



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-1α در بافت بیضه موشهای آزواسپرمی شده با بوسولفان متعاقب یک دوره تمرینات شنا

اطلاعات مقاله

چکیده

سحر کوچکی^۱
هاجر عباس زاده^{۲*}
پروین فرزانگی^۳

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

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۲۰ سرموش 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-1α می‌شود و ۸ هفته تمرین هوایی شنا با شدت پایین موجب افزایش معنادار آن در گروه تمرین + آزواسپرمی نسبت به گروه آزواسپرمی شده است.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج تحقیق حاضر بیان‌گر آن است که فعالیت ورزشی منظم هوایی مانند شنا با شدت پایین در مهار آثار ناشی از بیماری‌های ناباروری از طریق حفظ و توسعه بیوژن میتوکندری در بهبود فرآیند اسperm ماتتوژن کمک شایانی می‌کند.

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

وابستگی سازمانی نویسنده‌گان

- 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 تعییر 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 می‌گذارند. 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 دارند. از جمله رایج‌ترین فاکتورهای رونویسی که پرموتر ژن‌های میتوکندری را فال می‌کنند شامل ژن‌هایی از خانواده PGC-1α هستند. این خانواده از کواکتیویتورها چند مسیر ساخت و ساز بدن مانند تنفس سلولی، ترموزنر و متابولیسم را تنظیم می‌کنند. اگرچه این کواکتیویتورها بیوژن‌های میتوکندری را تحریک می‌کنند، میزان بیان و مقدار فعالیت PGC-1α توسط گروه متعدد از فاکتورهای بالادست از جمله تنظیم کننده‌های خاموش اطلاعات (۱-۷)، SIRT، تنظیم می‌شود (۵، ۶). هفت همولوگ پستانداران از SIRT (SIRTs ۱-۷)، پروتئین‌هایی متعلق به خانواده‌ای از آنزیمه‌های وابسته به NAD⁺ هستند که به طور تکاملی با فعالیت دی استیلاز و یا مونو-ADP ریبوزیل ترانسفراز حفظ شده‌اند. سیرتین‌ها در فرآیندهای سلولی متعددی از جمله تنظیم آپوپتوز توسط استیل زایی p53 به دنبال تنظیم پایین دست Bax نقش دارند. ۱ SIRT علاوه بر نقش آپوپتوز، نقش ضدالتهابی در بیضه نیز دارد که می‌تواند بر اسپرم زایی تأثیر بگذارد. نشان داده شده است که عدم وجود ۱ SIRT به طور قابل توجهی باعث کاهش اسپرم‌اتوژن در موش می‌شود، که نشان می‌دهد مسیرهای با واسطه SIRT1 برای فیزیولوژی بیضه مهم هستند (۷، ۸). ۱ SIRT به دلیل توانایی آن در دی اسیتیله کردن هیستون‌ها و پروتئین‌های غیرهیستونی مانند PGC-1 به چندین بیماری مرتبط با سن در ارتباط است. بنابراین، می‌تواند بیولوژی، متابولیسم و سرنوشت سلول را در سطوح مختلف تنظیم کند. بنابراین، سیرتین‌ها نقش مهمی در طیف وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی دارند. تنظیم متابولیسم گلیکولیتیک و کنترل تنفسی-متابولیسمی انرژی میتوکندری توسط سیرتین‌ها 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 همان‌گه 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 لاكتات تولید شده توسط سلول‌های سرتولی، بستر اصلی سلول‌های زاینده است. میتوکندری سلول‌های زایای جدا شده به طور بالقوه ATP را با سرعتی نزدیک به حداقل تولید می‌کند. بنابراین، اسپرم‌اتوژن ممکن است بسیار حساس به ترکیباتی باشد که با متابولیسم انرژی میتوکندری و کنترل تنفس سلولی تداخل دارند. هر گونه تعییر 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 الیاف 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 فسفوبله 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 آشنازی‌ها 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 $100 \times 50 \times 50$ سانتیمتری با درجه حرارت ۳۲-۳۰ 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، نمونه برداری از حیوانات پس از ۴۸ ساعت بعد از آخرین برنامه تمرینی شنا انجام گرفت. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتابیون (/mg \cdot kg $^{-1}$) و زایلازین (mg/kg ۵-۳) بیهوش و سپس کشته شدند و پس از کشتار بافت‌های پیوند شده مربوط به ناحیه پیضه 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-1α در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک PCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایم انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس RT-qPCR 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 کیازول (Kiazol)، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سیتیاثن (CinnaGen) استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاقی 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 (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 اسپرم اتوژن 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 اسپرم اتوژن 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، دویلن مدام روی چرخش دور 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 بیوژن میتوکندریایی در بافت بیضه موش‌های مدل آزواسپرمی این PGC-1α و SIRT1 با هدف بررسی بیان ژن‌های آزواسپرمی 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 20.5 ± 6.5 گرم از انسنتیو پاستور خردباری شدند. حیوانات در محیطی با میانگین دمای $22 \pm 1/4$ درجه سانتیگراد، رطوبت ۵۵ درصد و چرخه روش‌نایابی تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی کربنات نگهداری شدند. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انسنتیو بین‌المللی سلامت و پروتکل‌های این پژوهش با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاقی بیان ژن 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 آلدگی 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 داده‌ها در فرمول زیر:

$$R = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$$

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

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.

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

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

در فرمول فوق Efficiency معرف E است و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای ژن به دست می‌آید (۳).

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 PGC-1α 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 ($p \geq 0.05$).

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که گروه آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل سالم موجب کاهش معنادار سطح بیان ژن SIRT1 می‌شود و هفته تمرین هوایی شنا باشد 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 الکتروفوروز استفاده گردید.

جهت استخراج RNA ابتدا به بافت بیضه ۲۰۰-۳۰۰ لاندا کیازول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آن در دمای ۸۰-۹۰°C قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت پلاک موجود در کرایوتیوب را در حالت نیمه انجماد توسط سرسملپر خرد کرده، سپس کمی آن را پیپتاژ 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 ۱۲۰۰ 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 ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ مایع رویی تخیله 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 سسپلر تخیله گردید و سپس پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. به منظور حل کردن RNA به میزان ۲۰ لاندا آب مقتدر ۶۰ درجه بر روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرسملپر پیپتاژ و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه‌ی ۶۰ درجه قرار داده شد.

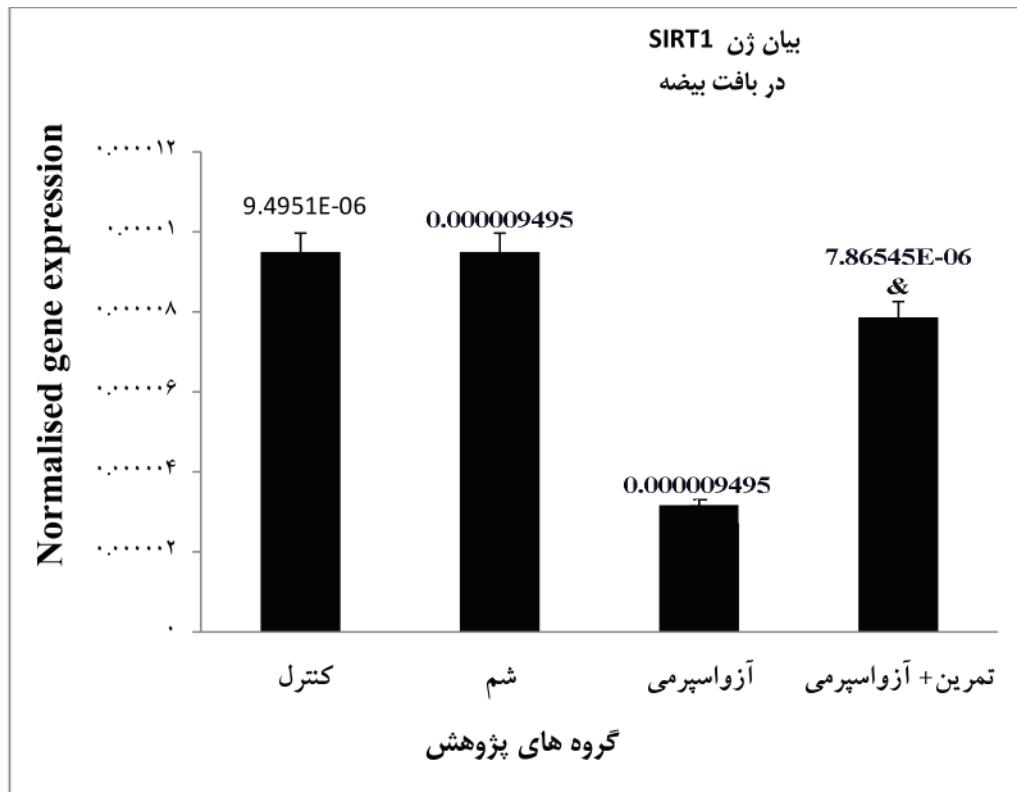
همچنین جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از پرایمر Oligo-dT مکروس (شرکت فرمتاز Fermentas) استفاده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. هر واکنش برداری استفاده از PCR master mix Applied Biosystems و Applied Biosystems, Se- SYBER Green ABI) Foster City CA, quences Detection Systems ۴۰ (Step One) طبق بروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۲۰ ثانیه، 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 گروه های مختلف مورد مطالعه

