از محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی در ترمیم عوارض مختلف مورد توجه بسیار قرار گرفته است [۴۰].

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش هر کدام از روش‌های مداخله‌ای تمرین شنا، سلول‌درمانی و لیزردرمانی بر بیان ژن PGC-1α بافت بیضه رت‌های آزواسپرمی تأثیر معنی‌داری داشت، درحالی که در مورد بیان ژن OPA1 تنها استفاده ترکیبی از مداخله‌ی تمرین با سلول‌درمانی و لیزردرمانی تغییر معنی‌داری ایجاد کرد. لذا ممکن است ترکیب تمرین شنا با سلول‌درمانی و لیزردرمانی با تغییر در پویایی میتوکندریایی بافت بیضه رت‌های مدل تجربی آزواسپرمی سبب بارور شدن رت‌ها شود، ولی اظهارنظر قطعی نیازمند پژوهش‌های بیشتر در این خصوص می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تمامی مراحل تحقیق حاضر توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تایید شده است (IR.IAU.SARI.REC.1398.149).

حامی مالی

این مقاله حامی مالی ندارد و با هزینه شخصی نویسندگان انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در نوشتن این مقاله به صورت یکسان همکاری کرده اند.

تعارض منافع

این مقاله حاصل رساله دکتری با کد اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1398.149 و با هزینه شخصی انجام شده است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب رساله دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علی‌آباد کتول انجام شد. بدین‌وسیله، نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحد دانشگاهی اعلام می‌دارند.

References

[1] He H, Yu F, Shen W, Chen K, Zhang L, Lou S, Zhang Q, Chen S, Yuan X, Jia X, Zhou Y. The novel key genes of non-obstructive azoospermia affect spermatogenesis: transcriptomic analysis based on RNA-Seq and scRNA-Seq data. Frontiers in Genetics. 2021 Feb 26;12:608629. [10.3389/fgene.2021.608629] [PMID]

[2] Kohn TP, Pastuszak AW. Non-obstructive azoospermia and shortened leukocyte telomere length: further evidence linking poor health and infertility. Fertility and Sterility. 2018 Sep 1;110(4):629-30. [10.1016/j.fertnstert.2018.06.013] [PMID]

[3] Abu Shelbayeh O, Arroum T, Morris S, Busch KB. PGC-1α is a master regulator of mitochondrial lifecycle and ROS stress response. Antioxidants. 2023 May 10;12(5):1075. [10.3390/antiox12051075] [PMID].

[4] Halling JF, Pilegaard H. PGC-1α-mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. 2020;45(9):927-36. [10.1139/apnm-2020-0005] [PMID]

[5] Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Millán I, Ortega ÁL, Pérez S. PGC-1α, inflammation, and oxidative stress: an integrative view in metabolism. Oxidative medicine and cellular longevity. 2020 Oct;2020. [10.1155/2020/1452696] [PMID]

[6] Khosrobakhsh F, Moloudi MR, Shoja K, Mohammadi S. Effect of alpha-lipoic acid on pancreatic optic atrophy 1 (OPA1) gene expression in male rat model of obstructive cholestasis and cirrhosis. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2019 Dec 10;24(5):120-34.

[7] Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. Human genetics. 2001 Dec;109:584-91. [10.1007/s00439-001-0633-y] [PMID]

[8] Nikbin S, Derakhshideh A, Karimi Jafari S, Mirzahamedani A, Moslehi A, Ourzamani S, Barati E, Amini F, Zolfaghari FS, Azarbayjani MA. Investigating the protective effect of aerobic exercise on oxidative stress and histological damages of testicular tissue associated with chlorpyrifos in male rats. Andrologia. 2020 Mar;52(2):e13468. [10.1111/and.13468] [PMID]

[9] Dutra Gonçalves G, Antunes Vieira N, Rodrigues Vieira H, Dias Valério A, Elóisa Munhoz de Lion Siervo G, Fernanda Felipe Pinheiro P, Eduardo Martinez F, Alessandra Guarnier F, Rampazzo Teixeira G, Scantamburlo Alves Fernandes G. R ole of resistance physical exercise in preventing testicular damage caused by chronic ethanol consumption in UChB rats. Microscopy Research and Technique. 2017 Apr;80(4):378-86. [10.1002/jemt.22806] [PMID]

[10] Khosravi Sadr M, Nasiri E, Khalili M. The effect of resistance training on testicular function and spermatogenesis process and sperm parameters of adult male Wistar rats. Daneshvar Medicine. 2021 Jan 3;28(5):11-22.

