



Evaluation of SIRT1 and PGC-1 α gene expression in testicular tissue of azoospermic rats treated with busulfan after a period of swimming training

Abstract

Article Info

Introduction: Azoospermia is defined as the absence of sperm from semen. Spermatogenesis may be highly sensitive to compounds that interfere with mitochondrial energy metabolism and control of cellular respiration. The aim of this study was to evaluate the expression of SIRT1 and PGC-1 α genes in testicular tissue of azoospermic rats treated with busulfan after a period of swimming training.

Methods: In this experimental study, 20 adult male wistar rats were randomly divided into four groups of healthy control: sham, azoospermia, exercise + azoospermia after azoospermia model was created. Exercise + azoospermia group, one month after azoospermia, performed low-intensity swimming exercises for 8 weeks, five days a week for 30 minutes each day. One-way analysis of variance was used to analyze the data.

Results: The results showed that azoospermia group significantly reduced the expression level of SIRT1 and PGC-1 α genes compared to healthy control group and 8 weeks of low intensity aerobic training caused a significant increase in Azoospermia + exercise group compared to azoospermia group. Has been.

Conclusion: In general, the results of the present study indicate that regular aerobic exercise such as low-intensity swimming in controlling the effects of infertility through the maintenance and development of mitochondrial biogenesis helps to improve the process of spermatogenesis.

Keywords: Swimming, SIRT1, PGC-1 α , Azoospermia

Authors:

Sahar Koochaki ¹

Hajar Abbaszadeh ^{2*}

Parvin Farzanegi ³

Affiliations

1- Ph.D Candidate, Exercise Physiology Department, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

*2- Associate Professor, Exercise Physiology Department, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

E-mail: h.abaszade61@gmail.com

3- Associate Professor, Exercise Physiology Department, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.



بررسی بیان ژنهای SIRT1 و PGC-1 α در بافت بیضه موشهای آزواسپرمی شده با بوسولفان متعاقب یک دوره تمرینات شنا

چکیده

اطلاعات مقاله

سحر کوچکی^۱
هاجر عباس زاده*^۲
پروین فرزانی^۳

مقدمه: آزواسپرمی به عنوان عدم وجود اسپرم از مایع منی تعریف می‌شود. اسپرماتوژنز ممکن است بسیار حساس به ترکیباتی باشد که با متابولیسم انرژی میتوکندری و کنترل تنفس سلولی تداخل دارند. هدف پژوهش حاضر بررسی بیان ژنهای SIRT1 و PGC-1 α در بافت بیضه موش‌های آزواسپرمی شده با بوسولفان متعاقب یک دوره تمرینات شنا بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار پس از ایجاد مدل آزواسپرمی به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل سالم، شم، آزواسپرمی، تمرین+ آزواسپرمی دسته‌بندی شدند. گروه تمرین+ آزواسپرمی، یک ماه بعد از ایجاد آزواسپرمی، به مدت ۸ هفته و هر هفته پنج روز و هر روز به مدت ۳۰ دقیقه به انجام تمرین شنا با شدت پایین پرداختند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که گروه آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل سالم موجب کاهش معنادار سطح بیان ژن SIRT1 و PGC-1 α می‌شود و ۸ هفته تمرین هوازی شنا با شدت پایین موجب افزایش معنادار آن در گروه تمرین+ آزواسپرمی نسبت به گروه آزواسپرمی شده است.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که فعالیت ورزشی منظم هوازی مانند شنا با شدت پایین در مهار آثار ناشی از بیماری‌های ناباروری از طریق حفظ و توسعه بیوژنز میتوکندری در بهبود فرآیند اسپرماتوژنز کمک شایانی می‌کند.

