



اثر تمرین شنا، سلول و لیزر بر بیان ژن‌های درگیر در اتوفآژی (LC3 و Beclin-1) در موش‌های مدل آزواسپرمی

مهديه اسدی: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم انسانی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران
پروین فرزانه‌گی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران (* نویسنده مسئول)
parvin.farzanegi@gmail.com
محمد علی آذربایجانی: استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

آزواسپرمی،
اتوفآژی،
تمرین شنا،
سلول‌درمانی و لیزردرمانی

زمینه و هدف: ناباروری در مردان ۱۰-۲۰ درصد موارد به‌علت آزواسپرمی است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین شنا، سلول و لیزر بر بیان ژن‌های درگیر در اتوفآژی در موش‌های مدل آزواسپرمی بود.

روش کار: پژوهش حاضر از نوع تجربی هست که ۳۰ سررت ۶ تا ۸ هفته‌ای از مرکز پژوهش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی تهران به‌صورت تصادفی انتخاب، و سپس مدل آزواسپرمی با داروی بوسولفان با دوز ۴۰ میلی‌گرم‌القاه و پس از گذشت یک‌ماه در هر گروه موش‌ها به‌صورت زیر گروه‌بندی شدند: کنترل بیمار، کنترل سالم، کنترل بیمار + لیزر، کنترل بیمار + شنا، گروه کنترل بیمار + سلول و گروه کنترل بیمار + سلول + لیزر + شنا (یک‌ماه بعد از ایجاد مدل یک‌بار سلول‌های بنیادی به‌صورت پیوند در ناحیه مجرای دفران به میزان یک میلیون سلول برای هر موش پیوندزده شد سپس پس از گذشت یک هفته از پیوند سلول لیزر با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر و توان ۱۰ میلی‌وات و انرژی ۳ ژول به‌صورت سه تکرار در کل دوره مطالعه با فاصله هر هفته یک‌بار اعمال شد و پس از بهبود زخم ناحیه پیوند سلولی بر روی شکم، به‌صورت روزانه به‌مدت ۳۰ دقیقه در روز، ۵ روز در هفته شنا انجام دادند که این زمان به‌مدت ۸ هفته انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که القای مدل آزواسپرمی سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های LC3 ($P \leq 0.01$) و Beclin-1 ($P \leq 0.01$) بافت بیضه نسبت به گروه کنترل شد که شنا در ترکیب با سلول و لیزر سبب کاهش LC3 ($P \leq 0.05$) و Beclin-1 ($P \leq 0.05$) و مهار اتوفآژی در موش‌های مدل آزواسپرمی شد.

نتیجه‌گیری: تمرین شنا در ترکیب با سلول‌درمانی و لیزردرمانی با مهار اتوفآژی ممکن است اثر حفاظتی خود را در موش‌های مدل آزواسپرمی اعمال نماید و سبب بارور شدن موش‌ها شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Asadi M, Farzanegi P, Azarbayjani MA. The Effect of Swimming Training, Cell and Laser on the Expression of Genes Involved in Autophagy (LC3 and Beclin-1) in Azoospermia Mice. Razi J Med Sci. 2024(14 Jan);30:166.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 4.0 صورت گرفته است.

The Effect of Swimming Training, Cell and Laser on the Expression of Genes Involved in Autophagy (LC3 and Beclin-1) in Azoospermia Mice

Mahdieh Asadi: PhD Candidate in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Humanities, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Parvin Farzanegi: Associate Professor of Exercise Physiology Department, Faculty of Humanities, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran (*Corresponding Author) parvin.farzanegi@gmail.com

Mohammad Ali Azarbayjani: Professor of Exercise Physiology Department, Faculty of Humanities, Tehran Markaz Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: Infertility in men is 10-20% of cases due to azoospermia and usually due to disorders of the reproductive system. Normally, the population of men with azoospermia is estimated to be around 2% (1) and it has been shown that in 20% of infertile men, azoospermia is the main cause of infertility (2). Non-obstructive azoospermia is a state in which no sperm is observed in ejaculation and is related to intra-testicular disorders and as a result spermatogenesis disorders, while in obstructive azoospermia, spermatogenesis is normal and the defect is related to obstruction in the ejaculatory ducts (3). In a study, decreased expression of autophagy pathway genes (Lc3B, Beclin1) was observed in patients with azoospermia (4). The aim of this study was to investigate the effect of swimming, cell and laser training on the expression of genes involved in autophagy in azoospermia model mice.

