The effect of swimming training and stem cells on the expression of DAZL and VASA genes in azoospermia model rats

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

1. Department of Physical Education and Sports Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Corresponding author e-mail: moradi.lida@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Spermatogenesis is a process that occurs with the proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. These cells are located on the basement membrane of seminiferous tubules and Sertoli cells surround them. This complex provides an environment that causes spermatogenesis to function and survive. The purpose of this research was to investigate the effect of swimming training and stem cells on the expression of DAZL and VASA genes in azoospermia model rats.

Materials and Methods: The research method is experimental in terms of controlling variables and practical in terms of purpose. Twenty-five 8-week-old rats were selected and after the induction of the azoospermia model, which histological studies showed the clear degeneration of spermatogenic cells, which leads to the formation of thin-walled seminiferous epithelium in most of the seminiferous tubules, which indicates a severe disorder in sperm production, and after confirmation Azoospermia model randomly divided into 5 groups; Healthy, azoospermic, azoospermic+exercise, azoospermic+stem cell group and azoospermic+stem cell+exercise group were divided. One month after the creation of the model, one million stem cells were transplanted once in the vas deferens of each mouse. Swimming training was done daily for 30 minutes a day and 5 days a week for 8 weeks. Genes were measured by Real time-PCR method. Kruskal-Wallis test was used to analyze the data. All calculations were done using SPSS/23 statistical software and at a significant level of $P \leq 0.05$.

Results: The results showed that there is a difference between the effect of swimming exercises and stem cells on the expression of DAZL (F=22.879 and P=0.0001) and VASA (F=23.359 and P=0.0001) genes in rats. There is a significant difference in the azoospermia model. The results showed that there are significant differences in both variables of the healthy control group and the azoospermic group with all groups, and between the groups of azoospermia+stem cells with azoospermia+exercise and azoospermia+stem cells+exercise as well as the group of azoospermia+exercise with azoospermia+ Stem cells + exercise no significant difference was observed.

Conclusion: In general, the results of the present research indicate that regular aerobic exercise such as swimming along with stem cell injection helps in controlling the effects of infertility diseases by increasing the expression of DAZL and VASA genes in improving the process of spermatogenesis.

Keywords: Azoospermia, stem cells, swimming training, DAZL, VASA

Received: Oct 01, 2024 **Revised:** Nov 12, 2024 **Accepted:** Nov 20, 2024

How to cite this article: Akbarnia F, Frzaneh Hesari A, Hashemvarzi A , Farsavian AA. The effect of swimming training and stem cells on the expression of DAZL and VASA genes in azoospermia model rats. Daneshvar Medicine 2024; 32(5):23-33. doi: 10.22070/DANESHMED.2024.19662.1550

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

اثر تمرین شنا و سلول های بنیادی بر بیان ژن های DAZL و VASA در موش های سفید بزرگ آزمایشگاهی مدل آزواسپرمی

مازیار شجاعی[1]، لیدا مرادی[1]*، پروین فرزانگی[2]، بهرام عابدی[1]

۱. گروه تربیت بدنی وعلوم ورزشی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی ورزشی،واحد ساری،دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

*نویسنده مسئول: لیدا مرادی **Email: moradi.lida@gmail.com**

چکیده

مقدمه و هدف: اسپرماتوژنز فرآیندی است که با تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی صورت می پذیرد. این سلولها روی غشای پایه لوله های منی ساز واقع شده اند و سلولهای سرتولی آنها را احاطه کرده اند. این مجموعه محیطی را فراهم می آورد که باعث عملکرد و بقای اسپرماتوژنز میشود. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر تمرین شنا و سلول های بنیادی بر بیان ژن های DAZL و VASA در موش های سفید بزرگ آزمایشگاهی مدل آزواسپرمی بود.

مواد و روش ها: روش تحقیق از نظر کنترل متغیرهای تحقیق تجربی و از نظر هدف کاربردی است. ۲۵ سر رت ۸ هفته ای و پس از القاء مدل آزواسپرمی که با بررسی‌های بافت‌شناسی انحطاط مشخص سلول‌های اسپرم‌ساز را نشان داد که منجر به ایجاد اپیتلیوم منی‌ساز با دیواره نازک در اکثر لوله های منی‌ساز می‌شود که نشان‌دهنده اختلال شدید در تولید اسپرم است و پس از تایید مدل آزواسپرمی به صورت تصادفی به ۵ گروه؛ سالم، آزواسپرمی، آزواسپرمی+ورزش، گروه آزواسپرمی+سلول بنیادی و گروه آزواسپرمی+سلول بنیادی+ورزش تقسیم شدند. یک ماه بعد از ایجاد مدل, یک میلیون سلول بنیادی, یک بار به صورت پیوند 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. ژن ها با روش Real time-PCR اندازه گیری شد. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون کروسکال والیس استفاده گردید. کلیه محاسبات با استفاده از نرم افزار آماری SPSS/23 و در سطح معنی دار $P\leq ۰/۰۵$ انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد بین اثر تمرینات شنا و سلول های بنیادی بر بیان ژن DAZL (F=۲۲/۸۷۹ و P=۰/۰۰۰۱) و VASA (F=۲۳/۳۵۹ و P=۰/۰۰۰۱) در موش های سفید بزرگ آزمایشگاهی مدل آزواسپرمی تفاوت معناداری وجود دارد. همچنین نتایج نشان داد در هر دو متغیر گروه کنترل سالم و گروه آزواسپرمی با تمامی گروه ها اختلاف معنی دار دارندو بین گروه های آزواسپرمی+سلول های بنیادی با آزواسپرمی+تمرین و آزواسپرمی+سلول های بنیادی+تمرین و همچنین گروه آزواسپرمی+تمرین با آزواسپرمی+سلول های بنیادی+تمرین تفاوت معناداری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که فعالیت ورزشی منظم هوازی مانند شنا به همراه تزریق سلول های بنیادی در مهار آثار ناشی از بیماری های ناباروری از طریق افزایش بیان ژن DAZL و VASAدر بهبود فرایند اسپرماتوژنز کمک شایانی می کند.