کلیدواژه‌گان: شنا، SIRT1، PGC-1 α ، آزواسپرمی

وابستگی سازمانی نویسندگان

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

پست الکترونیک: h.abaszade61@gmail.com

۳- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

مقدمه

است در بیماران تغییر کند. نشان داده شده که مهارکننده‌های خیلی متفاوتی برای زنجیره انتقال الکترون وجود دارد که به طور منفی بر تحرک اسپرم در هر دوی انسان و موش‌های مهندسی شده تاثیر می‌گذارد. جالب است که ارتباط قوی بین پتانسیل غشایی و تحرک اسپرم داخل میتوکندری وجود دارد. در قسمت میانی اسپرم پستانداران بالغ، میتوکندری، برای ایجاد انرژی مورد نیاز برای حرکت اسپرم نقش اساسی دارد. علاوه بر این، کاهش تولید انرژی ممکن است باعث توقف میوز در طی اسپرم‌زایی شود (۴). پروتئین‌های کدگذاری شده میتوکندری که در ژنوم هسته‌ای بیان می‌شوند، در فسفوریلاسیون اکسیداتیو، بیوسنتز آهن و ورود پروتئین‌های میتوکندری نقش دارند. از جمله رایج‌ترین فاکتورهای رونویسی که پروموتور ژن‌های میتوکندری را فعال می‌کنند شامل ژن‌هایی از خانواده گیرنده کوآکتیویتور گاما برای تکثیر پراکسی زوم مانند PGC-1 α هستند. این خانواده از کوآکتیویتورها چند مسیر سوخت و ساز بدن مانند تنفس سلولی، ترموژن و متابولیسم را تنظیم می‌کنند. اگرچه این کوآکتیویتورها بیوژن میتوکندری را تحریک می‌کنند، میزان بیان و مقدار فعالیت PGC-1 α توسط گروه متنوعی از فاکتورهای بالادست از جمله تنظیم کننده‌های خاموش اطلاعات (SIRT ۱-۷-SIRTs-Silent information regulator)، تنظیم می‌شود (۵، ۶). هفت همولوگ پستانداران از SIRT (SIRT ۱-۷)، پروتئین‌هایی متعلق به خانواده‌ای از آنزیم‌های وابسته به NAD⁺ هستند که به طور تکاملی با فعالیت دی استیلاز و یا مونو-ADP ریبوزیل ترانسفراز حفظ شده‌اند. سیرتوئین‌ها در فرآیندهای سلولی متنوعی از جمله تنظیم آپوپتوز توسط استیل زدایی p53⁺ به دنبال تنظیم پایین دست Bax نقش دارند. SIRT ۱ علاوه بر نقش آپوپتوز، نقش ضدالتهابی در بیضه نیز دارد که می‌تواند بر اسپرم زایی تأثیر بگذارد. نشان داده شده است که عدم وجود SIRT ۱ به طور قابل توجهی باعث کاهش اسپرماتوژن در موش می‌شود، که نشان می‌دهد مسیرهای با واسطه SIRT ۱ برای فیزیولوژی بیضه مهم هستند (۷، ۸). SIRT ۱ به دلیل توانایی آن در دی استیلاز کردن هیستون‌ها و پروتئین‌های غیرهیستونی مانند PGC-1 α به چندین بیماری مرتبط با سن در ارتباط است. بنابراین، می‌تواند بیولوژی، متابولیسم و سرنوشت سلول را در سطوح مختلف تنظیم کند. بنابراین، سیرتوئین‌ها نقش مهمی در طیف وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی دارند. تنظیم متابولیسم گلیکولیتیک و کنترل تنفسی-متابولیسمی انرژی میتوکندری توسط سیرتوئین‌ها نه تنها ارتباط فیزیولوژیکی آن‌ها را با محیط بیضه افزایش می‌دهد، بلکه، همچنین نشان می‌دهد که این متابولیسم‌ها عملکرد اسپرم و در نتیجه سلامت باروری مردان را کنترل می‌کنند. فعالیت میتوکندری برای سلول‌های

ناباروری مردان به یک مشکل جهانی تبدیل شده است و در ۵۰ درصد از موارد ناباروری نقش دارد. علت اصلی ناباروری مردان شکست اسپرماتوژن مانند اولیگوزواسپرمی و آزواسپرمی است. آزواسپرمی به عنوان عدم وجود اسپرم از مایع منی تعریف می‌شود و در ۱۵ درصد افراد نابارور وجود دارد. آزواسپرمی مربوط به فرآیند اسپرم زایی ناقص است که به اختلال ژنتیکی، مشکل هورمونی یا نارسایی بیضه مربوط می‌شود (۱). از طرفی، اسپرماتوژن چرخه‌ای از فرآیند منظم و پیوسته برای تکثیر و تمایز سلول‌های زایای مردانه است که هر روز حدود ۱۰۰ میلیون اسپرم در مردان بالغ تولید می‌کند. این فرآیند از دوران بلوغ شروع می‌شود و تا زمان مرگ حفظ می‌شود. اسپرماتوژن، داخل لوله‌های اسپرم‌ساز که حاوی مخلوطی از سلول‌های زایا و سلول‌های سرتولی هستند، اتفاق می‌افتد. سلول‌های سرتولی نقش پرستاری را برای سلول‌های زایا ایفا می‌کنند و همچنین در طول رویدادهای اسپرم زایی هماهنگ می‌شوند (۲). اسپرماتوژن یک فرآیند ضروری در حفظ تولید مثل در مردان است. عملکرد طبیعی بیضه مربوط به عملکرد همزمان غدد درون ریز و عوامل پاراکرین و واکنش بین سلول‌های سرتولی توسط سلول‌های اسپرم‌زا می‌باشد (۳). اسپرم‌زایی به شدت به متابولیسم انرژی و متابولیسم گلیکولیتیک وابسته است، زیرا لاکتات تولید شده توسط سلول‌های سرتولی، بستر اصلی سلول‌های زاینده است. میتوکندری سلول‌های زایای جدا شده به طور بالقوه ATP را با سرعتی نزدیک به حداکثر تولید می‌کند. بنابراین، اسپرماتوژن ممکن است بسیار حساس به ترکیباتی باشد که با متابولیسم انرژی میتوکندری و کنترل تنفس سلولی تداخل دارند. هر گونه تغییر در تنظیم رفتار متابولیک این سلول‌ها ممکن است توسعه طبیعی اسپرماتوژن و در نتیجه باروری مردان را به خطر بیندازد. پیشنهاد شده است که میتوکندری‌ها نیز در این فرآیند دژنراتیو اسپرم نقش دارند (۴). در اسپرم بالغ، میتوکندری‌ها آکسوزوم و ایف متراکم مربوط به قسمت میانی را از طریق فسفوریلاسیون اکسیداتیو، می‌پوشاند که باعث افزایش تولید آدنوزین تری فسفات (ATP) می‌شود. غشای داخلی میتوکندری شامل چندین بخش است (زنجیره انتقال الکترون، ETC)، که الکترون‌های حاصل از اکسیداسیون دی هیدروفلاوین-آدنین دی نوکلئوتید (FADH₂) و نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NADH) را انتقال می‌دهد. در این فرآیند یک گرادیان پروتون اسمزی در سراسر غشای داخلی میتوکندری ایجاد می‌شود و متعاقباً توسط ATP سنتاز برای فسفریله کردن آدنوزین دی فسفات (ADP) به ATP استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد ATP مشتق از فسفوریلاسیون اکسیداتیو برای تحرک اسپرم مهم است. بیان چندین پروتئین میتوکندری اسپرم، ممکن