Methods: The samples of the present study were male Wistar laboratory rats, which were under control in the laboratory in terms of many variables, therefore, the present study was of an experimental type. 30 6 to 8 week old rats from the research center and Reproduction of laboratory animals in Tehran were randomly selected. In order to create azoospermia model, the drug busulfan was injected intraperitoneally for each rat at a dose of 40 mg/kg of body weight (15). After a month of inducing the model, the rats in each group were divided as follows: Patient control group (one month after creating the model until the end of the study, they remained for 8 weeks), healthy control group (kept for 8 weeks), patient control group + low power laser (one month after creating the model, low laser Power with a wavelength of 632.8 nm and a power of 10 mW and an energy of 3 joules was applied three times in the entire study period with an interval of one week in the testicular region of azoospermic rats and rats until the end of the study for 8 weeks. were maintained), the patient control group + exercise (one month after creating azoospermic mice for 8 weeks, they swam daily for 30 minutes a day, 5 days a week), the patient control group + cell (one month later From the creation of azoospermic mice, stem cells were transplanted in the vas deferens region at the rate of one million cells per mouse in the right testis and the rats were kept for 8 weeks until the end of the study), patient control group + cells + low laser power + exercise (one month after the creation of azoospermic mice, stem cells were transplanted once in the vas deferens in the amount of one million cells for each mouse, then after a week of low power laser cell transplantation with wavelength 632.8 nm and power of 10 mW and energy of 3 joules were applied three times during the entire study period with an interval of one week and after the healing of the wound of the cell graft area on the abdomen, it was applied topically for 30 minutes a day. They swam 5 days a week, which lasted for 8 weeks). Tissue sampling was done from the testicular tissue of mice under completely similar conditions and in basic conditions (two days after the end of the training period). In order to eliminate the acute effect of training, sampling of the animals was done 48 hours after the last swimming training program. For this purpose, the animals were anesthetized by peritoneal injection of ketamine (30-50 mg/kg) and xylazine (5-3 mg/kg) and then killed, and after killing the transplanted tissues, they were evaluated for genetic studies. To check the expression of the studied genes in each group, real time PCR technique was used to examine the tissues. First, primer design was done and then total RNA was extracted from the tissues and converted into cDNA. Then, the cDNA was amplified by PCR and analyzed for the expression of the mentioned genes. To analyze the

Keywords

Azoospermia, Autophagy, Swimming Training, Cell Therapy and Laser Therapy

Received: 05/08/2023

Published: 14/01/2024

findings of this research, Smirnov's Kalmograph tests, one-way analysis of variance and Tukey's were used to compare between different groups. All calculations were done using SPSS/22 statistical software and at a significant level of $P \leq 0.05$.

Results: The results showed that there is a significant difference between the average expression of the Beclin gene in testicular tissue in different research groups; The control group has a significant difference with the model group at the confidence level of 0.01, and the model group has a significant difference with the cell, laser and training group at the confidence level of 0.05. Also, the results show that cells, laser and exercise simultaneously had an effect on the expression of Beclin gene in testicular tissue in azoospermia model mice. Also, the next finding showed that there is a significant difference between the average LC3 gene expression of testicular tissue in different research groups; The control group has a significant difference with the model group at the confidence level of 0.01, and the model group has a significant difference with the cell, laser and training group at the confidence level of 0.05. Also, the results show that cells, laser and training simultaneously had an effect on the expression of LC3 gene in testicular tissue in azoospermia model mice.

Conclusion: The results of the research showed that by inducing the azoospermia model, the expression of LC3 and Beclin-1 genes in the testicular tissue of mice increased significantly compared to the control group. On the other hand, with the implementation of exercise, cell and laser treatment methods, the expression of the mentioned genes in mice decreased compared to the azoospermic group, showing that this decrease was significant only in the combined exercise, cell and laser group. Research has shown that exercise can be a key factor in the regulation of proteins involved in the autophagy pathway, and the regulation of autophagy by exercise can be a key process in cellular and molecular mechanisms (11,10). The main path of the proteins involved in the autophagy process is regulated by complex regulatory mechanisms, which can be different input signals such as nutrients, growth factors, hormones, intracellular calcium concentration, ATP level, hypoxia, etc. The main regulatory pathway of these factors is the mTORC1 pathway, which is activated in cellular responses such as growth, proliferation, protein synthesis, and autophagy (11). The mTORC1 pathway can activate or inhibit the autophagy mechanism by regulating ULK1, ATG13 and FIP200 proteins (25). Various studies have shown that LC3 can increase cell death or its survival (26), it is also known as one of the effective factors in autophagy, which according to the available evidence can have an apoptotic function (27). It has been reported that decreased autophagic activity due to decreased expression of LC3 and Beclin-1 can be associated with tumorigenesis and increased tumor growth (28). No research was found that investigated the effect of stem cells and laser therapy on the expression of genes involved in autophagy. The results of the present study showed that cell therapy and laser therapy alone and in combination do not have a significant effect on the expression of LC3 and Beclin-1 genes in the testicular tissue of azoospermia model mice, but cell therapy and laser therapy in combination with exercise caused a significant decrease in these genes. And somehow it inhibited autophagy in testicular tissue of azoospermia model mice. Therefore, it is possible that exercise combined with cell therapy and laser therapy by inhibiting autophagy in the testicular tissue of azoospermia model mice induced with busulfan exerts its protective effect and in this way causes the fertility of azoospermia model mice, but a definite opinion needs more research in this regard. It is the context. In general, it has been shown in the research that autophagy is activated in pathological conditions and may have destructive effects on the tissue. In the present study, the induction of the azoospermia model by busulfan leads to an increase in the genes involved in autophagy and in some way activates the pathway that exercise Exercise in combination with cells and laser therapy by reducing genes and somehow inhibiting autophagy may exert its protective effect and thus prevent infertility in mice.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Asadi M, Farzanegi P, Azarbayjani MA. The Effect of Swimming Training, Cell and Laser on the Expression of Genes Involved in Autophagy (LC3 and Beclin-1) in Azoospermia Mice. Razi J Med Sci. 2024(14 Jan);30:166.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

***This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.**

مقدمه

ناباروری در مردان ۱۰-۲۰ درصد موارد به علت آرواسپرمی و به طور معمول به علت اختلالات سیستم تناسلی است. به طور معمول جمعیت مردان آرواسپرمی حدود ۲ درصد تخمین زده شده است (۱) و نشان داده شده است که در ۲۰ درصد مردان نابارور، آرواسپرمی علت اصلی ناباروری می باشد (۲). آرواسپرمی غیرانسدادی حالتی است که در انزال هیچ اسپرمی مشاهده نمی شود و مربوط به اختلالات داخل بیضه ای و در نتیجه اختلال در اسپرماتوزن می باشد، در حالی که در آرواسپرمی انسدادی اسپرماتوزن طبیعی بوده و نقص مربوط به انسداد در مجاری انزالی می باشد (۳). در مطالعه ای کاهش بیان ژن های مسیر اتوفاژی (LC3B, Beclin1) در بیماران مبتلا به آرواسپرمی مشاهده شده است (۴).

