



اثر تمرینات هوازی و سلول‌های بنیادی بر بیان ژن آزواسپرمی فاکتور در موش‌های نابارور

محرم نمکی: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
علیرضا براری: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران (✉ نویسنده مسئول) alireza54.barari@gmail.com
آسیه عباسی دلویی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
پروین فرزانه‌نگی: دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

ناباروری،
تمرین هوازی،
سلول‌های بنیادی،
آزواسپرمی فاکتور

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۲
تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۰۷/۱۷

زمینه و هدف: ناباروری معضلی شایع است که اهمیت سبک زندگی و عوامل ژنتیکی، در بروز آن ثابت شده است. هدف این پژوهش تعیین اثر تمرینات هوازی و سلول‌های بنیادی بر بیان ژن آزواسپرمی فاکتور در موش‌های نابارور بود.
روش کار: در این تحقیق تجربی، ۲۵ سر موش (سن ۶ تا ۸ هفته) پس از ایجاد مدل آزواسپرمی به پنج گروه کنترل سالم، آزو اسپرمی، آزو اسپرمی-تمرینات هوازی، آزو اسپرمی-سلول‌های بنیادی و آزو اسپرمی-تمرینات هوازی-سلول‌های بنیادی تقسیم شدند. مدل آزو اسپرمی با داروی بو سولفان (دوز ۴۰ میلی گرم) به صورت داخل صفاقی برای هر موش تزریق گردید. سلول‌های بنیادی به صورت پیوند در ناحیه مجرای دفران به میزان یک میلیون سلول برای هر موش پیوند زده شد. موش‌ها پس از بهبود زخم ناحیه پیوند سلولی در زمان ۴۸ ساعت، روزانه ۳۰ دقیقه در روز، ۵ روز در هفته و به مدت ۸ هفته تمرینات شنا با شدت پایین را انجام دادند. بیان ژن آزواسپرمی فاکتور (AZFa-azoospermia factor) بافت بیضه به روش Real Time PCR اندازه‌گیری شد. داده‌ها به روش تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: افزایش معنی‌داری در بیان ژن AZFa در گروه آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل سالم مشاهده شد ($P=0.001$)، میزان بیان ژن AZFa در گروه‌های تمرین هوازی، سلول‌های بنیادی و ترکیبی نسبت به گروه آزواسپرمی کاهش معنی‌داری داشت ($P=0.001$)، بیان ژن AZFa در گروه ترکیبی نسبت به گروه‌های تمرین هوازی و سلول‌های بنیادی کاهش معنی‌داری داشت ($P=0.001$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد مداخله ترکیبی تمرین هوازی و سلول‌های بنیادی می‌تواند به کاهش بیان ژن ناباروری آزو اسپرمی فاکتور بافت بیضه کمک کند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Namki M, Barari A, Abbasi Dalooi A, Farzanegi P. The Effect of Aerobic Training and Stem Cells on Gene Expression of Azoospermia Factor in Infertile Rats. Razi J Med Sci. 2023(9 Oct);30.110.

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

The Effect of Aerobic Training and Stem Cells on Gene Expression of Azoospermia Factor in Infertile Rats

Moharm Namki: PhD Student in Sport Physiology, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Alireza Barari: Associate Professor, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran (*Corresponding author) alireza54.barari@gmail.com

Asieh Abbasi Daloui: Associate Professor, Department of Sport Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Parvin Farzanegi: Associate Professor, Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Abstract

Background & Aims: Infertility is defined as the inability of couples to conceive after one year of trying to conceive, which is estimated to affect 15% of couples worldwide (1). More than half of infertility cases are male (2). Azoospermia is one of the most important factors in male infertility (7). Y chromosome deletions are one of the main genetic causes of infertility, which have been reported with a frequency of 10-15% in people with severe azoospermia and oligospermia. It is said that fertility genes are located on the Y chromosome and their absence causes infertility, and this hypothesis was later called azoospermia factor (AZFa) (8). Deletion of AZFa is associated with the complete absence of reproductive cells and Sertoli cell syndrome. Deletion of the AZF region causes special phenotypes and genes in each region are in a special stage of cell differentiation they act reproductively (10).

Recently, new guidelines for male infertility suggest that lifestyle management, including exercise, should be offered (5). Studies show that exercise can improve sperm parameters (12) and live birth outcomes (13) in male infertility. However, in Wise et al. (2011) research, it was reported that regular exercise does not affect semen parameters. In this prospective study on men, it was shown that none of the seminal parameters changed with regular exercise (15). In addition to lifestyle modification, stem cell therapy appears to be a promising treatment for infertility (16). Spermatogonial stem cells exist in all species, which maintain spermatogenesis throughout the life of a man (18). In this regard, Nasimi et al. (2018) in a study evaluated the effect of stem cell factor on the proliferation and differentiation of spermatogonial cells in the seminiferous tubules of the adult rat testis of the obstructive azoospermia model using a tissue culture system. The results showed that the stem cell increases the number of spermatogonia, spermatocytes and Leydig cells as well as the number of spermatid cells in the testicular tissue of obstructive azoospermia (19).

Environment and lifestyle can be an explanation for infertility. Consequently, it is important to focus on modifiable risk factors in this population. A better understanding of changes in the origin of the disorder in response to environmental conditions should also be a way to manage infertility. Therefore, it is necessary to identify appropriate treatment interventions for infertility. As mentioned, a significant improvement in the process of spermatogenesis and tissue indices of the testis has been observed in the samples treated with the culture medium derived from stem cells. In addition, the benefits of physical activity for the treatment of infertility diseases are known. However, the effect of exercise and stem cells on the expression of genes involved in infertility in azoospermia is not clear. Therefore, according to the mentioned cases, the current research seeks to answer the question of whether eight weeks of aerobic exercise and stem cells have aerobic training and stem cells on gene expression of azoospermia factor in infertile rats?