صورت آزاد در اختیار قرار می‌گرفت، تیمار شدند. غذای مصرفی حیوانات با توجه به وزنکشی هفتگی به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در اختیار حیوان قرار داشت.

به منظور ایجاد مدل آزواسپرمی، ابتدا داروی بوسولفان (Bu-sulfan) با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش‌های صحرایی به صورت داخل صفاقی برای هر موش صحرایی تزریق گردید. پس از گذشت یک ماه از القا مدل در هر گروه موش‌ها به صورت تصادفی به ۲ گروه آزواسپرمی (۵ سر) و تمرین+ آزواسپرمی (۵ سر) تقسیم شدند. یک گروه کنترل سالم (۵ سر)، بدون ایجاد مدل و یک گروه شم (۵ سر) فقط برای کنترل اثر تزریق در نظر گرفته شد. گروه آزواسپرمی، یک ماه بعد از ایجاد مدل تا پایان مطالعه (مدت ۸ هفته) باقی ماندند و گروه کنترل سالم و شم به مدت ۸ هفته نگهداری شدند و گروه تمرین+ آزواسپرمی، یک ماه بعد از ایجاد موش‌های آزواسپرمی به مدت ۸ هفته به انجام تمرین شنا پرداختند.

موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین+ آزواسپرمی، قبل از شروع پروتکل اصلی، به مدت یک هفته (۵ روز) هر بار به مدت مدت ۲۰ دقیقه به منظور آشنایی‌ها با آب و کاهش استرس شنا و سازگاری با شرایط تمرینی، در داخل استخر آب قرار می‌گرفتند. سپس ۵ روز در هفته تا پایان دوره تحقیق در یک مخزن آب به ابعاد ۵۰×۵۰×۱۰۰ سانتیمتری با درجه حرارت ۳۰-۳۲ درجه سانتیگراد در طی ۸ هفته به شنا پرداختند. مدت زمان تمرین در آب، روزانه ۳۰ دقیقه تا پایان مدت تمرین بود. 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 (۳۰-۵۰ mg/kg) و زایلازین (۳-۵ mg/kg) بیهوش و سپس کشته شدند و پس از کشتار بافت‌های پیوند شده مربوط به ناحیه بیضه جهت بررسی بافت‌شناسی و مطالعات ژنی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور نمونه‌های بافتی به فرمالین ۱۰ درصد و نمونه‌های مربوط به بررسی بیان ژن به تانک ازت منتقل شدند.

برای بررسی بیان ژنهای SIRT1 و PGC-1 α 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 تکنیک RT-qPCR جهت تایید بیان ژن‌های مورد مطالعه به صورت کمی استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کiazol (Kiazol)، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سینازن (CinnaGen) استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase IFermentas قرار گرفت. علاوه بر این،