واژه های کلیدی: آزواسپرمی، سلول های بنیادی، تمرین شنا، DAZL، VASA

وصول مقاله: ۱۴۰۳/۰۷/۱۰
اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۳/۰۸/۲۲
پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۳۰

مقدمه

حدود ۱۵-۱۰٪ افراد در سنین باروری در جهان نابارور[1] هستند که حدود ۵۰٪ از این ناباروری ها متعلق به مردان است. ناباروری مردان با اختلال عملکرد جنسی[2]، واریکوسل[3]، عفونت سیستم تولید مثل[4]، اختلالات غدد درون ریز، آزواسپرمی انسدادی[5] (OA) ، آزواسپرمی غیر انسدادی[6] (NOA) و غیره ارتباط نزدیکی دارد. میزان بروز NOA در مردان حدود ۱٪ است که ۱۵-۱۰٪ مردان نابارور را تشکیل می دهد و این یکی از مهمترین دلایل ناباروری مردان است (۱). فرایند اسپرماتوژنز در پستانداران سه مرحله شامل میتوز، میوز و اسپرمیوژنز می باشد. اختلال در هر یک از مراحل می تواند باعث ناباروری در مردان گردد. به طور کلی ناباروری به عنوان عدم توانایی در بچه دار شدن پس از حداقل یک سال پس از ازدواج بدون استفاده از وسایل پیشگیری از بارداری تعریف می شود (۲). آزواسپرمی غیر انسدادی نوعی ناباروری در مردان است که در اثر اختلال عملکرد اسپرماتوژنیک در بافت بیضه ایجاد می شود. بیماران مبتلا به NOA نمی‌توانند اسپرم تولید کنند یا فقط می توانند مقدار بسیار کمی اسپرم تولید کنند. در بیماران مبتلا به NOA ، ساختار توبول های اسپرم ساز[7] در بیضه بی نظم است، در حالی که بلوغ سلول های اسپرماتوژن مسدود شده و میوز سلول های اسپرماتوژن متوقف می شود (۳). در سالهای اخیر، برخی مطالعات (٤) نشان داده اند 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 می شوند، می توانند با تشخیص و درمان تزریق اسپرم داخل سیتوپلاسمی[8] (ICSI) درمان شوند (۱). در اکثر قریب به اتفاق موارد، آزواسپرمی با تعدادی از اختلالات برگشت ناپذیر بیضه ها همراه است که منجر به مهار اسپرماتوژنز می شود. این اختلالات اغلب با بیماری های غدد درون ریز، ژنتیکی و التهابی مرتبط هستند (۵). علاوه بر این، NOA می تواند ایدیوپاتیک باشد (٦). لمس و اندازه گیری، معمولاً بیضه های کوچک و شل آزواسپرمی غیر انسدادی را نشان می دهد. در تمام بیماران مبتلا به آزواسپرمی، سطح هورمون تحریک کننده فولیکول[9] (FSH)، هورمون لوتئینی[10] (LH)، پرولاکتین، تستوسترون تام، استرادیول و inhibin B باید اندازه گیری شود (۷). در اکثر بیماران با NOA، FSH افزایش یافته است (بیشتر از ۷/٦ 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 می شود و در اکثر بیماران مبتلا به NOA رخ می دهد، که معمولاً نشان دهنده کمبود سلول های لیدیگ می باشد (۹).

اسپرماتوژنز در لوله های اسپرم ساز بیضه صورت می گیرد. این روند شامل تکثیر اسپرماتوسیت ها، تمایز اسپرماتوگونی به اسپرماتوسیت ها، تولید اسپرماتید و بلوغ اسپرم است. عوامل زیادی در تنظیم اسپرماتوژنز از جمله ژن ها، هورمون ها و تنظیم کننده های اپی ژنتیک دخیل هستند (۱۰). مهمترین ژنها شامل VASA، DAZL و DMC1 هستند. VASA یک نشانگر سلول زایا[11] است که برای تکثیر و تمایز سلول های زایا مهم است و جهش VASA منجر به توقف تمایز سلول های زایا می شود

