Feyz Medical Sciences Journal
2024, Volume 28, Issue 5
Pages: 471-480
Doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.5.471
Original Article

The combined effects of swimming exercise and stem cell transplantation on the expression of CD9 and CD63 tetraspanin genes in a rat model of azoospermia

Maziyar Shojaee [1], Lida Moradi [1*], Parvin Farzanegi [2], Bahram Abedi [1]

[1] Department of Physical Education and Sports Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

[*]**Corresponding author: Lida Moradi**, Department of Physical Education and Sports Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: moradi.lida@gmail.com

Received: 20 August 2024 **Revised:** 13 November 2024 **Accepted:** 13 November 2024

Abstract

Background and Aim: Azoospermia, defined as the absence of sperm in semen, is a common cause of male infertility. This study aimed to determine the combined effects of swimming exercise and stem cell transplantation on the expression of CD9 and CD63 tetraspanin genes associated with spermatogenesis in an animal model of azoospermia.

Methods: In this experimental study, male rats were randomly divided into several groups after the induction of azoospermia. The groups included a healthy control group, an azoospermia group, an azoospermia + exercise group, an azoospermia + stem cell group, and an azoospermia + stem cell + exercise group. One million stem cells were transplanted into the vas deferens of each rat one month after the induction of azoospermia. Swimming exercise was performed daily for 30 minutes, 5 days a week for 8 weeks. After stem cell transplantation and exercise, the expression of CD9 and CD63 genes in testicular tissue was measured using Real-time PCR.

Results: Both swimming exercise and stem cell transplantation, individually and in combination, had a significant effect on the expression of CD9 (F=23.475, P=0.001) and CD63 genes (F=19.186, P=0.002). These findings indicate that both interventions are effective in improving the spermatogenesis process in the animal model of azoospermia.

Conclusion: The results of this study show that the combination of swimming exercise and stem cell transplantation can be considered as a novel therapeutic approach to improve fertility in men with azoospermia. The possible mechanism of this effect may be through the regulation of genes involved in spermatogenesis.

Keywords: Azoospermia, Stem cells, Swimming exercise, CD9, CD63

Copyright© 2024. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms. Downloaded from: http://feyz.kaums.ac.ir/

مجله علوم پزشکی فیض
دوره ۲۸، شماره ۵، آذر و دی ۱۴۰۳
صفحات: ۴۸۰- ۴۷۱
Doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.5.471
اصیل پژوهشی

تاثیر همزمان تمرین شنا و پیوند سلول‌های بنیادی بر بیان ژن تتراسپانین‌های CD9 و CD63 در رت های مدل آزواسپرمی

مازیار شجاعی [۱]، لیدا مرادی [۱*]، پروین فرزانگی [۲]، بهرام عابدی [۱]

[۱] گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۵/۳۰ **اصلاح مقاله:** ۱۴۰۳/۰۸/۲۳ **پذیرش مقاله:** ۱۴۰۳/۰۸/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: آزواسپرمی، به عنوان فقدان اسپرم در مایع منی، یکی از علل شایع ناباروری در مردان است. این مطالعه با هدف تعیین تاثیر هم‌زمان تمرین شنا و پیوند سلول‌های بنیادی بر بیان ژن تتراسپانین‌های CD9 و CD63 مرتبط با اسپرماتوژنز در مدل حیوانی آزواسپرمی انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، رت‌های نر پس از القای آزواسپرمی به صورت تصادفی در گروه‌های مختلف تقسیم شدند. گروه‌ها شامل گروه کنترل سالم، گروه آزواسپرمی، گروه آزواسپرمی+ورزش، گروه آزواسپرمی+سلول بنیادی و گروه آزواسپرمی+سلول بنیادی+ورزش بودند. یک ماه بعد از ایجاد مدل آزواسپرمی، یک میلیون سلول بنیادی در یک مرحله، در ناحیه مجران دفران هر موش پیوند زده شد. تمرین شنا به صورت روزانه به مدت ۳۰ دقیقه در روز و ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته انجام گرفت. پس از پیوند سلول‌های بنیادی و انجام تمرینات شنا، بیان ژن‌های CD9 و CD63 در بافت بیضه با استفاده از روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: تمرین شنا و پیوند سلول‌های بنیادی به طور جداگانه و ترکیبی بر بیان ژن‌های CD9 ($F= ۲۳/۴۷۵$ و $P= ۰/۰۰۰۱$) و CD63 ($F= ۱۹/۱۸۶$ و $P= ۰/۰۰۲$) تأثیر معنی‌داری داشتند. این یافته‌ها حاکی از آن است که هر دو مداخله در بهبود فرایند اسپرماتوژنز در مدل حیوانی آزواسپرمی موثر هستند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب تمرین شنا و پیوند سلول‌های بنیادی می‌تواند به عنوان یک رویکرد درمانی نوین در بهبود باروری مردان مبتلا به آزواسپرمی مورد توجه قرار گیرد. مکانیسم احتمالی این اثر می‌تواند از طریق تنظیم بیان ژن‌های دخیل در اسپرماتوژنز باشد.

کلیدواژه‌ها: آزواسپرمی، سلول های بنیادی، تمرین شنا، CD9، CD63

*نویسنده مسئول: **لیدا مرادی**. پست الکترونیک: moradi.lida@gmail.com
آدرس: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

حدود ۱۵–۱۰ درصد افراد در سنین باروری در جهان نابارور هستند که حدود ۵۰٪ از این ناباروری‌ها متعلق به مردان است. ناباروری مردان با اختلال عملکرد جنسی، واریکوسل، عفونت سیستم تولید مثل، اختلالات غدد درون ریز، آزواسپرمی انسدادی obstructive azoospermia (OA)، آزواسپرمی غیرانسدادی non-obstructive azoospermia (NOA) و غیره ارتباط نزدیکی دارد. میزان بروز NOA در مردان حدود ۱ درصد است که ٪۱۰–۱۵ مردان نابارور را تشکیل می‌دهد و این یکی از مهمترین دلایل ناباروری مردان است [۱]. فرایند اسپرماتوژنز در پستانداران سه مرحله شامل میتوز، میوز و اسپرمیوژنز می‌باشد. اختلال در هر یک از مراحل می‌تواند باعث ناباروری در مردان گردد. به طور کلی ناباروری به‌عنوان عدم توانایی در بچه دار شدن پس از حداقل یک سال پس از ازدواج بدون استفاده از وسایل پیشگیری از بارداری تعریف می‌شود [۲]. آزواسپرمی غیر انسدادی نوعی ناباروری در مردان است که در اثر اختلال عملکرد اسپرماتوژنیک در بافت بیضه ایجاد می‌شود. بیماران مبتلا به NOA نمی‌توانند اسپرم تولید کنند یا فقط می توانند مقدار بسیار کمی اسپرم تولید کنند. در بیماران مبتلا به NOA، ساختار توبول‌های اسپرم ساز seminiferous tubules در بیضه بی‌نظم است، در حالی که بلوغ سلول‌های اسپرماتوژن مسدود شده و میوز سلول‌های اسپرماتوژن متوقف می‌شود [۳]. در سال‌های اخیر، برخی مطالعات [۴] نشان داده‌اند که در اختلال اسپرماتوژنز بافت های کانونی و ناهمگن وجود دارد. حتی اگر اسپرم در اکثر لوله های اسپرم ساز در بافت بیضه یافت نشود، نمی توان کاملاً انکار کرد که ممکن است مقدار کمی اسپرم در برخی از لوله های اسپرم ساز وجود داشته باشد. مطالعات تأیید کرده اند که برخی از اسپرم های یافت شده از بیضه یا اپیدیدیمیس در بیمارانی که سلول‌های اسپرماتوژنیک آنها در حین میوز متوقف می‌شوند، می‌توانند با تشخیص و درمان تزریق اسپرم داخل سیتوپلاسمی intracytoplasmic sperm injection (ICSI) درمان شوند [۱]. در اکثر قریب به اتفاق موارد، آزواسپرمی با تعدادی از اختلالات برگشت ناپذیر بیضه‌ها همراه است که منجر به مهار اسپرماتوژنز می‌شود. این اختلالات اغلب با بیماری‌های غدد درون ریز، ژنتیکی و التهابی مرتبط هستند [۵]. علاوه بر این، NOA می‌تواند ایدیوپاتیک باشد [۶]. لمس و اندازه گیری، معمولاً بیضه‌های کوچک و شل آزواسپرمی غیر انسدادی را نشان می دهد. در تمام بیماران مبتلا به آزواسپرمی، سطح هورمون تحریک کننده فولیکول follicle stimulating hormone (FSH)، هورمون لوتئینی luteinizing hormone (LH)، پرولاکتین، تستوسترون تام، استرادیول و inhibin B باید اندازه گیری شود [۷]. در اکثر بیماران با NOA، FSH افزایش یافته است (بیشتر از ۷/۶ IU بر میلی لیتر) و LH بالا یا نزدیک به حد طبیعی است [۸]. هیپوگنادیسم با سطح پایین تستوسترون تام (پایینتر از ۳۰۰ نانوگرم بر دسی لیتر) تعریف می‌شود و در اکثر بیماران مبتلا به NOA رخ می‌دهد، که معمولاً نشان دهنده کمبود سلول‌های لیدیگ می‌باشد [۹].