اسپرم بالغ نیز حیاتی است زیرا با تحرک اسپرم مرتبط است که، عامل مهمی برای نفوذ سلول‌های کومولوس و زونا پلوسیدا تخمک است (۴، ۹). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد سبک زندگی بی تحرک می‌تواند تاثیر نامطلوبی بر تولید اسپرم در بیضه داشته باشد. با این حال، داده‌ها در مورد اثرات ورزش بر اسپرماتوژنز متنوع هستند. به عنوان مثال، گزارش‌ها نشان می‌دهند تمرینات ورزشی استقامتی طولانی مدت می‌تواند تولید تستوسترون را کاهش دهد، که به نوبه خود می‌تواند با کاهش اسپرماتوژنز همراه باشد. در واقع، سطح تستوسترون ورزشکاران تمرین شده استقامتی می‌تواند ۳۰ تا ۴۰ درصد کمتر از آن‌هایی که در گروه کنترل همسان سنی بودند، باشد. مطالعات با استفاده از مدل‌های حیوانی نشان می‌دهد که ۳ ساعت شنا در روز که ورزش فشرده محسوب می‌شود باعث ایجاد اختلالات گامتوژنیک و استروئیدوژنیک بیضه و افزایش استرس اکسیداتیو در موش صحرایی می‌شود. از سوی دیگر، دویدن مداوم روی چرخش دوار باعث کاهش تجمع آسیب اکسیداتیو شده و کاهش مرتبط با سن در اسپرم زایی بیضه موش را بهبود می‌بخشد (۷). درمان ناباروری‌های ناشی از آزواسپرمی، چالشی بزرگ در علوم پزشکی به حساب می‌آید (۱۰). یکی از راهکارهایی که محققان بر ناباروری موثر میدانند، فعالیت ورزشی می‌باشد. چرا که ناباروری ناشی از عدم تحرک که در افراد مبتلا به آزواسپرمی مشاهده می‌شود، از نگرانی‌های قابل توجه محافل پزشکی محسوب می‌شوند (۱۱). کاهش فعالیت بدنی می‌تواند باعث کاهش مقدار هورمون‌های جنسی، اسپرم زایی و باروری و نیز کوچک‌تر شدن بیضه و کاهش مقدار منی گردد. با توجه به وجود اطلاعات اندک در خصوص تاثیر فعالیت ورزشی بر ژن‌های موثر در بیوژنز میتوکندریایی در بافت بیضه موش‌های مدل آزواسپرمی این پژوهش با هدف بررسی بیان ژن‌های SIRT1 و PGC-1 α در بافت بیضه موش‌های آزواسپرمی شده با بوسولفان متعاقب یک دوره تمرینات شنا انجام شده است.

روش کار

در این مطالعه تجربی تعداد ۲۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی ۱۴/۷۸±۲۰۵/۶۵ گرم از انستیتو پاستور خریداری شدند. حیوانات در محیطی با میانگین دمای ۱/۴±۲۲ درجه سانتیگراد، رطوبت ۵۵ درصد و چرخه روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌کربنات 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 (۱۲). حیوانات از غذای پلت و آب که به

ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول زیر:

$$R = \frac{\Delta\Delta CT}{\Delta\Delta CT} = \frac{(CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}})_{\text{Time X}} - (CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}})_{\text{Time}}}{(CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}})_{\text{Time X}} - (CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}})_{\text{Time}}}$$

منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن با استفاده از حداقل ۵ غلظت لگاریتمی به ترتیب رقیق شونده از کنترل مثبت هر ژن رسم گردید. میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CT_{\text{target}}}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta CT_{\text{reference}}}}$$

($\Delta CT_{\text{reference}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{treatment}}$; $\Delta CT_{\text{target}} = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{treatment}}$)

در فرمول فوق E معرف Efficiency است و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای ژن به دست می‌آید (۱۳).

بعد از تحلیل آزمایشگاهی نمونه‌های بافتی، برای توصیف کمی داده‌ها از شاخص‌های آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف استاندارد و آمار استنباطی استفاده شد. ابتدا جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و برای تعیین تجانس واریانس از آزمون لون استفاده شد. سپس با توجه به طبیعی بودن نحوه توزیع داده‌ها از آزمون پارامتریک شامل آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری $p \leq 0.05$ برای بررسی تغییرات بیان ژن SIRT1 و افزایش PGC-1 α استفاده شد. برای انجام کلیه امور آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد و برای رسم نمودار از نرم افزار اکسل استفاده گردید.

یافته‌ها

جدول شماره ۱، میانگین وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد تفاوت معناداری در وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه وجود ندارد ($p > 0.05$).

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که گروه آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل سالم موجب کاهش معنادار سطح بیان ژن SIRT1 می‌شود و ۸ هفته تمرین هوازی شنا با شدت پایین موجب افزایش معنادار آن در گروه تمرین + آزواسپرمی نسبت به گروه آزواسپرمی شده است ($p = 0.001$) (نمودار شماره ۱).

جهت ارزیابی یکپارچگی RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز استفاده گردید.

جهت استخراج RNA ابتدا به بافت بیضه ۳۰۰-۲۰۰ لاندا کیازول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آن در دمای ۸۰- قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت پلاک موجود در کرایوتیوب را در حالت نیمه انجماد توسط سرسمپلر خرد کرده، سپس کمی آن را پیتاژ گردید. سپس به نمونه حدود ۱۰۰ لاندا کلروفرم اضافه شد تا سلول‌ها لیز شود. این محلول حدود ۱ دقیقه با سلول‌ها در تماس بود. پس از ۱ دقیقه محلول را با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ محلول به سه فاز تقسیم شد: قسمت بالایی لوله که شفاف و حاوی RNA بود، قسمت وسطی لوله که سفید رنگ و محتوی بافت لیز شده بود، قسمت پایینی لوله که صورتی و حاوی کیازول بود. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده، قرار داده شد. پس ۱ سیسی ایزوپروپانول را بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. ایزوپروپانول شفاف بوده و RNA نیز شفاف می‌باشد اما وقتی این دو با هم مخلوط شوند مایع کدری را به وجود می‌آورند. پس از افزودن ایزوپروپانول نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ سیسی الکل ۷۰ اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه گردید و سپس پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. به منظور حل کردن RNA به میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه بر روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرسمپلر پیتاژ و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه‌ی ۶۰ درجه قرار داده شد.