[11] Thompson M, Mei SH, Wolfe D, Champagne J, Fergusson D, Stewart DJ, Sullivan KJ, Doxtator E, Lalu M, English SW, Granton J. Cell therapy with intravascular administration of mesenchymal stromal cells continues to appear safe: an updated systematic review and meta-analysis. EClinicalMedicine. 2020 Feb 1;19. [10.1016/j.eclinm.2019.100249] [PMID]

[12] Kim HJ, Park JS. Usage of human mesenchymal stem cells in cell-based therapy: advantages and disadvantages. Development & reproduction. 2017 Mar;21(1):1. [10.12717/DR.2017.21.1.001] [PMID]

[13] Zhankina R, Baghban N, Askarov M, Saipiyeva D, Ibragimov A, Kadirova B, Khoradmehr A, Nabipour I, Shirazi R, Zhanbyrbekuly U, Tamadon A. Mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes for restoration of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia: a systemic review. Stem Cell Research & Therapy. 2021 Dec;12:1-2. [10.1186/s13287-021-02295-9] [PMID]

[14] Hasan P, SA R, Purnomo S, Kainama H. The possible application of low reactive-level laser therapy (LLLT) in the treatment of male infertility: a preliminary report. Laser therapy. 2004; 14(0_Pilot_Issue_2):0_65-6.

[15] Ziaeipour S, Norouzian M, Abbaszadeh HA, Aliaghaei A, Nazarian H, Karamian A, Tabeie F, Naserzadeh P, Abdi S, Abdollahifar MA, Paktinat S. Photobiomodulation therapy reverses spermatogenesis arrest in hyperthermia-induced azoospermia mouse model. Lasers in Medical Science. 2023 Apr 27;38(1):114. [10.1007/s10103-023-03780-8] [PMID]

[16] Jafari M, GHALAVAND A, RAJABI H, KHALEDI N, MOTAMEDI P. A review of the effect of exercise training on neuromuscular junction in throughout life: A logical analysis of animal experimental studies.

[17] Ghalavand A, Ghobadi MR. Effect of Exercise and Insulin Signaling on Glucose Transporter Type 4 in Skeletal Muscles: A narrative review. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences. 2023 Mar 27.

[18] Roberts FL, Markby GR. New insights into molecular mechanisms mediating adaptation to exercise; A review focusing on mitochondrial biogenesis, mitochondrial function, mitophagy and autophagy. Cells. 2021 Oct 2;10(10):2639. [10.3390/cells10102639] [PMID]

[19] Sorriento D, Di Vaia E, Iaccarino G. Physical exercise: a novel tool to protect mitochondrial health. Frontiers in physiology. 2021 Apr 27;12:660068. [10.3389/fphys.2021.660068] [PMID]

[20] Zohrabi Karani L, Farzanegi P, Azarbayjani MA. The Effect of 8-Weeks of Low-Intensity Swimming Training on Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein and Spermatid Transition Nuclear Protein Gene Expression in Azoospermic Rats Model. Internal Medicine Today. 2020 Sep 10;26(4):332-47.

[21] Koochaki S, Abbaszadeh H, FARZANEGI P. Evaluation of SIRT1 and PGC-1α, gene expression in testicular tissue of azoospermic rats treated with busulfan after a period of swimming training.

[22] Gao X, Feng B, Du C, Hou C, Jin S, Tang D, Zhu J. Characterization, expression dynamics, and potential function of OPA1 for regulation of mitochondrial morphology during spermiogenesis in Phascolosoma esculenta. Journal of Oceanology and Limnology. 2024 Jan 11:1-4.

[23] Yang W, Zhang G, Jiang F, Zeng Y, Zou P, An H, Chen Q, Ling X, Han F, Liu W, Yang H. BPDE and B [a] P induce mitochondrial compromise by ROS-mediated suppression of the SIRT1/TERT/PGC-1α pathway in spermatogenic cells both in vitro and in vivo. Toxicology and Applied Pharmacology. 2019 Aug 1;376:17-37.