اسپرماتوژنز در لوله‌های اسپرم ساز بیضه صورت می گیرد. این روند شامل تکثیر اسپرماتوسیت‌ها، تمایز اسپرماتوگونی به اسپرماتوسیت ها، تولید اسپرماتید و بلوغ اسپرم است. عوامل زیادی در تنظیم اسپرماتوژنز از جمله ژن ها، هورمون‌ها و تنظیم کننده‌های اپی ژنتیک دخیل هستند [۱۰]. اگرچه شناخته شده است که محتوای اگزوزوم با توجه به نوع سلول و وضعیت سلول متفاوت است. عنوان شده است که اگزوزوم‌ها تا حدی برای اجزایی مانند پروتئین و لیپید خاص هستند. به دلیل منشا اندوزومی، اگزوزوم‌ها دارای تتراسپانین (CD9، CD63، CD81 و CD82) می‌باشند [۱۱]. تتراسپانین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌های تراغشایی transmembrane هستند که نقش مهمی در فرآیندهای سلولی مانند چسبندگی، مهاجرت، سیگنال دهی و سازماندهی غشا ایفا می کنند. این پروتئین‌ها منحصربه‌فرد هستند زیرا ریزدامنه‌های تخصصی به نام «ریزدامنه‌های غنی‌شده با تتراسپانین tetraspanin-enriched microdomains را تشکیل می‌دهند که به‌عنوان پلت‌فرم‌هایی برای هماهنگ کردن تعامل بین گیرنده‌های سطح سلول، اینتگرین‌ها و سایر مولکول‌های سیگنال‌دهنده عمل می‌کنند [۱۲].

تتراسپانین دارای ۴ دامنه تراغشایی و دو حلقه خارج سلولی هستند که به آنها اجازه می‌دهد با پروتئین‌های مختلف هم‌ترازی داشته باشند. آن‌ها به عنوان "تسهیل‌کننده‌های مولکولی" molecular facilitators عمل می‌کنند و کمپلکس‌های چندمولکولی را سازماندهی می‌کنند که ارتباطات سلول به سلول را تنظیم می‌کند. این ویژگی در فرآیندهایی مانند پاسخ ایمنی، باروری و بازسازی بافت بسیار حیاتی است [۱۳].

بسیاری از مطالعات گزارش شده است وزیکول های خارج سلولی منی (EV) شامل اگزوزوم‌ها (۴۰–۱۲۰ نانومتر) و میکروسیکول‌ها (۱۲۰–۱۰۰۰ نانومتر) هستند که در چندین مکانیسم تولید مثل عملکردی نقش دارند؛ تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری نشان داده است که بیان CD63 و CD9 کمتر و بیان CD81 در اگزوزوم‌های پلاسمای منی در مقایسه با میکروسکول‌ها بالاتر است [۱۴–۱۷].

مشخص شده است که عوامل ژنتیک و محیطی نقش موثر بر سطح اسپرماتوژنز دارد؛ یکی از عوامل موثر بر بهبود عملکرد پارامترهای مرتبط با اسپرم، آسیب‌های بافت بیضه، و فرآیند اسپرماتوژنز در حیوانات آزمایشگاهی، فعالیت ورزشی می‌باشد که در این خصوص نتایج متفاوتی گزارش شده است و برخی تحقیقات گزارش کرده اند که تمرینات ورزشی نقش مثبتی بر این پارامترها و سیگنالینگ مرتبط با اسپرماتوژنز دارد [۱۸] ولی برخی نتایج اثر منفی تمرینات ورزشی بر عملکرد اسپرماتوژنز گزارش کرده اند. در این

تحقیق تعداد ۲۰ سر موش بالغ نر به مدت (۵ هفته و ۳ روز در هفته) با ۵۰ درصد توده بدنی و ۳۰ گرم اضافه بار تمرین و ۹۰ ثانیه استراحت انجام شد. آنان بیان داشتند تمرین مقاومتی باعث ایجاد اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز و پارامترهای اسپرمی شده و می‌تواند تأثیر منفی در سیستم باروری مردان داشته باشد [۱۹]. Li و همکاران نیز در تحقیق شان گزارش کردند که محدودیت رژیم غذایی و تمرینات ورزشی می‌تواند موجب اختلال در تولیدمثل مردان با ایجاد اختلال در الگوهای بیان ژن طبیعی در بیضه شود [۲۰] و این نشان دهنده اهمیت بررسی اثر تمرینات ورزشی بر مسیرهای ملکولی موثر بر اسپرماتوژنز برای مشخص شدن مکانیسم‌های مسئول در خصوص اثر تمرین ورزشی بر اسپرماتوژنز می‌باشد.