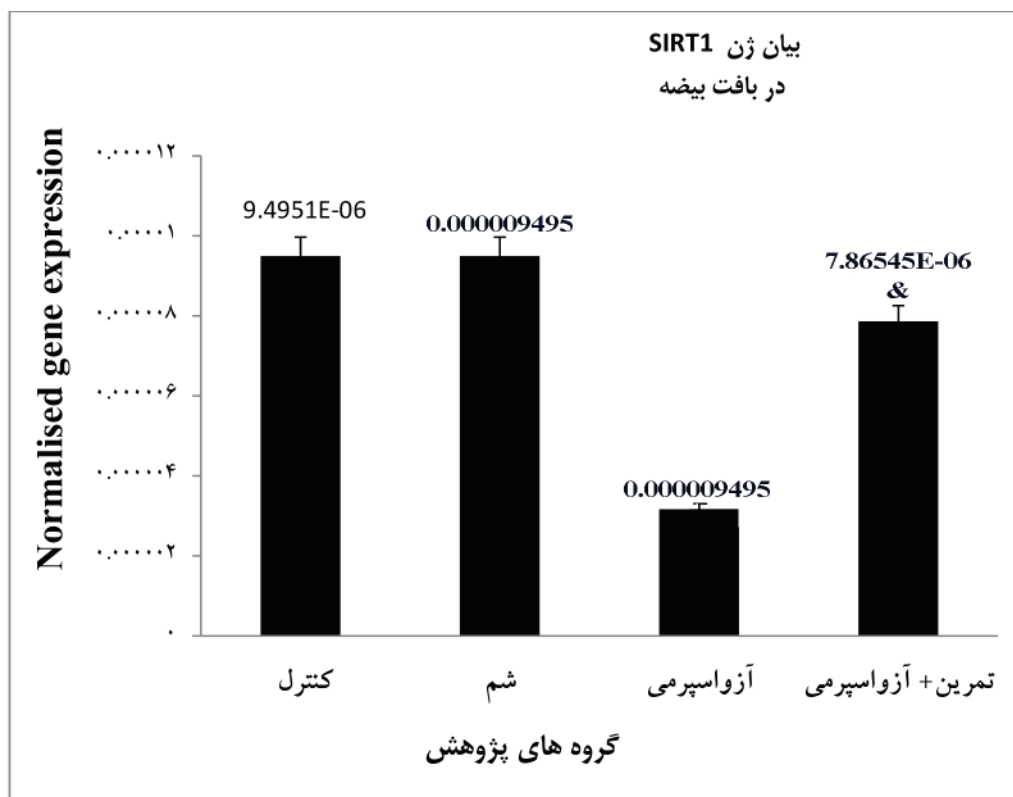
همچنین جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از پرایمر Oli-godtMWG-Biotech, Germany و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (شرکت فرمنتاز (Fermentas) استفاده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. هر واکنش PCR با استفاده از Applied Biosystems PCR master mix و SYBER Green در دستگاه، Applied Biosystems, Sequences Detection Systems Foster City CA (Step One) 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، ۵۸-۶۰ 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

جدول شماره ۱- میانگین و انحراف معیار وزن موش ها در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

گروه شاخص	کنترل انحراف معیار ± میانگین	شم انحراف معیار ± میانگین	آزواسپرمی انحراف معیار ± میانگین	تمرین + آزواسپرمی انحراف معیار ± میانگین
وزن (گرم)	۶/۲۰۴ ± ۴۵/۲۲	۷/۲۰۳ ± ۳۴/۱۴	۸/۲۰۸ ± ۷۶/۶	۸/۲۰۷ ± ۳۶/۱۷