Methods: In this experimental study, 25 rats (age 6 to 8 weeks) after creating the azoospermia model were divided into five groups include healthy control, azoospermia, azoospermia-aerobic exercise, azoospermia-stem cells and azoospermia-aerobic exercise-stem cells. The azoospermia model was injected intraperitoneally with busulfan at a dose of 40 mg per rat. Stem cells were transplanted in the vas deferens at the rate of one million cells per rat. The rats after healing the cell transplant wound performed low-intensity swimming exercises for 30 minutes daily, 5 days a week

Keywords

Infertile,
Aerobic Training,
Stem Cells,
Azoospermia Factor

Received: 03/07/2023

Published: 09/10/2023

for 8 weeks. Azoospermia gene expression (AZFa) of testicular tissue was measured by Real Time PCR. Data were analyzed by one-way analysis of variance and Tukey post hoc test at the $P < 0.05$.

Results: A significant increase in AZFa gene expression was observed in the azoospermic group compared to the healthy control group ($P = 0.001$). The gene expression of AZFa in aerobic exercise groups, stem cells and combination were significantly reduced compared to azoospermia group ($P = 0.001$). The results showed that the gene expression of AZFa in the combination group was significantly reduced compared to the aerobic exercise groups and stem cells ($P = 0.001$).

Conclusion: The results of the present study show that by inducing the azoospermia model, the expression of the AZFa gene in the testicular tissue of rats increased significantly compared to the control group. Aerobic exercise, stem cells and combined exercise led to the decrease of AZFa gene expression in testicular tissue of azoospermic rats. The results of the current research are in line with the research of Nikbin et al. (2020) and Santos et al. (2015) (23,24). It can be concluded that exercise can help to improve spermatogenesis in groups treated with exercise, probably through the reduction of AZFa gene expression in testicular tissue. Several mechanisms have been studied to destroy the function of the H-P-G axis, including peripheral (inability to synthesize steroids in the testis) and central (change in the central stimulation of the gonads) mechanisms. In addition, other factors that are related to exercise, such as weight and body fat loss, insufficient calorie intake, increased temperature inside the scrotum, and microdamages of the testis are other mechanisms of spermatogenesis reduction (28).

On the other hand, nowadays, stem cells have been identified in different parts of the male and female reproductive system, which are part of adult stem cells, and many of these cells have the ability to differentiate and regenerate tissue. (29). The results of the present research are consistent with the research of Nasimi et al. (2018), Salem et al. (2017), Mozafar et al. Several factors play a role in regulating the properties of stem cells. In addition to the role that the microenvironment plays in terms of its three-dimensional engineering structure, the interactions between stem cells and the surrounding environment are also important. These interactions include the communication of stem cells with each other, with adjacent differentiated cells, or with binding molecules in the microenvironment. In addition, the characteristics of the extracellular matrix components, the presence of specific growth factors and various cytokines, as well as the physico-chemical characteristics of the environment (pH, ion concentration, and the presence of metabolites such as ATP) also control the behavior of stem cells (34). The results of the present study showed that the combination of aerobic exercise and stem cells had a significant effect on the AZFa gene in the testicular tissue of azoospermia model rats, so that the expression of the AZFa gene in the testicular tissue in the combined group compared to the aerobic exercise and cell groups. Therefore, it is possible that exercise in combination with cell therapy by regulating the expression of genes involved in infertility in the testicular tissue of busulfan-induced azoospermia model rats exerts its protective effect and in this way It causes fertilization of azoospermia model rats. There were also limitations in the present research, among which we can point out the small number of samples in the present research, therefore, a similar study with the measurement of these indicators in a high number of samples is suggested. In general, it is possible that the therapeutic interventions of aerobic exercise and stem cells can help to reduce infertility, however, more studies will be necessary to clarify the definitive results in this field.

The results of the present study showed that azoospermia caused a significant increase in the expression of the azoospermia factor gene, and the intervention of aerobic exercise and stem cells led to a decrease in the expression of the azoospermia infertility gene of the testicular tissue factor. Therefore, according to the results of this research, it is possible that aerobic exercise to stem cells can help to improve infertility in azoospermic samples.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Namki M, Barari A, Abbasi Dalooi A, Farzanegi P. The Effect of Aerobic Training and Stem Cells on Gene Expression of Azoospermia Factor in Infertile Rats. Razi J Med Sci. 2023(9 Oct);30.110.

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

مقدمه

ناباروری به عنوان ناتوانی زوجین در باردار شدن پس از یک سال از تلاش برای بارداری تعریف می‌شود که تخمین زده می‌شود ۱۵ درصد از زوجها را در سرا سر جهان تحت تاثیر قرار دهد (۱). بیش از نیمی از موارد ناباروری، مردانه است (۲). دلایل زیادی برای ناباروری مردان وجود دارد. سبک زندگی ناسالم و کم تحرکی می‌تواند بر ناباروری تأثیر بگذارد (۳). کم تحرکی می‌تواند خطر بالای آسیب DNA اسپرم را دو برابر کند (۴). علاوه بر این، استرس اکسیداتیویکی از علل شایع ناباروری مردان است (۵) و افزایش سیتوکین های التهابی در پلاسمای منی ارتباط نزدیکی با کاهش کیفیت اسپرم و آسیب DNA اسپرم دارد (۶). همچنین از مهم ترین عوامل موثر در فرآیند ناباروری مردان آرواسپرمی می‌باشد (۷).

