اثر ۸ هفته تمرین شنا، سلول‌درمانی و مصرف ویتامین E بر سطوح تستوسترون و ژن‌های درگیر در مسیر اتوفاژی موش‌های نر نابارور

بهنام اسماعیلی[۱]، دکتر پروین فرزانگی[۲*]، دکتر سید عبدالله هاشم ورزی[۳]، دکتر بابی سان عسکری[۴]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.
۲. دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.
۳. استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.
۴. استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۳/۰۳/۰۷

خلاصه

مقدمه: ناباروری در واقع عدم باروری در زوجینی است که با وجود یک سال یا بیشتر تلاش برای تولید مثل، هیچ‌گونه لقاحی در آن‌ها رخ نداده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ۸ هفته تمرین شنا، سلول‌درمانی و مصرف ویتامین E بر تستوسترون و ژن‌های Lc31 و P62 بافت بیضه موش‌های مدل آزواسپرمی انجام شد.

روش‌کار: در این مطالعه تجربی، ۴۰ سر رت ۶ تا ۸ هفته‌ای به‌صورت تصادفی انتخاب، و سپس مدل آزواسپرمی با داروی بوسولفان با دوز ۴۰ میلی‌گرم القاء شد. پس از گذشت یک‌ماه موش‌ها در ۸ گروه: ۱) کنترل، ۲) بیمار، ۳) شم، ۴) بیمار + تمرین، ۵) بیمار + مکمل، ۶) بیمار + سلول، ۷) بیمار + مکمل + تمرین و ۸) بیمار + سلول + تمرین، تقسیم شدند. سلول‌های بنیادی در ناحیه مجران دفران به میزان یک میلیون سلول برای هر موش پیوند زده شد، محلول خوراکی ویتامین E به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به‌صورت گاواژ دریافت کردند و هم‌چنین گروه‌های تمرینی به‌مدت ۸ هفته، ۳۰ دقیقه در روز، ۵ روز در هفته تمرین شنا را به‌صورت تداومی و با شدت ثابت ۶۰ درصد ضربان قلب بیشینه انجام دادند. سطوح تستوسترون به روش الایزا و بررسی بیان ژن‌های P62 و LC31 بافت بیضه با تکنیک PCR Real Time انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۶) انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: القای آزواسپرمی باعث کاهش معنی‌دار سطوح تستوسترون و بیان ژن‌های Lc31 و P62 بافت بیضه نسبت به گروه کنترل شد ($p\leq ۰/۰۵$)، اما در گروه‌های مکمل، سلول، تمرین، تمرین+ مکمل و تمرین+ سلول نسبت به گروه‌های بیمار و شم افزایش معنی‌دار را نشان دادند ($p\leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر هم‌افزایی تمرین شنا با ویتامین E و سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در بهبود شار اتوفاژی در رت‌های مدل تجربی آزواسپرمی مشاهده شد که ممکن است از این طریق در افزایش تستوسترون و یا حتی باروری مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: آزواسپرمی، اتوفازی، تمرین شنا، سلول بنیادی مزانشیمی، ویتامین E

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر پروین فرزانگی؛ گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران. **تلفن:** ۰۱۱-۴۲۲۷۹۴۱۰؛ **پست الکترونیک:** parvin.farzanegi@gmail.com

مقدمه

آزوسپرمی[1] از جمله عوامل شناخته شده ناباروری در مردان به شمار می‌رود. ناباروری به‌عنوان عدم موفقیت در بارداری بالینی پس از ۱۲ ماه یا بیشتر از مقاربت منظم بدون پیشگیری از بارداری تعریف می‌شود. در سال‌های اخیر، ناباروری به یک موضوع بهداشت عمومی جهانی تبدیل شده است و قریب ۱٪ مردان از کل جمعیت را درگیر کرده و علت وقوع آن، فاکتور مهمی در شناخت و تعیین روش درمانی این بیماران است (۱).

تستوسترون برای رشد جنسی و حفظ ویژگی‌های مردانه ضروری است و کمبود این هورمون منجر به هیپوگنادیسم اولیه یا دیررس می‌شود. تستوسترون عمدتاً در سلول‌های لیدیگ تولید می‌شود، جایی که گزارش شده است که اتوفاژی بسیار فعال است. با این حال، نقش عملکردی اتوفاژی در سنتز تستوسترون ناشناخته باقی‌مانده است (۲). آداپتورهای اتوفاژی که به‌عنوان گیرنده‌های محموله برای تخریب انتخابی عمل می‌کنند، نقش مهمی در تعیین گزینش‌پذیری اندامک‌های هدف بازی می‌کنند. شناخته شده‌ترین آداپتور p62 است که حاوی یک دنباله تشخیص LC3[2] (LRS) با منطقه تعاملی LC3[3] (LIR)، یک دامنه مرتبط با یوبیکوئیتین[4] (UBA) و دامنه PHOX و BEM1P (BP1) است که مسئول دیمریزاسیون و چندمریزاسیون پروتئین هستند (۳). برای فعال کردن اتوفاژی انتخابی، ابتدا پروتئین‌های سطحی روی اندامک‌های آسیب‌دیده (مانند میتوکندری) یا میکروب‌ها توسط یوبیکوئین لیگاز شناسایی و سپس آداپتورهای اتوفاژی مانند P62، اندامک‌های آسیب‌دیده را از طریق فعل و انفعالات با پروتئین‌های یوبیکوئیلیته جذب می‌کنند. آداپتورهای روی اندامک‌های آسیب‌دیده توسط LC3 شناسایی می‌شوند و سپس هدف فرو بردن توسط اتوفاگوزوم است (۴).

اخیراً، شواهد زیادی نشان می‌دهد که اتوفاژی در تعداد زیادی از رویدادهای سلولی در طول اسپرم‌زایی، مانند تولید تستوسترون، مونتاژ تخصصی اکتوپلاسمی (ES)، بیوژنز آکروزوم و سازمان‌دهی اسکلت سلولی عمل می‌کند (۵). هم اتوفاژی حجیم و هم اتوفاژی انتخابی در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف، با تخریب و بازیافت اجزای سلولی، برای اطمینان از اسپرم‌زایی موفق شرکت می‌کنند (۶). نکته قابل توجه این است که اتوفاژی انتخابی که در رویدادهای مختلف نقش دارد، می‌تواند هموستاز سلولی را در طول اسپرماتوژنز حفظ کند (۷). اگرچه در ادبیات گزارش شده است که میتوفاژی، لیپوفاژی و رتیکولوفاژی ارتباط نزدیکی با اسپرماتوژنز دارند (۱۰-۸)، هیچ خلاصه مؤثری در مورد نقش اتوفاژی انتخابی در اسپرماتوژنز و باروری مردان وجود ندارد.