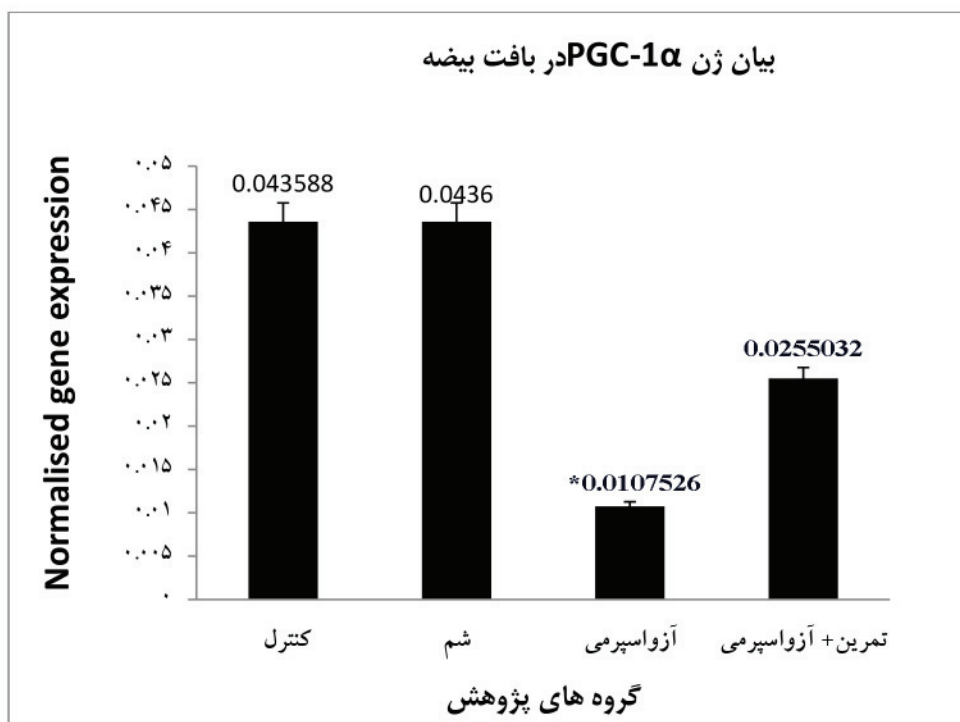
جدول شماره ۲- نتایج آزمون تحلیل واریانس یکرهه برای میزان بیان ژن SIRT1 و PGC-1α

آماره	F	df	P
بیان ژن SIRT1	۱۱/۹۹	۳	* < ۰/۰۰۰۱
بیان ژن PGC-1α	۴/۹۲۷	۳	* ۰/۰۱۳



نمودار شماره ۱- مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن SIRT1 بین گروه‌های مختلف پژوهش. * نشانه تغییر معنادار نسبت به گروه کنترل، & نشانه تغییر معنادار نسبت به گروه آزواسپرمی (مقدار $p \leq 0/05$).

همچنین نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که گروه آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل سالم موجب کاهش معنادار سطح بیان ژن PGC-1α می‌شود و ۸ هفته تمرین هوازی شناخت با شدت پایین موجب افزایش غیر معنادار آن در گروه تمرین + آزواسپرمی نسبت به گروه آزواسپرمی شده است (به ترتیب $p = 0/484$, $p = 0/024$) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲- مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن PGC-1 α بین گروه‌های مختلف پژوهش. * نشانه تغییر معنادار نسبت به گروه کنترل (مقدار $p \leq 0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

عروق دستگاه تناسلی شده و باعث افزایش جریان خون در آن می‌شود و متعاقب آن منجر به افزایش تولید اسپرم می‌گردد و در نتیجه باعث کاهش احتمال ناباروری در افرادی می‌گردد که به علت کمبود اسپرم دچار عقیمی شده‌اند (۱۵، ۱۶). فعالیت ورزشی آرام تا متوسط به علت افزایش جریان خون به تدریج سبب بهبود فعالیت متابولیکی می‌شود اما فعالیت شدید به دلیل تغییر جهت جریان خون به سمت ماهیچه‌های در حال فعالیت سبب کاهش آن می‌شود (۱۶، ۱۷). در اطراف قسمت میانی اسپرم غلافی از میتوکندری وجود دارد که غشای داخلی آن تولید ATP را با فسفوریلاسیون اکسیداتیو تسهیل می‌کند. اگر میتوکندری‌ها ناکارآمد باشند ممکن است قادر به ارائه ATP کافی برای تحرک مطلوب نباشند (۱۸). در این زمینه، افزایش بیان ژن SIRT1 و PGC-1 α مشاهده شد در مطالعه ما، با تمرین ممکن است با افزایش پتانسیل غشا و فعالیت متابولیک میتوکندری همراه باشد. در قسمت میانی اسپرم پستانداران بالغ، میتوکندری، برای ایجاد انرژی مورد نیاز برای حرکت اسپرم نقش اساسی دارد. علاوه بر این، کاهش تولید انرژی ممکن است باعث توقف میوز در طی اسپرم زایی

در تحقیق حاضر تاثیر ۸ هفته تمرین شنا با شدت پایین بر بیان ژن‌های SIRT1 و PGC-1 α در موش‌های مدل آزواسپرمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که القای مدل آزواسپرمی سبب کاهش سطح بیان ژن‌های SIRT1 و PGC-1 α شده و انجام ۸ هفته تمرین هوازی شنا با شدت پایین موجب افزایش این شاخص‌ها در گروه تمرین + آزواسپرمی نسبت به گروه آزواسپرمی شده است. در راستا نتایج این تحقیق، نشان داده شد که تمرین هوازی با توجه به بهبود سطح بیان ژن‌های موثر در بیوژنز میتوکندری و بهبود سلول‌های اسپرماتوگونی، سطح کیفیت جنسی و باروری را افزایش می‌دهد (۱۴). از سوی دیگر مطالعات حیوانی بیانگر توانایی سلول‌ها در بازگرداندن باروری، پس از فعالیت ورزشی در حیوانات هستند. فعالیت بدنی می‌تواند باعث آزاد شدن اکسید نیتریک^۱ گردد. اکسید نیتریک، آنزیم گوانیل سیکلاز را فعال کرده و در نتیجه میزان cGMP^۲ افزایش می‌یابد. این افزایش منجر به اتساع