حذف ها در کروموزوم Y یکی از دلایل عمده ژنتیکی ناباروری است، که با فراوانی ۱۵-۱۰ درصد در افراد آرو اسپرمی و الیگواسپرمی شدید گزارش شده است. گفته می‌شود که ژن های باروری روی کروموزوم Y قرار دارند و نبود آن ها سبب ناباروری می‌شود که این فرضیه بعدها به نام آرو اسپرمی فاکتور (AZFa - azoospermia factor) نامیده شد (۸). حذف های AZF به وسیله نو ترکیبی همولوگ و سدر و نکروموزومی بین بلوک های توالی های تکراری درون ساختار های پالیندرومی ایجاد می‌شوند (۹). حذف AZFa با غیبت کامل سلول های زایشی و با سندرم سلول های سرتولی همراه می‌شود. حذف ناحیه AZF باعث فنوتیپ های ویژه ای می‌شود و ژن ها در هر ناحیه در مرحله ویژه ای از تمایز سلول های زایشی عمل می‌کنند (۱۰). اسپرم سازی به وسیله تعدادی از ژن ها روی کروموزوم Y و اتوزوم ها تنظیم می‌شود. فراوانی حذف های کروموزوم Y باشد نقص اسپرماتوژنیک افزایش پیدا می‌کند. تقریباً ۱۵ درصد مردان آرواسپرم و ۵ تا ۱۰ درصد از مردان الیگواسپرم حذف های کروموزوم Y را نشان می‌دهند. با این وجود حذف های کروموزوم Y با آنالیز منی مشخص نمی‌شوند. بنابراین برای بررسی حذف های کروموزوم Y انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز مورد نیاز می‌باشد. مطالعات اخیر نشان دادند تنوع قابل ملاحظه ای در فراوانی حذف ها وجود دارد. حذف های AZF با مرحله ای

که اسپرماتوژنز متوقف می‌شود، ارتباط دارد. هر ناحیه AZF در مراحل مختلفی از اسپرم سازی عمل می‌کنند و حذف در هر ناحیه باعث توقف اسپرم سازی در مراحل ویژه ای می‌شود (۱۱).

اخیراً دستورالعمل های جدید برای ناباروری مردان پیشنهاد می‌کند که مدیریت سبک زندگی از جمله ورزش، باید ارائه شود (۵). مطالعات نشان می‌دهند که ورزش می‌تواند پارامتر های منی (۱۲) و پیامدهای تولد زنده (۱۳) را در ناباروری مردان بهبود بخشد. ورزش هایی که در شدت ها و تکرار های مختلف انجام می‌شوند اثرات متفاوتی بر باروری مردان و زنان دارند. یک بررسی سیستماتیک اخیر که شامل جمعیت مردان عادی، مطالعات مشاهده ای و مداخله ای بود، نشان داد که ورزش در سطوح بالا برای تحرک اسپرم مضر است اما فعالیت های بدنی تفریحی ممکن است کیفیت مایع منی را بهبود بخشد (۱۴). با این حال، در تحقیق وایس و همکاران گزارش شد که ورزش منظم بر پارامتر های مایع منی تأثیر نمی‌گذارد. در این مطالعه آینده نگر روی مردان نشان داده شد که هیچ یک از پارامتر های مایع منی با ورزش منظم تغییر نمی‌کند (۱۵).

علاوه بر اصلاح سبک زندگی، به نظر می‌رسد که درمان با سلول های بنیادی یک روش درمانی امیدوار کننده برای درمان ناباروری باشد. سلول های بنیادی، سلول های مولد پرتوان و غیر خون ساز هستند و می‌توانند به انواع مختلف سلول ها متمایز شوند (۱۶). در قسمت های مختلف سیستم تولید مثل مردان و زنان سلول های بنیادی شناسایی شده اند که جزء سلول های بنیادی بالغین هستند که بسیاری از این سلول ها توانایی تمایز و بازسازی یا نوسازی بافتی که را دارا می‌باشند (۱۷). سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا ل در همه گونه ها وجود دارد که سبب حفظ اسپرماتوژنز در تمام طول عمر یک مرد می‌شوند (۱۸). در همین رابطه نسیمی و همکاران در پژوهشی اثر فاکتور سلول بنیادی بر تکثیر و تمایز سلول های اسپرماتوگونی در لوله های اسپرم ساز بیضه موش بالغ مدل آرو اسپرمی انسدادی با استفاده از سیستم کشت بافت مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که سلول بنیادی تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و لایدیگ و همچنین تعداد سلول اسپرماتید در بافت بیضه آرواسپرمی انسدادی را افزایش

می دهد (۱۹).