[1] Infertility
[2] Sexual Dysfunction
[3] Varicocele
[4] Reproductive System Infection
[5] Obstructive Azoospermia
[6] Non-Obstructive Azoospermia
[7] Seminiferous Tubules
[8] Intracytoplasmic Sperm Injection
[9] Follicle Stimulating Hormone
[10] Luteinizing Hormone
[11] Germ Cell Marker

(۱۱) DAZL به عنوان یک دروازه در اوژنز[1] و اسپرماتوژنز عمل می کند، و بیان غیر طبیعی DAZL در شروع گامتوژنز تأثیر می گذارد (۱۲). مبارک و همکارانش عنوان کردند که القای آزواسپرمی موجب کاهش DAZL و VASA می‌شود (۱۳). 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 (۱۴،۱۳). 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، آسیب های بافت بیضه، و فرآیند اسپرماتوژنز در حیوانات آزمایشگاهی، فعالیت ورزشی می باشد 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 (۱۶،۱۵) ولی برخی نتایج اثر منفی تمرینات ورزشی بر عملکرد اسپرماتوژنز گزارش کرده اند (۱۷). لی و همکاران نیز در تحقیق شان گزارش کردند که محدودیت رژیم غذایی و تمرینات ورزشی می تواند موجب اختلال در تولیدمثل مردان با ایجاد اختلال در الگوهای بیان ژن طبیعی در بیضه شود (۱۸) و این نشان دهنده اهمیت بررسی اثر تمرینات ورزشی بر مسیرهای ملکلولی موثر بر اسپرماتوژنز برای مشخص شدن مکانیسم های مسئول در خصوص اثر تمرین ورزشی بر اسپرماتوژنز می باشد.

در دهه اخیر، زمینه ظهور سلول های بنیادی درمانی به سرعت به دوره جدیدی از پزشکی احیا تبدیل شده است. پتانسیل متنوع سلول های 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 بیماری ها است که همیشه برای پزشکان یک چالش بوده است (۱۹).

سلول‌های بنیادی سلول هایی هستند که در طول زندگی یک موجود زنده خودپایدار هستند و قادر به تمایز به سلول های مختلف هستند. انواع مختلفی از سلول های بنیادی در بافت های انسان وجود دارد. در میان آنها، سلول های بنیادی استرومایی مزانشیمی[2] (MSC) مشتق شده از بافت های مختلف از جمله مغز استخوان و بافت چربی، از نظر کاربرد در سلول درمانی، امیدوار کننده ترین ماده در نظر گرفته شده اند. MSC ها به دلیل پتانسیل تمایز چند خطی[3]، ایمنی زایی کم و مشارکت فعال در ترمیم بافت و بازسازی پس از مهاجرت به مکان های آسیب دیده، در بین دانشمندان و پزشکان محبوب هستند. به طور کلی، سلول های بنیادی مزانشیمی نسبت به سایر سلول های بنیادی برای استفاده بالینی در درمان های 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 (۲۰). ژانکینا و همکاران (۲۰۲۱) عنوان کردند که استفاده سلولهای بنیادی نقش موثری در بهبود توبولهای اسپرم ساز دارند و اگزوزوم های ترشح شده توسط سلولهای بنیادی مزانشیمی قادر به ایجاد فرآیند اسپرماتوژنز در بیضه مدلهای حیوانی نابارور هستند ولی علی رغم پیشرفت های بیشمار در زمینه درمان بیماریهای تولید مثل در مردان و زنان با کمک سلولهای بنیادی مزانشیمی یا اگزوزوم های آنها، هیچ آزمایش بالینی در مورد درمان NOA خاتمه نیافته است (۲۱) که نشان دهنده نیاز به تحقیقات بیشتر در این خصوص می باشد.

با توجه به مطالب گفته شده هدف تحقیق حاضر مقایسه اثر تمرینات شنا و سلول های بنیادی بر بیان ژن های DAZL و VASA در رت های مدل آزواسپرمی می باشد.

[1] Oogenesis

[2] Mesenchymal Stromal/Stem Cells
[3] Multilineal Differentiation

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع بنیادی و تجربی می باشد. 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 آزمودنی های انسان مقدور نبوده است لذا از آزمودنی های حیوان (رت های ویستار نر) استفاده شد. در ابتدا به کسب مجوز های لازم اقدام شد و سپس مطابق با دستورالعمل انجمن ایرانیان حمایت از حیوانات آزمایشگاهی در قفس های به صورت جداگانه نگهداری شدند. جامعه آماری جامعه تحقیق حاضر را رت های نر ویستار تشکیل می دادند که از بین جامعه آماری (موش‌های انستیتو پاستور ایران) ۲۵ سر موش نر با محدوده سن ٦ 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، آزواسپرمی، آزواسپرمی+تمرین، آزواسپرمی+سلول بنیادی و آزواسپرمی+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. موش ها در آزمایشگاه حیوانات در شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ٦ عصر و شروع خاموشی ٦ صبح) دما (۳±۲۲ سانتی گراد)، و رطوبت (حدود ٤٥ درصد) نگهداری شدند. موش ها در قفس هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ٤۳ 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، رت های نر بالغ ٦ تا ۸ هفته ای با میانگین وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. سپس داروی بوسولفان با دوز ٤۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن رت ها به صورت داخل صفاقی برای هر رت تزریق شد (۲۲).