1. Nitric oxide
2. cyclic guanosine monophosphate

عوامل مختلف رونویسی از جمله NRF_1 و NRF_2 را که فاکتورهای تعدیل کننده ژن‌های دخیل در اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری، چرخه TCA و زنجیره تنفسی‌اند را تنظیم می‌کنند (۲۲). $PGC1\alpha$ برنامه ژنتیکی را تنظیم می‌کند که سازگاری سلول‌ها را برای پاسخ‌گویی به نیازهای انرژی به ارمغان می‌آورد. بیان $PGC1\alpha$ در میتوئوب‌ها بیان ژن زنجیره تنفسی (مانند سیتوکروم C) را افزایش و بیوژنز میتوکندری را افزایش می‌دهد (۲۱).

به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که تغییر و کاهش بیان ژن‌های موثر در بیوژنز میتوکندری سلول‌های بافت بیضه در فرآیند اسپرماتوژنز می‌تواند باعث کاهش باروری و افزایش ناباروری گردد، ولی فعالیت ورزشی منظم هوازی مانند شنا با شدت پایین در مهار آثار ناشی از بیماری‌های ناباروری از طریق حفظ و توسعه بیوژنز میتوکندری در بهبود فرآیند اسپرماتوژنز کمک شایانی می‌کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دوره دکتری فیزیولوژی ورزشی می‌باشد. بدینوسیله نویسندگان تشکر خود را از تمامی کسانی که در پیشبرد اهداف رساله یاری نموده‌اند، اعلام می‌دارند.

تاییدیه اخلاقی

این پژوهش توسط کمیته مراقبت از حیوانات و استفاده از آن در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری تایید شده است (شماره مجوز تصویب: REC.SARI.IAU.IR.۱۴۹۰، ۱۳۹۸).

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

شود (۴). میتوکندری‌های اسپرم به‌طور منحصر به فردی در قسمت میانی قرار می‌گیرند تا انرژی را به سرعت و به‌طور موثر برای تحرک اسپرم تامین کنند. این میتوکندری‌ها نیاز شدید اسپرم به انرژی را با استفاده از فسفوریلاسیون اکسیداتیو (OXPHOS) از طریق زنجیره انتقال الکترون (ETC) تسهیل می‌کنند (۱۸). از دلایلی که میتوکندری‌ها برای اسپرم مهم هستند این است که آن‌ها تنها اندام‌هایی هستند که ژنوم خود را دارند: mtDNA ژنوم میتوکندری فقط از آگرون‌هایی که بدون اینترون بین ژن‌ها وجود دارند، تشکیل شده است. بنابراین، هر جهش یا حذف نقطه‌ای، ظرفیت تاثیرگذاری بر عملکرد میتوکندریایی در پشتیبانی از تنفس سلولی را دارد. برخی محققان گزارش کرده‌اند که این مکانیسم می‌تواند برش و پایه‌های ناشی از تخریب اکسیداتیو را ترمیم کند. میتوکندری همچنین به سرعت، بدون سیستم تصحیح قابل توجهی تکثیر می‌شود و نرخ جهش ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از DNA هسته‌ای (nDNA) است (۱۸).

جوزکو و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه خود اذعان داشتند که افزایش چگالی مویرگی و جریان خون، منجر به بهبود سطح و تحرک و تمایز سلول‌های بارور می‌شود (۱۹). همچنین تحقیقات انجام شده بر روی اثرگذاری فعالیت بدنی بر سلول‌های اسپرماتوگونی نشان می‌دهد که به دنبال فعالیت بدنی به ویژه هوازی، پاسخ سلولی با فعال شدن فوتواکسپتورهای موجود در زنجیره تنفسی واقع در میتوکندری آغاز شده و در اثر آن ردوکس سلولی تغییر حالت می‌دهد و همراه با تغییرات حالت غشاء سلولی با جابجایی کلسیم و تغییرات PH و فعال شدن $CAMP^1$ و مضاعف شدن DNA^2 منجر به ساخته شدن پروتئین‌های جدید و تکثیر سلولی می‌شود. به این ترتیب پاسخ‌های سلولی از سطح سلولی به سطح بافت و ارگان کشانده می‌شود و اثراتی مانند تکثیر سلولی، نئو و اسکولاریزاسیون^۳، شیفیت متابولیسم به سمت هوازی و متعادل کردن سطح باروری و کاهش ناباروری حاصل می‌آید (۲۰). نارا و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی تغییرات سطوح $SIRT_1$ و $PGC1\alpha$ در موش‌های جوان (۳ ماهه) و میانسال (۱۸ ماهه) بررسی کردند که در هر دو گروه تمرینی افزایش معنادار ($SIRT_1$ ، $PGC1\alpha$ ، AMPK) مشاهده شد. پروتکل تمرینی به مدت ۸ هفته و هر هفته ۵ روز به مدت ۵۰ دقیقه اجرا شد. سرعت نوارگردان ۰/۸ و ۱/۲ کیلومتر بر ساعت بود (۲۱). بر اساس مطالعات انجام شده، $SIRT_1$ سبب دی استیلاسیون و فعالیت $PGC1\alpha$ می‌شود که می‌تواند