محیط و سبک زندگی می تواند توضیحی برای ناباروری باشد. در نتیجه، تمرکز بر عوامل خطر قابل اصلاح در این جمعیت مهم است. درک بهتر تغییرات منشاء اختلال در پاسخ به شرایط محیطی نیز باید راهی برای مدیریت ناباروری باشد. بنابراین، شناسایی مداخلات درمانی مناسب برای نابارور ضروری است. همانطور که ذکر شده بود قابل توجه فرایند اسپرماتوژنز و شاخص های بافتی بیضه در نمونه های تحت درمان با محیط کشت حاصل از سلول های بنیادی مشاهده شده است. علاوه بر این، مزایای فعالیت بدنیه منظور درمان بیماری های ناباروری شناخته می شود. با این حال اثر تمرین و سلول های بنیادی بر بیان ژن های درگیر در ناباروری در آرواسپرمی مشخص نیست. بنابراین با توجه به موارد یاد شده تحقیق حاضر به دنبال پاسخ به این سوال است که آیا هشت هفته تمرینات هوازی و سلول های بنیادی بر بیان ژن آرواسپرمی فاکتور (AZFa) در موش های نابارور تاثیر دارد؟

روش کار

پژوهش حاضر، یک مطالعه تجربی می باشد. این مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1398.149 به ثبت رسیده است. نمونه آماری این پژوهش شامل موش های صحرایی نر نژاد ویستار با سن حدود ۶ تا ۸ هفته بودند که از بین آن ها ۲۵ سر موش از مرکز پژوهش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی تهران خریداری و پس از انتقال به محیط آزمایشگاه و آشنایی با محیط جدید پس از دو هفته و ایجاد مدل آرواسپرمی، موش ها به صورت تصادفی و به تعداد مساوی ۵ سر موش در هر گروه به پنج گروه شامل کنترل سالم (۵ سر)، آرواسپرمی (۵ سر)، آرواسپرمی + تمرین هوازی (۵ سر)، آرواسپرمی + سلول بنیادی (۵ سر) و آرواسپرمی + تمرین هوازی + سلول بنیادی (۵ سر) تقسیم شدند. حجم نمونه مطالعه حاضر بر اساس نتایج تحقیقات پیشین، در سطح معنی داری ۵ درصد (خطای نوع اول) و توان آماری ۹۵٪ (خطای نوع دوم) و با استفاده از نرم افزار Medcalc 18.2.1 (۵ سر در هر گروه) تعیین

شد. معیار انتخاب به مطالعه حاضر شامل نر بودن موش ها و قرار گرفتن در محدوده وزنی مورد نظر بود. معیار خروج از مطالعه عدم اجرای پروتکل تمرینی، مونث بودن و آسیب حین اجرا تمرین بود. پس از انتقال آزمودنی ها به محیط آزمایشگاه و پس از یک هفته سازگاری با محیط جدید، به صورت گروه های ۵ تایی در قفس های پلی کربنات شفاف در محیطی با میانگین دمای $22 \pm 1/4$ درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۵ درصد و چرخه ی تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی بین المللی سلامت و پروتکل های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد. همچنین حیوانات در طی پژوهش از غذای پک ساخت شرکت بهپرور کرج روزانه به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن (با توجه به 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 و خاک) در نظر گرفته شد که به ارتفاع ۳ تا ۵ سانتی متر از کف قفس قرار داده شد و دوبار در هفته در تمام دوره پژوهش تعویض انجام شدند.

به منظور ایجاد مدل آرواسپرمی، ابتدا موش های بالغ با میانگین وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. سپس داروی بوسولفان با دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش ها به صورت داخل صفاقی برای هر موش تزریق گردید (۲۰). پس از گذشت یک ماه از القا مدل موش ها به گروه های ذیل 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 + ورزش (یک ماه بعد از ایجاد موش های آرواسپرمی به مدت ۸ هفته، به صورت روزانه به مدت ۳۰ دقیقه در روز ۵ روز در هفته شنا انجام دادند)؛ گروه کنترل بیمار + سلول (یک ماه بعد از ایجاد موش های آرواسپرمی یک بار سلول های بنیادی به صورت پیوند در ناحیه مجران دفران به میزان یک میلیون سلول برای هر موش در

بیضه سمت راست پیوند زده شد و موش‌ها تا پایان مطالعه به مدت ۸ هفته نگهداری شدند) و گروه کنترل بیمار + سلول + ورزش (یک ماه بعد از ایجاد موش‌های آزواسپرمی یک بار سلول‌های بنیادی به صورت پیوند در ناحیه مجرای دفران به میزان یک میلیون سلول برای هر موش پیوند زده شد. پس از بهبود زخم ناحیه پیوند سلولی بر روی شکم، به صورت رزوانه تمرینات شنا را انجام دادند).

برنامه‌ی تمرینی: آزمودنی‌های گروه مداخله ورزشی قبل از شروع پروتکل اصلی، به مدت یک هفته (۵ روز) هر بار به مدت مدت ۲۰ دقیقه به منظور آشنایی‌ها با آب و کاهش استرس شنا و سازگاری با شرایط تمرینی، در داخل استخر آب قرار می‌گرفتند. سپس ۵ روز در هفته تا پایان دوره تحقیق در یک مخزن آب به ابعاد ۵۰×۵۰×۱۰۰ سانتی‌متری با درجه حرارت ۳۲-۳۰ درجه سانتی‌گراد در طی ۸ هفته به شنا پرداختند. مدت زمان تمرین در آب، روزانه ۳۰ دقیقه تا پایان مدت تمرین بود و شدت تمرین نیز با تنظیم شدت پمپاژ آب در استخر تنظیم گردید (۲۱).