اتوفاژی یک فرایند برنامه ریزی شده از نظر ژنتیکی و تکاملی حفاظت شده است که پروتئین های سلولی با عمر طولانی و ارگانل ها را تخریب می کند. در واقع اتوفاژی شامل تشکیل وزیکول دو غشایی است که سیتوپلاسم و ارگانل ها را احاطه می کند و سپس با لیزوزوم ها ادغام می شود، بنابراین محتوای لیزوزوم را تخریب می کند (۵). حدود ۳۰ ژن ویژه، اتوفاژی را تنظیم می کنند که از بین این ژن ها، LC3 (پروتئین زنجیره سبک ۳ مرتبط با میکروتوبول) نقش مهمی در اتوفاژی پستانداران ایفا می کند و معمولاً به عنوان نشانگر تشکیل اتوفاگوزوم مورد استفاده قرار می گیرد که تعداد اتوفاگوزوم های مشاهده شده در بافت به نوبه خود می تواند به عنوان مقیاس فعالیت اتوفاژیک در نظر گرفته شود (۶). هم چنین پروتئین Beclin-1 جزئی از کمپلکس فسفاتیدیل اینوزیتول-۳ کلاس III (PIK3C3) است که نقش اساسی در هسته گذاری و تشکیل اتوفاگوزوم بر عهده دارد و هم چنین به نظر می رسد در نروژنز و مرگ سلولی نیز دخالت داشته باشد (۷).

فعالیت بدنی که امروزه در برابر بیماری های مختلف راه حل کاربردی مناسبی به شمار می رود باعث کاهش عوامل خطرزای قلبی، جلوگیری از تخریب میوکارد و افزایش عملکرد قلب می شود (۸). هم چنین، تمرینات ورزشی منجر به سازگاری های متابولیکی عضله ای

اسکلتی، آمادگی قلبی عروقی، ترکیب بدن و کنترل گلیسمی می شود (۹). پژوهش های مختلفی در مورد تأثیر فعالیت ورزشی بر اتوفاژی انجام شده است، جوکار و همکاران نشان دادند که هشت هفته تمرین ورزشی منجر به کاهش محتوای پروتئین های FOXO3a و Beclin-1 بافت قلب و مهار اتوفاژی در موش های مبتلا به دیابت می شود (۱۰). هم چنین، آقاعلی نژاد و همکاران اثر تمرینات ورزشی در مقابله با رشد تومور از طریق تغییر در بیان ژن های LC3 و Bcl-2 در موش های مبتلا به سرطان را نشان داده اند (۱۱). با این حال سازوکارهای مکانیسم سلولی و مولکولی هنوز به خوبی شناخته نشده است.

از طرفی، امروزه برای درمان ناباروری مردان از روش های مختلفی از جمله سلول درمانی با استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی می باشد (۱۲). در میان روش های مختلف سلول درمانی استفاده از سلول های بنیادی برای بازگرداندن ساختار یا عملکرد بافت آسیب دیده بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۳، ۱۴). منابع مختلفی برای سلول های بنیادی جنینی یا قرار می گیرد از جمله سلول های بنیادی جنینی یا سلول های بنیادی پرتوان، اما استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی به دلیل سهولت در دسترسی و کار با آن مورد توجه بسیار است. سلول های بنیادی مزانشیمی می تواند از منابع مختلفی مانند مغز استخوان، بافت چربی، پالپ دندان و خون قانده گی که همگی توانایی بالایی برای تمایز به بافت های مختلف از خود نشان داده اند به دست آیند (۱۵، ۱۶، ۱۷)، در این میان سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به دلیل توانایی بالا در تمایز به انواع رده های سلولی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته اند (۱۳، ۱۸). در پژوهشی مظفر و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که محیط استفاده شده در کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می تواند موجب بازگشت اسپرماتوزن در موش های آرواسپرمیک القاء شده شود (۱۹).

از طرفی، مطالعات نشان داده است که هرگونه تغییر مورفولوژیکی و یا بیوشیمیایی در سلول های اپی تلیوم بیضه موجب تغییر در روند اسپرماتوزن و تغییر در میزان باروری موش ها می شود (۲۰). تابش نور با برخی

شرکت بهرپور 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 بطری‌هایی به آب مصرفی دسترسی داشتند.

به منظور ایجاد مدل آرواسپرمی، ابتدا رت‌های بالغ ۶ تا ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی ۲۲۰ 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 گردید (۱۵). پس از گذشت یک ماه از القا مدل در هر گروه موش‌ها به‌صورت زیر گروه بندی شدند:

- گروه کنترل بیمار (یک ماه بعد از ایجاد مدل تا پایان مطالعه باقی ماندند به مدت ۸ هفته).

- گروه کنترل سالم (به مدت ۸ هفته نگهداری شدند).

- گروه کنترل بیمار + لیزر کم توان (یک ماه بعد از ایجاد مدل، لیزر کم توان با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر و توان ۱۰ میلی‌وات و انرژی ۳ ژول به‌صورت سه تکرار در کل دوره مطالعه با فاصله هر هفته یک‌بار در ناحیه بیضه موش‌های آرواسپرمی اعمال شد. و رت‌ها تا پایان مطالعه به مدت ۸ هفته نگهداری شدند)

- گروه کنترل بیمار + ورزش (یک ماه بعد از ایجاد موش‌های آرواسپرمی به مدت ۸ هفته، به‌صورت روزانه به‌مدت ۳۰ دقیقه در روز ۵ روز در هفته شنا انجام دادند).