در دهه اخیر، زمینه ظهور سلول‌های بنیادی درمانی به سرعت به دوره جدیدی از پزشکی احیا تبدیل شده است. پتانسیل متنوع سلول‌های بنیادی مرکز توجه تحقیقات بسیاری از دانشمندان در زمینه زیست شناسی مولکولی، مهندسی ژنتیک و حتی پزشکی عمومی برای ایجاد رویکردهای جدید در درمان تعدادی از بیماری‌ها است که همیشه برای پزشکان یک چالش بوده است [۲۱]. سلول‌های بنیادی سلول‌هایی هستند که در طول زندگی یک موجود زنده خودپایدار هستند و قادر به تمایز به سلول‌های مختلف هستند. انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی در بافت‌های انسان وجود دارد. در میان آنها، سلول‌های بنیادی استرومایی مزانشیمی mesenchymal stromal/stem cells (MSC) مشتق شده از بافت‌های مختلف از جمله مغز استخوان و بافت چربی، از نظر کاربرد در سلول درمانی، امیدوار کننده ترین ماده در نظر گرفته شده‌اند. MSCها به‌دلیل پتانسیل تمایز چند خطی multilineal differentiation، ایمنی‌زایی کم و مشارکت فعال در ترمیم بافت و بازسازی پس از مهاجرت به مکان‌های آسیب دیده، در بین دانشمندان و پزشکان محبوب هستند. به طور کلی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبت به سایر سلول‌های بنیادی برای استفاده بالینی در درمان‌های مبتنی بر سلول دارای مزایایی هستند. این مزایا شامل در دسترس بودن، جداسازی و گسترش آسان، تمایز چند خطی، سرکوب کننده سیستم ایمنی، و هر دو پیوند خودکار و آلوگرافت، فارغ از مسائل اخلاقی و طول عمر تکراری محدود امکان پذیر است [۲۲]. Zhankina و همکاران عنوان کردند که استفاده سلول‌های بنیادی نقش موثری در بهبود توبول‌های اسپرم ساز دارند و اگزوزوم‌های ترشح شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادر به ایجاد فرآیند اسپرماتوژنز در بیضه مدل‌های حیوانی نابارور هستند ولی علی رغم پیشرفت‌های بیشمار در زمینه درمان بیماری‌های تولید مثل در مردان و زنان با کمک سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا اگزوزوم‌های آنها، هیچ آزمایش بالینی در مورد درمان NOA خاتمه نیافته است [۲۳] که نشان دهنده نیاز به تحقیقات بیشتر در این خصوص می‌باشد.

با توجه به مطالب گفته شده هدف تحقیق حاضر مقایسه اثر تمرینات شنا و سلول‌های بنیادی بر بیان ژن‌های CD9 و CD63 در رت‌های مدل آزواسپرمی می‌باشد.

روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع بنیادی و تجربی می‌باشد. این پژوهش به روش آزمایشگاهی و کنترل شده انجام شد (کد اخلاق شماره IR.IAU.SARI.REC.1402.330 از دانشگاه آزاد اسلامی). با عنایت به اینکه از لحاظ محدودیت های مکانی، اخلاقی و زمانی دسترسی به آزمودنی‌های انسان مقدور نبوده است لذا از آزمودنی‌های حیوان (رت‌های ویستار نر) استفاده شد. در ابتدا به کسب مجوزهای لازم اقدام شد و سپس مطابق با دستورالعمل انجمن ایرانیان حمایت از حیوانات آزمایشگاهی در قفس‌های به صورت جداگانه نگهداری شدند. جامعه آماری جامعه تحقیق حاضر را رت های نر ویستار تشکیل می‌دادند که از بین جامعه آماری (موش‌های انستیتو پاستور ایران) ۲۵ سر موش نر با محدوده سن ۶ تا ۸ هفته با وزن ۲۰±۲۲۰ گرم (در ابتدا) خریداری شدند که به صورت تصادفی به پنج گروه (۵ سر موش در هر گروه) شامل کنترل سالم، آزواسپیرمی، آزواسپرمی+ تمرین، آزواسپرمی + سلول بنیادی و آزواسپیرمی+ سلول بنیادی+ تمرین تقسیم شدند. حجم نمونه با نرم افزار G POWER بر اساس روش آماری تحلیل واریانس و سطح خطای آلفای ۰/۰۵ و توان ۰/۸۵ برابر با ۲۵ موش تعیین شد. موش‌ها در آزمایشگاه حیوانات در شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۶ عصر و شروع خاموشی ۶ صبح) دما (۳±۲۲ سانتی گراد)، و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. موش ها در قفس هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ سانتیمتر به گونه‌ای نگهداری شدند که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشته باشند. در سرتاسر دوره تحقیق موش‌ها توسط یک نفر جابجا و دستکاری شدند.

ایجاد آزواسپرمی

به منظور ایجاد مدل آزواسپرمی، رت‌های نر بالغ ۶ تا ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. سپس داروی بوسولفان با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن رت‌ها به‌صورت داخل صفاقی برای هر رت تزریق شد [۲۴]. بررسی‌های بافت‌شناسی انحطاط مشخص سلول‌های اسپرم‌ساز را نشان داد که منجر به ایجاد اپیتلیوم منی‌ساز با دیواره نازک در اکثر لوله‌های منی‌ساز می‌شود که نشان‌دهنده اختلال شدید در تولید اسپرم است.

تغذیه و محیط نگهداری حیوانات

حیوانات در طی پژوهش از غذای پک ساخت شرکت بهپرور کرج روزانه به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن (با توجه به وزن کشی هفتگی) تغذیه شدند و به‌صورت آزاد از طریق بطری هایی به آب مصرفی دسترسی داشتند. پوشال مصرفی جهت استفاده در بستر قفس نگهداری حیوانات، خاک اره درشت از جنس

چوب نرات (با رنگ روشن بدون گرد وخاک) درنظر گرفته شد که به ارتفاع ۳ تا ۵ سانتی متر از کف قفس قرار داده شده و دوبار در هفته در تمام دوره پژوهش تعویض انجام شد.

برنامه تمرینی

در طی یک هفته آشنایی آزمودنی ها ۵ جلسه تمرین کردند که هر بار به مدت ۲۰ دقیقه به منظور آشنایی‌ها با آب و کاهش استرس شنا و سازگاری با شرایط تمرینی به تمرین پرداختند. آزمودنی‌ها پس از هر بار تمرین شنا پس از خشک کردن کامل با استفاده از حوله و خشک کن مخصوص به داخل قفس‌ها بازگردانده شدند. سپس ۵ روز در هفته تا پایان دوره تحقیق در یک مخزن آب به ابعاد ۵۰×۵۰×۱۰۰ سانتی‌متری با درجه حرارت ۳۰-۳۲ درجه سانتیگراد در طی ۸ هفته به شنا پرداختند. مدت زمان تمرین در آب، روزانه ۳۰ دقیقه تا پایان مدت تمرین بود. پروتکل تمرین در تحقیق حاضر برگرفته از پروتکل تمرین در تحقیق ظهرابی و همکاران (۲۰۲۰) می‌باشد که به بیان ژن PLZF و TNP در موش‌های آزواسپرمی انجام شده است و با توجه به این که این ژن‌ها در ارتباط با مسیر اسپروماتوژنز می‌باشند، در تحقیق حاضر نیز از این پروتکل تمرین استفاده شد [۲۴].

سلول‌های بنیادی

یک ماه پس از القای آزواسپرمی در موش‌ها یک بار سلول‌های بنیادی (یک میلیون سلول) به صورت پیوند در ناحیه مجرای دفران هر موش پیوند زده می‌شود. در تحقیق حاضر نحوه استفاده و دوز استفاده از سلول‌های بنیادی برگرفته از تحقیق اسدی و همکاران (۲۰۲۰) می‌باشد که در تحقیقی مشابه به بررسی اثر توام تمرین شنا و سلول های بنیادی بر اسپرماتوژنز رت‌های مدل آزواسپرمی انجام داده بودند [۲۵]. در این مطالعه که شامل القای آزواسپرمی در موش‌های صحرایی نر بود، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به داخل بیضه تزریق شد. نوع خاصی از سلول‌های بنیادی مورد استفاده سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بودند. تزریق با استفاده از سرنگ با سوزن گیج ۲۶ انجام شد. این اندازه سوزن معمولاً برای تحویل سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل تعادل بین به حداقل رساندن آسیب بافتی و حفظ زنده ماندن سلول در طول فرآیند تزریق استفاده می‌شود.