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 به صورت 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 ی تمرینی

در طی یک هفته آشنایی آزمودنی ها ۵ جلسه تمرین کردند که هر بار به مدت ۲۰ دقیقه به منظور آشنایی ها با آب و کاهش استرس شنا و سازگاری با شرایط تمرینی به تمرین پرداختند. آزمودنی ها پس از هر بار تمرین شنا پس از خشک کردن کامل با استفاده از حوله و خشک کن مخصوص به داخل قفس ها بازگردانده شدتد. 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) می باشد که به بیان ژن PLZF و TNP در موش های آزواسپرمی انجام شده است و با توجه به این که این ژنها در ارتباط با مسیر اسپروماتوژنز می باشند، در تحقیق حاضر نیز از این پروتکل تمرین استفاده شد (۲۲).

سلول های بنیادی

یک ماه پس از القای آزواسپرمی در موش ها یک بار سلول‌های بنیادی (یک میلیون سلول) به صورت پیوند در ناحیه مجرای دفران هر موش پیوند زده می شود. در تحقیق حاضر نحوه استفاده و دوز استفاده از سلول های بنیادی برگرفته از تحقیق اسدی و همکاران (۲۰۲۰) می‌باشد که در تحقیقی مشابه به بررسی اثر توام تمرین شنا و سلول‌های بنیادی بر اسپرماتوژنز رت های مدل آزواسپرمی انجام داده بودند (۲۳).

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(1 cc) ، دماسنج جیوه ای، سانتریفوژ (سرعت g ۸۰۰۰)، وسایل تشریح (پنس، قیچی جراحی، تیغ و دسته اسکالپر مخصوص جراحی استریل)، وسایل ازمایشگاهی شامل لوله آزمایش، میکرو تیوب، شیشه ساعت، PH متر، الایزا ریدر، هاون چینی برای پودر کردن بافت ها، 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 با PH=7.4 با غلظت ۱۰۰ میلی مولار حاوی KIU/Ml۱۵۰ آپروتینین به عنوان 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 موش ها پس از شنا بودند.

روش بررسی ژن های مورد بررسی تحقیق

۲۴ ساعت پس از پایان مطالعه از موش ها خونگیری و پس از قربانی کردن 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 نمونه های مربوط به بررسی بیان ژنی به تانک ازت منتقل شدند.

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

تجزیه و تحلیل آماری

در تجزیه و تحلیل استنباطی برای بررسی نرمالیتی از آزمون شاپیروویلک و برای تجانس واریانس ها از آزمون لوین استفاده شد. با توجه به عدم احراز شرایط همگنی واریانس ها و توزیع طبیعی داده ها، از آزمون های ناپارامتریک به منظور آزمون فرضیه ها استفاده شد. به این منظور برای آزمون فرضیه ها نیز از آزمون کروسکال والیس استفاده شد. سطح معنی داری برابر با $P\leq0.05$ در نظر گرفته شد. جهت انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد.

نتایج

در مطالعه حاضر، بیان ژن ،VASA، DAZL با استفاده از تکنیک Real time PCR در آزمایشگاه اندازه گیری شد که نتایج در جدول ۱ به صورت میانگین و انحراف استاندارد در گروه ها گزارش شده است (جدول ۱).

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

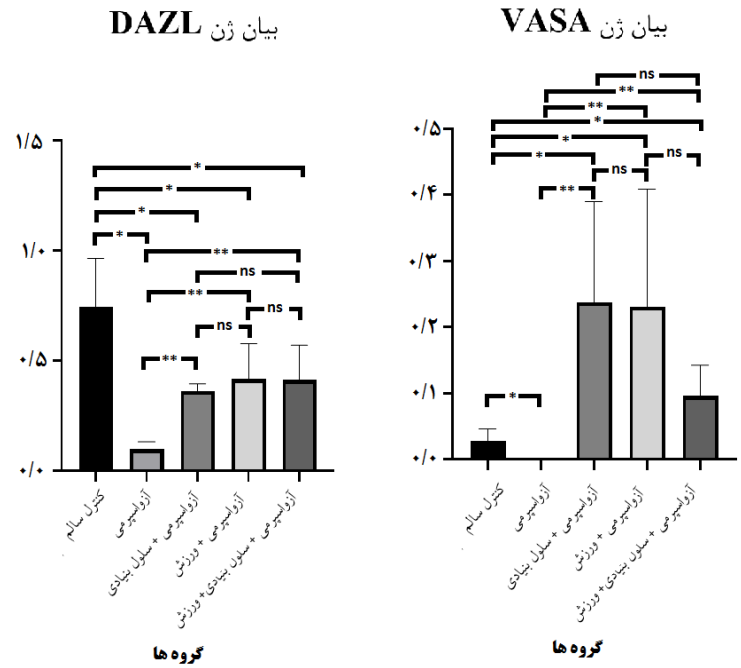
متغیر	گروه کنترل سالم M±SD	گروه کنترل مدل آزواسپرمی M±SD	گروه آزواسپرمی+سلول بنیادی M±SD	گروه آزواسپرمی+ تمرین M±SD	گروه آزواسپرمی+ سلول بنیادی+ تمرین M±SD
DAZL	۰/۰±۷٤٤۳/۲۱۹	۰/۰±۰۹۷۲/۰۳٤	۰/۰±۳٦۱٦/۰۳۲	۰/۰±٤۱٦۸/۱٦۰	۰/۰±٤۱۳۰/۱۵۷
VASA	۰/۰±۰۲۷۱/۰۱۸	۰/۰±۰۰۰۱٦/۰۰۰۰٤	۰/۰±۲۳۷۳/۱۵۲	۰/۰±۲۳۰۹/۱۷۷	۰/۰±۰۹۵۸/۰٤٦