یک کارآزمایی تصادفی‌سازی و کنترل شده اخیر که توسط آزمایشگاه تحقیقاتی انجام شد، نشان داد که در افراد سالم، تمرینات هوازی با شدت متوسط می‌تواند باعث بهبود قابل توجهی در پارامترهای مایع منی و یکپارچگی DNA اسپرم، عمدتاً از طریق سازگاری در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی منی و کاهش نشانگرهای منی التهاب شود (۱۱)، با این‌حال، تا به امروز، هیچ گزارش منتشر شده‌ای در مورد اثرات تمرین ورزشی بر ژن‌های درگیر در اتوفاژی رت‌های مبتلا به آزواسپرمی وجود ندارد. بنابراین، با در نظر گرفتن نقش نشانگرهای اتوفاژی در عملکرد تناسلی مردان و اثرات بالقوه تمرین ورزشی بر واسطه‌های التهابی منی و هموستاز ردوکس، این فرضیه مطرح است که در رت‌های نابارور، تمرین ورزشی هوازی متوسط به‌عنوان یک گزینه درمان جدید، در بهبود اتوفاژی و افزایش باروری موفق خواهد بود و این تغییرات با افزایش تستوسترون، بهبود در اسپرم‌زایی و در نهایت عملکرد تولید مثل مردان مرتبط است (۱۲). هم‌چنین تحقیقات انجام شده نشان داده است که ورزش هوازی می‌تواند با بهبود وضعیت عملکردی اتوفاژی، آتروفی عضلانی اسکلتی را سرکوب کند، همانطور که توسط سطوح بیان نشانگرهای زیستی مرتبط با اتوفاژی متعدد، از جمله Atg5، Atg7، p62 و LC3-II در مدل موش‌های پیر تأیید شده است (۱۳). لیانگ و همکاران (۲۰۲۱) افزایش نسبت LC3-II/LC3-I و

[1] Azoospermia
[2] LC3 recognition sequence
[3] LC3- interacting region
[4] Ubiquitinated proteins

کاهش p62 را در موش‌ها پس از مداخله تمرین هوازی تداومی مشاهده نمودند. این یافته نشان می‌دهد که ورزش هوازی می‌تواند شار اتوفاژیک را افزایش دهد، حذف پروتئین‌های آسیب‌دیده داخل سلولی و ضایعات متابولیکی در سلول‌ها را تسریع بخشد و در نتیجه بازسازی ساختاری و عملکردی فیبرهای عضلات اسکلتی را تقویت کند (۱۴).

از طرفی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی نوعی سلول بنیادی بزرگسال محسوب می‌شوند و با دو خاصیت پتانسیل خود تجدیدی برای مدت طولانی و توان تمایز به سلول‌های رده اسکلتی، شناخته می‌گردند (۱۵). در واقع، این سلول‌ها، نوعی سلول غیرخون‌ساز ساکن در مغز استخوان بوده و برای اولین بار از این بافت جداسازی و توصیف شده‌اند. علاوه بر مغز استخوان، سایر منابع حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در افراد بزرگسال شامل بافت پریوست، استخوان ترابکولار، بافت چربی، پرده سینوویال، عضله اسکلتی، خون محیطی و دندان شیری است. پتانسیل تمایز و نیز توان تکثیر برای مدت طولانی سبب شده است که سلول بنیادی مزانشیمی به یک منبع مناسب در استراتژی‌های ترمیم بافتی، سلول درمانی و مهندسی بافت تبدیل شود (۱۶). پیوند سلول-های بنیادی مزانشیمی، یک روش درمانی جدید است که برای القای اسپرم‌زایی و درمان ناباروری مردان پیشنهاد شده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در فرآیندهای بقای سلولی، تکثیر، مهاجرت، رگ‌زایی و تعدیل ایمنی نقش دارند (۱۷). با توجه به مزایای ذکر شده، این سلول‌ها به‌عنوان یک ماده ایده‌آل برای درمان آزواسپرمی در نظر گرفته می‌شوند، اما تاکنون در رابطه با اثر این سلول‌ها در ژن‌های درگیر در اتوفاژی رت‌های مبتلا به آزواسپرمی پژوهشی صورت نگرفته است.

علاوه بر این، مکمل ویتامین E برای کاهش رشد تومور پستان استفاده شده است و خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضد التهابی، محافظت کننده قلبی و عصبی آن گزارش شده است (۱۸). مطالعات سال‌های گذشته نشان داده است که آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ویتامین E می‌توانند تأثیر مثبتی بر استروئیدزایی داشته باشند. نتایج مطالعات in vitro و in vivo تأیید می‌کند که ویتامین E اثر محافظتی بر استروئیدزایی سلول لیدیگ دارد (۱۹، ۲۰)، اما تاکنون اثر آن به‌تنهایی و در ترکیب با تمرین شنا بر فرآیند اتوفاژی رت‌های مدل آزواسپرمی مورد آزمایش قرار نگرفته است.

با عنایت به موارد مطروحه و اثرات مفید فعالیت ورزشی، سلول بنیادی و مصرف ویتامین E در درمان ناباروری و این‌که هیچ پژوهشی در خصوص اثر هم‌افزایی استفاده هم‌زمان از تمرین ورزشی با ویتامین E و سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر اتوفاژی رت‌های مبتلا به آزواسپرمی مورد بررسی قرار نگرفته است، لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر تمرین شنا، مصرف ویتامین E و تزریق سلول بنیادی بر سطوح تستوسترون و ژن‌های درگیر در مسیر لیپوفاژی موش‌های نر نابارور انجام شد.

روش‌کار

نمونه‌های پژوهش حاضر را موش‌های آزمایشگاهی تشکیل می‌دادند که به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. با توجه به این که آزمودنی‌ها در آزمایشگاه به لحاظ بسیاری از متغیرها تحت کنترل بودند، از این رو پژوهش حاضر از نوع تجربی می‌باشد.

جامعه و نمونه آماری پژوهش: نمونه آماری این پژوهش شامل موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با سن حدود ۸-۶ هفته بودند که از بین آن‌ها ۴۰ سر موش از مرکز پژوهش و تکثیرحیوانات آزمایشگاهی تهران خریداری و پس از انتقال آزمودنی‌ها به محیط آزمایشگاه و پس از یک هفته سازگاری با محیط جدید، به‌صورت گروه‌های ۵تایی در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف در محیطی با میانگین دمای ۱/۴±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵٪ و چرخه 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 وزن‌کشی هفتگی) تغذیه شدند و به‌صورت آزاد از طریق بطری‌هایی به آب مصرفی دسترسی داشتند.