روش جراحی و پیوند سلول‌های بنیادی به مجرای دفران در موش بدین صورت بوده است. تزریق صفاقی کتامین (۳۰-۵۰ mg/kg) و زایلازین (3-5 mg/kg) بی‌هوش شدند. ناحیه جراحی تراشیده و ضدعفونی شد تا از عفونت جلوگیری شود. یک برش کوچک در ناحیه تحتانی شکم ایجاد شد تا مجرای مجرای انتقال اسپرم از بیضه به مجرای ادرار را آشکار کند.مجرای دفران بدون آسیب رساندن به بافت های اطراف مانند رگ های خونی یا اعصاب به دقت جدا شد. با استفاده از یک میکرواینژکتور با نوک ریز، سلول‌های بنیادی مستقیماً به مجرای مجرای دفران یا بافت بیضه مجاور تزریق می‌شوند. پس از پیوند سلول‌های بنیادی، مجرای دفران به دقت جابه جا شد. عضلات و پوست شکم با استفاده از بخیه‌های قابل جذب یا غیرقابل بخیه زدن بخیه می‌شوند. سپس موش‌ها در یک ناحیه ریکاوری با پدهای گرم کننده قرار داده می‌شوند تا از بهبودی آرام پس از بیهوشی اطمینان حاصل شود. داروهای ضد درد برای به حداقل رساندن درد بعد از عمل تجویز شد. موش‌ها از نظر علائم عفونت یا سایر عوارض به دقت تحت نظر بودند. پس از جراحی و بهبودی موش‌ها از نظر فعالیت و رفتار طبیعی مورد بررسی قرار گرفتند.

ابزارهای مورد استفاده در پژوهش شامل، قفس پلی کربنات شفاف به ابعاد۴۷×۲۷×۲۰ سانتی متر برای نگهداری موش و ظرف آب مخصوص، غذای مخصوص موش (پلت ساخت شرکت بهپرور کرج- ایران)، سرنگ انسولینی (۱ سی سی)، دماسنج جیوه ای، سانتریفوژ (سرعت g ۸۰۰۰)، وسایل تشریح (پنس، قیچی جراحی، تیغ و دسته اسکالپر مخصوص جراحی استریل)، وسایل آزمایشگاهی شامل لوله آزمایش، میکرو تیوب، شیشه ساعت، PH متر، الایزا ریدر، هاون چینی برای پودر کردن بافت‌ها، ماده بیهوشی مخلوطی از دو ماده زایلازین و کتامین سولفات، اتانول ۹۶ درصد، تیوباربیتوریک اسید ۳۳ درصد، آب مقطر، آب مقطر و الکل مطلق (حلال)، مایع نیتروژن، محلول بافر (بافر فسفات باPH=7.4 با غلظت ۱۰۰ میلی مولار حاوی KIU/mL۱۵۰ آپروتینین به‌عنوان آنتی پروتئاز)، یخچال ۷۰-درجه سانتیگراد (ساخت کشور ایتالیا)، تانک ۷ کیلویی نیتروژن مایع (ساخت کشور آمریکا)، زمان سنج دیجیتالی (Jemis-Japan) با دقت ۰/۰۱ ثانیه جهت ثبت زمان، ترازوی دیجیتالی با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم (ساخت کمپانی Sartarias آلمان)، استخر شنا ویژه جوندگان ساخت ایران، دستگاه خشک کن برای خشک کردن موش‌ها پس از شنا بودند.

۲۴ ساعت پس از پایان مطالعه از موش ها خونگیری، حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۳۰-۵۰ mg/kg) و زایلازین (۳-۵ mg/kg) بی‌هوش و کشته شدند و سپس بافت های پیوند شده مربوط به ناحیه بیضه جهت بررسی بافت شناسی و مطالعات ژنی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور نمونه های بافتی به فرمالین ۱۰٪ و نمونه‌های مربوط به بررسی بیان ژنی به تانک ازت منتقل شدند. ژن‌های مورد مطالعه در مقایسه با ژن GAPDH (گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز)- به‌دلیل بیان پایدار آن در بافت‌های مختلف به طور گسترده استفاده می‌شود، انجام گرفت.

بیان ژن

برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه تحقیق در هر گروه بررسی بافت‌ها از کیت‌های عمومی PCR و فلوسایتومتری و با تکنیک PCR Real Time استفاده شد. کیت‌های عمومی PCR می توانند برای ارزیابی سطوح بیان ژن این تتراسپانین‌ها استفاده شوند. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج، و به cDNA تبدیل شد. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفتند.

محاسبات آماری

در تجزیه و تحلیل استنباطی برای بررسی نرمالیتی از آزمون شاپیروویلک و برای تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. با توجه به عدم احراز شرایط همگنی واریانس‌ها و توزیع طبیعی داده‌ها، از آزمون‌های ناپارامتریک به منظور آزمون فرضیه‌ها استفاده شد. به این منظور برای آزمون فرضیه‌ها نیز از آزمون کروسکال والیس استفاده شد. سطح معنی‌داری برابر با P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد. جهت انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد.

نتایج

بیان ژن CD9 و CD63 با استفاده از تکنیک PCR Real Time در آزمایشگاه اندازه گیری شد که نتایج در جدول ۱ به صورت میانگین و انحراف استاندارد در گروه‌ها گزارش شده است.

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار متغیرها در ۵ گروه مورد مطالعه

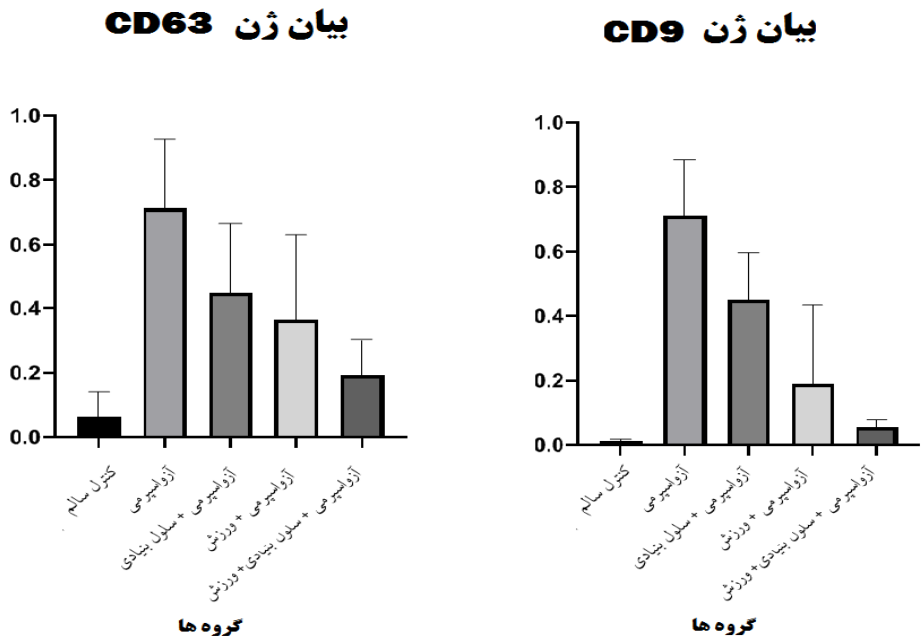
متغیر	گروه کنترل سالم M±SD	گروه کنترل مدل آزواسپرمی M±SD	گروه آزواسپرمی + سلول بنیادی M±SD	گروه آزواسپرمی + تمرین M±SD	گروه آزواسپرمی + سلول بنیادی+ تمرین M±SD
CD9	۰/۰۱۱۶±۰/۰۰۶	۰/۷۱۱۵±۰/۱۷۳	۰/۴۵۱۰±۰/۱۴۵	۰/۱۹۰۷±۰/۲۴۳	۰/۰۵۶۰±۰/۰۲۲
CD63	۰/۰۶۲۴±۰/۰۷۸	۰/۷۱۲۴±۰/۲۱۴	۰/۴۴۷۶±۰/۲۱۸	۰/۳۶۴۵±۰/۲۶۶	۰/۱۹۲۴±۰/۱۱۱

نتایج آزمون شاپیروویلک نشان داد که توزیع داده‌ها در متغیرهای CD9 و CD63 غیرنرمال می‌باشد. از آن جایی که نتایج آزمون شاپیرو ویلک و آزمون لوین به ترتیب دلالت بر توزیع غیرنرمال داده‌ها و عدم تجانس واریانس داشتند، لذا شرایط آزمون تحلیل واریانس یک راهه برقرار نمی‌باشد و از آزمون کروسکال والیس استفاده می‌شود. بنابراین برای آزمون فرضیه ها از این روش استفاده شده است که نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است.