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

- گروه کنترل بیمار + سلول + لیزر کم توان + ورزش (یک ماه بعد از ایجاد موش‌های آرواسپرمی یک بار سلول‌های بنیادی به‌صورت پیوند در ناحیه مجران دفران به میزان یک میلیون سلول برای هر موش پیوند زده شد سپس پس از گذشت یک هفته از پیوند سلول لیزر کم توان با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر و توان ۱۰ میلی‌وات و انرژی ۳ ژول به‌صورت سه تکرار در کل دوره مطالعه با فاصله هر هفته یک بار اعمال شد و پس

طول موج‌های خاص (ماده جاذب نور حساس به طول موج) در سلول قادر است، بعضی از اجزاء سلولی مانند فیبروبلاست‌ها را فعال کرده و به این ترتیب واکنش‌های شیمیایی و متابولیسم سلولی را تغییر دهد (۲۱). علاوه بر این لیزر موجب بروز گرما در بافت‌ها و افزایش آپوپتوزیس در سلول‌ها شده است. امروزه این باور وجود دارد که تحریکات خارج سلولی، پاسخ‌هایی از جمله تکثیر، تمایز و حتی آپوپتوز را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲۲).

با توجه به روند رو به رشد ناباروری در مردان نیاز مبرم جهت پیدا کردن رویکردهای درمانی جدید جهت جایگزینی و یا کمک به درمان‌های موجود احساس می‌شود. تأثیرات مفید تمرین، سلول‌درمانی و لیزر و اینکه تاکنون پژوهشی که اثر همزمان آن‌ها را در موش‌های مدل آرواسپرمی بررسی نموده باشد یافت نشد. این پژوهش بنا دارد بررسی نماید که آیا تمرین، سلول و لیزر بر بیان ژن‌های LC3 و Beclin-1 بافت بیضه موش‌های مدل آرواسپرمی اثر معنی‌داری دارد یا خیر؟

روش کار

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

نمونه آماری این پژوهش شامل موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با سن حدود ۶ تا ۸ هفته بودند که از بین آن‌ها ۳۰ سر موش از مرکز پژوهش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی تهران خریداری و پس از انتقال آزمودنی‌ها به محیط آزمایشگاه و پس از یک هفته سازگاری با محیط جدید، به‌صورت گروه‌های ۵ تایی در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف در محیطی با میانگین دمای $\pm 1/4$ ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و چرخه‌ی تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. نگره-داری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی بین‌المللی سلامت و پروتکل‌های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد. هم‌چنین حیوانات در طی پژوهش از غذای پک ساخت

Applied Biosystems,) در دستگاه SYBER Green (Sequences Detection Systems Foster City, CA. ABI Step One طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نمودار Melting جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده و به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تجزیه و تحلیل یافته‌های این پژوهش از آزمون‌های کالموگراف اسمیرنف، آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی برای مقایسه بین گروه‌های مختلف استفاده شد. کلیه محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS/22 و در سطح معنی‌دار $P \leq 0/05$ انجام شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که بین میانگین بیان ژن Beclin بافت بیضه در گروه‌های مختلف پژوهش تفاوت معنی‌داری وجود دارد؛ گروه کنترل با گروه مدل در سطح اطمینان ۰/۰۱ و گروه مدل با گروه سلول و لیزر و تمرین در سطح اطمینان ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند. همچنین نتایج نشان دهنده‌ی آن است که سلول و لیزر و تمرین به طور هم‌زمان بر بیان ژن Beclin بافت بیضه در موش‌های مدل ازواسپرمی تاثیر گذار بود (نمودار ۱).

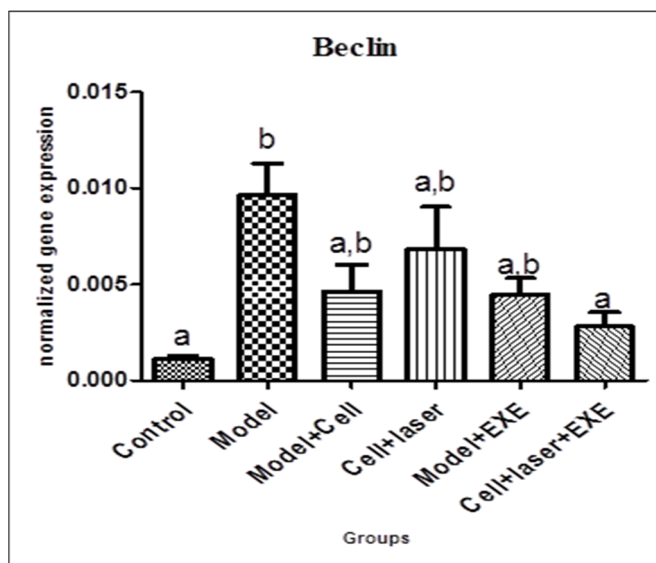
همچنین یافته بعدی نشان داد که بین میانگین بیان ژن LC3 بافت بیضه در گروه‌های مختلف پژوهش تفاوت معنی‌داری وجود دارد؛ گروه کنترل با گروه مدل در سطح اطمینان ۰/۰۱ و گروه مدل با گروه سلول و لیزر و تمرین در سطح اطمینان ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند. همچنین نتایج نشان دهنده‌ی آن است که سلول و لیزر و تمرین به طور هم‌زمان بر بیان ژن LC3 بافت بیضه در موش‌های مدل ازواسپرمی تاثیر گذار بود (نمودار ۲).