روش بافت برداری و اندازه‌گیری متغیرها: پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، به منظور از بین بردن اثرات حاد تمرین) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین (۶۰ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند. بافت مورد نظر بلافاصله پس از جداسازی و شست و شو با سالیین فوراً در تیوب‌های حاوی RNA later جهت جلوگیری از تخریب RNA قرار داده شده و به نیتروژن مایع منتقل و سپس در یخچال در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد. برای جلوگیری از تأثیر ریتم شبانه‌روزی، نمونه‌گیری از ساعت ۸ آغاز شده و در ساعت ۱۱:۳۰ دقیقه به پایان می‌رسید. جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت کبد با استفاده از تیزاژول، انجام گرفت، سپس با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با کمک رابطه زیر غلظت و درجه خلوص

نمونه RNA به صورت کمی بدست آمد.

$$C = A260 \times \epsilon \times d / 1000$$

(میکرو گرم/میکرولیتر)

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بسیار بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت (۲۲). ابتدا پرایمرهای طراحی شده، مربوط به ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت، و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام پذیرفت. برای کنترل داخلی از β -mRNA actin استفاده شد. پروتکل چرخه حرارتی مورد استفاده Real time-PCR شامل: ۹۵° به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵° به مدت ۱۰ ثانیه، و به دنبال آن ۴۵ سیکل ۱۰° ثانیه‌ای در حرارت ۶۰° بود. نسبت بیان ژن مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle: CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای اطمینان از طبیعی بودن توزیع متغیرها، از آزمون شاپیرو ویلکاستفاده شد. بعد از این که طبیعی بودن توزیع داده‌ها مشخص گردید، جهت بررسی مقایسه میانگین تغییرات متغیرهای تحقیق از تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی داری در همه موارد $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با نرم افزارهای SPSS با نسخه ۲۶ به اجرا درآمد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار وزن گروه‌ها و سطح بیان ژن AZFA در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که تفاوت معنی داری در وزن موش‌ها در گروه‌های مختلف وجود نداشت ($P < 0.05$).

نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه داده‌های مربوط به سطح بیان ژن AZFA با توجه به میزان $F = 39.229$ و $P = 0.001$ اختلاف معنی داری را بین گروه‌های کنترل سالم، آزواسپرمی، آزواسپرمی-تمرینات هوازی، آزواسپرمی-سلول‌های بنیادی و آزواسپرمی-تمرینات هوازی-سلول‌های بنیادی مشاهده گردید (جدول ۲).

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار وزن و سطح بیان ژن AZFa گروه های مختلف تحقیق

گروه	کنترل	مدل آرواسپرمی	تمرین هوازی	سلول های بنیادی	ترکیبی
وزن (گرم)	۲۰۵/۵±۲۰/۱	۲۰۵/۲±۱۸/۲	۲۰۲/۵±۱۴/۸	۲۱۰/۱±۶/۱۳	۲۰۳/۱±۷/۰۵
AZFa (U/mg protein)	۰/۰±۵۳/۱۲	۳/۰±۰۳/۲۸	۱/۰±۸۲/۷۹	۲/۰±۲۳/۳۴	۰/۰±۸/۲۲

جدول ۲- نتایج آزمون تحلیل واریانس مربوط به بیان ژن AZFa در گروه های مختلف

متغیر	مجموع مجزورات	درجات آزادی	میانگین مجزورات	نسبت F	سطح معناداری
AZFa	۲۹/۳۶۶	۵	۵/۸۷۳	۳۹/۲۲۹	۰/۰۰۱ *
بین گروه ها					
درون گروه	۴/۴۹۱	۳۰	۰/۱۵		
مجموع	۳۳/۸۵۷	۳۵			

جدول ۳- خلاصه نتایج آزمون توکی تغییرات بیان ژن AZFa در گروه های مختلف

گروه	گروه	اختلاف میانگین	سطح معناداری
کنترل	مدل آرواسپرمی	-۲/۴۹	* ۰/۰۰۱
	تمرین هوازی	-۱/۲۹	* ۰/۰۱
	سلول های بنیادی	-۱/۷	* ۰/۰۰۱
	ترکیبی	-۰/۲۷	۰/۸۲۹
مدل آرواسپرمی	تمرین هوازی	۱/۲	* ۰/۰۰۱
	سلول های بنیادی	۰/۷۹	* ۰/۰۱۵
	ترکیبی	۲/۲۲	* ۰/۰۰۱
تمرین هوازی	سلول های بنیادی	-۰/۴۱	۰/۴۵۱
	ترکیبی	۱/۰۲	* ۰/۰۰۱
سلول های بنیادی	ترکیبی	۱/۴۳	* ۰/۰۰۱

* تفاوت معنی دار

نتایج آزمون تعقیبی نشان داد بیان ژن AZFa در گروه آرواسپرمی نسبت به گروه کنترل سالم به طور معنی داری بیشتر بود ($P=0/001$). میزان بیان ژن AZFa در گروه های تمرین هوازی ($P=0/001$)، سلول های بنیادی ($P=0/015$) و ترکیبی ($P=0/001$) نسبت به گروه آرواسپرمی به طور معنی داری کمتر بود. همچنین بیان ژن AZFa در گروه ترکیبی نسبت به گروه های تمرین هوازی و سلول های بنیادی به طور معنی داری کمتر بود ($P=0/001$) (جدول ۳).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان می دهد که با القای مدل آرواسپرمی بیان ژن AZFa بافت بیضه در موش ها نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت. تمرین هوازی، سلول های بنیادی و ترکیبی منجر به کاهش بیان ژن AZFa بافت بیضه موش های آرواسپرمی شد.