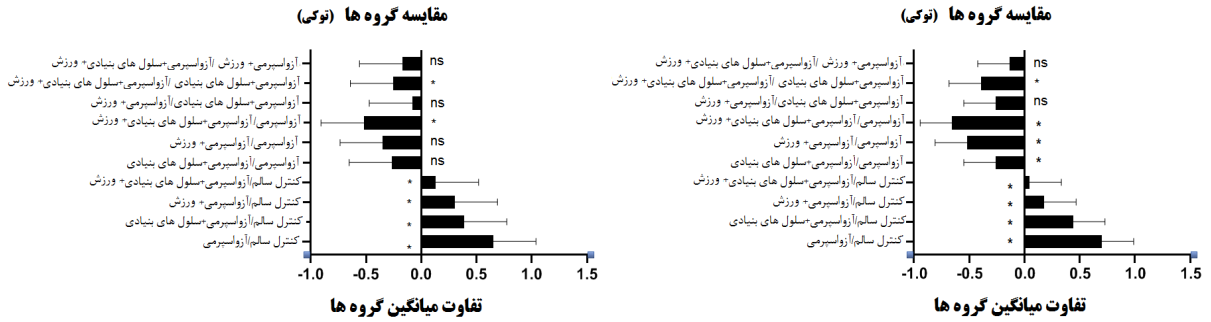
نتایج آزمون کروسکال والیس در مورد بیان ژن CD9 و CD63 نشان‌دهنده آن است که ارزش خی دو و ارزش P محاسبه شده به ترتیب (chi-square=۱۹/۱۸۶ و P=۰/۰۰۲) و (۲۳/۴۷۵=chi-square و P=۰/۰۰۰۱) بوده است. این نتایج حاکی از وجود تفاوت معنی داری بین میزان بیان ژن CD9 و CD63 نمونه ها در گروه های مختلف پژوهش است.

جدول ۲. نتایج آزمون کروسکال والیس در خصوص مقایسه بیان ژن CD9 و CD63 در گروه‌های مختلف پژوهش

متغیر	درجات آزادی df	Chi-Square	P
CD9	۴	۱۹/۱۸۶	۰/۰۰۲*
CD63	۴	۲۳/۴۷۵	۰/۰۰۰۱*



نمودار ۱. مقادیر بیان ژن CD9 و CD63



نمودار ۲. مقایسه گروه‌های پژوهش در در متغیر CD9 و CD63 (*: اختلاف معنی دار و ns غیر معنی‌دار در سطح α≤۰/۰۵)

از آزمون کروسکال والیس به منظور مقایسه متغیرهای وابسته در گروه های تحقیق استفاده شد. نتایج آزمون فرضیه‌های تحقیق نشان داد که در سطح اطمینان ۰/۰۵، در متغیر CD9 نتایج حاکی از آن است که گروه کنترل سالم و گروه آزواسپرمی با تمامی گروه‌ها اختلاف معنی دار دارند. همچنین بین گروه آزواسپرمی + سلول بنیادی+ ورزش با گروه آزواسپرمی + سلول بنیادی اختلاف معنی داری مشاهده شد. در متغیر CD63 نتایج نشان داد گروه کنترل سالم با تمامی گروه ها اختلاف معنی دار دارند. همچنین بین گروه آزواسپرمی+سلول بنیادی+ورزش با گروه آزواسپرمی و گروه آزواسپرمی+سلول بنیادی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (نمودار ۲).

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد القای آزوسپرمی باعث افزایش معنادار میزان بیان ژن CD9 و CD63 شده است. تمرین شنا باعث کاهش معنادار میزان بیان ژن‌ها شد. تزریق سلول‌های بنیادی و تمرین باعث کاهش معنادار میزان بیان ژن CD9 و CD63 در گروه آزوسپرمی+سلول‌های بنیادی و گروه آزواسپرمی+ورزش شد. در هر دو متغیر اختلاف معناداری گروه آزواسپرمی + سلول بنیادی+ ورزش با گروه آزواسپرمی + سلول بنیادی مشاهده شد. با تزریق سلول‌های بنیادی و اجرای ورزش میزان بیان ژن CD9 و CD63 به صورت معناداری کاهش یافت. در گروه آزواسپرمی+سلول‌های بنیادی+ورزش میزان بیان ژن ها از میزان بیان ژن در گروه‌های آزواسپرمی+سلولهای بنیادی و آزواسپرمی+ورزش به صورت غیر معناداری پایین تر بود.

تترااسپنین ها، پروتئین های درون غشایی (دارای دومین های ۴ بار گذر از غشا) هستند که شامل حداقل ۳۳ عضو متمایز از جمله CD81 ,CD82 CD9,CD37, CD53, CD63 و CD151 می‌باشند اعضای این خانواده در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مانند لقاح، چسبندگی سلولی تحرک اسپرم و تهاجم تومور دخیل هستند [۲۶]. امروزه اعتقاد بر این است که تترااسپنین‌ها که با نام جایگاه تترااسپنین‌ها یا میکرودمین‌های غنی از تترااسپنین‌ها (متشکل از مولکول‌های سطح سلولی در تعامل با یکدیگر) شناخته شده اند به عنوان تسهیل کننده ها یا آداپتورهای مولکولی عمل می‌کنند. قابل ذکر است که برخی از تترا اسپنین ها در شروع، ترویج، متاستاز و آنژیوژنز تومور نقش کلیدی دارند. CD9 بر فرآیندهای فیزیکی سلول مانند تکثیر، آپوپتوز و متاستاز تومور تاثیر می‌گذارد. اتصال CD9 موجب ایجاد آپوپتوز می‌شود. بیان CD9 از تغییر شکل فاکتور رشد، از طریق شکسته شدن حفاظت کرده، در نتیجه تکثیر و مهاجرت سلولی را تنظیم می‌کند. بنابراین بیان CD9 سیگنالهای مختلف داخل سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۲۷]. CD63 علاوه بر اینکه نشانگر فعال شدن چندین سلول خونی است [۲۸،۲۹]. عملکردهای پاتولوژیک و فیزیولوژیکی بسیاری نیز دارد [۲۹–۳۱]. CD63 می‌تواند با شرکای تعامل خود مانند اینتگرین‌ها، گیرنده‌ها، کینازها و سایر پروتئین‌های تترااسپینین در سطح سلول ارتباط برقرار کند و از این طریق به تنظیم مسیرهای سیگنالینگ متعدد کمک کند [۲۸،۳۰].

