

## Research Paper

# 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



Leila Zohrabi Karani<sup>1</sup>, \*Parvin Farzanegi<sup>1</sup>, Mohamad Ali Azarbayjani<sup>2</sup>

1. Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.  
2. Department of Exercise Physiology, Tehran Central Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.



**Citation** 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 (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2020; 26(4):332-347. <https://doi.org/10.32598/hms.26.4.450.2>

**doi** <https://doi.org/10.32598/hms.26.4.450.2>



**Received:** 16 Nov 2019  
**Accepted:** 06 Jan 2020  
**Available Online:** 01 Oct 2020

### Key words:

Swimming, Promyelocytic Leukemia Zinc Finger (PLZF) protein, Spermatid Transition Nuclear Protein (TNP), Azoospermia

## ABSTRACT

**Aims** One of the causes of infertility in men is the azoospermia disease, which is attributed to the lack of sperm in each sperm. The primary function of spermatogenesis is the maintenance, proliferation, and differentiation of spermatogonial cells. Thus, the present study aimed to investigate the changes in Promyelocytic Leukemia Zinc Finger (PLZF) and spermatid Transition Nuclear Protein (TNP) gene expression levels in an azoospermic rat model after 8 weeks of low-intensity aerobic training.

**Methods & Materials** In this experimental study, 15 adult male Wistar rats were randomly divided into three groups of healthy control, with azoospermia, and exercise plus azoospermia after creating an azoospermia model. The patient plus exercise group performed a low-intensity swimming exercise 30 minutes a day, five days a week for 8 weeks, after the creation of the azoospermic rats. A One-way ANOVA test was used for data analysis.

**Findings** The results showed that a period of swimming exercise program in the exercise plus azoospermia group significantly reduced PLZF gene expression compared to the healthy control groups ( $P=0.001$ ) and no significant increase to the azoospermia group ( $P=0.06$ ). There was also a significant decrease in TNP gene expression levels in the exercise plus azoospermia group compared to the healthy control group ( $P=0.001$ ) and a significant increase in the azoospermia group ( $P=0.057$ ).

**Conclusion** Based on these Findings, it can be stated that the alteration of key molecules or signaling pathways and expression of the PLZF and TNP genes in the spermatogenesis process may increase infertility, but regular aerobic exercise, such as low-intensity swimming, helps to control the effects of infertility by increasing the maintenance and development of spermatogonial stem cells.

## English Version

### 1. Introduction

S

permatogenesis is a process that occurs by the proliferation and differentiation of Spermatogonial Stem Cells (SSCs) [1]. These cells are

located on the basement membrane of the seminiferous tubules and are surrounded by Sertoli cells [2]. This complex provides an environment that promotes sperm function and survival [3]. Any change in this environment disrupts spermatogenesis, which in turn can lead to temporary or permanent infertility [4]. SSCs form the basis of the process of spermatogenesis and male fertility [5].

#### \* Corresponding Author:

Parvin Farzanegi, PhD.

Address: Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

Tel: +98 (911) 2230233

E-mail: parvin.farzanegi@gmail.com

Among the various types of stem cells found in a living organism, SSCs are important because of their ability to pass on genetic information to the next generation; therefore, these cells can be used as a valuable resource for various research studies [4, 5]. Proliferation and differentiation of spermatogonia cells are the main and primary key in the process of spermatogenesis and maintenance of male fertility [6].

Promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein is one of the known markers of SSCs that is essential for the maintenance and development of SSCs in culture [7]. PLZF is produced and secreted by Sertoli cells and subsets of spermatogonia express its receptor [8]. This factor preserves and proliferates spermatogonia stem cells in vitro [9]. In the testes, PLZF is limited to SSC spermatogonia. Studies have shown that after SSC transplantation in rats without PLZF, spermatogenesis does not resume in recipient rats [10]; therefore, one of the possible functions for PLZF could be to maintain a non-differential position [11]. PLZF is considered the basic surface marker of progenitor cells/spermatogonia stem [12].

Another type of sperm nucleoprotein is a protein called spermatid transition nuclear protein (TNP) [13]. These transient proteins make up about 90% of the major chromatin proteins during the histone deletion and transient protein replacement steps [4]. Laboratory studies have reported that the potential function of TNP protein is to release DNA into nucleosome particles, to reduce the melting point of DNA, and to stimulate topoisomerases-1 activity [14]. In infertile men, spermatozoa have shown many nuclear changes, including abnormal chromatin structure, small chromosomal deletions, aneuploidy, and DNA strand breaks [15].

The results of studies indicate that increasing the expression and signaling of PLZF and TNP is a promising therapeutic strategy for the treatment of azoospermia [16]. In this regard, there are modifiable factors such as a physical activity that help prevent and treat this disease by regulating and modulating genes that are effective in fertility [17], because infertility caused by inactivity has been observed in people with azoospermia, which is a significant concern in medical practice [18]. But the most effective exercise and cellular and molecular mechanisms involved in the exercise are not yet fully clear. Studies show that low-intensity aerobic exercise can reduce the expression of inflammatory cytokines, oxidative stress in testicular tissue, systemic inflammation, and thus improve immune responses by creating a protective mechanism [19].

Among aerobic exercises, low-intensity aerobic swimming exercise is one of the exercises that are safe

and usable in various physiological conditions. Also, because of its weight intolerance in water compared to non-water sports, it is used in most physiological, biochemical, and molecular reactions studies [20]. Slow to moderate exercise gradually improves metabolic activity due to increased blood flow, but strenuous activity decreases blood flow due to the change in the direction of blood flow to active muscles [20]. Decreased physical activity can reduce the amount of sex hormones, sperm production, and fertility, as well as shrink the testicles and reduce the amount of sperm [21].

A study by Ferenc et al. (2014) reported that after 12 weeks of moderate-intensity aerobic exercise, spermatogenesis markers such as PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1) and PLZF were improved in rats [22]. In a review study by Vaamonde et al. (2017), it was reported that after a period of low- and moderate-intensity aerobic exercise, the level of azoospermia decreases by modulating the genes involved in the disease and reducing the level of oxidative stress and inflammation in these patients, and the quality of sperm and fertility increase [23]. In this regard, the results of studies showed that high-intensity exercise can lead to negative and positive changes in genes that affect sperm fertility such as PLZF and TNP [24]. Although possible mechanisms have been suggested, the results of studies on the relationship between physical activity and the rate of azoospermia are not conclusive. Therefore, because of the importance of preventing the causes of azoospermia, the lack of necessary and sufficient information about the effect of exercise on the expression of PLZF and TNP gene in azoospermia, the present study aimed to investigate the effect of 8 weeks of low-intensity swimming exercise on PLZF and TNP gene expression in azoospermic rats.