نتایج آزمون شاپیروویلک نشان داد که توزیع داده ها در متغیرهای **DAZL** و **VASA** غیرنرمال می باشد. از آن جایی که نتایج آزمون شاپیرو ویلک و آزمون لوین به ترتیب دلالت بر توزیع غیرنرمال داده ها و عدم تجانس واریانس داشتند، لذا شرایط آزمون تحلیل واریانس یک راهه برقرار نمی باشد و از آزمون کروسکال والیس استفاده می شود. بنابراین برای ازمون فرضیه ها از این روش استفاده شده است که نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. نتایج آزمون کروسکال والیس در خصوص مقایسه بیان ژن **DAZL** و **VASA**در گروه‌های مختلف پژوهش

متغیر	درجات آزادی **df**	**Chi-Square**	ارزش **p**
DAZL	۴	۲۲/۸۷۹	٭۰/۰۰۰۱
VASA	۴	۲۳/۳۵۹	٭۰/۰۰۰۱

نتایج آزمون کروسکال والیس در مورد بیان ژن **DAZL** و **VASA** نشان‌دهنده آن است که ارزش خی دو محاسبه شده به ترتیب (۲۲/۸۷۹) و (۲۳/۳۵۹) معنی داری هر دو در سطح **p=**۰/۰۰۰۱ بوده است. این نتایج حاکی از وجود تفاوت معنی داری بین میزان بیان ژن **DAZL** و **VASA** نمونه ها در گروه های مختلف پژوهش است. از آزمون کروسکال والیس به منظور مقایسه متغیرهای وابسته در گروه های تحقیق استفاده شد. نتایج آزمون تعقیبی بن‌فرونی نشان داد که در سطح اطمینان ۰/۰۵، در هر دو متغیر **DAZL** و **VASA** گروه کنترل سالم و گروه آزواسپرمی با تمامی گروه ها اختلاف معنی‌دار دارندو بین گروه های آزواسپرمی+سلول های بنیادی با آزواسپرمی+تمرین و آزواسپرمی+سلول های بنیادی+تمرین و همچنین گروه آزواسپرمی+تمرین با آزواسپرمی+سلول های بنیادی+تمرین تفاوت معناداری مشاهده نشد (نمودار ۱).



نمودار۱. مقادیر بیان ژن **DAZL** و **VASA** و مقایسه گروه های پژوهش در در متغیر DAZL و VASA(٭ و ٭٭: **اختلاف معنی دار** و ns **غیر معنی دار در سطح** ۰/۰۵≥**α**)

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد القای آزوسپرمی باعث کاهش معنادار میزان بیان ژن DAZL در موش های سفید بزرگ آزمایشگاهی شد. تزریق سلول‌های بنیادی و ورزش باعث افزایش معنادار میزان بیان ژن DAZL در گروه آزوسپرمی+سلول‌های بنیادی و گروه آزواسپرمی+ورزش شد. اختلاف معناداری بین گروه آزوسپرمی+سلول بنیادی+ورزش با گروه های آزواسپرمی+ورزش و آزواسپرمی+سلول‌های بنیادی مشاهده نشد. نتایج دیگر مطالعه حاضر نشان داد القای آزواسپرمی باعث کاهش میزان بیان ژن VASA شد. با تزریق سلول‌های بنیادی و اجرای ورزش میزان بیان ژن VASA به صورت معناداری افزایش یافت. در گروه آزواسپرمی+سلول‌های بنیادی+ورزش میزان بیان ژن VASA از میزان بیان ژن در گروه‌های آزواسپرمی+سلولهای بنیادی و آزواسپرمی+ورزش به صورت غیر معناداری پایین تر بود.