به منظور ایجاد مدل آزواسپرمی، ابتدا رت‌های بالغ ۸-۶ هفته‌ای با میانگین وزنی ۲۵۰-۲۲۰ 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 (۲۱). پس از گذشت یک ماه از القاء مدل در هر گروه، موش‌ها به‌صورت زیر گروه‌بندی شدند:

گروه کنترل (به‌مدت ۸ هفته نگهداری شدند)

گروه بیمار (یک ماه بعد از ایجاد مدل تا پایان مطالعه باقی ماندند به‌مدت ۸ هفته)

گروه شم (یک ماه بعد از ایجاد مدل تا پایان مطالعه باقی ماندند به‌مدت ۸ هفته)

گروه بیمار + تمرین (یک ماه بعد از ایجاد موش‌های آزواسپرمی به‌مدت ۸ هفته، به‌صورت روزانه به‌مدت ۳۰ دقیقه در روز ۵ روز در هفته تمرین شنای تداومی را با شدت ثابت ۶۰٪ ضربان بیشینه انجام دادند) (۲۲).

گروه بیمار + سلول (یک ماه بعد از ایجاد موش‌های آزواسپرمی یک بار سلول‌های بنیادی به‌صورت پیوند در ناحیه مجران دفران به میزان یک میلیون سلول برای هر موش در بیضه سمت راست پیوند زده شد و رت‌ها تا پایان مطالعه به‌مدت ۸ هفته نگهداری شدند (۲۱)).

گروه بیمار + ویتامین E (یک ماه بعد از ایجاد مدل، ویتامین E به‌صورت محلول خوراکی به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به‌صورت گاواژ دریافت کردند) (۲۳).

گروه بیمار + تمرین + ویتامین E (یک ماه بعد از ایجاد موش‌های آزواسپرمی، محلول خوراکی ویتامین E را به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت گاواژ دریافت کردند، سپس به‌صورت روزانه به‌مدت ۸ هفته، ۳۰ دقیقه در روز و ۵ روز در هفته تمرین شنای تداومی را با شدت ثابت ۶۰٪ ضربان بیشینه انجام دادند).

گروه بیمار + تمرین + سلول (یک ماه بعد از ایجاد موش-های آزواسپرمی یک‌بار سلول‌های بنیادی به‌صورت پیوند در ناحیه مجران دفران به‌میزان یک میلیون سلول برای هر موش پیوند زده شد، پس از گذشت یک هفته از پیوند سلول، به‌صورت روزانه به‌مدت ۳۰ دقیقه در روز و ۵ روز در هفته تمرین شنای تداومی را با شدت ثابت ۶۰٪ ضربان بیشینه انجام دادند که این زمان به مدت ۸ هفته انجام گرفت).

نمونه‌گیری بافتی از بافت بیضه موش‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۲ روز پس از پایان دوره تمرین) انجام شد. جهت حذف اثر حاد تمرین، نمونه‌بردای از حیوانات پس از ۴۸ ساعت بعد از آخرین برنامه تمرینی شنا انجام گرفت. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۵۰-۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵-۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش و سپس کشته شدند و پس از کشتار بافت‌های پیوند شده جهت بررسی مطالعات ژنی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش بررسی ژن‌های مورد بررسی تحقیق: برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه (P62، LC31) تحقیق در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک PCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت ها 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.

استخراج RNA کل: 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 تک‌رشته‌ای از پرایمر (MWG-Biotech, Germany) Oligodt) 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 Detection Systems Focter City, CA.) ABI) 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 سانتی-گراد 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 به‌صورت 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.

نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (CT)[1] مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول

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

$$\Delta\Delta CT = (CT_{target} - CT_{refence})_{Time\ X} - (CT_{target} - CT_{refence})_{Time\ 0}$$

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

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

$$(\Delta Ct_{refrence} = Ct_{control}\text{-}Ct_{treatment} و \Delta Ct_{target} = Ct_{control}\text{-}Ct_{treatment})$$

در فرمول فوق E معرف Efficiency است و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای ژن به‌دست می-آید.

روش‌های آماری و تجزیه و تحلیل اطلاعات: جهت طبقه‌بندی داده‌های حاصل از این پژوهش، از آمار توصیفی استفاده شد. جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک استفاده گردید. جهت تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیرها و تعامل بین آن-ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه و در صورت معنی‌دار بودن داده‌ها برای تعیین محل تفاوت از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. یافته‌ها در سطح اطمینان ۹۵٪ ($p\leq ۰/۰۵$) بررسی شدند و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۶) استفاده گردید. تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار ارائه شدند.