1. Cyclic Adenosine Monophosphate
2. Duplication
3. Neovascularization

منابع

- PGC-1 α in a rat testicular milieu. *Reproductive biology*. 2019 Mar 1;19(1):22-37.
10. Chen H, Tang QL, Wu XY, Xie LC, Lin LM, Ho GY, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. *Mol Med Rep*. 2015;12(1):819-28.
 11. Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril*. 2013;100(5):1180-6.
 12. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. *Guide to the care and use of experimental animals*. 2nd ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care Ottawa Pub; 1993. 1-193.
 13. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
 14. Zheng G, Huang L, Tong H, et al. Treatment of acute respiratory distress syndrome with allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: a randomized, placebo-controlled pilot study. *Respir Res*. 2014;15:39.
 15. Taher, Z. Hamednia, M. Haghghi, H. Investigation of Effect of one Session Moderate and Heavy Resistance Exercise on Acute and Delayed Responses of Leptin, Insulin, Cortisol, Testosterone and 24- Hour Energy Expenditure in Healthy Men Iranian Journal of Endocrinology & Metabolism; May 2011, Vol. 13 Issue 1, p67. [Persian].
 16. Bagheri Hamzian Olya jaleh, Khadem Ansarimohamad hasan, Yaghmaei parichehr. The effect of endurance running activities on Prolactin, Testosterone and DHEA-S levels. *Urmia Medical Journal* 2011;21(5):391-397. [Persian].
 17. Vaamonde D, Garcia-Manso JM, Hackney AC. Impact of physical activity and exercise on male reproductive potential: a new assessment questionnaire. *Revista andaluza de medicina del deporte*. 2017 Jun 1;10(2):79-93.
 18. O'Connell M, McClure N, Lewis SE. A
 1. Azantee YA, Lokman MI. The future of Azospermic Patients: In vitro spermatogenesis. *Andrology*. 2015;4:1000143.
 2. Singh SR, Burnicka-Turek O, Chauhan C, Hou SX. Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011 Mar;15(3):468-83.
 3. Jafarian A, Sadeghi MR, Pejhan N, Salehkhah S, Lakpour N, Akhondi MM. Regeneration of spermatogenesis in a mouse model of azoospermia by follicle-stimulating hormone and oestradiol. *Andrologia*. 2014 Dec;46(10):1098-106.
 4. Illiano E, Trama F, Zucchi A, Iannitti RG, Fioretti B, Costantini E. Resveratrol-Based Multivitamin Supplement Increases Sperm Concentration and Motility in Idiopathic Male Infertility: A Pilot Clinical Study. *Journal of Clinical Medicine*. 2020 Dec;9(12):4017.
 5. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C. The p38–PGC-1 α –irisin–betatrophin axis: Exploring new pathways in insulin resistance. *Adipocyte*. 2014 Jan 28;3(1):67-8.
 6. Popov LD. Mitochondrial biogenesis: An update. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020 May;24(9):4892-9.
 7. 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.
 8. Ianni A, Kumari P, Tarighi S, Argento FR, Fini E, Emmi G, Bettiol A, Braun T, Prisco D, Fiorillo C, Becatti M. An Insight into Giant Cell Arteritis Pathogenesis: Evidence for Oxidative Stress and SIRT1 Downregulation. *Antioxidants*. 2021 Jun;10(6):885.
 9. Renu K, Gopalakrishnan AV. Deciphering the molecular mechanism during doxorubicin-mediated oxidative stress, apoptosis through Nrf2 and

comparison of mitochondrial and nuclear DNA status in testicular sperm from fertile men and those with obstructive azoospermia. *Human Reproduction*. 2002 Jun 1;17(6):1571-7.

19. Józków P, Rossato M. The Impact of Intense Exercise on Semen Quality. *Am J Mens Health*. 2017;11(3):654-662.

20. Farup J, Srensen H, Kjlhede T. Similar changes in muscle fiber phenotype with differentiated consequences for rate of force development: endurance versus resistance training. *Hum Mov Sci*. 2014;34:109–19.

21. Nara R. C, Marques S, Luciano S, Pauli J, Moura L, Caperuto E et al.(2014). Treadmill Training Increases SIRT-1 and PGC-1 α Protein Levels and AMPK Phosphorylation in Quadriceps of Middle-Aged Rats in an Intensity-Dependent Manner

22. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*,1,361-70.