## 2. Materials and Methods

In this experimental study, 15 adult male Wistar rats aged 6-8 weeks with a Mean $\pm$ SD weight of 202.85 $\pm$ 15.62 g were purchased from the Pasteur Institute. The animals were kept in special polycarbonate cages in an environment with an average temperature of 22 $\pm$ 1.4°C, the humidity of 55%, and a light-dark cycle of 12:12 hours. The animals were cared for following the guidelines of the International Institute of Health and the protocols of this study, following the principles of the Helsinki Declaration and the rules of medical ethics [25]. The animals were treated with free pellet food and water. The food consumed by the animals was given to the animal at the rate of 10 g per 100 g of body weight according to the weekly weight gain.

To create the azoospermia model, busulfan (40 mg/kg body weight) was first injected intraperitoneally into each rat. One month after induction of the model in the rats, they were randomly divided into 3 groups: Healthy control (5 heads), azoospermia (5 heads), and exercise plus azoospermia (5 heads) [4, 5]. The azoospermic group remained one month after modeling until the end of the study (8 weeks) and the healthy control group was kept for 8 weeks, and the exercise plus azoospermia group swam for 8 weeks, one month after the development of azoospermia.

Before the start of the main protocol, the rats in the exercise plus azoospermia group got acquainted with the water and swimming and adapted to exercise conditions for 20 minutes per day for 5 days. Then, 5 days a week until the end of the research period, they swam in a water tank measuring 50×50×100 cm with a temperature of 30°C-32°C for 8 weeks. The duration of exercise in water was 30 minutes daily until the end of the exercise period.

To eliminate the acute effect of exercise, the animals were sampled 48 hours after the last swimming exercise program. For this purpose, the animals were first anesthetized using an intraperitoneal injection of ketamine (50-30 mg/kg) and xylazine (3-5 mg/kg) and then were killed. Afterward, their tissues around the testicular area were evaluated for histology and genetic studies. For this purpose, tissue samples were transferred to 10% formalin and samples related to gene expression were transferred to a nitrogen tank.

A real-time PCR technique was used to evaluate the expression of PLZF and TNP genes in each tissue analysis group. First, primer design was performed and then total RNA was extracted from tissues and converted to cDNA. Then cDNA was amplified by PCR and RT-qPCR technique was used to confirm quantitatively the expression of the studied genes. To this end, first, whole-cell RNA was extracted using RNeasy lysis solution according to RNeasy protocol and exposed to DNase I Fermentas to ensure contamination with genomic DNA. Besides, gel electrophoresis was used to evaluate the integrity of the extracted RNA.

To extract RNA, the first 200-300 Landa Chiazol was added to the testicular tissue and it was maintained at -80°C for 24 hours. Then, the plaque in the Cryotube was crushed in a semi-frozen state by a sampler and then slightly pipetted. About 100 Landa chloroforms were then added to the sample to lyse the cells. This solution should be in contact with the cell for about 1 minute. Afterward, the solution was centrifuged at 12000 rpm for 10 minutes. Next, the solution was divided into three parts: the upper part of the tube, which was clear and contained RNA; the middle part of the tube, which was white and had the lysed texture; and the lower part of

the tube which was pink and contained Chiazol. The clear liquid at the top of the tube containing the RNA was gently removed and placed in a DEPC microtube. Then 1 mL of isopropanol was poured on clear RNA and stirred by hand for 1 minute. Isopropanol is clear and RNA is clear, but when the two are mixed, they form a turbid liquid. After adding isopropanol, the samples were centrifuged at 12000 rpm for 10 minutes. After removing from the centrifuge, the supernatant was drained and 1 mL of 70% alcohol was added. After vortexing, the mixture was centrifuged at 7500 rpm for 10 minutes. The supernatant was then drained with a sampler and then the plaque was dried inside a microtube. To dissolve RNA, 20 Landa 60° distilled water was poured on the plate inside the microtube. It was then pipetted slightly with a sampler and placed on a 60° plate for 5 minutes.

Also, for the preparation of single-stranded cDNA, Oligo (dt) (MWG-Biotech primer, Germany) and reverse transcription enzyme (Fermentas company) were used and performed according to the manufacturer's instructions. Each PCR reaction used PCR Master Mix (Applied Biosystems) and SYBR Green (Applied Biosystems), and Sequences Detection Systems. Foster City, CA (ABI Step One) was done according to the manufacturer's protocol. Forty cycles were considered for each cycle of real-time PCR, and the temperatures of each cycle were set at 94°C for 20 seconds, 58°C-60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. A melting diagram was drawn to evaluate the accuracy of PCR reactions and was evaluated specifically for each gene and in each reaction with a negative control diagram to check for contamination in each reaction.

The expression ratio of the genes studied in this study was evaluated by the threshold cycle comparison method (Threshold Cycle: TC) using the data in the [Formula 1](#):

$$1. R = 2^{-(\Delta\Delta C)}$$

$$\Delta\Delta C = (C^{T_{target}} - C^{T_{reference}})_{Time X} - (C^{T_{target}} - C^{T_{reference}})_{Time 0}$$

The specific standard curve of each gene was plotted using at least 5 logarithmic concentrations in diluting order of positive control of each gene. The expression level of the target gene was normalized with the reference gene and the expression of genes in the healthy group was considered as a calibrator ([Formula 2](#)).

$$2. Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta C T_{target}}}{(E_{reference})^{\Delta C T_{reference}}}$$

$$(\Delta C T_{reference} = C t_{control} - C t_{treatment}, \Delta C T_{target} = C t_{control} - C t_{treatment})$$

In the above formula, E represents efficiency and is obtained by drawing a standard curve for the gene [26].

After in vitro analysis of tissue samples, descriptive statistics including mean and standard deviation and inferential statistics were used to quantitatively describe the data. First, the Shapiro-Wilk test was done to determine the normality of the data distribution, and then Levene's test was used to determine the homogeneity of variance. Because of the normal distribution of data, parametric tests, including 1-way analysis of variance and Tukey post hoc test at a significance level of  $P \leq 0.05$  were used to examine changes in PLZF and TNP gene expression. SPSS version 23 was used to perform all statistical tasks and Excel software was used to draw the chart.

### 3. Results

Table 1 presents the mean weight of rats in the different studied groups. The results of the 1-way analysis of variance showed no significant difference in the weight of rats in different groups ( $P \geq 0.05$ ).

The results of the Tukey post hoc test showed that 8 weeks of low-intensity aerobic swimming exercise significantly re-

duced the level of PLZF gene expression in the exercise plus azoospermia group compared to the healthy control group (125.42%) and a non-significant increase compared to the azoospermia group (42.47%) ( $P=0.001$ ,  $P=0.06$ , respectively) (Figure 1).

The results of the Tukey post hoc test indicate that 8 weeks of low-intensity aerobic swimming exercise significantly reduced the expression level of the TNP gene in the exercise plus azoospermia group compared to the healthy control group (104.93%) and no significant increase compared to the azoospermia group (265.76%) ( $P=0.001$ ,  $P=0.057$ , respectively) (Figure 2).