[24] Torma F, Koltai E, Nagy E, Ziaaldini MM, Posa A, Koch LG, Britton SL, Boldogh I, Radak Z. Exercise increases markers of spermatogenesis in rats selectively bred for low running capacity. PloS one. 2014 Dec 10;9(12):e114075. [10.1371/journal.pone.0114075] [PMID]

[25] Samadian Z, Tofighi A, Razi M, Tolouei Azar J, Ghaderi Pakdel F. Moderate-intensity exercise training ameliorates the diabetes-suppressed spermatogenesis and improves sperm parameters: Insole and simultaneous with insulin. Andrologia. 2019 Dec;51(11):e13457. [10.1111/and.13457] [PMID]

[26] Jokar M, Ghalavand A. Improving endothelial function following regular pyramid aerobic training in patients with type 2 diabetes. Razi Journal of Medical Sciences. 2021 Sep 10;28(6):60-9.

[27] Mruk DD, Sarkar O, Mathur PP. Nitric oxide-cGMP signaling: its role in cell junction dynamics during spermatogenesis. Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents). 2008 Mar 1;8(1):28-35.

[28] MacVicar T, Langer T. OPA1 processing in cell death and disease–the long and short of it. Journal of cell science. 2016 Jun 15;129(12):2297-306. [10.1242/jcs.159186] [PMID]

[29] Von der Malsburg A, Sapp GM, Zuccaro KE, von Appen A, Moss III FR, Kalia R, Bennett JA, Abriata LA, Dal Peraro M, van der Laan M, Frost A. Structural mechanism of mitochondrial membrane remodelling by human OPA1. Nature. 2023 Aug 31;620(7976):1101-8. [10.1038/s41586-023-06441-6] [PMID]

[30] Frezza C, Cipolat S, De Brito OM, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. Cell. 2006 Jul 14;126(1):177-89. [10.1016/j.cell.2006.06.025] [PMID]

[31] Singh SK, Chakravarty S. Antispermatogenic and antifertility effects of 20, 25-diazacholesterol dihydrochloride in mice. Reproductive Toxicology. 2003 Jan 1;17(1):37-44. [10.1016/s0890-6238(02)00075-8] [PMID]

[32] Deihimi M, Azornia M, Takzare N. Effect of red and infrared spectrum low level of laser rays on Rat Seminiferous tubules. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2010 Oct 10;12(3):10-7.

[33] Mozafar A, Mehranani D, Vahdati A, Hosseini SE, Forouzanfar M. The Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Culture in the Treatment of Azoospermic Infertility induced by Busulfan Balb/C mice. Armaghane Danesh. 2017 Aug 10;22(3):295-310.

[34] Karimaghai N, Tamadon A, Rahmanifar F, Mehrabani D, Jahromi AR, Zare S, Khodabandeh Z, Jahromi IR, Koohi-Hoseinabadi O, Dianatpour M. Spermatogenesis after transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermic hamster. Iranian journal of basic medical sciences. 2018 Jul;21(7):660. [10.22038/IJBMS.2018.29040.7010] [PMID]

[35] Kamardi MT, Pourgholaminejad A, Eslaminejad MB, Sotoodeh nejadnematalahi F. Mesenchymal stem cells and their application in autoimmune disease treatment. Tehran University Medical Journal. 2014 Sep 1;72(6).

[36] Hoang DM, Pham PT, Bach TQ, Ngo AT, Nguyen QT, Phan TT, Nguyen GH, Le PT, Hoang VT, Forsyth NR, Heke M. Stem cell-based therapy for human diseases. Signal transduction and targeted therapy. 2022 Aug 6;7(1):1-41. [10.1038/s41392-022-01134-4] [PMID]

[37] Zhou BR, Xu Y, Guo SL, Xu Y, Wang Y, Zhu F, Permatasari F, Wu D, Yin ZQ, Luo D. The effect of conditioned media of adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. BioMed Research International. 2013 Oct;2013. [10.1155/2013/519126] [PMID]

[38] Ho JC, Lai WH, Li MF, Au KW, Yip MC, Wong NL, Ng ES, Lam FF, Siu CW, Tse HF. Reversal of endothelial progenitor cell dysfunction in patients with type 2 diabetes using a conditioned medium of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. Diabetes/Metabolism Research and Reviews. 2012 Jul;28(5):462-73. [10.1002/dmrr.2304] [PMID]

[39] Park BS, Kim WS, Choi JS, Kim HK, Won JH, Ohkubo F, Fukuoka H. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. Biomedical Research. 2010;31(1):27-34. [10.2220/biomedres.31.27] [PMID]

[40] Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. BioMed research international. 2014 Oct;2014. [10.1155/2014/965849] [PMID]