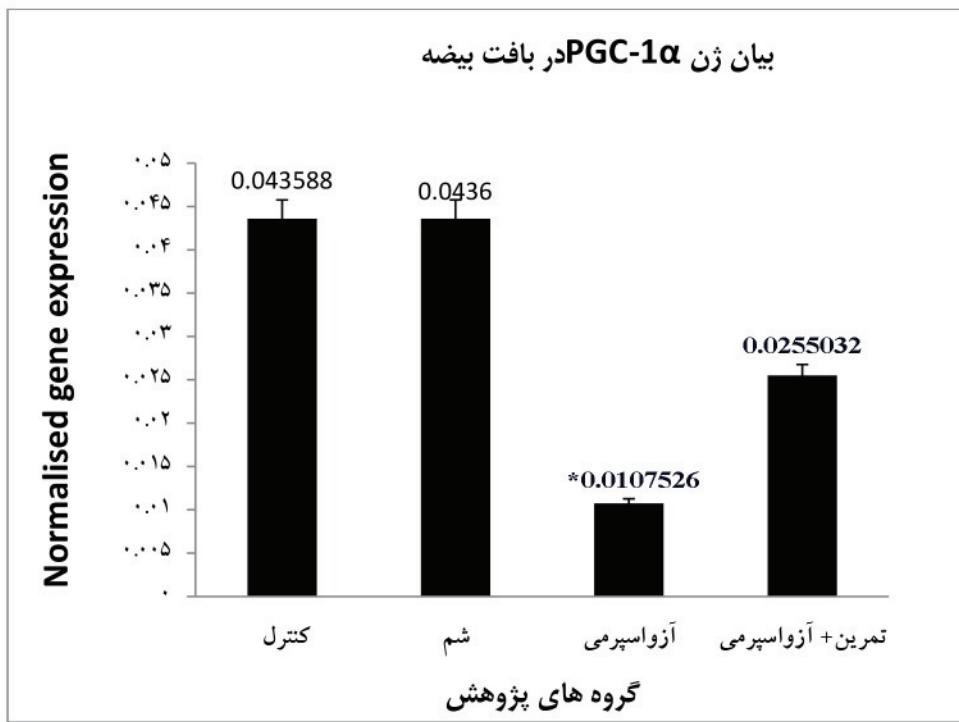
گروه شاخص	وزن (گرم)	میانگین انحراف معیار \pm	کنترل میانگین انحراف معیار \pm	شم میانگین انحراف معیار \pm	آزواسپرمی میانگین انحراف معیار \pm	تمرین + آزواسپرمی میانگین انحراف معیار \pm
	وزن (گرم)	۶/۲۰۴ \pm ۴۵/۲۲	۷/۲۰۳ \pm ۳۴/۱۴	۸/۲۰۸ \pm ۷۶/۶	۸/۲۰۷ \pm ۳۶/۱۷	میانگین انحراف معیار \pm

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

P	df	F	آماره
* <0.0001	۳	۱۱/۹۹	بیان ژن SIRT1
** <0.013	۳	۴/۹۲۷	بیان ژن PGC-1α

نمودار شماره ۱- مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن SIRT1 بین گروه های 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 می شود و ۸ هفته تمرین هوازی شنا با شدت پایین موجب افزایش غیر معنادار آن در گروه تمرین + آزواسپرمی نسبت به گروه آزواسپرمی شده است (به ترتیب $p = 0.024$, $p = 0.084$). (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲ - مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن PGC-1 α بین گروه های مختلف پژوهش. * نشانه تغییر معنادار نسبت به گروه کنترل (مقدار $p \leq 0.05$).

عروق دستگاه تناسلی شده و باعث افزایش جریان خون در آن می شود و متعاقب آن منجر به افزایش تولید اسپرم می گردد و در نتیجه باعث کاهش احتمال ناباروری در افرادی می گردد که به علت کمبود اسپرم چار عقیمی شده اند (۱۵، ۱۶). فعالیت ورزشی آرام تا متوسط به علت افزایش جریان خون به تدریج سبب بهبود فعالیت متابولیکی می شود اما فعالیت شدید به دلیل تغییر جهت جریان خون به سمت ماهیچه های در حال فعالیت سبب کاهش آن می شود (۱۷، ۱۶). در اطراف قسمت میانی اسپرم غلافی از میتوکندری وجود دارد که غشاء داخلی آن تولید ATP را با فسفوریلاسیون اکسیداتیو تسهیل می کند. اگر میتوکندری ها 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

بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر تاثیر ۸ هفته تمرین شنا باشد پایین بر بیان ژن های SIRT1 و PGC-1 α در موش های مدل آزواسپرمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که القای مدل آزواسپرمی سبب کاهش سطح بیان ژن های SIRT1 و PGC-1 α شده و انجام ۸ هفته تمرین هوازی شنا باشد پایین موجب افزایش این شاخص ها 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 ژن های موثر در بیوژنز میتوکندری و بهبود سلول های اسپرماتوگونی، سطح کیفیت جنسی و باروری را افزایش میدهد (۱۹)، از سوی دیگر مطالعات حیوانی بیانگر توانایی سلول ها در بازگرداندن باروری، پس از فعالیت ورزشی در حیوانات هستند. فعالیت بدنی می تواند باعث آزاد شدن اکسید نیتریک¹ گردد. اکسید نیتریک، آنزیم گوانیل سیکلاز را فعال کرده و در نتیجه میزان cGMP² افزایش می یابد. این افزایش منجر به اتساع

1. Nitric oxide

2. cyclic guanosine monophosphate

عوامل مختلف رونویسی از جمله NRF₁ و NRF₂ را که فاکتورهای تعدیل کننده ژن‌های دخیل در اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری، چرخه TCA و زنجیره تنفسی آند را تنظیم می‌کنند (۲۲). PGC1α برنامه ژنتیکی را تنظیم می‌کند که سازگاری سلول‌ها را برای پاسخ‌گویی به نیازهای انرژی به ارمغان می‌آورد. بیان PGC1α در میوتوب‌ها بیان ژن زنجیره تنفسی (مانند سیتوکروم C) را افزایش و بیوژن ز میتوکندری را افزایش می‌دهد (۲۱).

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

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دوره دکتری فیزیولوژی ورزشی می‌باشد. بدینوسیله نویسندهای تشكر 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: IR.REC.SARI.IAU.IR. ۱۳۹۸، ۱۴۹).

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندهای بیان نشده است.

شود (۴). میتوکندری‌های اسپرم به طور منحصر به فردی در قسمت میانی قرار می‌گیرند تا انرژی را به سرعت و به طور موثر برای حرکت اسپرم تأمین 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 اندامک‌هایی هستند که ژنوم خود را دارند: mtDNA ژنوم میتوکندری فقط از اگرون‌هایی که بدون ایتررون بین ژن‌ها وجود دارند، تشکیل شده است. بنابراین، هر جهش یا حذف نقطه‌ای، ظرفیت تاثیرگذاری بر عملکرد میتوکندری‌ای در پشتیبانی از تنفس سلولی را دارد. برخی محققان گزارش کرده‌اند که این مکانیسم می‌تواند برش و پایه‌های ناشی از تخرب 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 حرک 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 هوایی، پاسخ سلولی با فعال شدن فوتواکسپتورهای موجود در زنجیره تنفسی واقع در میتوکندری آغاز شده و در اثر آن ردوكس سلولی تغییر حالت می‌دهد و همراه با تغییرات حالت غشاء سلولی با جابجایی کلسیم و تغییرات PH و فعال شدن CAMP¹ و مضاعف شدن² DNA 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 اثر اتی مانند تکثیر سلولی، نشو و اسکولاریزاسیون³، شیفت متایولیسم به سمت هوایی و متعادل کردن سطح باروری و کاهش ناباروری حاصل می‌آید (۲۰). نارا و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی تغییرات سطوح PGC1α و SIRT در موش‌های جوان (۳ ماهه) و میانسال (۱۸ ماهه) بررسی کردند که در هر دو گروه تمرینی افزایش معنادار (AMPK, PGC-1α, SIRT) 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، سبب دی استیلاسیون و فعالیت PGC1α 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 Azoospermic 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, Salehkhou 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, Bettoli 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, Kjelhede 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.