محققان تاکنون تحقیقی را که محتوای بیان ژن AZFa بافت بیضه در آزمودنی های آرواسپرمی اندازه گیری کرده باشند، مشاهده نکردند. با این حال، نتایج نیکبین و همکاران نشان می دهد که ورزش هوازی می تواند آسیب های بیضه ناشی از کلرپیرفوس را در موش های صحرایی کاهش دهد (۲۳). سانتوس و همکاران نیز در پژوهشی نشان دادند که مداخله ورزشی تأثیرات مفیدی بر شاخص چربی، چربی غدد جنسی، مارکرهای استرس اکسیداتیو، کیفیت اسپرم و باروری دارد (۲۴). نتایج پژوهش حاضر با تحقیق نیکبین و همکاران سانتوس و همکاران همسو است (۲۳ و ۲۴). در پژوهش حاضر نیز مشخص شد که بیان ژن AZFa بافت بیضه در گروه تمرین در مقایسه با گروه آرواسپرمی کمتر است. از این یافته می توان نتیجه گرفت که اعمال تمرین احتمالاً از طریق کاهش بیان ژن AZFa بافت بیضه می تواند به بهبود اسپرماتوژنز در گروه های درمان با تمرین کمک

کند. با این حال مخالف با نتایج تحقیق حاضر، شواهدی نیز وجود دارد که ورزش طولانی مدت بر کیفیت اسپرم و پتانسیل تولید مثل تأثیر منفی می‌گذارد در همین زمینه مشاهده شده است که ورزش شدید و طولانی مدت ممکن است منجر به اثرات نامطلوب بر سیستم‌های فیزیولوژیکی، به‌ویژه، سیستم تولید مثل و باروری با تغییرات در سطوح هورمون‌های تولید مثلی، آتروفی اپیتلیوم ژرمینال بیضه و اثرات نامطلوب بر اسپرم زایی، تغییر در پارامترهای مایع منی شامل مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم و کاهش تحرک اسپرم شود (۲۵-۲۷). تفاوت‌ها در نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های فوق می‌تواند به نوع تمرینات انجام شده و همچنین نوع آزمودنی‌ها و بیمار بودن آن‌ها باشد. مطالعات زیادی در ارتباط با اثرات فعالیت بدنی روی سیستم تولید مثلی در انسان‌ها انجام شده است. اما اکثراً این مطالعات بر روی زنان انجام شده است. مکانیسم‌های متعددی برای تخریب عملکرد محور H-P-G مورد مطالعه قرار گرفته است که شامل مکانیسم‌های محیطی (نا توانی در سنتز استروئیدها در بیضه) و مرکزی (تغییر تحریکات مرکزی گونادها) می‌باشد. به علاوه فاکتورهای دیگری که وابسته به ورزش می‌باشد مثل کاهش وزن و چربی بدن، دریافت کالری ناکافی، افزایش دمای درون اسکروتوم و آسیب‌های ریز بیضه از دیگر مکانیسم‌های کاهش اسپرماتوژنز می‌باشد (۲۸). بررسی تأثیر ورزش روی عملکرد بیضه‌ای بحث‌انگیز است چرا که اکثر مطالعات انجام گرفته در نوع، شدت و مدت تمرین به طور معناداری متفاوت هستند. بنابراین افزایش یا کاهش میزان عوامل دخیل در تولید مثل که در تحقیقات مختلف مشاهده می‌شود باید با توجه به این متغیرها لحاظ شود.

از طرفی، امروز هدر قسمت‌های مختلف سیستم تولیدمثل مردان و زنان سلول‌های بنیادی شناسایی شده‌اند که جزء سلول‌های بنیادی بالغین هستند که بسیاری از این سلول‌ها توانایی تمایز و بازسازی یا نوسازی بافتی را دارا می‌باشند (۲۹). نتایج پژوهش حاضر با تحقیق نسیمی و همکاران، سالم و همکاران، مظفر و همکاران همسو است (۳۱، ۳۰، ۱۹). نسیمی و

همکاران در پژوهشی اثر فاکتور سلول بنیادی و رتینوئیدها بر تکثیر و تمایز سلول‌های اسپرماتوگونی در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه موش‌بالغ مدل آزواسپرمی انسدادی با استفاده از سیستم کشت بافت مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و لایدیگ در روز ۲۵، ۳۰ و ۳۵ کشت و همچنین تعداد سلول اسپرماتید گرد و دراز در روز ۳۵ کشت در بافت بیضه آزواسپرمی انسدادی در مقایسه با گروه‌های تجربی و کنترل افزایش معنی‌دار داشتند (۳۰). در پژوهش سالم و همکاران پتانسیل تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف و سلول‌های بنیادی مغز استخوان مورد مقایسه قرار گرفت تا سلول بنیادی مناسبی، به منظور تمایز به سلول‌های زایا معرفی شود. در صد زیستایی در سلول‌های بنیادی مغز استخوان بیشتر بود و با افزایش تعداد پاساژ، سرعت تکثیر سلول‌ها در این گروه افزایش یافت. تعداد کلنی‌های ایجاد شده در سلول‌های بنیادی مغز استخوان نسبت به سلول‌های بنیادی بندناف، به طور معنی‌داری بیشتر بود در مقابل بیان ژن‌های PLZF، OCT4 و SCP3 در سلول‌های بنیادی بند ناف، پس از گذشت ۱۰ روز از کشت مشاهده شد، ولی در سلول‌های بنیادی مغز استخوان، بیان ژن‌های PLZF و SCP3 فقط پس از گذشت ۱۵ روز از کشت قابل مشاهده بود (۱۹). مظفر و همکاران بهبود قابل توجه فرایند اسپرماتوژنز و شاخص‌های بافتی بیضه در نمونه‌های تحت درمان با محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نسبت به گروه آزواسپرمیک القا شده را نشان دادند. هم‌راستا پژوهش‌های دیگری نیز در حیواناتی نظیر همستر و موش بیانگر بهبود قابل ملاحظه فرایند اسپرماتوژنز در اثر درمان با سلول بنیادی بود (۳۱). سلول‌های سرتولی به عنوان تنها سلول‌های سوماتیک موجود در لوله‌های اسپرم‌ساز در واکنش مستقیم با سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی از طریق ترشح فاکتورهای رشد مانند فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از گلیال، فاکتور رشد فیروبلست، پروتئین ریخت‌شناسی استخوان، فاکتور سلول بنیادی و فاکتور رشد اپیدرمی سیگنال‌های پاراکرین در تشکیل آشیانه و تعادل بین