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 سلول های بنیادی بالغ ممکن است مبنایی برای برخی از نتایج مثبت مرتبط با ورزش فراهم کنند. تمرین شنا برای اثرات بالقوه آن بر سلامت باروری مورد بررسی قرار گرفته است. اسدی و همکاران (۱٤۰۲) و شاپوری و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که شنا می‌تواند بر بیان ژن مرتبط با اسپرم‌زایی تأثیر مثبت بگذارد. به طور خاص، مشخص شد که تمرین شنا منجر به افزایش بیان ژن‌های مرتبط با رشد سلول‌های زاینده در مدل‌های موش آزواسپرمی می‌شود. این نشان می دهد که فعالیت بدنی ممکن است ظرفیت بازسازی بافت بیضه را افزایش دهد و نتایج بهتری را از نظر تولید اسپرم افزایش دهد. سلول های بنیادی خونساز و مزانشیمی دو جمعیت سلول بنیادی بالغ هستند که پتانسیل چند خطی را حفظ می کنند و در غلظت های کمی در مغز استخوان، خون و بافت های متعدد در انسان بالغ توزیع می شوند. بدن انسان به عنوان سلول های بنیادی تک توان یا سلول های 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). سلول های بنیادی اندوتلیال، ماهواره ای و عصبی به کنار، حداقل اطلاعات در مورد پاسخ سلول های پیش ساز چند توان و ساکن به ورزش وجود دارد (۲٤–۲۸).

مطالعه اسپرماتوژنز در شرایط آزمایشگاهی در توضیح زیست شناسی سلول های زاینده مهم است و دانش ممکن است برای دستکاری ژنتیکی سلول های زایای معیوب یا تولید حیوانات تراریخته، حفظ باروری و درمان ناباروری مفید باشد. حفظ باروری برای بیماران بالغ و پیش از بلوغ که به دلیل گنادوتوکسین ها دچار عقیمی می شوند، سودمندتر خواهد بود. کشف مراحل گام به گام در اسپرم زایی و اشکال مختلف توقف در مراحل خاص به تشخیص ناباروری به خصوص ایدیوپاتیک و تصمیم گیری در مورد گزینه های درمانی کمک می کند. تکنیک‌های مختلفی برای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های زاینده در طول دهه‌ها امتحان شده است. تعداد بیشتری از مطالعات از سلول های بنیادی دستکاری شده ژنتیکی برای دستیابی به سلول های زایای تمایز یافته استفاده کرده اند. (۲۹،۳۰). VASA mRNA و پروتئین در سلول های جنسیتی هر دو جنس در طول رشد آنها تولید می شود(۳۱). در ایمونوهیستوشیمی ، سلول های جوانه ای اولیه انسان که مهاجرت می کنند پروتئین VASA دارند. (۳۲،۳۳). در مقابل ، پروتئین در موش ها پس از رسیدن سلول های جوانه ای اولیه به لبه تناسلی تولید می شود(۱۱،۳٤).

برخی مطالعات نشان می دهد که پروتئین VASA در دروسوفیلا به طور یکنواخت در سیتوپلاسم سلول ها توزیع شده است که به عنوان همراهی RNA ادامه می‌یابد و با بدن کروماتوئید (CB) مرتبط است. مطالعه دیگری نشان داد که VASA به عنوان CB عمل می کند و mrna را که در اسپرماتوزو باقی می ماند، هنگامی که ژنوم خواب می شود، رونویسی می کند. VASA نه تنها برای اسپرماتوژنز مورد نیاز است، بلکه برای سلول های بنیادی جنینی که به سلول های جنینی اولیه و سلول های بنیادی اسپرماتوگونیوم متمایز می شوند نیز مورد نیاز است.

گو و همکارانش نشان دهید که بیان بالاتر VASA در طول SSC ممکن است با تمایز غیر طبیعی سلول های جنینی اولیه یا SSC همراه باشد که منجر به کاهش تولید SSc و کاهش تولید اسپرم می شود (۳۵).

یانگ[1] و همکاران در سال ۲۰۱٤ در پژوهش خود نشان داده‌اند که تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسان (HUC-MSCs) به بیضه موش‌های آزواسپرمی می‌تواند به طور قابل توجهی بیان ژن‌های اختصاصی سلول زایا از جمله DAZL و VASA را افزایش دهد. سه هفته پس از تزریق، افزایش قابل توجهی (۲ تا ۸ برابر) در سطح بیان این ژن ها در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت. این نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی HUC-MSC ممکن است با ترویج اسپرم‌زایی از طریق تنظیم دخیل در ژن‌های ضروری که در رشد سلول‌های زایا نقش دارند، بهبودی از آزواسپرمی را تسهیل کنند (۳٦).

ژن DAZL در انسان نیز با عقیمی در ارتباط بوده و هرگونه تغییر در توالی این ژن و یا حذف آن، مردان را با خطر شدید ناباروری روبرو ساخته است. زمانی که میزان رونویسی از این ژن در انسان کاهش یافته است ذخیره اسپرمی بسیار کاسته شده و هم چنین اسپرمهای ناقص تولید شده است. در تحقیق حاضر آزواسپرمی باعث کاهش میزان بیان ژن VASA شد. با تزریق سلول‌های بنیادی و اجرای ورزش میزان بیان ژن VASA به صورت معناداری افزایش یافت. اگرچه این مطالعه بر روی موش‌های آزمایشگاهی انجام شد و در تعمیم یافته‌ها به انسان‌ها می-بایست احتیاط کرد، اما پیشنهاد می‌شود برای درمان افراد دارای آزواسپرمی، تمرینات ورزشی شنا و تزریق سلول های بنیادی احتمالا می تواند 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 می شود در پژوهشی مشابه، از مدت و شدت بالاتری از فعالیت برای مشاهده آثار آن بر فرآیند اسپرماتوژنز در موش های سفید بزرگ آزمایشگاهی مدل آزواسپرمی استفاده شود. همچنین توجه به تاثیر بعضی از مکمل ها مانند زینک بر فرآیند اسپرماتوژنز پیشنهاد می شود در پژوهشی مشابه، از مقادیر مصرف مکمل زینک و ورزش استفاده و آثار آن بر فرآیند اسپرماتوژنز بررسی شود.