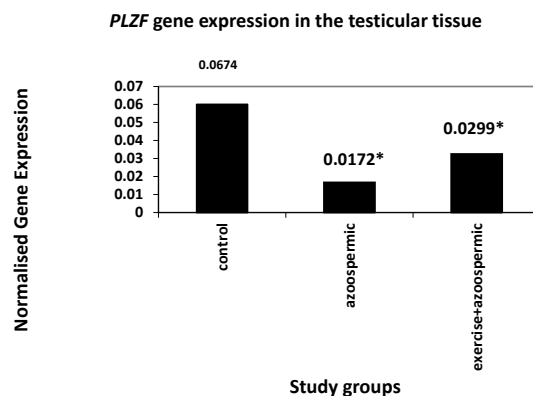
### 4. Discussion

In the present study, the effect of 8 weeks of low-intensity swimming exercise on PLZF and TNP gene expression in azoospermia rats was investigated. One of the important results of the present study is a significant decrease in PLZF and TNP gene expression levels in azoospermia rats compared to the healthy group. The results of the present study are consistent with the results of the studies of some researchers who stated that azoospermia alters the expression of genes involved in fertility such as PLZF and TNP [22-24].

**Table 1.** The Mean and Standard Deviation of rats' weight in the studied groups

Indicator	Mean±SD		
	Group		
	Control	Azoospermia	Exercise Plus Azoospermia
Weight (g)	205.5±20.16	215.8±5.25	208.1±20.16

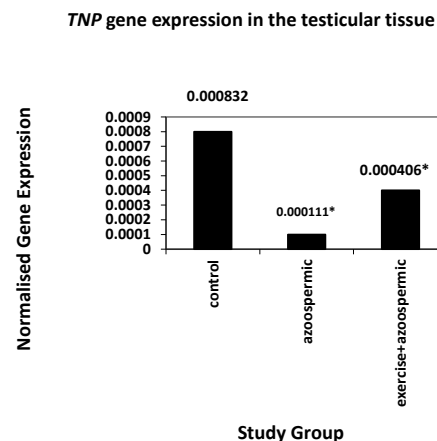
Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences



Quarterly of  
The Horizon of Medical Sciences

**Figure 1.** Comparison of mean mRNA levels for PLZF gene expression between different studied groups

\* Significant change compared to the control group ( $P \leq 0.05$ ).



**Figure 2.** Comparison of mean mRNA levels for TNP gene expression between different study groups

\* Significant change compared to the control group ( $P \leq 0.05$ ).

PLZF and TNP have been identified as key markers in the maintenance and development of spermatogonia stem cells [27]. The results showed that in infertile sperms there are many nuclear changes, including the abnormal structure of chromatin and DNA strand breaks that lead to changes in the expression level of this gene [13]. This gene, which plays a role in the proliferation and differentiation of spermatogenesis stem cells, has different receptors in most tissues of the body, such as the testes, and is important for the maintenance and development of stem cells [28].

Chen et al. in their study acknowledged that azoospermia leads to decreased growth and development and even the proliferation and differentiation of stem cells, and decreased sperm production quality leads to decreased expression levels of PLZF and TNP genes [18]. Decreased levels of SSCs receptors inhibit the production and expression of spermatogonia stem cells [29]. Therefore, it seems that reducing the receptor and increasing inflammation in azoospermic patients can reduce the expression level of PLZF and TNP genes [28].

The results of the present study also showed that 8 weeks of low-intensity swimming exercise caused no significant increase in PLZF and TNP gene expression in rats in the swimming exercise group compared with the azoospermia group. Because a clear mechanism for the effect of physical activity on PLZF and TNP gene expression has not yet been properly elucidated, it is impossible to properly explain the research Findings. The results of some similar studies showed the improving effect of aerobic exercise on the expression of spermatogonia stem cells [21-24]. Frances et al. in their study acknowledged that aerobic exercise, especially moderate-intensity aerobic exercise could affect,

modulate, and improve spermatogenesis markers such as PLZF and TNP and reduce the level of inflammation in infertile patients [22].

In line with the results of this study, it was shown that aerobic exercise increases the level of sexual quality and fertility due to the reduction in the expression of inflammatory genes and the improvement of spermatogonia stem cells [23]. Physical activity can release nitric oxide that activates the enzyme guanyl cyclase, resulting in increased levels of cGMP (cyclic guanosine monophosphate). This increase leads to the dilation of the arteries of the reproductive system and increases its blood flow, which in turn leads to increased sperm production [30]. These changes reduce the risk of infertility in men who have become infertile due to a lack of sperm [31]. In other words, physical activity leads to increased sperm production and treatment of infertility due to spermatogenesis by dilating blood vessels and increasing the blood flow cycle in organs such as the reproductive system [32]. Also, increasing capillary density in response to exercise leads to adequate oxygen supply to the tissue, which in turn activates and alters cell membrane permeability, thereby increasing mRNA production and cell division, and the expression level of spermatogonia stem cell genes increases [33].

In their study, Faustino-Rocha et al. (2017) acknowledged that increasing capillary density and blood flow improves stem cell surface area, motility, differentiation of fertile cells [23]. Also, research on the effect of physical activity on spermatogonial stem cells shows that following physical activity, especially aerobic, the cellular response begins with the activation of photoreceptors in the respiratory chain located in the mitochondria, resulting in altered cel-

lular redox. It modifies and together with changes in cell membrane state with calcium transfer and pH changes and activation of CAMP (cyclic adenosine monophosphate) and DNA duplication leads to the formation of new proteins and cell proliferation [34]. In this way, cellular responses are drawn from the cellular surface to the surface of tissue and organs and effects such as cell proliferation, neovascularization, aerobic metabolism shift, and fertility balance and infertility reduction are achieved [35, 36].

## 5. Conclusion

In general, the results of the present study indicate that alteration of key molecules or signal pathways and expression of PLZF and TNP genes in the process of spermatogenesis can reduce fertility and increase infertility, but regular aerobic exercise, such as low-intensity swimming, treats infertility by increasing the maintenance and development of spermatogonia stem cells.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

The researchers followed all the ethical rules related to animal Research Protocols (Ethics Code: IR.IAU.SARI.REC.1398.149).

### Funding

The present paper was extracted from the PhD. thesis of the second author, Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari.

### Authors' contributions

Data collection: Leila Zahrabi Korani; Research idea presentation, study design, writing, and editing the manuscript: Parvin Farzangi; Data analysis and initial review: Mohammad Ali Azarbayjani.

### Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

This Page Intentionally Left Blank

# تأثیر ۸ هفته تمرین شنا با شدت پایین بر بیان ژن PLZF و TNP در موش‌های صحرایی مدل آزواسپرمی

لیلا ظهراهی کرانی<sup>۱</sup>، پروین فرزانیکی<sup>۱\*</sup>، محمدعلی آذربایجانی<sup>۲</sup>

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری، ایران.

۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

## چکیده

تاریخ دریافت: ۲۵ آبان ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۱۶ دی ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۰ مهر ۱۳۹۹

**اهداف:** یکی از علل ناباروری در مردان بیماری آزواسپرمی است که به نبود اسپرم در هر انزال اطلاق می‌شود. حفظ، تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی، کلید اصلی و اولیه در روند اسپرم‌زایی است. بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی تغییرات بیان ژن PLZF و TNP در موش‌های صحرایی مدل آزواسپرمی به دنبال هشت هفته تمرین شنا با شدت پایین بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، پانزده سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار پس از ایجاد مدل آزواسپرمی به صورت تصادفی به سه گروه کنترل سالم، مبتلا به آزواسپرمی، تمرین+مبتلا به آزواسپرمی دسته‌بندی شدند. گروه تمرین+آزواسپرمی، یک ماه بعد از ایجاد آزواسپرمی، به مدت هشت 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 شد.

**یافته‌ها:** یافته‌ها حاکی از آن بود که یک دوره برنامه تمرینی شنا در گروه تمرین+آزواسپرمی سبب کاهش معنادار بیان ژن PLZF نسبت به گروه‌های کنترل سالم ( $P=0/001$ ) و افزایش غیرمعنادار نسبت به گروه آزواسپرمی ( $P=0/06$ ) شد. همچنین کاهش معناداری در سطح بیان ژن TNP در گروه تمرین+آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل سالم ( $P=0/001$ ) و افزایش غیرمعنادار نسبت به گروه آزواسپرمی مشاهده شد ( $P=0/057$ ).

**نتیجه‌گیری:** بر اساس این یافته‌ها می‌توان این‌گونه اذعان داشت که تغییر مولکول‌های کلیدی یا مسیرهای سیگنالی و بیان ژن PLZF و TNP در فرایند اسپرماتوژنز می‌تواند باعث افزایش ناباروری شود. ولی فعالیت ورزشی منظم هوازی مانند شنا با شدت پایین در مهار آثار ناشی از بیماری‌های ناباروری از طریق افزایش حفظ و توسعه سلول‌ها بنیادی اسپرماتوگونی کمک شایانی می‌کند.

## کلیدواژه‌ها:

شنا، TNP، PLZF، آزواسپرمی

## مقدمه

بنیادی که در یک موجود زنده یافت می‌شوند، سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از نظر اینکه قادر به انتقال اطلاعات وراثتی به نسل بعد از خود هستند، حائز اهمیت‌اند؛ بنابراین این سلول‌ها را می‌توان به عنوان منبع باارزشی به منظر تحقیقات مختلف مورد استفاده قرار داد [۵،۴]. تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی، کلید اصلی و اولیه در روند اسپرم‌زایی و حفظ باروری مردان هستند [۶].

PLZF<sup>۲</sup> به عنوان یکی از مارکرهای شناخته‌شده سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است که برای حفظ و توسعه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی در کشت ضروری است [۷]. PLZF توسط سلول‌های سرتولی تولید و ترشح می‌شود و زیرمجموعه‌ای از سلول‌های اسپرماتوگونی، رسپتور آن را بیان می‌کنند [۸]. این فاکتور باعث حفظ و تکثیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی

اسپرماتوژنز<sup>۱</sup> فرایندی است که با تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی<sup>۲</sup> صورت می‌پذیرد [۱]. این سلول‌ها روی غشای پایه لوله‌های اسپرم‌ساز واقع شده‌اند و سلول‌های سرتولی<sup>۳</sup> آن‌ها را احاطه کرده‌اند [۲]. این مجموعه، محیطی را فراهم می‌آورد که باعث عملکرد و بقای اسپرم می‌شود [۳]. هرگونه تغییر در این محیط باعث اختلال در اسپرماتوژنز می‌شود که به نوبه خود می‌تواند باعث ناباروری موقت یا دائم شود [۴]. سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی پایه و اساس روند اسپرم‌زایی و باروری جنس مذکر را تشکیل می‌دهند [۵]. از میان انواع مختلف سلول‌های

1. Spermatogenesis
2. Spermatogonial Stem Cells (SSCs)
3. Sertoli cells

4. Promyelocytic leukaemia zinc finger protein

\* نویسنده مسئول:

دکتر پروین فرزانیکی

نشانی: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری.

تلفن: ۲۲۳۰۲۲۳۳ (۹۱۱) +۹۸

پست الکترونیکی: parvin.farzanegi@gmail.com



تا متوسط به علت افزایش جریان خون به تدریج سبب بهبود فعالیت متابولیسی می‌شود، اما فعالیت شدید به دلیل تغییر جهت جریان خون به سمت ماهیچه‌های در حال فعالیت سبب کاهش آن می‌شود [۲۰]. کاهش فعالیت بدنی می‌تواند باعث کاهش مقدار هورمون‌های جنسی، اسپرم‌زایی و باروری و نیز کوچک‌تر شدن بیضه و کاهش مقدار منی شود [۲۱]. در مطالعه فرنس و همکاران گزارش شد که متعاقب ۱۲ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط نشانگرهای اسپرماتوژنز از قبیل سطح PGC-1 $\alpha$  و PLZF در موش‌های صحرایی بهبود یافتند [۲۲]. در مطالعه مرویوماندو و همکاران این‌طور گزارش شده که بعد از یک دوره فعالیت ورزشی هوازی با شدت پایین و متوسط، سطح بیماری آواسپرمی از طریق تعدیل ژن‌های درگیری در این بیماری و کاهش سطح استرس اکسیداتیو و التهاب در این بیماران، کیفیت منی و باروری افزایش می‌یابد [۲۳]. در این راستا نتایج مطالعات نشان داد که تمرین با شدت بالا می‌تواند منجر به تغییرات منفی و مثبت در ژن‌های مؤثر در باروری اسپرم از قبیل PLZF و TNP داشته باشد [۲۴].

مکانیسم‌های احتمالی نیز پیشنهاد شده است، اما نتایج مطالعات در مورد ارتباط بین فعالیت بدنی و میزان بیماری آواسپرمی اندک و متناقض است. بنابراین با توجه به اهمیت پیشگیری از عوامل بروز بیماری آواسپرمی و نیز فقدان اطلاعات لازم و مکفی در خصوص تأثیر تمرین‌های ورزشی بر سطح بیان ژن PLZF و TNP در بیماری آواسپرمی، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرین شنا با شدت پایین بر بیان ژن PLZF و TNP در موش‌های صحرایی مدل آواسپرمی انجام گرفت.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی پانزده سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار شش تا هشت هفته‌ای با میانگین وزنی  $202/85 \pm 10/62$  گرم از انستیتو پاستور خریداری شدند. حیوانات در محیطی با میانگین دمای  $23 \pm 1/4$  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 بود و پروتکل‌های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد [۲۵]. حیوانات از غذای پلت و آب که به 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.