اشاره کرد؛ لذا، مطالعه‌ای مشابه با اندازه‌گیری این شاخص‌های در تعداد نمونه‌های بالا پی‌شنهاد می‌شود. همچنین پیشنهاد می‌شود که تحقیقی مشابه با اندازه‌گیری بیان ژن‌های ناباروری متعاقب پروتکل‌های تمرینی با شدت‌های مختلف انجام شود. در مجموع، نتایج این تحقیق می‌تواند اثر مثبت تمرینات بدنی و تزریق سلول‌های بنیادی را در در مان ناباروری در نمونه‌های حیوانی نشان دهد و نیاز به تحقیقات بیشتری در نمونه‌های انسانی خواهد بود.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که آرواسپرمی موجب افزایش معنی‌دار در بیان ژن آرواسپرمی فاکتور شد. همچنین مداخله تمرین هوازی و سلول‌های بنیادی منجر به کاهش بیان ژن ناباروری آرواسپرمی فاکتور بافت بیضه شد. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق، احتمالاً تمرین هوازی به سلول‌های بنیادی بتواند به بهبود ناباروری در نمونه‌های آرواسپرمی کمک کند.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با تایید کمیته اخلاق در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی با شماره IR.IAU.SARI.REC.1398.149 انجام شد. بدین وسیله از کلیه افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Fertil Steril. 2013;99:63.
2. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. Hum Reprod Update. 2015;21:411–26.
3. Jiang H, Deng CH. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chinese Male Diseases and Expert Consensus (2016 Version). Beijing: People's Medical Publishing House; 2017.
4. Gill K, Jakubik J, Kups M, et al. The impact of sedentary work on sperm nuclear DNA integrity. Folia Histochem Cytobiol. 2019;57:15–22.
5. Agarwal A, Parekh N, Paner Selvam MK, et al.

تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی نقش مرکزی دارند (۳۲). پتانسیل سلول‌های بنیادی برای تمایز به سلول‌های بالغ دودمان و بیش از همه گسترش خصوصیات درونی و تنظیم کننده سیستم ایمنی را ممکن می‌کند (۳۳). بنابراین آنها را به ابزاری مهم در سلول درمانی، تبدیل می‌کند. عوامل متعددی در تنظیم خصوصیات سلول‌های بنیادی نقش دارند. علاوه بر نقشی که ریزمحیط از لحاظ ساختار مهندسی سه بعدی خود ایفا می‌نماید، تقابلات موجود بین سلول‌های بنیادی و محیط اطراف نیز حائز اهمیت است. این تقابلات شامل ارتباط سلول‌های بنیادی با همدیگر، با سلول‌های تمایز یافته‌ی مجاور و یا با مولکول‌های اتصال‌ی موجود در ریزمحیط می‌باشد. به علاوه خصوصیات اجزای ماتریکس خارج سلولی، حضور فاکتورهای رشد اختصاصی و سایتوکاین‌های مختلف، همچنین خصوصیات فیزیکی- شیمیایی محیط شامل pH، غلظت یونی و حضور متابولیت‌هایی مانند ATP) نیز رفتار سلول‌های بنیادی را تحت کنترل قرار می‌دهد (۳۴). یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که درمان با سلول‌های بنیادی ممکن است به تنظیم عامل بیان ژنی درگیر در ناباروری در مدل آرواسپرمی کمک کند. تحقیقی که اثر ترکیبی تمرینات هوازی، سلول‌های بنیادی را در بیان ژن‌های درگیر در ناباروری بررسی کرده باشد یافت نشد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ترکیب تمرینات هوازی و سلول‌های بنیادی تأثیری قابل ملاحظه‌ای بر ژن AZFa بافت بیضه موش‌های مدل آرواسپرمی داشت؛ به طوری که بیان ژن AZFa بافت بیضه در گروه ترکیب نسبت به گروه‌های تمرین هوازی و سلول‌های بنیادی به طور معنی‌داری کمتر بود. لذا، ممکن است تمرینات ورزشی در ترکیب با سلول درمانی با تنظیم بیان ژن درگیر در ناباروری در بافت بیضه موش‌های مدل آرواسپرمی القاء شده با بوسولفان اثر حفاظتی خود را اعمال نماید و به این طریق سبب بارور شدن موش‌های مدل آرواسپرمی شود ولی اظهار نظر قطعی نیازمند پژوهش بیشتر در این زمینه می‌باشد. محدودیت‌هایی نیز در تحقیق حاضر وجود داشت که از جمله می‌توان به تعداد کم نمونه‌ها در تحقیق حاضر

Male oxidative stress infertility (MOSI): proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. *World J Mens Health*. 2019;37:296–312.