نتیجه‌گیری

در مجموع، مطالعه حاضر که با هدف بررسی اثر تمرین شنا و سلول های بنیادی بر عوامل اسپرماتوژنز در موش های سفید بزرگ آزمایشگاهی مدل آزواسپرمی انجام شد به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تزریق سلول های بنیادی به همراه تمرین می‌تواند باعث بهبود عوامل فرایند اسپروماتوژنز در موش های مدل آزواسپرمی شود و سطح کیفیت جنسی و باروری را افزایش می دهد.

تشکر و قدردانی

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.

ملاحظات اخلاقی

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.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

[1] Yang

منابع

1. He H, Yu F, Shen W, Chen K, Zhang L, Lou S, Zhang Q, Chen S, Yuan X, Jia X, Zhou Y. The Novel Key Genes of Non-obstructive Azoospermia Affect Spermatogenesis: Transcriptomic Analysis Based on RNA-Seq and scRNA-Seq Data. Front Genet. 2021;26(12):608629. doi: 10.3389/fgene.2021.608629.
2. Cannarella R, Condorelli RA, Mongioì LM, La Vignera S, Calogero AE. Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. International Journal of Molecular Sciences. 2020;3;21(5):1728. doi: 10.3390/ijms21051728.
3. Kohn TP, Pastuszak AW. Non-obstructive azoospermia and shortened leukocyte telomere length: further evidence linking poor health and infertility. Fertility and Sterility. 2018;110(4):629-630. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.013.
4. Vij SC, Sabanegh E Jr, Agarwal A. Biological therapy for non-obstructive azoospermia. Expert Opinion on Biological Therapy. 2018;18(1):19-23. doi: 10.1080/14712598.2018.1380622.
5. Caroppo E, Colpi GM. Hormonal Treatment of Men with Nonobstructive Azoospermia: What Does the Evidence Suggest? Journal of Clinical Medicine. 2021;20;10(3):387. doi: 10.3390/jcm10030387.
6. Oud MS, Ramos L, O'Bryan MK, McLachlan RI, Okutman Ö, Viville S, de Vries PF, Smeets DFCM, Lugtenberg D, Hehir-Kwa JY, Gilissen C, van de Vorst M, Vissers LELM, Hoischen A, Meijerink AM, Fleischer K, Veltman JA, Noordam MJ. 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):1592-1605. doi: 10.1002/humu.23312.
7. Kumanov P. Managing Infertility Due to Endocrine Causes. The Diagnosis and Treatment of Male Infertility. Springer 2017;63-78. https://doi.org/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 International. 2012;110(4):568-72. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10783.x.
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. The Journal of Urology. 2017;197(5):1326-1331. doi: 10.1016/j.juro.2017.01.018.
10. Yu S, Zhao Y, Zhang FL, Li YQ, Shen W, Sun ZY. Chestnut polysaccharides benefit spermatogenesis through improvement in the expression of important genes. Aging (Albany NY). 2020;21;12(12):11431-11445. doi: 10.18632/aging.103205.
11. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T. The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells. Genes & Development. 2000;1;14(7):841-53.
12. Gill ME, Hu YC, Lin Y, Page DC. Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;3;108(18):7443-8. doi: 10.1073/pnas.1104501108.
13. Mobarak H, Heidarpour M, Rahbarghazi R, Nouri M, Mahdipour M. Amniotic fluid-derived exosomes improved spermatogenesis in a rat model of azoospermia. Life Sciences. 202;11;274:119336. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119336.
14. Barranco I, Padilla L, Parrilla I, Álvarez-Barrientos A, Pérez-Patiño C, Peña FJ, Martínez EA, Rodriguez-Martínez H, Roca J. Extracellular vesicles isolated from porcine seminal plasma exhibit different tetraspanin expression profiles. Scientific Reports. 2019;9;9(1):11584. doi: 10.1038/s41598-019-48095-3.
15. Nikbin S, Derakhshideh A, Karimi Jafari S, Mirzahamedani A, Moslehi A, Ourzamani S, Barati E, Amini F, Zolfaghari FS, Azarbayjani MA. Investigating the protective effect of aerobic exercise on oxidative stress and histological damages of testicular tissue associated with chlorpyrifos in male rats. Andrology. 2020;52(2):e13468. doi: 10.1111/and.13468.
16. Dutra Gonçalves G, Antunes Vieira N, Rodrigues Vieira H, Dias Valério A, Elóisa Munhoz de Lion Siervo G, Fernanda Felipe Pinheiro P, Eduardo Martinez F, Alessandra Guarnier F, Rampazzo Teixeira G, Scantamburlo Alves Fernandes G. Role of resistance physical exercise in preventing testicular damage caused by chronic ethanol consumption in UChB rats. Microscopy Research and Technique. 2017;80(4):378-386. doi: 10.1002/jemt.22806.
17. 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 Medicine: Basic and Clinical Research Journal. 2021;28(5):11-22. doi: 10.22070/DANESHMED. [Farsi].
18. Li Y, Zhang L, Zheng X, Qian J, Li Y, Xie C, Zhang X, Zhou Y, Huang H. Dietary restriction and/or exercise training impairs spermatogenesis in normal rats. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. 2021;46(3):229-237. doi: 10.1139/apnm-2020-0477.
19. Thompson M, Mei SHJ, Wolfe D, Champagne J, Fergusson D, Stewart DJ, Sullivan KJ, Doxtator E, Lalu M, English SW, Granton J, Hutton B, Marshall J, Maybee A, Walley KR, Santos CD, Winston B, McIntyre L. Cell therapy with intravascular administration of mesenchymal stromal cells continues to appear safe: An updated systematic review and meta-analysis. EClinicalMedicine. 2020;17;19:100249. doi: 10.1016/j.eclinm.2019.100249.
20. Kim HJ, Park JS. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. Development & Reproduction. 2017;21(1):1-10. doi: 10.12717/DR.2017.21.1.001.
21. Zhankina R, Baghban N, Askarov M, Saipiyeva D, Ibragimov A, Kadirova B, Khoradmehr A, Nabipour I, Shirazi R, Zhanbyrbekuly U, Tamadon A. Mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes for restoration of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia: a systemic review. Stem Cell Research & Therapy. 2021;6;12(1):229. doi: 10.1186/s13287-021-02295-9.
22. Zohrabi Karani L, Farzanegi P, Azarbayjani MA. The Effect of 8-Weeks of Low-Intensity Swimming Training on Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein and Spermatid Transition Nuclear Protein Gene Expression in Azoospermic Rats Model. Quarterly of the Horizon of Medical Sciences. 2020;26(4):332-47. doi:10.32598/hms.26.4.450.2. [Farsi].
23. 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. Razi Journal of Medical Sciences 2023;30 (7). doi: 10.47176/rjms.30.166. [Farsi].
24. Seib DR, Martin-Villalba A. Neurogenesis in the Normal Ageing Hippocampus: A Mini-Review. Gerontology. 2015;61(4):327-35. doi: 10.1159/000368575.
25. Kretzschmar K, Watt FM. Markers of epidermal stem cell subpopulations in adult mammalian skin. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2014;3;4(10):a013631. doi: 10.1101/cshperspect.a013631.
26. Shin S, Kaestner KH. The origin, biology, and therapeutic potential of facultative adult hepatic progenitor cells. Current Topics in Developmental Biology. 2014;107:269-92. doi: 10.1016/B978-0-12-416022-4.00010-X.
27. Leri A, Rota M, Hosoda T, Goichberg P, Anversa P. Cardiac stem cell niches. Stem Cell Research. 2014;13(3 Pt B):631-46. doi: 10.1016/j.scr.2014.09.001.
28. Shapouri A, Asgharpour H, Farzanegi P, Aghaei Bahmanbeglo N. The effect of swimming, cells and laser therapy on the expression of Drp1, Murf1 and Mfn2 genes in the testes of azoospermic rats. 2024; In Press (May-Jun). https://mlj.goums.ac.ir/browse.php?a_id=1473&sid=1&slc_lang=fa.
29. Dissanayake DM. In vitro spermatogenesis; past, present, and future. Spermatozoa: Facts and Perspectives. 2018;13:25-51. doi:10.5772/intechopen.73505.
30. Sun YC, Sun XF, Dyce PW, Shen W, Chen H. The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances. International Journal of Biological Sciences. 2017;11;13(4):449-457. doi: 10.7150/ijbs.18836.
31. Gustafson EA, Wessel GM. Vasa genes: emerging roles in the germ line and in multipotent cells. BioEssays. 2010;32(7):626-37. doi: 10.1002/bies.201000001.
32. Zarate-Garcia L, Lane SI, Merriman JA, Jones KT. FACS-sorted putative oogonial stem cells from the ovary are neither DDX4-positive nor germ cells. Scientific Reports. 2016;15;6:27991. doi: 10.1038/srep27991.
33. Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;15;97(17):9585-90. doi: 10.1073/pnas.160274797.
34. Lacham-Kaplan O. In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse. Reproduction. 2004;128(2):147-52. doi: 10.1530/rep.1.00220.
35. Guo X, Gui YT, Tang AF, Lu LH, Gao X, Cai ZM. Differential expression of VASA gene in ejaculated spermatozoa from normozoospermic men and patients with oligozoospermia. Asian Journal of Andrology. 2007;9(3):339-44. doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00253.x.
36. Yang, R. F., Liu, T. H., Zhao, K., & Xiong, C. L. (2014). Enhancement of mouse germ cell-associated genes expression by injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells into the testis of chemical-induced azoospermic mice. Asian Journal of Andrology, 16(5), 698–704. https://doi.org/10.4103/1008-682X.129209