ورزش از طریق طیف وسیعی از مکانیسم‌های سیستمیک (یعنی فراتر از عضلات اسکلتی کار) که معمولاً به مولکول‌های کوچک و هورمون‌های پپتیدی نسبت داده می‌شود، سلامت را بهبود می‌بخشد. اکتشافات اخیر نشان داده است که فراوانی وزیکول‌های خارج سلولی (EVs) در گردش مانند اگزوزوم‌ها با ورزش تغییر می‌کند، اما ارتباط این تغییرات با سازگاری‌های ورزشی سیستمیک مشتق از عضلات اسکلتی چالش‌برانگیز بوده است. یک مانع کلیدی برای پیوند دادن EV های عضله اسکلتی به سازگاری با ورزش، تعیین این است که کدام یک از صدها مولکول که ممکن است توسط EV های عضله اسکلتی منتقل شوند، در زمینه ورزش ارتباط عملکردی دارند. تترا اسپینین‌ها مشخصه پروتئین غشایی EVs هستند. گروه‌های متعدد اخیرا نشان داده‌اند که ورزش فراوانی EV های در گردش حاوی تترا اسپینین‌ها را افزایش می‌دهد، که نشان می‌دهد ورزش ممکن است تحویل تترا اسپینین‌ها را به سلول‌های گیرنده افزایش دهد. یکی دیگر از کشفیات اخیر نشان داده است که تترا اسپینین‌ها از حفظ سلامت متابولیک بافت چربی در طول چاقی پشتیبانی می‌کند، اما مشخص نیست که تترا

اسپینین ها تا چه حد در این پدیده نقش دارند [۳۲].

ورزش یک اثر محافظتی کلی بر بدن انسان دارد و بازسازی بافت را تقویت می‌کند، که شامل بازسازی قلبی [۳۳، ۳۴]، بازسازی عصبی [۳۵] و بازسازی عضلات [۳۶] می‌شود. مطالعات بر روی موش ها همچنین نشان داده است که انواع مختلف ورزش، از جمله شنا، دویدن داوطلبانه با چرخ، و دویدن روی تردمیل، اثرات خاصی بر تکثیر سلولی و بازسازی بافت دارند. متداول‌ترین مدل‌های ورزش جوندگان شامل تمرینات هوازی مانند تمرین شنا (۲ تا ۴ هفته، پروتکل رمپ از جلسات ۱۰ تا ۹۰ دقیقه‌ای دو بار در روز، ۵ تا ۷ روز در هفته)، دویدن روی تردمیل (۲ تا ۶ هفته). یک پروتکل سطح شیب دار از ۱۰ دقیقه در روز تا ۶۰ دقیقه در روز، ۵ تا ۷ روز در هفته، و چرخش داوطلبانه (۴ روز تا ۸ هفته) (۳۷، ۳۸]. تغییرات در انواع و مدت تمرینات مختلف اغلب اثرات محرک متفاوتی دارند. سلول‌های پیش‌ساز یا سلول‌های بنیادی در این سیستم‌های اندام با ورزش فعال می‌شوند تا تکثیر شوند [۳۹، ۴۰]، متمایز شوند [۴۱]، یا پاسخ‌های التهابی را القاء کنند که باعث بازسازی بافت می‌شوند [۴۲]. بیشتر تحقیقات انجام شده تاثیر ورزش بر روی تتراسپینین‌ها را مورد بررسی قرار دادند که با تحقیق حاضر همسو هستند. تحقیقاتی که اثر همزمان تمرین شنا و سلول های بنیادی بر تترا اسپینین ها را مورد بررسی قرار دهند توسط محقق یافت نشد.

در این مطالعه، تمرین شنا ممکن است یک ریزمحیط بیضه سالم‌تری ایجاد کرده باشد که به تنظیم بیان CD9 و CD63 در بیضه کمک می‌کند. این تتراسپانین‌ها به خاطر نقش خود در ارتباط و چسبندگی سلولی شناخته شده اند که برای عملکرد طبیعی سلول های سرتولی و پیشرفت اسپرماتوژنز بسیار مهم هستند. در این مطالعه، القای سلول‌های بنیادی احتمالا بازسازی سلول‌های زایای آسیب‌دیده یا غیرعملکردی را با ادغام در طاقچه بیضه و فعال‌سازی مجدد فرآیند اسپرم‌زایی ترویج می‌کند. افزایش بیان این تتراسپانین‌ها ممکن است نشان دهنده ادغام موفقیت آمیز سلول های بنیادی و افزایش سیگنال دهی سلولی باشد که برای بازیابی اسپرماتوژنز بسیار مهم است. افزایش بیان این تتراسپانین‌ها نشان-دهنده افزایش تعاملات سلولی و بهبود ارتباط بین سلول‌های سرتولی، سلول‌های زاینده و سلول‌های بنیادی است که برای بازسازی اسپرماتوژنز در شرایط آزواسپرمی ضروری هستند.

این واقعیت که فعالیت بدنی یک محرک قوی برای بازسازی بافت و همچنین یک جزء ضروری برای حفظ سلامتی و تندرستی است، نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی بالغ ممکن است مبنایی برای برخی از نتایج مثبت مرتبط با ورزش فراهم کنند. سلول‌های بنیادی خونساز و مزانشیمی دو جمعیت سلول بنیادی بالغ هستند که پتانسیل چند خطی را حفظ می‌کنند و در غلظت‌های کمی در مغز استخوان، خون و بافت‌های متعدد در انسان بالغ توزیع می‌شوند. بدن انسان به عنوان سلول‌های بنیادی تک توان یا سلول‌های پیش ساز ساکن با ظرفیت محدود برای تمایز توصیف شده است. نمونه‌هایی از این سلول‌های بنیادی متعهد شامل سلول‌های اندوتلیال (رگ‌ها)، سلول‌های ماهواره‌ای (عضله اسکلتی)، سلول‌های بنیادی عصبی، سلول‌های بنیادی روده، سلول‌های برآمده (پوست)، سلول‌های زاینده، سلول‌های بیضی (کبد)، پیش سازهای قلبی، و سلول‌های برونشیول آلوئولار هستند (ریه). سلول‌های بنیادی اندوتلیال، ماهواره‌ای و عصبی به کنار، حداقل اطلاعات در مورد پاسخ سلول‌های پیش ساز چند توان و ساکن به ورزش وجود دارد [۴۳-۴۶]. اگرچه این مطالعه بر روی موش های آزمایشگاهی انجام شد و در تعمیم یافته‌ها به انسان‌ها می‌بایست احتیاط کرد، اما پیشنهاد می‌شود برای درمان افراد دارای آزواسپرمی، تمرینات ورزشی شنا و تزریق سلول‌های بنیادی احتمالا می‌تواند به بهبود و کنترل بیماری کمک کند. لذا پیشنهاد می شود افراد دارای آزواسپرمی برای افزایش باروری از این روش‌ها برای بهبود فرآیند اسپرماتوژنز خود به صورت همزمان استفاده کنند. با توجه به این که بسیاری از آثار فعالیت ورزشی وابسته به دوز و مقدار حجم این تمرینات است، پیشنهاد می‌شود در پژوهشی مشابه، از مدت و شدت بالاتری از فعالیت برای مشاهده آثار آن بر فرآیند اسپرماتوژنز در رت‌های مدل آزواسپرمی استفاده شود. همچنین با توجه به تاثیر بعضی از مکمل‌ها مانند زینک بر فرآیند اسپرماتوژنز پیشنهاد می‌شود در پژوهشی مشابه، از مقادیر مصرف مکمل زینک و ورزش استفاده و آثار آن بر فرآیند اسپرماتوژنز بررسی شود. در نهایت پیشنهاد می‌شود تاثیر همزمان مصرف مکمل، تمرین و سلول‌های بنیادی بر عوامل اسپرماتوژنز در رت‌های مدل آزواسپرمی بررسی شود.