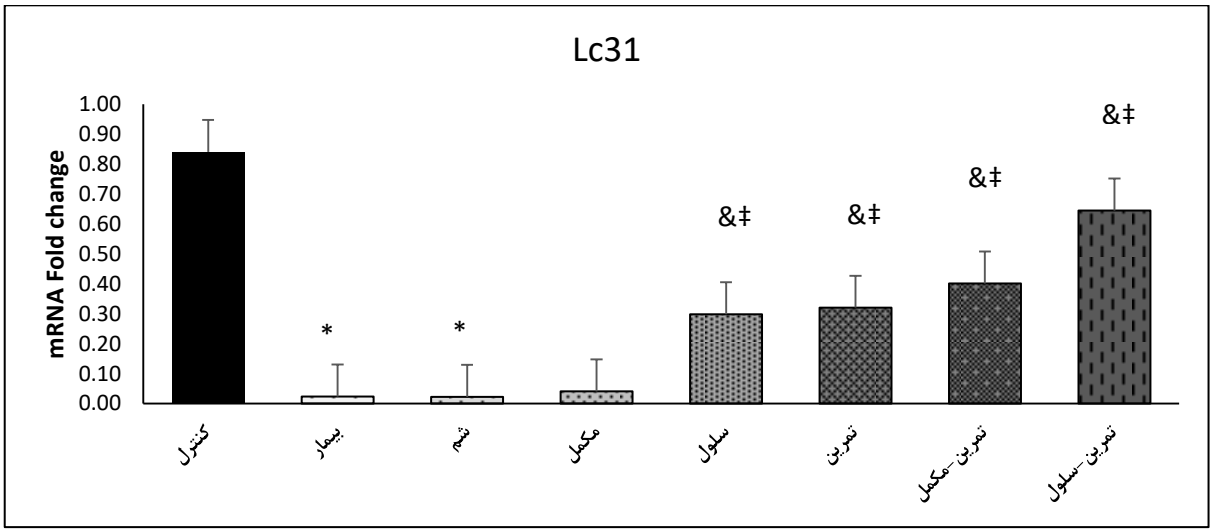
یافته‌ها

در جدول ۱ نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه بیان ژن Lc31 بافت بیضه نشان داده شده است. بر اساس نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه بر سطوح Lc31 گروه-های مختلف پژوهش، ارزش F محاسبه شده (۵/۰۰۷) و معنی‌داری آن در سطح $p<۰/۰۰۱$ حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین سطوح Lc31 در گروه‌های مختلف پژوهش بود. بر اساس نتایج آزمون تعقیبی توکی (نمودار ۱)؛ در سطح اطمینان ۰/۰۵ گروه‌های بیمار و شم نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p\leq ۰/۰۵$). هم‌چنین گروه‌های تمرین، سلول، تمرین مکمل و تمرین+ سلول نسبت به گروه‌های بیمار و شم افزایش معنی‌داری را نشان دادند ($p\leq ۰/۰۵$).

[1] Thereshold Cycle

جدول ۱- نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه سطوح Lc31 در گروه‌های مختلف پژوهش

منابع تغییر	مجموع مربعات SS	درجات آزادی df	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش p
بین گروهی	۲/۸۸۶	۷	۰/۴۱۲	۵/۰۰۷	۰/۰۰۱
درون گروهی	۲/۶۳۵	۳۲	۰/۰۸۲		
جمع کل	۵/۵۲۱	۳۹			



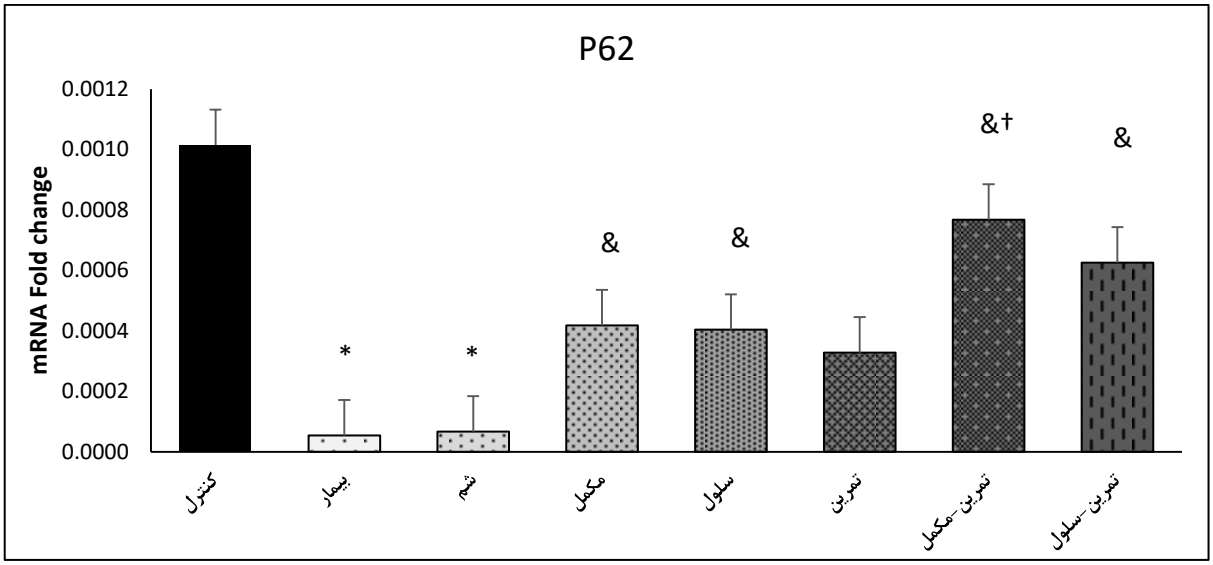
نمودار ۱- مقایسه میانگین سطوح Lc31 در گروه‌های مختلف پژوهش بر اساس آزمون تعقیبی توکی

* تفاوت معناداری در مقایسه با گروه کنترل، & تفاوت معناداری در مقایسه با گروه بیمار، ‡ تفاوت معناداری در مقایسه با گروه شم

در جدول ۲ نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه بیان ژن P62 نشان داده شده است. بر اساس نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه بر سطوح P62 گروه‌های مختلف پژوهش، ارزش F محاسبه شده (۶/۶۱۹) و معنی‌داری آن در سطح p<۰/۰۰۱ حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین سطوح P62 در گروه‌های مختلف پژوهش بود. بر اساس نتایج آزمون تعقیبی توکی (نمودار ۲)؛ در سطح اطمینان ۰/۰۵ گروه‌های بیمار و شم نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان دادند (p≤۰/۰۵). هم‌چنین گروه‌های مکمل، سلول، تمرین+ سلول و تمرین+ مکمل نسبت به گروه بیمار افزایش معنی‌داری را نشان دادند (p≤ ۰/۰۵).

جدول ۲- نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه سطوح P62 در گروه‌های مختلف پژوهش

منابع تغییر	مجموع مربعات SS	درجات آزادی df	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش p
بین گروهی	۰/۰۰۰۰۰۳	۷	۰/۰۰۰۰۰۰۴	۶/۶۱۹	۰/۰۰۱
درون گروهی	۰/۰۰۰۰۰۲	۳۲	۰/۰۰۰۰۰۰۱		
جمع کل	۰/۰۰۰۰۰۴	۳۹			