در شرایط آزمایشگاهی می‌شود [۹]. در بیضه PLZF محدود به اسپرماتوگونیا‌های SSC است. مطالعات نشان داده که پس از پیوند SSCها از موش‌های بدون PLZF، در موش گیرنده روند اسپرماتوژنز از سر گرفته نمی‌شود [۱۰]؛ بنابراین یکی از نقش‌های احتمالی برای PLZF می‌تواند حفظ موقعیت غیرتمایزی باشد [۱۱]. PLZF به عنوان مارکر اساسی سطحی سلول‌های پروژنیاتور / بنیادی اسپرماتوگونی محسوب می‌شود [۱۲].

نوع دیگر نوکلئوپروتئین‌های اسپرمی، پروتئین‌هایی هستند که تحت عنوان پروتئین‌های هسته‌ای گذرا نام‌گذاری می‌شوند [۱۳]. این پروتئین‌های گذرا حدود ۹۰ درصد از پروتئین‌های اصلی کروماتین را طی مراحل حذف هیستون‌ها و جایگزینی پروتئین‌های گذرا، تشکیل می‌دهد [۴]. مطالعات آزمایشگاهی گزارش کرده‌اند که عملکرد احتمالی پروتئین TNP شامل آزادسازی DNA در ذرات هسته‌ای نوکلئوزوم‌ها، کاهش دمای ذوب DNA و تحریک فعالیت توپوایزومر از نوع ۱ است [۱۴]. مشخص شده است که در مردان نابارور اسپرماتوزوئا تغییرات هسته‌ای زیادی شامل ساختار غیرطبیعی کروماتین، حذف‌های کوچک کروموزومی، آنیپلوئیدی و شکست‌های رشته‌ای DNA دارند [۱۵].

نتایج مطالعات بیانگر آن است که افزایش بیان و سیگنالینگ PLZF و TNP در یک استراتژی درمانی امیدوارکننده برای درمان آواسپرمی است [۱۶]. در این راستا، عوامل قابل اصلاحی مانند فعالیت بدنی وجود دارند که به پیشگیری و درمان این بیماری از طریق تنظیم و تعدیل ژن‌های مؤثر در باروری کمک می‌کنند [۱۷]. چراکه ناباروری ناشی از عدم تحرک که در افراد مبتلا به آواسپرمی مشاهده می‌شود، از نگرانی‌های قابل توجه محافل پزشکی محسوب می‌شوند [۱۸]. اما اینکه چه نوع فعالیت ورزشی و از طریق چه مکانیسم‌های سلولی و مولکولی می‌تواند بهترین اثربخشی را داشته باشد، هنوز به طور کامل و دقیق شناخته نشده است. مطالعات نشان می‌دهد که تمرین هوازی با شدت پایین می‌تواند با ایجاد مکانیسم حفاظتی منجر به کاهش بیان سایتوکین‌های التهابی، استرس اکسیداتیو در بافت بیضه، التهاب سیستمیک و در نتیجه بهبود پاسخ‌های ایمنی شود [۱۹]. از میان تمرین‌های هوازی، تمرین هوازی شنا با شدت پایین از جمله تمریناتی است که در شرایط مختلف فیزیولوژیک، ایمن و قابل استفاده بوده و به دلیل عدم تحمل وزن در آب نسبت به ورزش‌های غیرآبی در اکثر مطالعات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و واکنش‌های مولکولی به کار می‌رود [۲۰]. فعالیت ورزشی آرام

5. Progenitor cell
6. Spermatid nuclear transition protein (TNP)
7. Chromatin
8. Nucleosome
9. Aneuploidy

10. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1

جهت استخراج RNA ابتدا به بافت بیضه ۲۰۰-۳۰۰ لاندا کیازول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آن در دمای منهای ۸۰ قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت پلاک موجود در کرایوتیوب در حالت نیمه انجماد توسط سرمپلر خرد و سپس مقدار کمی از آن، پیپتاژ شد. سپس به نمونه حدود ۱۰۰ لاندا کلروفرم اضافه شد تا سلولها لیز شود. این محلول حدود ۱ دقیقه باید با سلولها در تماس بود.

پس از ۱ دقیقه محلول با دور ۱۲ هزار به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفیوژ شد. پس از سانتیفیوژ محلول به سه فاز تقسیم شد: قسمت بالایی لوله که شفاف و حاوی RNA بود، قسمت وسطی لوله که سفیدرنگ و حاوی بافت لیز شده بود و 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. سپس ۱ سی سی ایزوپروپانول روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. ایزوپروپانول شفاف و RNA نیز شفاف است، اما وقتی این دو با هم مخلوط شوند مایع کدری را به وجود می آورند. پس از افزودن ایزوپروپانول نمونهها در سانتیفیوژ با دور ۱۲ هزار به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتیفیوژ مایع رویی تخلیه و به آن ۱ سی سی الکل ۷۰ درصد اضافه شد. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتیفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه شد و سپس پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. به منظور حل کردن RNA به میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرمپلر پیپتاژ و به مدت ۵ دقیقه روی صفحه ۶۰ درجه قرار داده شد.

همچنین جهت تهیه cDNA تکرار شده‌ای از پرایمر Oligod- tMWG-Biotech, Germany و آنزیم نسخه برداری معکوس (شرکت فرمنتاز "Fermentas") استفاده شد و برای این کار طبق دستورالعمل شرکت سازنده عمل شد. هر واکنش PCR با استفاده از Applied Biosystems PCR master mix و SYBER Green در دستگاه Applied Biosystems, Sequences De- (ABI Step One tectonSystems. Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. چهل 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 ترسیم شد و به صورت اختصاصی برای هر ژن استفاده شد و در هر بار 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

به منظور ایجاد مدل آزواسپرمی، ابتدا داری بوسولفان<sup>۱۱</sup> با ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش‌های صحرایی به صورت داخل صفاقی برای هر موش صحرایی تزریق شد. پس از گذشت یک ماه از القای مدل در هر گروه، موش‌ها به صورت تصادفی به سه گروه کنترل سالم (پنج سر)، آزواسپرمی (پنج سر)، تمرین+آزواسپرمی (پنج سر) تقسیم شدند [۵، ۴]. گروه آزواسپرمی، یک ماه بعد از ایجاد مدل تا پایان مطالعه (مدت هشت هفته) باقی ماندند و گروه کنترل سالم به مدت هشت هفته نگهداری شدند و گروه تمرین+آزواسپرمی، یک ماه بعد از ایجاد موش‌های آزواسپرمی به مدت هشت هفته به انجام تمرین شنا پرداختند.

موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین+آزواسپرمی، قبل از شروع پروتکل اصلی، به مدت یک هفته (پنج 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 پنج روز در هفته تا پایان دوره تحقیق در یک مخزن آب به ابعاد ۱۰۰×۵۰×۵۰ سانتی‌متری با درجه حرارت ۳۰-۳۲ درجه سانتیگراد در طی هشت هفته به شنا پرداختند. مدت زمان تمرین در آب، روزانه ۳۰ دقیقه تا پایان مدت تمرین بود.