6. Fraczek M, Szumala-Kakol A, Dworacki G, et al. In vitro reconstruction of inflammatory reaction in human semen: effect on sperm DNA fragmentation. *J Reprod Immunol*. 2013;100:76–85.

7. Ernst, C., Eling, N., Martinez-Jimenez, C.P. et al. Staged developmental mapping and X chromosome transcriptional dynamics during mouse spermatogenesis. *Nat Commun*. 2019;10:1251.

8. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod*. 2010;12:417–35.

9. Huynh T, Mollard R, Trounson A. Slected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod*. 2002;8:183-98.

10. Krausz C, Rajpert-De Meyts E, Frydelund-Larsen L, Quintana-Murci L, McElreavey K, Skakkebaek NE. Double - blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: Microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:2636-42.

11. Spiridonov N, Wong L, Zervas P, Starost F, Pack S, Paweletz C. Identification and characterization of SSTK, a serin/threonine protein kinase essential for male infertility. *Mol Cell Biol*. 2005;10:4250-61.

12. Tolahunase M, Bisht S, Sagar R, et al. Effect of yoga on quality of life and seminal quality in male infertility patients with major depressive disorder (MDD): randomized controlled trial. *Andrology*. 2016;4:112.

13. Maleki BH, Tartibian B. High-intensity exercise training for improving reproductive function in infertile patients: a randomized controlled trial. *J Obstet Gynaecol Can*. 2017;39:545–58.

14. Ibanez-Perez J, Santos-Zorrozuza B, Lopez-Lopez E, et al. An update on the implication of physical activity on semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2019;299:901–21.

15. Wise LA, Cramer DW, Hornstein MD, Ashby RK, Missmer SA. Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril*. 2011;95(3):1025–30.

16. Weir GC, Cavelti-Weder C, Bonner-Weir S. Stem cell approaches for diabetes: towards beta cell replacement. *Genome Med*. 2011;3(9):61–61.

17. Kyurkchiev S, Gandolfi F, Hayrabyan S, Brevini TA, Dimitrov R, Fitzgerald JS, Jabeen A, Mourdjeva M, Photini SM, Spencer P, Fernández N, Markert UR. Stem cells in the reproductive system. *Am J Reprod Immunol*. 2012;67(6):445-62.

18. Du H, Taylor HS. Stem cells and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2010;22(3):235-41.

19. Nasimi, M, Fattahi, I, Joursarai, SGA, Gholami Tabar T, Maryam, Z Neyshabouri, E. Influence of

stem cell factor and retinoids on the differentiation of spermatogonia cells of adult rat testicular model of obstructive azoospermia. *J Anim Biol*. 2019;12(2):83-97

20. Baazm M, Darabi M R, Babaie S, Talebi R. Improvement in Sperm Parameters with Gonadotropin-Releasing Hormone Analogue in Busulfan Treated Prepubertal Mice. *J Arak Uni Med Sci*. 2014;16(10):11-18.

21. Montenegro ML, Bonocher CM, Meola J, Portella RL, Ribeiro-Silva A, Brunaldi MO, Ferriani RA, Rosa-E-Silva JC. Effect of Physical Exercise on Endometriosis Experimentally Induced in Rats. *Reprod Sci*. 2019;26(6):785-793.

22. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.

23. 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.

24. Santos M, Rodríguez-González GL, Ibáñez C, Vega CC, Nathanielsz PW, Zambrano E. Adult exercise effects on oxidative stress and reproductive programming in male offspring of obese rats. *American journal of physiology. Regul Integr Compar Physiol*. 2015;308(3):219–225.

25. Fitzgerald LZ, Robbins WA, Kesner JS, Xun L. Reproductive hormones and interleukin-6 in serious leisure male athletes *Eur J Appl Physiol*. 2012;112(11):3765-3773

26. Manna I, Jana K, Samanta PK. Effect of different intensities of swimming exercise on testicular oxidative stress and reproductive dysfunction in mature male albino Wistar rats *Indian J Exp Biol*. 2004;42(8):816-822

27. Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, García-Manso JM, Vaamonde-Lemos R, Swanson RJ, Oehninger SC. Response of semen parameters to three training modalities *Fertil Steril*. 2009; 92 (6):1941-1946

28. Hackney AC. Effects of endurance exercise on the reproductive system of men: The "exercise-hypogonadal male condition". *J Endocrinol Invest*. 2008;31(10):932-938.

29. Kyurkchiev S, Gandolfi F, Hayrabyan S, Brevini TA, Dimitrov R, Fitzgerald JS, Jabeen A, Mourdjeva M, Photini SM, Spencer P, Fernández N, Markert UR. Stem cells in the reproductive system. *Am J Reprod Immunol*. 2012;67(6):445-62.

30. Salem Maryam, Mirzapour Toobi, Bayrami Abolfazl, Ghaem Maghami Roghayeh. Comparison of differentiation and proliferation potential of bone marrow mesenchymal stem cells and Wharton's umbilical cord jelly in germ cell production. *Biopathol Res (Modares Medical Sciences)* Winter

2016;22(1):41-50.

31. 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.

32. Du H, Taylor HS. Stem cells and reproduction. Curr Opin Obstet Gynecol. 2010 Jun;22(3):235-41.

33. Le Blanc K., Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. Am Soc Blood Marrow Trans. 2005;11:321–334.

34. Sujata L, Chaudhuri S. Stem Cell Niche, the Microenvironment and Immunological Crosstalk. Cell Mol Immunol. 2008;5(2):107-12.