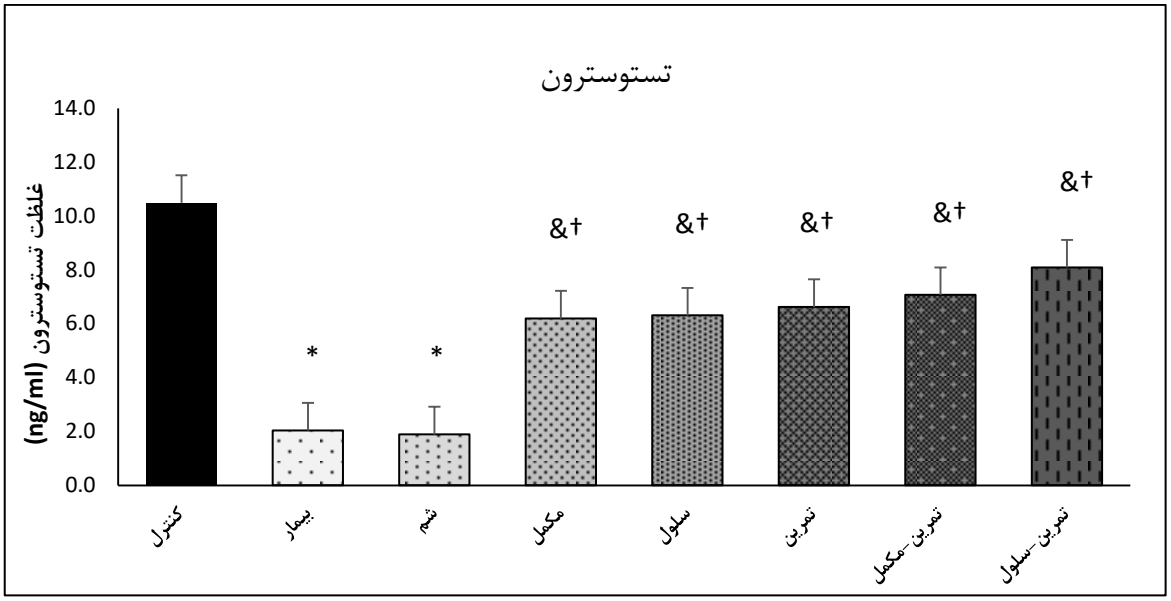
نمودار ۲- مقایسه میانگین سطوح P62 در گروه‌های مختلف پژوهش بر اساس آزمون تعقیبی توکی

* تفاوت معناداری در مقایسه با گروه کنترل، & تفاوت معناداری در مقایسه با گروه بیمار، † تفاوت معناداری در مقایسه با گروه شم

در جدول ۳ نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه سطوح تستوسترون نشان داده شده است. بر اساس نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه بر سطوح تستوسترون گروه‌های مختلف پژوهش، ارزش F محاسبه شده (۴۵/۱۷۷) و معنی‌داری آن در سطح p<۰/۰۰۱ حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین سطوح تستوسترون در گروه‌های مختلف پژوهش بود. بر اساس نتایج آزمون تعقیبی توکی (نمودار ۳)؛ در سطح اطمینان ۰/۰۵ گروه‌های بیمار و شم نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان دادند (p≤۰/۰۵). هم‌چنین گروه-های مکمل، سلول، تمرین، تمرین+ مکمل و تمرین+ سلول نسبت به گروه‌های بیمار و شم افزایش معنی-داری را نشان دادند (p≤۰/۰۵).

جدول ۳- نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه سطوح تستوسترون در گروه‌های مختلف پژوهش

منابع تغییر	مجموع مربعات SS	درجات آزادی df	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش p
بین گروهی	۲۹۳/۵۰۰	۷	۴۱/۹۲۹	۴۵/۱۷۷	۰/۰۰۱
درون گروهی	۲۹/۶۹۹	۳۲	۰/۹۲۸		
جمع کل	۳۲۳/۱۹۹	۳۹			



نمودار ۳- مقایسه میانگین سطوح تستوسترون در گروه‌های مختلف پژوهش بر اساس آزمون تعقیبی توکی

* تفاوت معناداری در مقایسه با گروه کنترل، & تفاوت معناداری در مقایسه با گروه بیمار، † تفاوت معناداری در مقایسه با گروه شم

بحث

در مطالعه حاضر القای آزواسپرمی سبب کاهش بیان ژن‌های Lc31 و P62 بافت بیضه و سطوح تستوسترون نسبت به گروه کنترل شد، در حالی که اجرای هر کدام از مداخلات مکمل، سلول، تمرین، تمرین+ مکمل و تمرین+ سلول نسبت به گروه‌های بیمار و شم افزایش معنی‌داری را نشان دادند.

تحقیقی که اثر تمرین ورزشی بر ژن‌های Lc31 و P62 بافت بیضه را بررسی کرده باشد، یافت نشد. مطالعات قبلی نشان داده است که مسیرهای سیگنال-دهی اتوفاژی حفظ هموستاز سلولی و کنترل توده عضلانی اسکلتی در طول فرآیند پیری است (۲۴، ۲۵). حالت‌های مختلف ورزشی می‌توانند نسبت LC3-II/LC3-I را افزایش داده و p62 را کاهش دهند که نشان می‌دهد ورزش می‌تواند جریان اتوفاژیک را افزایش داده و حذف پروتئین‌های آسیب‌دیده داخل سلولی و ضایعات متابولیک از فیبرهای عضلات اسکلتی را تسهیل کند (۱۳). اتوفاژی ناشی از ورزش در عضله اسکلتی می‌تواند حذف و بازیافت پروتئین‌ها و اندامک-های آسیب دیده را تسریع کند، متابولیسم را بهبود بخشد و هموستاز سلولی عضله اسکلتی را تثبیت کند (۲۶). علاوه بر این، ورزش هوازی می‌تواند با بهبود وضعیت عملکردی اتوفاژی، آتروفی عضلانی اسکلتی را سرکوب کند، همانطور که توسط سطوح بیان نشانگرهای زیستی مرتبط با اتوفاژی متعدد، از جمله Atg5، Atg7، p62 و LC3-II در مدل موش‌های پیر تأیید شده است (۲۷).در مطالعه کیم و همکاران (۲۰۱۳) پس از ۸ هفته دویدن روی تردمیل، کاهش تنظیم Beclin1 و Atg7 در موش‌های مسن ناشی از افزایش سن جبران شد و کیفیت عضلات اسکلتی نیز به‌طور مؤثری بهبود یافت (۲۸). مطابق با این یافته‌ها، لیانگ و همکاران (۲۰۲۱) افزایش نسبت LC3-II/LC3-I و کاهش p62 را در موش‌ها پس از مداخله تمرین هوازی تداومی مشاهده نمودند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ورزش هوازی می‌تواند شار اتوفاژیک را افزایش دهد، حذف پروتئین‌های آسیب‌دیده داخل سلولی و ضایعات متابولیکی در سلول‌ها را تسریع بخشد و در نتیجه بازسازی ساختاری و عملکردی فیبرهای عضلات اسکلتی را تقویت کند (۱۴). اتوفاژی یک فرآیند ضروری برای عملکرد طبیعی بافت‌ها می‌باشد، بنابراین، تنظیم فرآیند اتوفاژی از طریق فعالیت‌های ورزشی می‌تواند یک روش درمانی مفید در شرایط پاتولوژیک باشد (۲۹). در تحقیقات انجام شده، افزایش شار اتوفاژیک ناشی از فعالیت ورزشی در بافت‌های

آسیب‌دیده مشاهده شد، در این پژوهش نیز تمرین ورزشی شنا منجر به افزایش شار اتوفاژیک بافت بیضه رت‌های آزواسپرمی با افزایش ژن‌های Lc31 و P62 شد، که این احتمال وجود دارد که افزایش شار اتوفاژی در بافت بیضه رت‌های آزواسپرمی با حذف سلول‌های آسیب‌دیده و افزایش تستوسترون به باروری رت‌های آزواسپرمی کمک کند.