جهت حذف اثر حاد تمرین، نمونه بردای 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 میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۳-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) 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 PLZF و TNP در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک PCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج شد و به cDNA تبدیل شد. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از تکنیک RT-qPCR جهت تأیید بیان ژنهای مورد مطالعه به صورت کمی استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کیازول<sup>۱۲</sup>، RNA کل سلولها طبق پروتکل سیناژن<sup>۱۳</sup> استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase I Fermentas قرار گرفت. علاوه بر این، جهت ارزیابی یکپارچگی RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز استفاده شد.

11. Busulfan
12. Kiazol
13. CinnaGen

داده‌ها از شاخص‌های آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف استاندارد و آمار استنباطی استفاده شد. ابتدا جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو ویلک 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 PLZF و TNP استفاده شد. برای انجام کلیه امور آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد و برای رسم نمودار از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

### 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 هشت هفته تمرین هوازی شنا با شدت پایین موجب کاهش معنادار سطح بیان ژن PLZF در گروه تمرین+آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل سالم (۱۲۵/۴۲ درصد) و افزایش غیرمعنادار نسبت به گروه آزواسپرمی (۴۲/۴۷ درصد) شده است (به ترتیب  $P=0/001$ ،  $P=0/06$ ) (تصویر شماره ۱).

مقایسه‌ای چرخه آستانه<sup>۱۴</sup> مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول شماره ۱:

۱.

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

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

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

۲.

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

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

در فرمول شماره ۲ E معرف Efficiency است و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای ژن به دست می‌آید [۲۶].

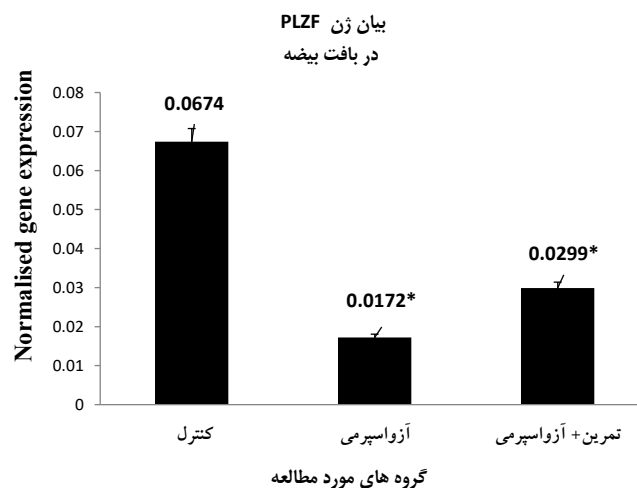
بعد از تحلیل آزمایشگاهی نمونه‌های بافتی، برای توصیف کمی

14. Threshold Cycle (CT)

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار وزن موش‌ها در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

شاخص	میانگین $\pm$ انحراف معیار		
	تمرین+آزواسپرمی	آزواسپرمی	کنترل
وزن (گرم)	۲۰۸/۱ $\pm$ ۱۵/۶۰	۲۱۵/۸ $\pm$ ۵/۲۵	۲۰۵/۵ $\pm$ ۲۰/۱۶

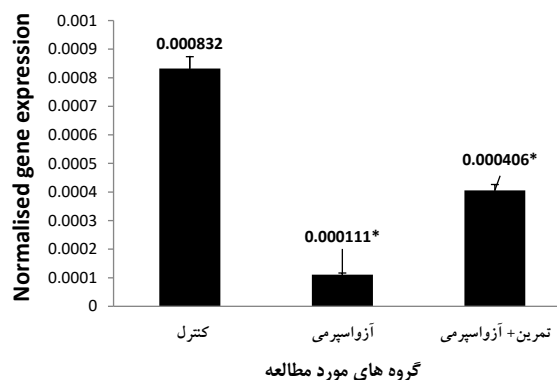
### فوق دانش



تصویر ۱. مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن PLZF در بافت بیضه بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه \* نشانه تغییر معنادار نسبت به گروه کنترل (مقدار  $P \leq 0/05$ ).

### فوق دانش

بیان ژن TNP  
در بافت بیضه



تصویر ۲. مقایسه سطوح میانگین mRNA برای بیان ژن TNP بافت بیضه بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه \* نشانه تغییر معنادار نسبت به گروه کنترل (مقدار  $P \leq 0.05$ ).

## افق دانش

و بیان سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی می‌شود [۲۹]. بنابراین به نظر می‌رسد کاهش گیرنده‌ها و افزایش التهاب در بیماران آزواسپرمی، می‌تواند منجر به کاهش سطح بیان ژن PLZF و TNP شود [۲۸].

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هشت هفته تمرین شنا با شدت پایین سبب افزایش غیرمعنادار بیان ژن PLZF و TNP موش‌های صحرایی گروه تمرینی شنا در مقایسه با گروه آزواسپرمی شد. از آنجایی که مکانسیم روشنی از تأثیرگذاری فعالیت بدنی بر بیان ژن PLZF و TNP هنوز به‌درستی مشخص نشده است، ممکن است توضیح نتایج تحقیقات به‌درستی امکان‌پذیر نباشد. نتایج برخی از مطالعات هم‌راستا با نتایج تحقیق حاضر، اثر افزایشی ورزش هوازی بر بیان ژن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی را ثابت کردند [۲۱-۲۴].

فرنس و همکاران در مطالعه خود این‌گونه اذعان داشتند که شدت فعالیت هوازی به‌ویژه انجام فعالیت هوازی با شدت متوسط، قابلیت اثرگذاری و تعدیل و بهبود نشانگرهای اسپرماتوژنز مانند PLZF و TNP را دارد و کاهش سطح التهاب در بیماران نارور را در پی دارد [۲۲]. در راستای نتایج این تحقیق، نشان داده شد که تمرین هوازی با توجه به بهبود کاهش سطح بیان ژن‌های التهابی و بهبود سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی، سطح کیفیت جنسی و باروری را افزایش می‌دهد [۲۳].

فعالیت بدنی می‌تواند باعث آزاد شدن اکسید نیتریک<sup>۱۵</sup> شود. اکسید نیتریک، آنزیم گوانیل سیکلاز را فعال کرده و در نتیجه میزان cGMP<sup>۱۶</sup> افزایش می‌یابد. این افزایش منجر به اتساع عروق دستگانه تناسلی شده و باعث افزایش جریان خون در آن می‌شود و متعاقب آن منجر به افزایش تولید اسپرم می‌شود [۳۰]. این

نتایج بررسی آزمون تعقیبی توکی بیانگر آن است که هشت هفته تمرین هوازی شنا با شدت پایین موجب کاهش معنادار سطح بیان ژن TNP در گروه تمرین+آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل سالم (۱۰۴/۹۳ درصد) و افزایش غیرمعنادار نسبت به گروه آزواسپرمی (۲۶۵/۷۶ درصد) شده است (به ترتیب ۰/۰۰۱،  $P=0.057$ ) (تصویر شماره ۲).