نتیجه‌گیری

در مجموع، مطالعه حاضر که با هدف بررسی اثر تمرین شنا و سلول‌های بنیادی بر عوامل اسپرماتوژنز در رت‌های مدل آزواسپرمی انجام شد به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تزریق سلول‌های بنیادی به همراه تمرین می‌تواند باعث بهبود عوامل فرایند اسپروماتوژنز در رت‌های مدل آزواسپرمی‌شود و سطح کیفیت جنسی و باروری را افزایش می‌دهد.

تشکر و قدردانی: این مقاله برگرفته از رساله دانشجویی در مقطع دکتری فیزیولوژی ورزش با کد اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1400.330 در دانشکده تربیت بدنی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال است. پژوهشگران نهایت سپاس و قدردانی خود را از مسئولان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال که با مشارکت خود ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، و تمامی افرادی که در این مطالعه همکاری کردند، اعلام می نمایند.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. He H, Yu F, Shen W, Chen K, Zhang L, Lou S, et al. The Novel Key Genes of Non-obstructive Azoospermia Affect Spermatogenesis: Transcriptomic Analysis Based on RNA-Seq and scRNA-Seq Data. Front Genet. 2021; 12: 251. doi:10.3389/fgene.2021.608629 PMid:33732283 PMCid:PMC7959792
2. Maleki B, Shabani S, Vallian Borojeni S. The role of miRNA in spermatogenesis and male infertility. Lab Diag. 2018; 10(41): 48-55.
3. Kohn TP, Pastuszak AW. Non-obstructive azoospermia and shortened leukocyte telomere length: further evidence linking poor health and infertility. Fertil Steril. 2018; 110(4): 629-30. doi:10.1016/j.fertnstert.2018.06.013PMid:30196950
4. Vij SC, Sabanegh Jr E, Agarwal A. Biological therapy for non-obstructive azoospermia. Expert Opin Biol Ther. 2018; 18(1): 19-23. doi:10.1080/14712598.2018.1380622 PMid:28927307
5. Caroppo E, Colpi GM. Hormonal treatment of men with nonobstructive azoospermia: what does the evidence suggest? J Clin Med. 2021; 10(3): 387. doi:10.3390/jcm10030387 PMid:33498414 PMCid:PMC7864204
6. Oud MS, Ramos L, O'Bryan MK, McLachlan RI, Okutman Ö, Viville S, et al. Validation and application of a novel integrated genetic screening method to a cohort of 1,112 men with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. Human Mutation. 2017; 38(11): 1592-605. doi:10.1002/humu.23312 PMid:28801929
7. Kumanov P. Managing Infertility Due to Endocrine Causes. The Diagnosis and Treatment of Male Infertility: Springer; 2017. 63-78. doi:10.1007/978-3-319-56547-7_5
8. Gordetsky J, van Wijngaarden E, O'Brien J. Redefining abnormal follicle-stimulating hormone in the male infertility population. BJU Int. 2012; 110(4): 568-72. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10783.x PMid:22177092
9. Ring J, Welliver C, Parenteau M, Markwell S, Brannigan RE, Köhler TS. The utility of sex hormone-binding globulin in hypogonadism and infertile males. J Urol. 2017; 197(5): 1326-31. doi:10.1016/j.juro.2017.01.018 PMid:28087298
10. Yu S, Zhao Y, Zhang FL, Li YQ, Shen W, Sun Z-Y. Chestnut polysaccharides benefit spermato-genesis through improvement in the expression of important genes. Aging (Albany NY). 2020; 12(12): 11431. doi:10.18632/aging.103205 PMid:32568099 PMCid:PMC7343452
11. Mobarak H, Heidarpour M, Rahbarghazi R, Nouri M, Mahdipour M. Amniotic fluid-derived exosomes improved spermatogenesis in a rat model of azoospermia. Life Sci. 2021; 274: 119336. doi:10.1016/j.lfs.2021.119336 PMid:33716061
12. Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins at a glance. J Cell Sci. 2014:127(Pt 17): 3641-8. doi:10.1242/jcs.154906 PMid:25128561
13. Florin L, de Winde, CM. Recent advancements in the understanding of tetraspanin functions. Med Microbiol Immunol 2020; 209(4): 393-5. doi:10.1007/s00430-020-00687-x PMid:32705340 PMCid:PMC7376529
14. Barranco I, Padilla L, Parrilla I, Álvarez-Barrientos A, Pérez-Patiño C, Peña FJ, et al. Extra-cellular vesicles isolated from porcine seminal plasma exhibit different tetraspanin expression pro-files. Sci Reports. 2019; 9(1): 1-9. doi:10.1038/s41598-019-48095-3 PMid:31399634 PMCid:PMC6689046
15. Fan Y, Pionneau C, Cocozza F, Boëlle PY, Chardonnet S, Charrin S, et al. Differential proteomics argues against a general role for CD9, CD81 or CD63 in the sorting of proteins into extracellular vesicles. J Extracell Vesicles. 2023; 12(8): 12352. doi:10.1002/jev2.12352 PMid:37525398 PMCid:PMC10390663
16. Tognoli ML, Dancourt J, Bonsergent E, Palmulli R, de Jong OG, Van Niel G, Rubinstein E, Vader P, Lavieu G. Lack of involvement of CD63 and CD9 tetraspanins in the extracellular vesicle content delivery process. Communications Biol. 2023; 6(1): 532. doi:10.1038/s42003-023-04911-1 PMid:37198427 PMCid:PMC10192366
17. Rimmer MP, Gregory CD, Mitchell RT. The transformative impact of extracellular vesicles on developing sperm. Reprod Fertil. 2021; 2(3): R51-R66. doi: 10.1530/RAF-20-0076. PMID: 35118397; PMCID: PMC8788574. doi:10.1530/RAF-20-0076 PMid:35118397 PMCid:PMC8788574
18. Nikbin S, Derakhshideh A, Karimi Jafari S, Mirzahamedani A, Moslehi A, Ourzamani S, et al. Investigating the protective effect of aerobic exercise on oxidative stress and histological damages of testicular tissue associated with chlorpyrifos in male rats. Andrologia. 2020; 52(2): e13468. doi:10.1111/and.13468 PMid:31773799
19. Khosravi Sadr M, Nasiri E, Khalili M. The effect of resistance training on testicular function and spermatogenesis process and sperm parameters of adult male Wistar rats. Daneshvar Medi-cine: Basic Clin Res J. 2021; 28(5): 11-22.
20. Li Y, Zhang L, Zheng X, Qian J, Li Y, Xie C, et al. Dietary restriction and/or exercise training impairs spermatogenesis in normal rats. Applied Physiology, Nutr Metab. 2021;46(3):229-37. doi:10.1139/apnm-2020-0477 PMid:32905708
21. Thompson M, Mei SH, Wolfe D, Champagne J, Fergusson D, Stewart DJ, et al. Cell therapy with intravascular administration of mesenchymal stromal cells continues to appear safe: an updated systematic review and meta-analysis. EClinicalMedicine. 2020; 19: 100249. doi:10.1016/j.eclinm.2019.100249 PMid:31989101 PMCid:PMC6970160
22. Kim HJ, Park JS. Usage of human mesenchymal stem cells in cell-based therapy: advantages and disadvantages. Dev Reprod. 2017; 21(1): 1. doi:10.12717/DR.2017.21.1.001 PMid:28484739 PMCid:PMC5409204
23. Zhankina R, Baghban N, Askarov M, Saipiyeva D, Ibragimov A, Kadirova B, et al. Mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes for restoration of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia: a systemic review. Stem Cell Res Ther. 2021; 12(1): 1-12. doi:10.1186/s13287-021-02295-9 PMid:33823925 PMCid:PMC8025392
24. 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. Horizon Med Sci. 2020; 26(4):332-47. doi:10.32598/hms.26.4.450.2
25. Asadi M, farzanegi P, Azarbayjani M A. The effect of swimming training, cell and laser on the expression of

genes involved in autophagy (LC3 and Beclin-1) in azoospermia mice. RJMS 2023; 30 (7). doi:10.47176/rjms.30.166
26. Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. 2001; 58:1189-205. doi:10.1007/PL00000933 PMid:11577978 PMCid:PMC11337403
27. Huang CL LD, Masuya D, Kameyama K, Nakashima T, Yokomise H UM, Miyake M. MRP- 1/CD9 gene transduction downregulates Wnt signal pathways. Oncogene. 2004: 83/7475-23. doi:10.1038/sj.onc.1208063 PMid:15334057
28. Kraft S, Jouvin MH, Kulkarni N, Kissing S, Morgan ES, Dvorak AM, et al. The tetraspanin CD63 is required for efficient IgE-mediated mast cell degranulation and anaphylaxis. J Immunol. 2013; 191: 2871-8. doi:10.4049/jimmunol.1202323 PMid:23945142 PMCid:PMC3780990
29. Israels SJ, McMillan-Ward EM. Palmitoylation supports the association of tetraspanin CD63 with CD9 and integrin alphaIIbbeta3 in activated platelets. Thromb Res. 2010; 125: 152-8 doi:10.1016/j.thromres.2009.07.005 PMid:19640571
30. Chen X, Deng H, Churchill MJ, Luchsinger LL, Du X, Chu TH, et al. Bone marrow myeloid cells regulate myeloid-biased hematopoietic stem cells via a histamine-dependent feedback loop. Cell Stem Cell. 2017; 21: 747-60 e747. doi:10.1016/j.stem.2017.11.003 PMid:29198940 PMCid:PMC5975960
31. Kobuch J, Cui H, Grunwald B, Saftig P, Knolle PA, Kruger A. TIMP-1 signaling via CD63 triggers granulopoiesis and neutrophilia in mice. Haematologica. 2015;100:1005-13. doi:10.3324/haematol.2014.121590 PMid:26001794 PMCid:PMC5004415
32. Easterday DS, Lark DS. Circulating Tetraspanins: From Markers to Mechanisms Driving Systemic Exercise Adaptation. Function (Oxf). 2023; 4(6): zqad048. doi:10.1093/function/zqad048 PMid:37753183 PMCid:PMC10519272
33. Qiu Y, Pan X, Chen Y, Xiao J. Hallmarks of exercised heart. J Mol Cell Cardiol. 2021; 164: 126-35. doi:10.1016/j.yjmcc.2021.12.004 PMid:34914934
34. Fiuza-Luces C, Santos-Lozano A, Joyner M, Carrera-Bastos P, Picazo O, Zugaza JL, et al. Exercie benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors. Nat Rev Cardiol. 2018; 15: 731-43. doi:10.1038/s41569-018-0065-1 PMid:30115967
35. Adusumilli VS, Walker TL, Overall RW, Klatt GM, Zeidan SA, Zocher S, et al. ROS dynamics delineate functional states of hippocampal neural stem cells and link to their activity-dependent exit from quiescence. Cell Stem Cell. 2021; 28: 300-14 e306. doi:10.1016/j.stem.2020.10.019 PMid:33275875 PMCid:PMC7875116
36. Brett JO, Arjona M, Ikeda M, Quarta M, de Morrée A, Egner IM, et al. Exercise rejuvenates quiescent skeletal muscle stem cells in old mice through restoration of Cyclin D1. Nat Metab. 2020; 2: 307-17. doi:10.1038/s42255-020-0190-0 PMid:32601609 PMCid:PMC7323974
37. Bernardo BC, Ooi JYY, Weeks KL, Patterson NL, McMullen JR. Understanding key mechanisms of exercise-induced cardiac protection to mitigate disease: current knowledge and emerging concepts. Physiol Rev. 2018; 98: 419-75. doi:10.1152/physrev.00043.2016 PMid:29351515
38. Bei Y, Wang L, Ding R, Che L, Fan Z, Gao W, et al. Animal exercise studies in cardiovascular research: current knowledge and optimal design-A position paper of the Committee on Cardiac Rehabilitation, Chinese Medical Doctors' Association. J Sport Health Sci. 2021;10:660-674. doi:10.1016/j.jshs.2021.08.002 PMid:34454088 PMCid:PMC8724626
39. Chen Z, Li L, Wu W, Liu Z, Huang Y, Yang L, et al. Exercise protects proliferative muscle satellite cells against exhaustion via the Igfbp7-Akt-mTOR axis. Theranostics. 2020; 10: 6448-66. doi:10.7150/thno.43577 PMid:32483463 PMCid:PMC7255041
40. Abreu P, Kowaltowski AJ. Satellite cell self-renewal in endurance exercise is mediated by inhibition of mitochondrial oxygen consumption. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2020; 11: 1661-76. doi:10.1002/jcsm.12601 PMid:32748470 PMCid:PMC7749620
41. Leiter O, Seidemann S, Overall RW, Ramasz B, Rund N, Schallenberg S, et al. Exercise-induced activated platelets increase adult hippocampal precursor proliferation and promote neuronal differentiation. Stem Cell Rep. 2019; 12: 667-79. doi:10.1016/j.stemcr.2019.02.009 PMid:30905740 PMCid:PMC6450435
42. Saito Y, Chikenji TS, Matsumura T, Nakano M, Fujimiya M. Exercise enhances skeletal muscle regeneration by promoting senescence in fibro-adipogenic progenitors. Nat Commun. 2020; 11: 889. doi:10.1038/s41467-020-14734-x PMid:32060352 PMCid:PMC7021787
43. Seib DR, Martin-Villalba A. Neurogenesis in the normal ageing hippocampus: a mini-review. Gerontology. 2015; 61: 327-35. doi:10.1159/000368575 PMid:25471300
44. Kretzschmar K, Watt FM. Markers of epidermal stem cell subpopulations in adult mammalian skin. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;4:10. doi:10.1101/cshperspect.a013631 PMid:24993676 PMCid:PMC4200210
45. Shin S, Kaestner KH. The origin, biology, and therapeutic potential of facultative adult hepatic progenitor cells. Curr Top Dev Biol. 2014; 107: 269-92. doi:10.1016/B978-0-12-416022-4.00010-X PMid:24439810 PMCid:PMC4708083
46. Leri A, Rota M, Hosoda T, Goichberg P, Anversa P. Cardiac stem cell niches. Stem Cell Res. 2014; 13: 631-46. doi:10.1016/j.scr.2014.09.001 PMid:25267073 PMCid:PMC4253904

How to Cite this Article: Shojaee M, Moradi L, Farzanei P, Abedi B. The combined effects of swimming exercise and stem cell transplantation on the expression of CD9 and CD63 tetraspanin genes in a rat model of azoospermia. Feyz Med Sci J 2024; 28 (5) :471-480.
Doi: 10.48307/FMSJ.2024.28.5.471