در پژوهش حاضر گروه‌های تحت درمان با سلول نیز افزایش شار اتوفاژی در بافت بیضه و افزایش تستوسترون را نشان دادند، که این افزایش در گروه ترکیبی سلول با تمرین شنا بیشتر بود، لذا سلول و تمرین شنا در بهبود اتوفاژی بافت بیضه دارای هم-افزایی می‌باشند. پژوهشی که اثر سلول درمانی بر ژن-های Lc31 و P62 بافت بیضه را بررسی کرده باشد، یافت نشد. هدف اصلی هر درمان با سلول‌های بنیادی، ترمیم بافت‌های آسیب دیده‌ای است که به خودی خود توانایی بهبود ندارند، این به بسیاری از بیماران امید می‌دهد که بیماری‌های خود را درمان کنند و سلول-های در حال مرگ را جایگزین کنند. عملکرد درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مبتنی بر توانایی آن‌ها در تمایز به سلول‌هایی است که باید جایگزین شوند، هم-چنین فعالیت‌های تعدیل‌کننده ایمنی، پاراکرین و اثر آنتی‌اکسیدانی آن‌ها که به بهبود بافت‌های متنوع کمک می‌کند (۱۵).

با فرآیندی به نام تمایز که توسط سیگنال‌های داخل و خارج سلول‌ها کنترل می‌شود، سلول‌های تخصصی ایجاد می‌شود. سیگنال‌های داخلی توسط ژن‌های داخل سلول کنترل می‌شوند، درحالی‌که سیگنال‌های خارجی شامل مواد شیمیایی هستند که توسط سلول‌های دیگر ترشح می‌شوند. در سال‌های اخیر، زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی بر روی اثر آنتی‌اکسیدانی و کاربرد آن در ترمیم آسیب بافتی ناشی از ROS متمرکز شده است (۳۰، ۳۱).

روشنده و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده کردند که سلول-های بنیادی مزانشیمی با بیان آنتی‌ژن سطحی خاص و توانایی تمایز استخوان‌زایی، غضروفی و چربی‌زایی آن‌ها مشخص می‌شود و دارای تسهیلات خودنوسازی هستند. توانایی درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر اساس توانایی‌های ضد التهابی، ضد فیبروتیک و بازسازی آن است. همه این‌ها می‌تواند آسیب‌ها و انحطاط بافت‌ها را بهبود بخشد (۳۲). هم‌چنین فاضلی و همکاران (۲۰۱۸) افزودند که MSCها در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند التیام زخم‌ها، بیماری‌های عصبی و ریوی، دیابت، فیبروز کیستیک، آسم و موارد ناباروری کاربرد دارد (۳۳). از طرفی لودی و همکاران (۲۰۱۱) خاطرنشان کردند که حتی اگر استفاده از MSCها توانایی‌های درمانی زیادی داشته باشد، استفاده از آنها در درمان با برخی نگرانی‌ها همراه است، زیرا سلول‌های بنیادی توانایی تجدید و انعطاف‌پذیری مشابهی با سلول‌های سرطانی دارند و این ممکن است باعث ایجاد تومور شود (۳۴).

MSCها توانایی محافظت از بیضه را با مکانیسم‌های مختلف دارند، آن‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و مهار کننده ROS هستند (۳۵). علاوه بر این، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، توانایی تعدیل وضعیت ایمنی و التهابی ناشی از تجویز سیس پلاتین را دارند و به‌دلیل بیان بیش از حد پروتئین کلیدی ضد آپوپتوز Bcl2، اثرات ضدآپوپتوزی دارند (۳۶). هم‌چنین نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آزاد کردن فاکتورهای رشد و سیتوکین‌هایی که سلول‌های اسپرماتوگونیک باقی مانده را تشویق به تکثیر و پایان تقسیم خود می‌کنند، بازسازی بافت را تقویت می‌کنند (۳۷).

در این پژوهش تزریق سلول به‌تنهایی و در ترکیب با تمرین شنا بیان ژن‌های Lc31 و P62 بافت بیضه و سطوح تستوسترون را افزایش دادند که ممکن است از این طریق به باروری رت‌ها کمک کند، ضمن این‌که بهترین نتیجه در گروه ترکیبی تمرین+ سلول به‌دست آمد که نشان از هم‌افزایی تمرین ورزشی شنا و تزریق سلول بنیادی در افزایش شار اتوفاژیک بافت بیضه رت-های آزواسپرمی دارد که ممکن است در درمان ناباروری مؤثرتر باشد. باروری که در گروه‌های تحت درمان با سلول‌های بنیادی بازگردانده می‌شود، ممکن است به‌دلیل تأثیر سلول‌های بنیادی در حفظ سلول‌های

بنیادی اسپرماتوگونی باقی‌مانده در بیضه باشد یا این‌که سلول بنیادی توانایی تمایز به سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیا را دارد که بعداً اسپرم‌سازی می‌کنند (۱۵).