## بحث

در تحقیق حاضر تأثیر هشت هفته تمرین شنا با شدت پایین بر بیان ژن PLZF و TNP در موش‌های مدل آزواسپرمی مورد بررسی قرار گرفت. از نتایج مهم تحقیق حاضر کاهش معنادار سطح بیان ژن PLZF و TNP موش‌های صحرایی مدل آزواسپرمی نسبت به گروه سالم است. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه برخی از محققین که در تحقیق خود اظهار داشتند بیماری آزواسپرمی منجر به تغییر بیان ژن‌های درگیر در باروری از قبیل PLZF و TNP می‌شود، همسوست [۲۲-۲۴]. PLZF و TNP از مارکرهای اساسی در حفظ و توسعه سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی شناخته شدند [۲۷].

نتایج تحقیقات نشان داد که در مردان نابارور اسپرماتوزوها تغییرات هسته‌ای زیادی شامل ساختار غیرطبیعی کروماتین و شکست‌های رشته‌ای DNA وجود دارد که منجر به تغییر در سطح بیان این ژن می‌شود [۱۳]. این ژن‌ها که در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوژنز نقش ایفا می‌کنند، دارای گیرنده‌های مختلفی در اکثر بافت‌های بدن مانند بیضه بوده و جهت حفظ و توسعه سلول‌های بنیادی دارای اهمیت هستند [۲۸]. چن و همکاران در مطالعه خود اذعان داشتند که بیماری آزواسپرمی منجر به کاهش سطح رشد و توسعه و حتی تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی می‌شود و کاهش سطح کیفیت اسپرم‌زایی منجر به پایین آمدن سطح بیان ژن PLZF و TNP می‌شود [۱۸]. کاهش سطح گیرنده‌های SSCs، مانع از تولید

15. Nitric Oxide

16. Cyclic Guanosine Monophosphate

REC.1398.149 به ثبت رسیده است.

### حامی مالی

هزینه مالی این مطالعه به صورت شخصی تأمین شده است. این مقاله برگرفته از رساله دوره دکتری پروین فرزانی در گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، است.

### مشارکت نویسندگان

جمع‌آوری داده‌ها: لیلا ظهرابی کورانی؛ ارائه ایده تحقیق، طراحی مطالعه، نگارش و ویرایش نسخه خطی: پروین فرزانی؛ تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی اولیه: محمدعلی آذربایجانی.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

تغییرات باعث کاهش احتمال ناباروری در افرادی می‌شود که به علت کمبود اسپرم دچار عقیمی شده‌اند [۳۱]؛ به عبارت دیگر، فعالیت بدنی از طریق اتساع عروق و افزایش چرخه جریان خون در اندام‌های بدن از قبیل دستگاه تناسلی منجر به افزایش اسپرم‌زایی و درمان ناباروری ناشی از اسپرماتوژنز می‌شود [۳۲]. همین‌طور افزایش چگالی مویرگی در پاسخ به فعالیت‌های ورزشی منجر به فراهم کردن اکسیژن کافی در بافت‌ها می‌شود و این مورد باعث فعال‌سازی و تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی و به دنبال آن افزایش ساخته شدن mRNA و تقسیم سلولی می‌شود و سطح بیان ژن سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی افزایش می‌یابد [۳۳].

جوزکو و همکاران در مطالعه خود اذعان داشتند که افزایش چگالی مویرگی و جریان خون، منجر به بهبود سطح و تحرک سلول‌های بنیادی و تمایز سلول‌های بارور می‌شود [۳۳]. همچنین تحقیقات انجام‌شده روی اثرگذاری فعالیت بدنی بر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نشان می‌دهد که به دنبال فعالیت بدنی به‌ویژه 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 غشای سلولی با جابه‌جایی کلسیم و تغییرات PH و فعال شدن  $^{35}$ CAMP و مضاعف شدن  $^{35}$ DNA منجر به ساخته شدن پروتئین‌های جدید و تکثیر سلولی می‌شود [۳۴]. به این ترتیب پاسخ‌های سلولی از سطح سلولی به سطح بافت و ارگان کشانده می‌شود و اثراتی مانند تکثیر سلولی، نئوواسکولاریزاسیون<sup>۱۹</sup>، شیفت متابولیسم به سمت هوازی و متعادل کردن سطح باروری و کاهش ناباروری حاصل می‌شود [۳۵، ۳۶].

### نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که تغییر مولکول‌های کلیدی یا مسیرهای سیگنالی و بیان ژن PLZF و TNP در فرایند اسپرماتوژنز می‌تواند باعث کاهش باروری و افزایش ناباروری شود، ولی فعالیت ورزشی منظم هوازی مانند شنا با شدت پایین در مهار آثار ناشی از بیماری‌های ناباروری از طریق افزایش حفظ و توسعه سلول‌ها بنیادی اسپرماتوگونی کمک شایانی می‌کند.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

پژوهشگران کلیه قوانین اخلاقی مرتبط با تحقیقات روی حیوانات را رعایت کردند. این مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.SARI.