از بهبود زخم ناحیه پیوند سلولی بر روی شکم، به صورت رزوانه به مدت ۳۰ دقیقه در روز ۵ روز در هفته شنا انجام دادند که این زمان به مدت ۸ هفته انجام گرفت.

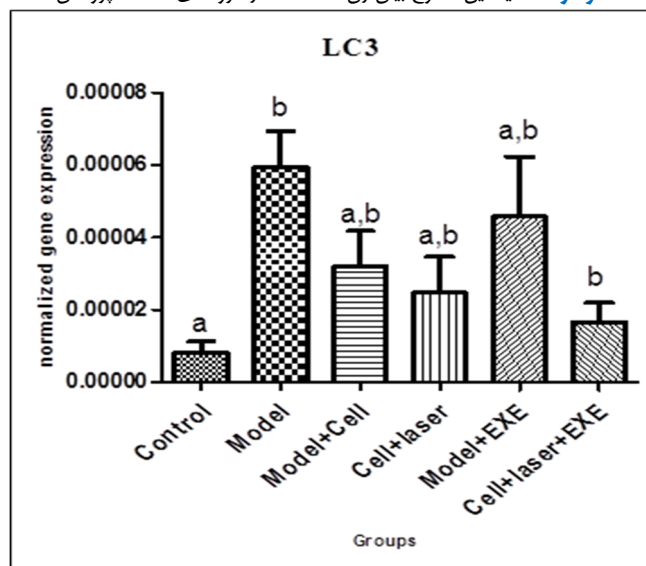
نمونه‌گیری بافتی از بافت بیضه موش‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (دو روز پس از پایان دوره تمرین) انجام شد. جهت حذف اثر حاد تمرین، نمونه برداری از حیوانات پس از ۴۸ ساعت بعد از آخرین برنامه تمرینی شنا انجام گرفت. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (۳۰-۵۰ mg/kg) و زایلازین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

برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه تحقیق در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک PCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت‌ها در همه گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیازن، آلمان) انجام گرفت. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت.

برای تکنیک RT-qPCR، ابتدا با استفاده از محلول کیازول، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سیناژن استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض (DNase I Fermentas) قرار گرفت. سپس کیفیت RNA‌های استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتری (DPI-1, Kiagen) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تهیه cDNA تک رشته‌ای از پرایمر (MWG-Biotech, Germany) (Oligodt) و آنزیم نسخه برداری معکوس (Fermentas) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. هر واکنش PCR با استفاده از (PCR master mix Applied Biosystems) و



نمودار ۱- میانگین سطوح بیان ژن Beclin در گروه‌های مختلف پژوهش



نمودار ۲- میانگین سطوح بیان ژن LC3 در گروه‌های مختلف پژوهش

بحث

مسیر اتوفاژی باشند و تنظیم اتوفاژی توسط تمرینات ورزشی می‌تواند فرایندی کلیدی در سازوکارهای سلولی و مولکولی باشد (۱۰، ۱۱). محققان تاکنون تحقیقی را که محتوای پروتئین Beclin-1 را در بیضه آزمودنی‌های آزواسپریمی اندازه‌گیری کرده باشند مشاهده نکردند. با این حال، جوکار و همکاران (۲۰۱۹) کاهش محتوای Beclin-1 را در بافت قلب آزمودنی‌های دیابتی مشاهده کردند (۱۰). برندت (Brandt) و همکاران (۲۰۱۸) افزایش محتوای پروتئین Beclin-1 عضله اسکلتی موش‌های سالم را نشان داده‌اند (۲۳). نتایج پژوهش

نتایج پژوهش نشان داد که با القای مدل آزواسپریمی بیان ژن‌های LC3 و Beclin-1 بافت بیضه در موش‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. از طرفی با اجرای روش‌های درمانی تمرین، سلول و لیزر بیان ژن‌های ذکر شده در موش‌ها نسبت به گروه آزواسپریمی کاهش نشان داد که این کاهش فقط در گروه ترکیبی تمرین، سلول و لیزر معنی‌دار بود. تحقیقات نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی می‌توانند یک عامل کلیدی در تنظیم پروتئین‌های درگیر در

بسیاری از موارد برای کاهش التهاب و عوارض ناشی از آن استفاده می‌شوند و به همین دلیل استفاده از این سلول‌ها برای مقابله با بیماری‌های خود ایمنی رو به افزایش است (۳۲). سلول‌های بنیادی قابلیت ترمیم و تبدیل به بافت صدمه‌دیده را دارند و یا این که محیطی مناسب برای ترمیم این بافت‌ها را فراهم می‌کنند، محققین را بر آن داشته است تا با استفاده از محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی به بررسی اثرات آن بپردازند.

تحقیقات انجام‌شده پیشین نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی فاکتورهای گوناگونی را در محیط کشت رها می‌کنند که از آن جمله می‌توان به فاکتورهای رشد استحال‌های بتا Transforming growth factor beta (TGF- β)، هیپاتوسیتی Hepatocyte growth factor (HGF)، کراتینوسیتی Keratinocyte growth factor (KGF)، فیبروبلاستی پایه Basic fibroblast growth factor (bFGF)، اندوتلیال عروقی Vascular endothelial growth factor (VEGF) و سیتوکین‌ها اشاره نمود (۳۳).

تحقیقات متعددی نشان داده است که محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی حاوی فاکتورهای رشد و همچنین سیتوکین‌های مختلفی است که در فرایند ترمیم می‌تواند مؤثر باشد (۳۴، ۳۵). استفاده از محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی به دلیل سهولت در نگهداری، ذخیره و جابه‌جایی نسبت به سلول‌های بنیادی و همچنین احتمال کمتر ایجاد واکنش‌های ایمنی می‌تواند گزینه مناسبی برای استفاده در ترمیم‌های بافتی باشد، به همین دلیل امروزه استفاده از محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی در ترمیم عوارض مختلف مورد توجه بسیار قرار گرفته است (۳۶). از طرفی، مطالعات نشان داده‌اند که بسیاری از مسیرهای سلولی از طریق وضعیت Redox سلول تنظیم می‌شود. تعدیل وضعیت Redox سلولی از طریق عامل نسخه‌برداری NF-KB و فسفولیپاز A2 سنتز DNA را افزایش می‌دهند. بنابراین لیزر کم‌توان ریتم تقسیمات میتوزی و میوزی را در اسپرماتوزن سرعت می‌بخشد و در تعداد سلول‌های ژرمینال به خصوص اسپرماتوسیت‌های اولیه، افزایش ایجاد می‌نماید (۲۲). پرتوهای لیزر کم‌توان علاوه بر تأثیر بر فسفوریلاسیون

حاضر با تحقیق جوکار و همکاران همسو و با نتایج پژوهش برنندت در یک راستا نیست، تفاوت‌های موجود در پژوهش می‌توان به نوع تمرینات انجام شده و همچنین نوع آزمودنی‌ها و بیمار بودن اشاره کرد که می‌تواند دلیلی بر تناقض به وجود آمده باشد. اگر اتوفاژی تنظیم شود، می‌تواند از طریق تخریب پروتئین‌های دناتوره‌شده و تولید اسیدهای آمینه در سلول‌ها زمینه‌ی اصلی رشد و بقای سلول را فراهم کند (۱۰). اتوفاژی یک فرایند ضروری برای عملکرد طبیعی بافت‌ها می‌باشد، بنابراین، تنظیم فرایند اتوفاژی از طریق فعالیت‌های ورزشی می‌تواند یک روش درمانی مفید در شرایط پاتولوژیک باشد (۲۴).

مسیر اصلی پروتئین‌های درگیر در فرایند اتوفاژی توسط سازوکارهای تنظیمی پیچیده‌ای تنظیم می‌شود که می‌توان به سیگنال‌های ورودی گوناگون از جمله مواد مغذی، فاکتورهای رشدی، هورمون‌ها، غلظت کلسیم داخل سلولی، میزان ATP، هیپوکسی و ... باشد. مسیر اصلی تنظیم‌کننده این عوامل مسیر mTORC1 است که در پاسخ‌های سلولی مانند رشد، تکثیر، سنتز پروتئین و اتوفاژی فعال می‌شود (۱۱). مسیر mTORC1 با تنظیم پروتئین‌های ULK1، ATG13 و FIP200 می‌تواند فعال‌کننده یا مهارکننده ساز و کار اتوفاژی باشد (۲۵).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که LC3 می‌تواند مرگ سلولی و یا بقای آن را افزایش دهد (۲۶)، هم‌چنین به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر در اتوفاژی نیز شناخته شده است که بر اساس شواهد موجود می‌تواند عملکرد آپوپتوتیک داشته باشد (۲۷). گزارش شده است که کاهش فعالیت اتوفاژیک به دلیل کم شدن میزان بیان LC3 و Beclin-1 می‌تواند با توموروزن و افزایش رشد تومور همراه باشد (۲۸).

مظفر و همکاران (۲۰۱۷) بهبود قابل توجه فرایند اسپرماتوزن و شاخص‌های بافتی بیضه در نمونه‌های تحت درمان با محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نسبت به گروه آژواسپرمیک القاشده را نشان دادند (۱۹). هم‌راستا پژوهش‌های دیگری نیز در حیواناتی نظیر همستر و موش بیانگر بهبود قابل ملاحظه فرایند اسپرماتوزن در اثر درمان با سلول بنیادی بود (۲۹-۳۱). سلول‌های بنیادی در

تمرینات ورزشی در ترکیب با سلول‌درمانی و لیزر درمانی با مهار اتوفازی در بافت بیضه موش‌های مدل آزواسپرمی القاء شده با بوسولفان اثر حفاظتی خود را اعمال نماید و به این طریق سبب بارور شدن موش‌های مدل آزواسپرمی شود ولی اظهار نظر قطعی نیازمند پژوهش بیشتر در این زمینه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی در تحقیقات نشان داده شده است که در شرایط پاتولوژیک اتوفازی فعال می‌شود و ممکن است آثار مخربی در بافت داشته باشد در پژوهش حاضر نیز القای مدل آزواسپرمی توسط بوسولفان منجر به افزایش ژن‌های درگیر در اتوفازی و به نوعی فعال شدن مسیر دارد که تمرین ورزشی در ترکیب با سلول و لیزر درمانی با کاهش ژن‌ها و به نوعی مهار اتوفازی ممکن است اثر حفاظتی خود را اعمال و به این ترتیب از ناباروری موش‌ها جلوگیری نماید.

References

1. Yaghobinejad M, Solhjoo S, Heidar T, Bashghareh A, Nohesara AA, Rastegar T. The effect of osteocalcin on testis morphometry in azoospermic Syrian male NMRI. *J Neyshabur Univ Mes Sci* 2019;7(1):98-111.
2. Smith LB, Saunders PT. The skeleton: the new controller of male fertility? *Cell* 2011;144(5):642-3.
3. Gudeman SR, Townsend B, Fischer K, Walters RC, Crain D. Etiology of azoospermia in a military population. *J Urol* 2015;193(4):1318-21.
4. Asgari R, Bakhtiari M, Rezazadeh D, Vaisi-Raygani A, Mansouri K. Autophagy related gene expression status in patients diagnosed with azoospermia: A cross-sectional study. *Journal of Gene Medicine*, 06 Feb 2020, 22(4):e3161.
5. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer research*. 2006; 66(19):9349-51.
6. He JH, Luo RZ, Cai MY, Li M, Lu JB, Yuan ZY. Decreased expression of light chain 3 (LC3) increased the risk of distant metastasis in triple-negative breast cancer. *Medical Oncology*. 2013; 30(1):468.
7. Hasanpour SZ, Allah Bakhshian Farsani M, Hajifathali A, Mohammadi MH. Evaluation of Beclin 1 and Atg10 gene expression of the autophagy pathway in acute lymphoblastic leukemia patients. *SJKU* 2018; 23 (6): 142-151.

اکسیداتیو در میتوکندری‌ها و افزایش تولید ATP میکروسیر کولاسیون (گردش خون میکروسکوپی) را افزایش می‌دهند. لیزر با آزادسازی مواد شیمیایی مانند هیستامین سبب انبساط عروقی می‌شود که همراه با افزایش فسفوریلاسیون اکسیداتیو سلول‌ها سبب افزایش متابولیسم سلولی می‌گردد (۲۲). افزایش میکروسیر کولاسیون در بیضه وضعیت متابولیسمی را بهبود می‌بخشد که پس تابش لیزر اثر تحریکی بیولوژیک مهم در اسپرماتوژنز را توجیه می‌کند (۳۷). تحت تأثیر پرتوهای لیزر کم‌توان تغییراتی در مرحله پاک‌ی تن اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتیدها در درجات مختلف ایجاد می‌شود و در نتیجه طول فاز سیکل سلولی در انواع سلول‌های ژرمینال تغییر می‌نماید (۳۸). از طرف دیگر پرتو لیزر کم‌توان به‌ویژه با طیف مادون قرمز (IR) سبب افزایش تولید تستوسترون با اثر روی سلول‌های لایدیگ می‌شود (۳۹). تستوسترون و FSH برای اتصال اسپرماتید و اجزاء سلولی سرتولی ضروری هستند. اسپرماتوزوئیدهای در حال نمو توسط پل‌های سیتوپلاسمیک به هم متصل هستند. این شبکه سلولی، به‌طور فیزیکی توسط انشعابات سیتوپلاسمی وسیع سلول‌های سرتولی پشتیبانی می‌گردد. به علت این که اسپرماتوتوسیت‌ها، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوئیدها از خون توسط سد خونی-بیضه‌ای جدا گشته‌اند، این سلول‌های اسپرماتوتونیک برای تبادل مواد غذایی و متابولیت‌ها، به سلول‌های سرتولی وابسته هستند. سد سلول‌های سرتولی، اسپرم‌های در حال رشد را از حمله ایمنولوژیک نیز محافظت می‌نماید و هنگام اسپرمیوژنز سیتوپلاسم اضافی اسپرماتید از آن جدا می‌شود و این قطعات سیتوپلاسمی توسط لیزوزوم‌های سلول‌های سرتولی فاگوسیتیه و منهدم می‌شوند (۴۰).

تحقیقی که اثر سلول‌های بنیادی و لیزر درمانی را در بیان ژن‌های درگیر در اتوفازی بررسی کرده باشد یافت نشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سلول‌درمانی و لیزر درمانی به‌تنهایی و ترکیبی تأثیری قابل ملاحظه‌ای بر بیان ژن‌های LC3 و Beclin-1 بافت بیضه موش‌های مدل آزواسپرمی ندارد، اما سلول‌درمانی و لیزر درمانی در ترکیب با تمرینات ورزشی سبب کاهش معنی‌دار این ژن‌ها و به نوعی سبب مهار اتوفازی در بافت بیضه موش‌های مدل آزواسپرمی شد. لذا ممکن است

8. Tao L, Bei Y, Zhang H, Xiao J, Li X. Exercise for the heart: signaling pathways. *Oncotarget* 2015; 6(25):20773-84.
9. Hafstad AD, Lund J, Hadler-Olsen E, Höper AC, Larsen TS, Aasum E. High-and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* 2013; 62(7):2287-94.
10. Jokar M, Sherafati Moghadam M. High intensity interval training inhibits autophagy in the heart tissue of type 2 diabetic rats by decreasing the content of FOXO3A and BECLIN-1 proteins. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*; Vol.18, No 6, 2019.
11. Agha-Alinejad H, Hashemi Jokar E. Effect of Six Weeks of Interval Exercise Training along with Selenium Nanoparticle Ingestion on Bcl-2 and LC3 Genes expression in the Tumor Tissue of Breast Tumor-Bearing Mice. *Iranian Quarterly Journal of Breast Disease*. 2019;12(2):26-37.
12. O'Brien KLF, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril* 2010; 93(1): 1-12.
13. Zhang D, Liu X, Peng J, He D, Lin T, Zhu J, et al. Potential spermatogenesis recovery with bone marrow mesenchymal stem cells in an azoospermic rat model. *Int J Mol Sci* 2014; 15(8): 13151-65.
14. Leatherman J. Stem cells supporting other stem cells. *Front Genet* 2013; 4(12): 257-62.
15. Asadi-Yousefabad SL, Khodakaram-Tafti A, Dianatpour M, Mehrabani D, Zare S, Tamadon A, et al. Genetic evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by a modified karyotyping method. *Comp Clin Pathol* 2015; 24(11): 1361-6.
16. Shaterzadeh-Yazdi H, Mehrabani D, Khodakaram-Tafti A, Dianatpour M, Zare SH, Tamadon A, et al. Osteogenic potential of subcutaneous adipose-derived stem cells in a rabbit model. *Online J Vet Res* 2015; 19(6): 436-45.
17. Mehrabani D, Bahrami-Nazarabadi R, Dianatpour M, Vahdati A, Tamadon A, Kasraeian M, et al. Growth kinetics, characterization and plasticity of human menstrual blood stem cells. *Iran J Med Sci* 2016; 41(2): 132-9.
18. Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med* 2011; 208(3): 421-8.
19. Mozafar A, Mehranani D, Vahdati A, Hosseini SE, Forouzanfar M. The Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Culture in the Treatment of Azoospermic Infertility induced by Busulfan Balb/C mice. *Armaghane-danesh* 2017; 22 (3): 295-310.
20. Nel-Themaat L, Vadakkan TJ, Wang Y, Dickinson ME, Akiyama H, Behringer RR. Morphometric analysis of testis cord formation in Sox9-EGFP mice. *Dev Dyn*. 2009 May; 238(5):1100-10.
21. Taha MF, Valojerdi MR. Quantitative and qualitative changes of the seminiferous epithelium induced by Ga. Al. As. (830 nm) laser irradiation. *Lasers Surg Med*. 2004;34(4):352-9.
22. Hasanzadeh Gh, Deihimi M, Azornia M, Rajabi M, Takzare N. Effect of red and infrared spectrum low level of laser rays on Rat Seminiferous tubules. *J Gorgan Uni Med Sci*. Autumn 2010; 12 (3): 10-17.
23. Brandt N, Gunnarsson TP, Bangsbo J, Pilegaard H. Exercise and exercise training-induced increase in autophagy markers in human skeletal muscle. *Physiological reports* 2018; 6(7):e13651.
24. Lee Y, Kwon I, Jang Y, Song W, Cosio-Lima LM, Roltsch MH. Potential signaling pathways of acute endurance exercise-induced cardiac autophagy and mitophagy and its possible role in cardioprotection. *The Journal of Physiological Sciences* 2017; 67(6):639-54.
25. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science* 2009; 122(20):3589-94.
26. Ladoire S, Chaba K, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Michaud M, et al. Immunohistochemical detection of cytoplasmic LC3 puncta in human cancer specimens. *Autophagy*. 2012; 8(8):1175-84.
27. Tran TA, Ahn KS, Song YW, Moon JY, Cho M, Lim Y, Cho SK. Mechanism of 2', 3'-dimethoxyflavone-induced apoptosis in breast cancer stem cells: Role of ubiquitination of caspase-8 and LC3. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014; 562:92-102.
28. Shen Y, Li DD, Wang LL, Deng R, Zhu XF. Decreased expression of autophagy-related proteins in malignant epithelial ovarian cancer. *Autophagy*. 2008; 4(8):1067-8.
29. Rahmanifar F, Tamadon A, Mehrabani D, Zare Sh, Abasi S, Keshavarz S, et al. Histomorphometric evaluation of treatment of rat azoospermic seminiferous tubules by allo-transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Iran J Basic Med Sci* 2016;19(5): 653-61.
30. Tamadon A, Mehrabani D, Rahmanifar F, Raayat Jahromi A, Panahi M, Zare S, et al. Induction of Spermatogenesis by Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Busulfan-induced Azoospermia in Hamster. *Int J Stem Cells* 2015; 8(2): 134-45.
31. Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Isik A, et al. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. *Bio Med Res Int* 2013; 2013: 529589.
32. Kamardi MT, Pourgholaminejad A, Eslaminejad MB, Sotoodehnejad Nematalahi F. Mesenchymal stem cells and their application in

autoimmune disease treatment: review article. TUM J 2014; 72(6): 341-51.

33. Zhou BR, Xu Y, Guo SL, Xu Y, Wang Y, Zhu F, et al. The effect of conditioned media of adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. Biomed Res Int 2013; 2013: 519126.

34. Park BS, Kim WS, Choi JS, Kim HK, Won JH, Ohkubo F, Fukuoka H. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. Biomed Res 2010; 31(1): 27-34.

35. Ho JC, Lai WH, Li MF, Au KW, Yip MC, Wong NL, et al. Reversal of endothelial progenitor cell dysfunction in patients with type 2 diabetes using a conditioned medium of human embryonic stem cell-derived endothelial cells. Diabetes Metab Res Rev 2012; 28(5): 462-73.

36. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. Biomed Res Int 2014; 2014: 965849.

37. Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Chuma Sh, Nakatsuji N, Takehashi M, et al. Phenotypic Plasticity of Mouse Spermatogonial Stem Cells. PLoS One. 2009 Nov; 4(11): e7909.

38. Jørgensen A, Nielsen JE, Møthorst JE, Bjerregaard P, Leffers H. Laser capture microdissection of gonads from juvenile zebrafish. Reprod Biol Endocrinol. 2009; 7: 97.

39. Singh SK, Chakravarty S. Antispermato-genic and antifertility effects of 20,25-diazacholesterol dihydrochloride in mice. Reprod Toxicol. 2003 Jan-Feb; 17(1): 37-44.

40. Hikim AP, Lue Y, Yamamoto CM, Vera Y, Rodriguez S, Yen PH, Soeng K, Wang C, Swerdloff RS. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. Endocrinology. 2003 Jul; 144(7): 3167-75.