از دیگر نتایج این پژوهش، افزایش بیان ژن‌های Lc31 و P62 بافت بیضه و سطوح تستوسترون رت‌های آزواسپرمی با مصرف ویتامین E به‌تنهایی و در ترکیب با تمرین شنا بود. بهترین نتیجه مربوط به گروه ترکیبی ویتامین E+تمرین شنا بود که نشان از هم‌افزایی این دو مداخله در افزایش شار اتوفاژی و تستوسترون در رت‌های مدل تجربی آزواسپرمی داشت که ممکن است به باروری رت‌ها کمک کند. ویتامین E یک ویتامین محلول در چربی است که رادیکال‌های آزاد را که باعث آسیب به غشای سلولی می‌شوند، مهار می‌کند، از پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کند و فعالیت سایر آنتی‌اکسیدان‌ها را بهبود می‌بخشد و در نتیجه ROS منی را در رت‌های نابارور کاهش می‌دهد. هم‌چنین، برخی از داده‌های اپیدمیولوژیک وجود دارد که از رابطه مستقیم بین بهبود پارامترهای منی و افزایش دریافت ویتامین E در رژیم غذایی حمایت می‌کند (۳۸). در مطالعه شمس و همکاران (۲۰۲۳) نشان داده شد که مصرف ویتامین E در رژیم غذایی می‌تواند الگوی بیان ژن‌های مسیر سیگنال‌دهی آندروژن را بهبود ببخشد (۱۹). هم‌چنین نشان داده شد که رژیم غذایی حاوی ویتامین E، بیان ژن‌های خانواده PPAR را افزایش می‌دهد (۳۹). ویتامین E فیزیولوژیکی (آلفا توکوفرول) می‌تواند از آسیب اکسیداتیو و اختلال عملکرد بیضه جلوگیری کند. نتایج مطالعه ال-اتر و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که مکمل ویتامین E می‌تواند از اختلال عملکرد بیضه ناشی از کروم جلوگیری کرده و استروئیدزایی را بهبود بخشد (۴۰). هم‌چنین گزارش شد که ویتامین E بیان آنزیم‌های استروئیدزا مانند Star، 3β-HSD و 17-β-HSD را در موش‌های صحرایی افزایش می‌دهد و نقش مهمی در بهبود اختلال عملکرد سلول‌های لیدیگ بیضه ناشی از پلی کلر بی‌فنیل‌ها (PCBs) ایفا می‌کند که به وضوح نشان می‌دهد مصرف ویتامین E منجر به افزایش بیان برخی ژن‌های مسیر سیگنالینگ آندروژن (SRD5a2-HSD3B) می‌شود (۱۹). یکی از محدودیت‌های مشهود مطالعه حاضر، کمبود پیشینه پژوهش بود که اظهارنظر قطعی و بیان مکانیسم‌های اساسی را چالش‌برانگیز می‌کند، لذا به‌نظر می‌رسد انجام پژوهش‌های بیشتر در این زمینه برای مشخص شدن مکانیسم‌های اساسی ضرورت دارد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر هر سه مداخله تمرین شنا، ویتامین E و سلول‌درمانی در افزایش شار اتوفاژی و تستوسترون مؤثر بودند، هم‌چنین هم‌افزایی تمرین شنا با ویتامین E و سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در بهبود شار اتوفاژی در رت‌های مدل تجربی آزواسپرمی مشاهده شد که ممکن است از این طریق در افزایش تستوسترون و یا حتی باروری مؤثر باشند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب رساله دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری انجام شد. بدین‌وسیله از این واحد دانشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

این مقال حاصل رساله دکتری و با هزینه شخصی انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی بهنام اسماعیلی دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری بوده و پروتکل‌های آن با کد اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1401.185 صادره از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه ساری به تأیید رسیده است.

مشارکت نویسندگان

پروین فرزانگی ایده اصلی، طراحی پروتکل، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها را انجام دادند، بهنام اسماعیلی پیش‌نویس نسخه خطی را آماده نمودند، سید عبدالله هاشم‌ورزی بازنگری انتقادی نسخه خطی و بابی سان عسکری تجزیه و تحلیل آماری را به‌عهده داشتند.

منابع

1. Hashemi Karoii D, Azizi H, Skutella T. Altered G-protein transduction protein gene expression in the testis of infertile patients with nonobstructive azoospermia. DNA and Cell Biology 2023; 42(10):617-37.
2. Gao F, Li G, Liu C, Gao H, Wang H, Liu W, et al. Autophagy regulates testosterone synthesis by facilitating cholesterol uptake in Leydig cells. Journal of Cell biology 2018; 217(6):2103-19.
3. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM 1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. The FEBS journal 2015; 282(24):4672-8.
4. Anding AL, Baehrecke EH. Cleaning house: selective autophagy of organelles. Developmental cell 2017; 41(1):10-22.
5. Lv C, Wang X, Guo Y, Yuan S. Role of selective autophagy in spermatogenesis and male fertility. Cells 2020; 9(11):2523.
6. Gao H, Khawar MB, Li W. Autophagy in reproduction. Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science 2019: 453-68.
7. Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. Nature cell biology 2014; 16(6):495-501.
8. Chow CY, Avila FW, Clark AG, Wolfner MF. Induction of excessive endoplasmic reticulum stress in the Drosophila male accessory gland results in infertility. PloS one 2015; 10(3):e0119386.
9. Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. Human reproduction update 2009; 15(5):553-72.
10. Yang W, Li L, Huang X, Kan G, Lin L, Cheng J, et al. Levels of Leydig cell autophagy regulate the fertility of male naked mole-rats. Oncotarget 2017; 8(58):98677.
11. Hajizadeh Maleki B, Tartibian B. Combined aerobic and resistance exercise training for improving reproductive function in infertile men: a randomized controlled trial. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism 2017; 42(12):1293-306.
12. Maleki BH, Tartibian B, Chehrazi M. The effects of three different exercise modalities on markers of male reproduction in healthy subjects: a randomized controlled trial. Reproduction 2017; 153(2):157-74.
13. Liang J, Zhang H, Zeng Z, Lv J, Huang J, Wu X, et al. MicroRNA profiling of different exercise interventions for alleviating skeletal muscle atrophy in naturally aging rats. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 2023; 14(1):356-68.
14. Liang J, Zhang H, Zeng Z, Wu L, Zhang Y, Guo Y, et al. Lifelong aerobic exercise alleviates sarcopenia by activating autophagy and inhibiting protein degradation via the AMPK/PGC-1α signaling pathway. Metabolites 2021; 11(5):323.
15. Ismail HY, Hussein S, Shaker NA, Rizk H, Wally YR. Stem cell treatment trials for regeneration of testicular tissue in laboratory animals. Reproductive Sciences 2023; 30(6):1770-81.
16. Okada K, Fujisawa M. Recovery of spermatogenesis following cancer treatment with cytotoxic chemotherapy and radiotherapy. The world journal of men's health 2019; 37(2):166.
17. Tamadon A, Zhan-byrbekuly U, Kairgaliyev I, Khoradmehr A. Mesenchymal stem cell therapy of male infertility. Male Reproductive Health 2019: 105.
18. Pizato N, Kiffer LF, Luzete BC, Assumpção JA, Correa LH, Braz de Melo HA, et al. Omega 3-DHA and delta-tocotrienol modulate lipid droplet biogenesis and lipophagy in breast cancer cells: The impact in cancer aggressiveness. Nutrients 2019; 11(6):1199.
19. Shams AA, Vesal S, Hashemi Karoii D, Vesali S, Alizadeh A, Shahhoseini M. Paternal Trans Fatty Acid and Vitamin E Diet Affect the Expression Pattern of Androgen Signaling Pathway Genes in the Testis of Rat Offspring. Paternal Trans Fatty Acid and Vitamin E Diet Affect the Expression Pattern of Androgen Signaling Pathway Genes in the Testis of Rat Offspring, 2023.
20. Wang M, Li Y, Molenaar A, Li Q, Cao Y, Shen Y, et al. Vitamin E and selenium supplementation synergistically alleviate the injury induced by hydrogen peroxide in bovine granulosa cells. Theriogenology 2021; 170:91-106.
21. Tamadon A, Mehrabani D, Rahmanifar F, Jahromi AR, Panahi M, Zare S, et al. Induction of spermatogenesis by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermia in hamster. International journal of stem cells 2015; 8(2):134.
22. 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; 26(4):332-47.
23. Hosseini A, Zare S, Ghaderi Pakdel F, Ahmadi A. Evaluation of the antioxidant effect of ginseng plant extract and vitamin E on the fertility of large male laboratory rats after long-term treatment with cyclophosphamide. Journal of Reproduction and Infertility 2010; 11(4):227-37.
24. Carter HN, Kim Y, Erlich AT, Zarrin-khat D, Hood DA. Autophagy and mitophagy flux in young and aged skeletal muscle following chronic contractile activity. The Journal of physiology 2018; 596(16):3567-84.
25. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, Ortet L, Rodríguez-Ubreva J, Rebollo E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. Nature 2016; 529(7584):37-42.

26. Vainshtein A, Hood DA. The regulation of autophagy during exercise in skeletal muscle. Journal of Applied Physiology 2016; 120(6):664-73.
27. Lenhare L, Crisol BM, Silva VR, Katashima CK, Cordeiro AV, Pereira KD, et al. Physical exercise increases Sestrin 2 protein levels and induces autophagy in the skeletal muscle of old mice. Experimental gerontology 2017; 97:17-21.
28. Kim YA, Kim YS, Oh SL, Kim HJ, Song W. Autophagic response to exercise training in skeletal muscle with age. Journal of physiology and biochemistry 2013; 69:697-705.
29. Lee Y, Kwon I, Jang Y, Song W, Cosio-Lima LM, Roltsch MH. Potential signaling pathways of acute endurance exercise-induced cardiac autophagy and mitophagy and its possible role in cardioprotection. The journal of physiological sciences 2017; 67:639-54.
30. Hassan AI, Alam SS. Evaluation of mesenchymal stem cells in treatment of infertility in male rats. Stem cell research & therapy 2014; 5:1-15.
31. Kobayashi CI, Suda T. Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. Journal of cellular physiology 2012; 227(2):421-30.
32. Roushandeh AM, Bahadori M, Roudkenar MH. Mesenchymal stem cell-based therapy as a new horizon for kidney injuries. Archives of Medical Research 2017; 48(2):133-46.
33. Fazeli Z, Abedindo A, Omrani MD, Ghaderian SM. Mesenchymal stem cells (MSCs) therapy for recovery of fertility: a systematic review. Stem cell reviews and reports 2018; 14:1-12.
34. Lodi D, Iannitti T, Palmieri B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2011; 30:1-20.
35. Mehrabani D, Hassanshahi MA, Tamadon A, Zare S, Keshavarz S, Rahmanifar F, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. Journal of human reproductive sciences 2015; 8(2):103-10.
36. Park JJ, Lim KH, Baek KH. Annexin-1 regulated by HAUSP is essential for UV-induced damage response. Cell death & disease 2015; 6(2):e1654-.
37. Monsefi M, Fereydouni B, Rohani L, Talaei T. Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats. Iranian journal of reproductive medicine 2013; 11(7):537.
38. Bahmyari R, Ariafar A, Sayadi M, Hossieni S, Azima S. The effect of daily intake of selenium, vitamin E and folic acid on sperm parameters in males with idiopathic infertility: a single-blind randomized controlled clinical trial. International Journal of Fertility & Sterility 2021; 15(1):8.
39. Lee HS. Impact of maternal diet on the epigenome during in utero life and the developmental programming of diseases in childhood and adulthood. Nutrients 2015; 7(11):9492-507.
40. Al-Attar AM. Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. Saudi journal of biological sciences 2011; 18(1):63-72.

The effect of 8 weeks of swimming training, cell therapy and vitamin E consumption on testosterone levels and genes involved in the autophagy pathway of infertile male rats

Behnam Esmaeeli[1], Parvin Farzanegi[2*], Seyed Abdollah Hashemvarzi[3], Babisan Askari[4]

1. PhD Student in Sports Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.
2. Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Ghaemshahr Branch, Islamic Azad University, Ghaemshahr, Iran.

Received: Feb 24, 2024 **Accepted:** May 27, 2024

Abstract

Introduction: Infertility is actually a lack of fertility in couples that has not conceived despite a year or more of trying to reproduce. The present study was performed with aim to investigate the effect of 8 weeks of swimming training, cell therapy and vitamin E consumption on testosterone and Lc31 and P62 genes in the testicular tissue of azoospermia model rats.

Methods: In this experimental study, forty 6- to 8-week-old rats were randomly selected, and then the azoospermia model was induced with the busulfan at a dose of 40 mg. After one month, the rats were divided into 8 groups: 1) control, 2) patient, 3) sham, 4) patient + exercise, 5) patient + supplement, 6) patient + cell, 7) patient + supplement + exercise, and 8) patient + cell + exercise. Stem cells were transplanted in the vas deferens at the rate of one million cells for each mouse, they received an oral solution of vitamin E at the rate of 100 mg/kg by gavage, also the training groups performed swimming training continuously with a constant intensity of 60% of the maximum heart rate for 8 weeks, 30 minutes a day, 5 day of the week. Testosterone levels were measured by ELISA and the expression of P62 and LC31 genes in testicular tissue was measured by Real Time PCR technique. Data were analyzed using SPSS statistical software (version 26). $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results: Induction of azoospermia significantly decreased testosterone levels and the expression of Lc31 and P62 genes in testicular tissue compared to the control group ($P\leq0.05$), but showed a significant increase in the supplement, cell, exercise, exercise+supplement and exercise+cell groups compared to the patient and sham groups ($P\leq0.05$).

Conclusion: In the present study, the synergism of swimming exercise with vitamin E and mesenchymal stem cells derived from bone marrow in improving the autophagy flux in experimental rats with azoospermia was observed, which may be effective in increasing testosterone or even fertility.

Keywords: Azoospermia, Autophagy, Mesenchymal Stem Cell, Swimming Exercise, Vitamin E

► **Please cite this article as:**
Esmaeeli B, Farzanegi P, Hashemvarzi SA, Askari B. The effect of 8 weeks of swimming training, cell therapy and vitamin E consumption on testosterone levels and genes involved in the autophagy pathway of infertile male rats. **Iran J Obstet Gynecol Infertil** 2024; 27(3):37-49. **DOI:** 10.22038/ijogi.2024.77433.5972