17. Cyclic Adenosine Monophosphate

18. Duplication

19. Neovascularization

## References

- [1] Ernst C, Eling N, Martinez-Jimenez CP, Marioni JC, Odom DT. Staged developmental mapping and X chromosome transcriptional dynamics during mouse spermatogenesis. *Nature Communications*. 2019; 10(1):1251. [DOI:10.1038/s41467-019-09182-1] [PMID] [PMCID]
- [2] Ni FD, Hao SL, Yang WX. Multiple signaling pathways in Sertoli cells: Recent Findings in spermatogenesis. *Cell Death & Disease*. 2019; 10(8):541. [DOI:10.1038/s41419-019-1782-z] [PMID] [PMCID]
- [3] Griswold MD. Spermatogenesis: The commitment to meiosis. *Physiological Reviews*. 2016; 96(1):1-17. [DOI:10.1152/physrev.00013.2015] [PMID] [PMCID]
- [4] Gutierrez K, Glanzner WG, Chemeris RO, Rigo ML, Comim FV, Bordignon V, et al. Gonadotoxic effects of busulfan in two strains of mice. *Reproductive Toxicology*. 2016; 59:31-9. [DOI:10.1016/j.reprotox.2015.09.002] [PMID]
- [5] Khanezhad M, Abolhasani F, Koruji SM, Ragerdi Kashani I, Aliakbari F. [The roles of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells (Persian)]. *Tehran University Medical Journal*. 2016; 73(12):878-87. <http://tums.tums.ac.ir/article-1-7253-en.html>
- [6] Cioppi F, Casamonti E, Krausz C. Age-dependent de novo mutations during spermatogenesis and their consequences. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019; 1166:29-46. [DOI:10.1007/978-3-030-21664-1\_2] [PMID]
- [7] Fahnenstich J, Nandy A, Milde-Langosch K, Schneider-Merck T, Walther N, Gellersen B. Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger protein (PLZF) is a glucocorticoid- and progesterone-induced transcription factor in human endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells. *Molecular Human Reproduction*. 2003; 9(10):611-23. [DOI:10.1093/molehr/gag080] [PMID]
- [8] Wang X, Wang J, Zhang L. Characterization of atypical acute promyelocytic leukaemia: Three cases report and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98(19):e15537. [DOI:10.1097/MD.00000000000015537] [PMID] [PMCID]
- [9] Fayomi AP, Orwig KE. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Research*. 2018; 29:207-14. [DOI:10.1016/j.scr.2018.04.009] [PMID] [PMCID]
- [10] Savage AK, Constantinides MG, Han J, Picard D, Martin E, Li B, et al. The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity*. 2008; 29(3):391-403. [DOI:10.1016/j.immuni.2008.07.011] [PMID] [PMCID]
- [11] Jin Y, Nenseth HZ, Saatcioglu F. Role of PLZF as a tumor suppressor in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(41):71317-24. [DOI:10.18632/oncotarget.19813] [PMID] [PMCID]
- [12] Liu TM, Lee EH, Lim B, Shyh-Chang N. Concise review: Balancing stem cell self-renewal and differentiation with PLZF. *Stem Cells*. 2016; 34(2):277-87. [DOI:10.1002/stem.2270] [PMID]
- [13] Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*. 2003; 111(8):483-8. [DOI:10.1007/s00412-002-0227-z] [PMID]
- [14] Jedrzejczak P, Kempisty B, Bryja A, Mostowska M, Depa-Martynow M, Pawelczyk L, et al. Quantitative assessment of transition proteins 1, 2 spermatid-specific linker histone H1-like protein transcripts in spermatozoa from normozoospermic and asthenozoospermic men. *Archives of Andrology*. 2007; 53(4):199-205. [DOI:10.1080/01485010701426430] [PMID]
- [15] Meistrich ML. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertility and Sterility*. 2013; 100(5):1180-6. [DOI:10.1016/j.fertnstert.2013.08.010] [PMID] [PMCID]
- [16] Torma F, Koltai E, Nagy E, Mosaferi Ziaaldini M, Posa A, Koch LG, et al. Exercise increases markers of spermatogenesis in rats selectively bred for low running capacity. *PLoS One*. 2014; 9(12):e114075. [DOI:10.1371/journal.pone.0114075] [PMID] [PMCID]
- [17] Mohaqiq M, Movahedin M, Mazaheri Z, Amirjannati N. Successful human spermatogonial stem cells homing in recipient mouse testis after in vitro transplantation and organ culture. *Cell Journal*. 2019; 20(4):513-20. [DOI:10.26226/morressier.5af300b3738ab10027aa9b14] [PMID] [PMCID]
- [18] 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. *Molecular Medicine Reports*. 2015; 12(1):819-28. [DOI:10.3892/mmr.2015.3528] [PMID] [PMCID]
- [19] Bagheri Hamzian Olya J, Khadem Ansari MH, Yaghmaei P. [The effect of endurance running activities on Prolactin, Testosterone and DHEA-S levels (Persian)]. *The Journal of Urmia University of Medical Sciences*. 2011; 21(5):391-7. <http://umj.umsu.ac.ir/article-1-828-en.html>
- [20] 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 (Persian)]. *Iranian Journal of Endocrinology & Metabolism*. 2011; 13(1):67-73. <http://ijem.sbmu.ac.ir/article-1-871-fa.html>
- [21] Urhausen A, Kullmer T, Kindermann W. A 7-week follow up study of the behavior of testosterone and cortisol during the competition period in rowers. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 1987; 56(5):528-33. [DOI:10.1007/BF00635365] [PMID]
- [22] Manna I, Jana K, Samanta PK. Effect of intensive exercise-induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders in mature male Wistar strain rats: A correlative approach to oxidative stress. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2003; 178(1):33-40. [DOI:10.1046/j.1365-201X.2003.01095.x] [PMID]
- [23] 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; 10(2):79-93. [DOI:10.1016/j.ramd.2016.11.017] [PMID] [PMCID]
- [24] Józków P, Rossato M. The impact of intense exercise on semen quality. *American Journal of Men's Health*. 2017; 11(3):654-62. [DOI:10.1177/1557988316669045] [PMID] [PMCID]
- [25] National Research Council, Division on Earth and Life Studies, Institute for Laboratory Animal Research, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide to the care and use of experimental animals*. 2<sup>nd</sup> ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care Ottawa Pub; 1993. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
- [26] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29(9):e45. [DOI:10.1093/nar/29.9.e45] [PMID] [PMCID]
- [27] Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature Genetics*. 2004; 36(6):653-9. [DOI:10.1038/ng1367] [PMID]
- [28] Choi WI, Kim MY, Jeon BN, Koh DI, Yun CO, Li Y, et al. Role of Promyelocytic Leukemia Zinc Finger (PLZF) in cell proliferation and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21WAF/CDKN1A) gene repression. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289(27):18625-40. [DOI:10.1074/jbc.M113.538751] [PMID] [PMCID]

- [29] Hsu YH, Chen YC, Chen TH, Sue YM, Cheng TH, Chen JR, et al. Far-infrared therapy induces the nuclear translocation of PLZF which inhibits VEGF-induced proliferation in human umbilical vein endothelial cells. *PLoS One*. 2012; 7(1):e30674. [DOI:10.1371/journal.pone.0030674] [PMID] [PMCID]
- [30] Kemi OJ, Wisloff U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. *Acta Physiologica (Oxf)*. 2010; 199(4):425-39. [DOI:10.1111/j.1748-1716.2010.02132.x] [PMID]
- [31] Farup J, Sørensen H, Kjølhede T. Similar changes in muscle fiber phenotype with differentiated consequences for rate of force development: Endurance versus resistance training. *Human Movement Science*. 2014; 34:109-19. [DOI:10.1016/j.humov.2014.01.005] [PMID]
- [32] Snijders T, Nederveen JP, Joannisse S, Leenders M, Verdijk LB, van Loon LIC, et al. Muscle fibre capillarization is a critical factor in muscle fibre hypertrophy during resistance exercise training in older men. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2017; 8(2):267-76. [DOI:10.1002/jcsm.12137] [PMID] [PMCID]
- [33] Kingsley JD, Figueroa A. Acute and training effects of resistance exercise on heart rate variability. *Clinical Physiology and Functional Imaging*. 2016; 36(3):179-87. [DOI:10.1111/cpf.12223] [PMID]
- [34] Isner-Horobeti ME, Dufour SP, Vautravers P, Geny B, Coudeyre E, Richard R. Eccentric exercise training: Modalities, applications and perspectives. *Sports Medicine*. 2013; 43(6):483-512. [DOI:10.1007/s40279-013-0052-y] [PMID]
- [35] Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The New England Journal of Medicine*. 1990; 322(4):223-8. [DOI:10.1056/NEJM199001253220403] [PMID]
- [36] Pozefsky T, Tancredi RG, Moxley RT, Dupre J, Tobin JD. Effects of brief starvation on muscle amino acid metabolism in nonobese man. *The Journal of Clinical Investigation*. 1976; 57(2):444-9. [DOI:10.1172/JCI108295] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank