Archive

ORIGINAL ARTICLE

Protective Effect of Pentoxifylline on Sperm and Biochemical Parameters against Dexamethasone-Induced Toxicity in Mice

Monireh Mahmoodi[1],
Malek Soleimani Mehranjani[2],
Nasrin Kheradmand[3]

[1] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
[2] Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
[3] MSc in Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

(Received January 1, 2019 ; Accepted April 5, 2020)

Abstract

Background and purpose: Nowadays, the side effects of chemical drugs such as dexamethasone, as a steroidal anti-inflammatory factor, is considered on reducing male reproductive potential. The aim of this study was to evaluate the effect of pentoxifylline on sperm parameters and biochemical factors in mice treated with dexamethasone.

Materials and methods: In this study, 24 adult male NMRI mice (35±2gr) were randomly divided into four groups (n=6 per group): control, dexamethasone (7mg/kg/day), pentoxifylline (200mg/kg/day), and dexamethasone + pentoxifylline. After 7 days of intraperitoneal treatments, sperm parameters and oxidative stress factors were measured. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test.

Results: Compared to the control group, sperm count, progressive motility percentage, viability, sperm tail length (STL), daily sperm production (DSP), and total antioxidant capacity (TAC) significantly decreased in dexamethasone group ($P<0.001$), while plasma MDA level showed significant increase ($P<0.001$). These parameters did not show significant differences between the control group and the group that received dexamethasone + pentoxifylline ($P> 0.05$). Assessment of DNA integrity showed that dexamethasone had no effect on denaturation of the sperm DNA double-stranded structure.

Conclusion: According to this study, pentoxifylline could prevent the adverse effects of dexamethasone on sperm parameters, biochemical factors, and daily sperm production by reducing oxidative stress.

Keywords: dexamethasone, pentoxifylline, sperm, oxidative stress, mice

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (185): 113-124 (Persian).

* **Corresponding Author: Monireh Mahmoodi -** Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran
(E-mail: m-mahmoodi@araku.ac.ir)

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 185 خرداد سال 1399 (124-113)

اثر حفاظتی پنتوکسی‌فیلین بر پارامترهای اسپرمی و بیوشیمیایی در برابر سمیت ناشی از دگزامتازون در موش

منیره محمودی[1]
ملک سلیمانی مهرنجانی[2]
نسرین خردمند[3]

چکیده

سابقه و هدف: امروزه عوارض جانبی داروهای شیمیایی از جمله دگزامتازون به عنوان یک فاکتور ضدالتهاب استروئیدی بر کاهش توان تولیدمثلی مردان مورد توجه است. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر پنتوکسی‌فیلین بر پارامترهای اسپرمی و فاکتورهای بیوشیمیایی در موش‌های تیمار شده با دگزامتازون بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، 24 سر موش نر بالغ نژاد Naval Medical Research Institute (NMRI) (2±35 گرم) به صورت تصادفی در 4 گروه 6 تایی شامل گروه کنترل، دگزامتازون (7mg/kg/day)، پنتوکسی‌فیلین (200mg/kg/day) و دگزامتازون به علاوه پنتوکسی‌فیلین تقسیم شدند. پس از 7 روز تیمار داخل صفاقی، پارامترهای اسپرمی و فاکتورهای استرس اکسیداتیو سنجش شد. داده‌ها با روش آماری One-Way ANOVA و تست توکی آنالیز شدند.

یافته‌ها: تعداد اسپرم، درصد حرکت پیش‌رونده، قابلیت حیات، طول دم و تولید روزانه اسپرم و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/001$). در حالی که سطح مالون‌دی‌آلدئید سرم به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($P<0/001$). پارامترهای فوق در گروه تیمار همزمان پنتوکسی‌فیلین و دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$). ارزیابی تمامیت DNA نشان داد که دگزامتازون تاثیری بر روی دناتوره شدن ساختمان دورشته‌ای DNA اسپرم ندارد.

استنتاج: بر اساس این مطالعه، پنتوکسی‌فیلین توانست با کاهش استرس اکسیداتیو از اثرات مضر دگزامتازون بر پارامترهای اسپرمی، فاکتورهای بیوشیمیایی و تولید روزانه اسپرم ممانعت کند.

واژه های کلیدی: دگزامتازون، پنتوکسی‌فیلین، اسپرم، استرس اکسیداتیو، موش

مقدمه

حدود 10 تا 15درصد زوجین در سراسر دنیا از مشکلات ناباروری رنج می‌برند و نیمی از این مشکلات، مربوط به اختلالات ناباروری در مردان است(1،2). از طرفی نیز حدود 30 تا 80 درصد علت ناباروری مردان ناشی از اثرات مخرب استرس اکسیداتیو می‌باشد(2). بنابراین مصرف تعدادی از داروها می‌تواند از طریق تولید

مولف مسئول: منیره محمودی - گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران E-mail: m-mahmoodi@araku.ac.ir
1. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران
2. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران
3. کارشناسی ارشد زیست شناسی جانوری (گرایش سلولی - تکوینی)، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران
تاریخ دریافت : 1398/10/11 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1398/10/17 تاریخ تصویب : 1399/1/17

www.SID.ir

Archive of SID

رادیکال‌های آزاد و اکسیداسیون سلول‌های جنسی در بافت بیضه و در نتیجه کاهش تولید، تراکم و توقف بلوغ اسپرم در بروز ناباروری دخیل باشند(3). دگزامتازون یک گلوکوکورتیکوئید مصنوعی است که به‌علت دارابودن اثرات ضدالتهابی و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی به‌طور گسترده‌ای در درمان التهاب، اختلالات خودایمنی و آلرژیک، لوسمی، حالت تهوع، نارسایی غده فوق کلیوی، درد مفاصل و سرطان‌های لنفاوی استفاده می‌شود.همچنین دامنه گسترده درمانی این ترکیبات موجب شده است که در سال‌های اخیر تجویز بیش از حد این داروها توسط پزشکان صورت گیرد(5،4). مطالعات نشان داده است که افزایش غلظت گلوکوکورتیکوئیدها با تأثیر بر هیپوفیز قدامی و بیضه‌ها باعث مهار ترشح تستوسترون می‌شود(6،4،3) و از آن‌جایی‌که وجود تستوسترون برای عملکرد طبیعی و بقای سلول‌های جنسی در لوله‌های منی‌ساز ضروری است، موقعی که محیط بیضه نتواند فرایند اسپرماتوژنزیس را حمایت کند، مسیرهای ویژه‌ای که به آپوپتوز سلول‌های جنسی منجر می‌شود فعال می‌گردند و تشدید غیرنرمال آپوپتوز سلول‌های جنسی ممکن است موجب عدم تعادل در تکثیر و مرگ سلولی و در نتیجه اختلال در فرایند اسپرماتوژنز شود(6،4). بنابراین گلوکوکورتیکوئیدها از طریق عملکرد مستقیم بر روی سلول‌های لیدیگ (تاثیر بر روی P450scc، 3βHSD و P450c17) و عملکرد غیرمستقیم بر روی هیپوتالاموس و غده هیپوفیز، استروئیدوژنزیس بیضه را مهار می‌کنند(5) که می‌تواند در نهایت منجر به ناباروری گردد.

پنتوکسی‌فیلین (Pentoxifylline, PTX) یک مشتق متیل‌گزانتینی با ویژگی‌های هموروئولوژی متعدد می‌باشد که بر روی گزانتین اکسیداز به‌عنوان محرک تشکیل رادیکال آزاد اکسیژن در سلول، اثرات مهاری دارد(8،7). از طرفی اثر آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی پنتوکسی‌فیلین در مطالعات متعددی نشان داده شده است(10،9،7). پنتوکسی‌فیلین همچنین به‌عنوان یک مهارکننده فسفودی‌استراز، آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP[1]) داخل سلولی را افزایش، آنیون‌های سوپراکسید را کاهش و فاکتور نکروز تومور-α (TNFα[2])، IL-1، IL-6 و TGF-β را مهار می‌کند(11،10،7). مطالعات دیگر حاکی از آن است که پنتوکسی‌فیلین همچنین منجر به مهار احتقان، فعال‌سازی گرانولوسیت‌های نوتروفیل، کاهش ویسکوزیته خون، افزایش فشار اکسیژن، از بین بردن رادیکال‌های آزاد، مهار بیان NF-κB mRNA کاهش آپوپتوز سلول می‌شود(8). در درمان ناباروری، پنتوکسی‌فیلین ابتدا جهت افزایش خون بیضه‌ای مصرف می‌شد(12) اما در چند سال اخیر مطالعات متعددی نقش موثر پنتوکسی‌فیلین را در بهبود عملکرد اسپرم و ناباروری مردان نشان داده‌اند(13،11،10). به‌طوری‌که این دارو در موارد کلینیکی برای جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن وکاهش پراکسیداسیون لیپیدی‌که منجر به آپوپتوز و آسیب غشای اسپرم می‌شوند، استفاده می‌گردد(11). بنابراین پنتوکسی‌فیلین بخاطر ویژگی آنتی‌اکسیدانتی‌اش که به‌عنوان یک جاروب کننده ROS عمل می‌کند، تحریک‌کننده اسپرم در نظر گرفته می‌شود(11). از آن‌جایی‌که cAMP در کنترل تحرک اسپرم و تنظیم واکنش آکروزومی دخیل است(11)، پنتوکسی‌فیلین با مهار تجزیه آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) باعث ایجاد گلیکولیز سلولی و تولید آدنوزین‌تری فسفات (ATP) اندوژن می‌شود که موتیلیتی اسپرم را تحریک و بر توانایی لقاح تاثیر می‌گذارد(13). بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر پنتوکسی‌فیلین بر پارامترهای اسپرمی، فاکتورهای استرس اکسیداتیو، طول دم اسپرم، تولید روزانه اسپرم و ارزیابی تمامیت DNA در موش تیمار شده با دگزامتازون بود.

1. cyclic adenosine monophosphate
2. Tumor Necros Factor alpha

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه، 24 سر موش نر بالغ نژاد (NMRI[3]) با میانگین وزنی 2±35 گرم از مرکز انیستیتو پاستور (تهران- ایران) خریداری و در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد (دمای 2±21 درجه سانتی گراد و نور محیطی با شرایط 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی) و دسترسی آزاد به آب و غذا، نگهداری شدند. سپس موش‌ها به صورت تصادفی به 4 گروه 6تایی شامل: گروه کنترل، گروه دگزامتازون (7mg/kg, Sigma Germany) (۱،۶)، گروه پنتوکسی‌فیلین (200mg/kg, Sigma Germany) و گروه تیمار همزمان دگزامتازون و پنتوکسی‌فیلین تقسیم شدند. تیمار به‌صورت داخل صفاقی و به مدت 7 روز انجام گرفت(6،1) و در تمام مراحل انجام کار، اصول اخلاقی کار با حیوانات رعایت گردید (کد اخلاق ir.arakmu.res.1397.17).

سنجش پارامترهای اسپرمی

سنجش تحرک اسپرم

24 ساعت پس از آخرین تزریق، موش‌ها توسط دی‌اتیل‌اتر بیهوش شدند(1) و پس از کالبدگشایی، ناحیه دمی اپی‌دیدیم چپ آن‌ها خارج و در داخل پلیت حاوی محیط کشت Ham's F10 گذاشته شد. سپس به کمک تیغ، قطعه قطعه و به منظور خروج اسپرم‌ها به مدت 5 دقیقه در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. تحرک اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus BH-2,Japan) و بزرگ‌نمایی 200× و بر اساس دستورالعمل WHO (World Health Organization) سنجش شد و درصد اسپرم‌های دارای حرکات پیش‌رونده (اسپرم‌هایی که به‌صورت خطی و یا درحول یک دایره بزرگی به‌طور فعال حرکت می‌کنند)، حرکات درجا (اسپرم‌هایی که در جای خود بدون حرکت پیشرونده درجا می‌زنند) و بی‌تحرک (اسپرم‌های غیرمتحرک و ساکن) محاسبه گردید(14).

شمارش تعداد اسپرم

سوسپانسیون محیط کشت حاوی اسپرم با استفاده از فیکساتور فرمالین 2 درصد به نسبت 9:1 رقیق شد و سپس با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی40× شمارش اسپرم انجام گرفت و تعداد اسپرم‌ها در میلی‌لیتر محاسبه شد(15).

سنجش قابلیت حیات اسپرم

یک حجم از سوسپانسیون اسپرم با دو حجم از ائوزین 1درصد (مرک، آلمان) مخلوط و پس از 30 ثانیه نگهداری در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد، حجم مساوی از محلول نیگروزین 10 درصد (مرک، آلمان) به آن اضافه شد و گسترش نازکی از آن بر روی لام ایجاد گردید. سپس نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی 1000× بررسی و درصد نسبت اسپرم‌های مرده که سرشان به رنگ قرمز یا صورتی کمرنگ بود به اسپرم‌های زنده با سر سفید محاسبه شد(15).

اندازه گیری تولید روزانه اسپرم (Daily sperm production, DSP)

پس از خروج بیضه چپ و حذف کپسول آن، پارانشیم بیضه در2میلی‌لیتر بافر (تریتون 100-X 0/05 درصد در نرمال‌سالین) هموژن شد و برای رنگ‌آمیزی اسپرماتیدها، چند قطره ائوزین 1درصد به محلول اضافه گردید، سپس تعداد اسپرماتیدها توسط لام نئوبار با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی 40 × شمارش شد. سپس محاسبه تعداد اسپرماتید (testicular spermatid number, TSN) در هر گرم بیضه و تولید روزانه اسپرم طبق رابطه زیر انجام گرفت:

DSP = TSN/4.84

4.84 : مدت زمانی که اسپرماتیدها رشد کرده و به اسپرم تبدیل می‌شود(14).

1. Naval Medical Research Institute

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه گیری طول دم اسپرم

برای تخمین طول دم اسپرم، سوسپانسیون اسپرمی با ائوزین- نیگروزین رنگ‌آمیزی شد و گسترش‌های تهیه شده از آن با میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین و با بزرگنمایی 400× مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که با استفاده از سیستم آزمون، به طور میانگین 200 اسپرم بر روی هر اسلاید شمارش گردید. سیستم آزمون شامل دو جزء می باشد: جزء اول، فریم شمارش است. در این فریم، سر اسپرم‌هایی که داخل فریم شمارش قرار گرفته بودند و به‌خطوط ممنوعه تماس نداشتند، مورد شمارش قرار می گیرند. جزء بعدی، گرید مرز است که یک منحنی با دو نیم‌دایره مساوی است. با استفاده از رابطه زیر طول دم اسپرم بر حسب µm محاسبه شد:

$$\Sigma L\ (\text{total tails}) = (\pi/2).(a/l).(1/asf).\Sigma I\ L(\text{tail}) = \Sigma L/\Sigma N$$

که در آن "a/l" ثابت گرید مرز است. "asf" (area sampling fraction) مساحت کسر نمونه برداری است که با تقسیم مساحت مستطیل چهارگوشه به مساحت فریم شمارش محاسبه می‌شود. "ΣI" مجموع کل برخوردهای دم اسپرم به نیم‌دایره‌ها است. "ΣN" تعداد کل اسپرم‌های شمارش شده داخل فریم شمارش می‌باشد(14).

ارزیابی‌های بیوشیمیایی

سنجش غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA)

برای اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید، از روش Buege و Aust استفاده شد. برای اینکار ابتدا یک محلول شامل تری‌کلرواستیک اسید 15 درصد، تیوباربیوتیک اسید 0/375 درصد و اسید کلریدریک 0/25 نرمال تهیه شد. سپس 50 میکرولیتر از نمونه سرم خون با 100 میکرولیتر از محلول فوق مخلوط و به مدت 15 دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت. نمونه‌ها به سرعت با استفاده از آب سرد خنک شده و به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به دقت جدا و جذب آن در 532 نانومتر خوانده شد. در نهایت غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از فرمول زیر و برحسب نانومول برمیلی‌لیتر محاسبه گردید(16).

$$\text{ضریب خاموشی: } \frac{\text{جذب}}{1.56\times10^5} = X\ Mol/l = X \times 10^6 = nmol/ml$$

بررسی میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام

برای اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌های تام سرم از روش (Ferric Reducing Ability of Plasma; FRAP) استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سرم در احیای یون‌های Fe^{+3} به Fe^{+2} در حضور ماده‌ای به نام تری‌پیریدیل تریازین (TPTZ) استوار است. میزان احیاءکنندگی هر نمونه از طریق افزایش غلظت کمپلکس $TPTZ\text{-}Fe^{+2}$ در طول موج 593 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد(17).

بررسی کیفیت کروماتین اسپرم از طریق رنگ‌آمیزی هسته به روش آکریدین اورانژ (AO)

جهت ارزیابی تمامیت DNA، گسترش‌های نازکی از اسپرم تهیه و در محلول فیکساتور متانول- اسید استیک گلاسیال به نسبت 1:3 به مدت 14 ساعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد تثبیت و سپس با محلول آکریدین اورنژ به مدت 10 دقیقه رنگ‌آمیزی شد. لام‌ها بعد از شستشو با آب مقطر، در دمای آزمایشگاه خشک و به وسیله میکروسکوپ فلورسنس با بزرگنمایی 1000× مورد بررسی قرار گرفتند. اسپرم‌های با سر سبز رنگ بیانگر DNA دورشته‌ای یا سالم و اسپرم‌های با سر زرد و قرمز بیانگر DNA تک‌رشته‌ای یا دناتوره می‌باشد. در هر لام حداقل 100 اسپرم شمارش شد تا درصد اسپرم‌های دورشته‌ای و تک‌رشته‌ای تعیین گردد(15).

آنالیز آماری

داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SPSS ورژن 16 و روش آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و تست آماری Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقادیر به‌صورت Means±SD گزارش شد. تفاوت میانگین‌ها در سطح $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

یافته ها

قابلیت تحرک اسپرم

میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت (P<0/001) در حالی که افزایش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های پیش‌رونده در گروه دگزامتازون به‌علاوه پنتوکسی‌فیلین نسبت به گروه دگزامتازون مشاهده گردید (P<0/001)، به طوری که در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان نداد. با مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های با حرکات درجا در بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری دیده نشد. درصد اسپرم‌های بی‌تحرک در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (P<0/001). میانگین درصد اسپرم‌های بی‌تحرک (P<0/001) در گروه دگزامتازون به‌علاوه پنتوکسی فیلین در مقایسه با گروه دگزامتازون کاهش معنی‌داری نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول شماره 1).

جدول شماره 1: مقایسه میانگین قابلیت تحرک اسپرم (درصد) در گروه‌های مختلف، 7روز پس از تیمار با دگزامتازون (7mg/kg/day) و پنتوکسی‌فیلین (200mg/kg/day).

گروه‌ها	اسپرم‌های‌پیش رونده (%)	اسپرم‌های درجا (%)	اسپرم‌های ساکن (%)
کنترل	73/53 ± 0/71 (a)	10/13 ± 0/89 (a)	16/34 ± 0/65 (a)
دگزامتازون	31/00 ± 0/76 (b)	14/33 ± 0/85 (a)	54/67 ± 0/42 (b)
دگزامتازون+پنتوکسی‌فیلین	71/10 ± 0/92 (a)	14/17 ± 0/36 (a)	14/73 ± 0/61 (a)
پنتوکسی‌فیلین	78/16 ± 0/16 (c)	10/46 ± 0/43 (a)	11/38 ± 0/49 (a)

مقادیر به‌صورت mean±SD می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد (P<0/05، one way ANOVA , Tukey's test).

تعداد و حیات اسپرم

از مقایسه میانگین تعداد اسپرم و درصد اسپرم‌های زنده در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری مشاهده شد (P<0/001). قابلیت حیات و تعداد اسپرم در گروه دگزامتازون به علاوه پنتوکسی‌فیلین نسبت به گروه دگزامتازون افزایش معنی‌داری نشان داد (P<0/001). به‌طوری‌که میانگین‌آن‌ها در گروه دگزامتازون به‌علاوه پنتوکسی‌فیلین در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول شماره 2).

تولید روزانه و طول دم اسپرم

کاهش معنی‌داری در میانگین تولید روزانه و طول دم اسپرم در موش‌های تیمار شده با دگزامتازون نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<0/001)، درحالی‌که این پارامترها در گروه دگزامتازون به‌علاوه پنتوکسی‌فیلین، در مقایسه با گروه دگزامتازون افزایش معنی‌داری نشان داد (P<0/01). در واقع پنتوکسی‌فیلین توانست موجب کاهش اثرات مخرب دگزامتازون بر تولید روزانه و طول دم اسپرم شود و آن را به حد گروه کنترل برساند (جدول شماره 2).

جدول شماره 2: مقایسه میانگین تعداد، حیات، تولید روزانه و طول دم اسپرم در گروه‌های مختلف، 7روز پس از تیمار با دگزامتازون (7mg/kg/day) و پنتوکسی فیلین (200mg/kg/day).

گروه‌ها	میانگین تعداد اسپرم ×10⁶	میانگین حیات اسپرم (%)	DSP/g (10⁶)	میانگین طول دم اسپرم (µm)
کنترل	10/83 ± 0/73 (a)	74/01 ± 0/65 (a)	25/26 ± 0/89 (a)	86/01 ± 0/79 (a)
دگزامتازون	5/85 ± 0/31 (b)	50/18 ± 0/66 (b)	17/62 ± 0/89 (b)	74/12 ± 0/69 (b)
دگزامتازون+پنتوکسی‌فیلین	9/58 ± 0/61 (a)	73/24 ± 1/82 (a)	23/19 ± 0/94 (a)	84/28 ± 0/80 (a)
پنتوکسی‌فیلین	11/66 ± 0/65 (a)	73/94 ± 0/75 (a)	29/89 ± 0/5 (c)	90/81 ± 0/35 (c)

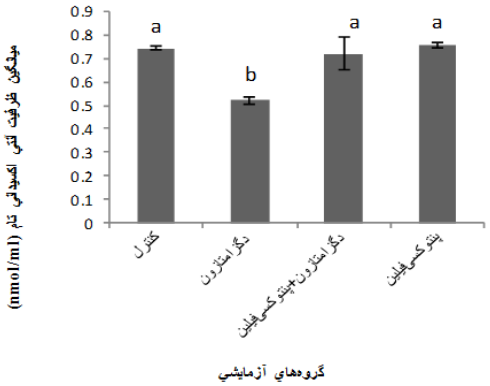
مقادیر به صورت mean±SD می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف، دارای تفاوت معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد (P<0/05 و one way ANOVA , Tukey's test).

میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام

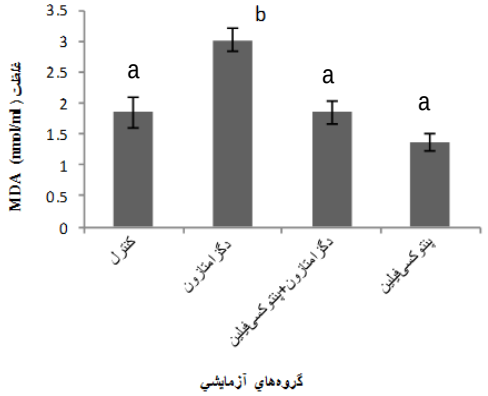
میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (P<0/001). در گروه دگزامتازون به‌علاوه پنتوکسی‌فیلین، پنتوکسی‌فیلین توانست میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش و به حد گروه کنترل برساند (نمودار شماره1).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره 1: مقایسه میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم (nmol/ml) در گروه‌های مختلف، 7 روز پس از تیمار با دگزامتازون (7mg/kg/day) و پنتوکسی فیلین (200 mg/kg/day). هر ستون نشان دهنده mean±SD می‌باشند. میانگین‌ها با کدهای مختلف دارای تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر می‌باشند (P<0/05 و one way ANOVA , Tukey's test).



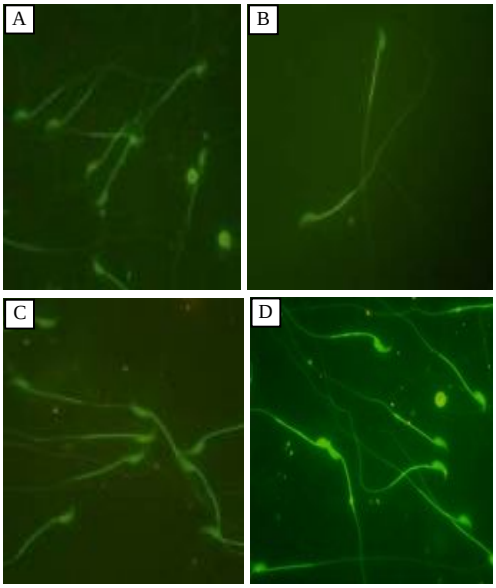
نمودار شماره 2: مقایسه میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) برحسب (nmol/ml) در گروه‌های مختلف، 7 روز پس از تیمار با دگزامتازون (7mg/kg/day) و پنتوکسی‌فیلین (200 mg/kg/day). هر ستون نشان دهنده mean±SD می‌باشند. میانگین‌ها با کدهای مختلف دارای تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر می‌باشند (P<0/05 و one way ANOVA , Tukey's test).

میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (P<0/001). از طرفی میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید در گروه دگزامتازون به علاوه پنتوکسی‌فیلین، در مقایسه با گروه دگزامتازون کاهش معنی‌داری نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود. به عبارت دیگر در گروه دگزامتازون به علاوه پنتوکسی‌فیلین، پنتوکسی‌فیلین توانست میزان پراکسیداسیون لیپیدی را در مقایسه با گروه دگزامتازون به‌طور معنی‌داری کاهش دهد (نمودارشماره2).

ارزیابی تمامیت DNA

از مقایسه تمامیت DNA در بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که نشان‌دهنده این است که تیمار موش‌ها با دگزامتازون در مقایسه با گروه کنترل تاثیری روی دناتوره شدن ساختمان دورشته‌ای DNA اسپرم نداشت، به‌طوری‌که سر اسپرم‌ها در موش‌های تیمار شده با دگزامتازون به رنگ سبز نمایان شدند (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: ارزیابی کیفیت کروماتین هسته اسپرم در گروه‌های مختلف، 7 روز پس از تیمار با دگزامتازون (7mg/kg/day) و پنتوکسی فیلین (200mg/kg/day). A: گروه کنترل. B: گروه دگزامتازون. C: گروه دگزامتازون+ پنتوکسی فیلین. D: گروه پنتوکسی فیلین (رنگ آمیزی آکریدین‌اورانژ، بزرگ نمایی 1000×).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نتایج پژوهش حاضر کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده و اسپرم‌های دارای حرکت جلورونده و افزایش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های بی‌تحرک در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل نشان داد که مطابق با نتایج دیگران می‌باشد(18،14). این نتایج احتمالاً ناشی از اثرات DEX در افزایش قابل توجه بیان Bax و FasL و در نتیجه القاء آپوپتوز در سلول‌های جنسی و سلول‌های لیدیگ بیضه باشد. وقوع آپوپتوز در سلول‌های سرتولی نیز موجب می‌شود که این سلول‌ها عملکرد حمایتیشان را بر روی سلول‌های جنسی از دست بدهند و این ممکن است سیگنالینگ آپوپتوزی را در سلول‌های جنسی تحریک کند(19،3). همچنین دگزامتازون با افزایش سطح ROS می‌تواند موجب تغییر در سیستم آنزیمی سلول‌های اسپرم، افزایش پراکسیداسیون فسفولیپیدها وکاهش سیالیت و تراوایی غشاء سلول‌ها شود که تغییرات ناشی از پراکسیداسیون اجزاء غشاء اسپرم‌ها منجر به کاهش فعالیت پمپ Na+/K+-ATPase و درنهایت افت شدید در قدرت تحرک سلول‌های اسپرم می‌گردد. بنابراین به دنبال اختلال در فرایندهای تبادل یونی غشاء و آنزیم‌های دخیل در آن، در اثر تغییر تراوائی غشاء، از میزان فعالیت و تحرک سلول‌های اسپرم کاسته می‌شود(22-20). همچنین از آن جایی‌که تحرک اسپرم به دو پارامتر، میزان انرژی موجود در قطعه میانی دم اسپرم و همچنین طول دم اسپرم بستگی دارد(23)، دگزامتازون با ایجاد ROS و استرس اکسیداتیو سبب آسیب رساندن به غشای میتوکندری به‌عنوان منبع انرژی تحرک اسپرم‌ها شده و با تخلیه ATP موجب کاهش انرژی و همچنین کاهش فسفریلاسیون پروتئین آکسونال و در نهایت موجب کاهش تحرک اسپرم می‌گردد(25،24). همچنین با افزایش استرس اکسیداتیو، سطح آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی مهم در سلول‌های لیدیگ کاهش می‌یابد و باعث کاهش سنتز و ترشح تستوسترون می‌شود که عامل موثری جهت اختلال در اسپرمیوژنز و به طبع آن کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی می‌باشد(26).

در این پژوهش میانگین تولید روزانه و طول دم اسپرم در موش‌های تیمار شده با دگزامتازون، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد که تحقیقات پیشین نیز این یافته‌ها را تائید می‌کند(27،14). به‌طور کلی، پتانسیل تولید روزانه اسپرم به دو پارامتر مهم تعداد سلول‌های سوماتیک از جمله سلول‌های سرتولی و لیدیگ و تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک بستگی دارد(28). از آن‌جاکه سلول‌های لیدیگ گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید را سنتز می‌کنند، بنابراین اولین هدف گلوکوکورتیکوئیدها در بافت بیضه خواهد بود. از طرف دیگر، سطح تستوسترون خون توسط سلول‌های لیدیگ بیضه تأمین می‌شود، که نقش مهمی در تکوین و تمایز سلول‌های اسپرم در فرآیند اسپرماتوژنز دارد(29). در نتیجه، می‌توان احتمال داد که DEX از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در سلول‌های اسپرماتوژنیک، سلول‌های سرتولی و لیدیگ و همچنین کاهش سطح تستوسترون خون منجر به ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژنز و کاهش تولید روزانه اسپرم می‌شود(30،20). کاهش طول دم اسپرم نیز می‌تواند به دلیل کاهش هورمون تستوسترون ترشحی از سلول‌های لیدیگ باشد. همان‌طور که گزارش شده است هورمون استروئیدی تستوسترون نقش مهمی در تکامل و تمایز سلول‌های اسپرم ایفا می‌کند(32،31) و سطح پایین تستوسترون علاوه بر مختل کردن اسپرماتوژنز، می‌تواند بر عملکرد بافت اپیدیدیم نیز اثرات منفی داشته و موجب اختلال در بلوغ و کیفیت اسپرم شود(33). همچنین عوامل استرس‌زای متفاوتی از قبیل استرس‌اکسیداتیو، بیان HSP70 را القا می‌کند. HSP70 در فلاژلوم یوکاریوتی متمرکز شده و در ساختار آکسونم تاژکی دخالت دارد(34). بنابراین تصور می شود که دگزامتازون نیز با القاء استرس اکسیداتیو و بیان زیاد HSP70 ها بر ساختار

www.SID.ir

Archive of SID

تاژک‌ها و تحرک اسپرم تاثیر بگذارد. نتایج مطالعه حاضر افزایش معنی‌داری در میزان MDA سرم خون و کاهش معنی‌داری در سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل نشان داد. می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که دگزامتازون با القای استرس اکسیداتیو و کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجب کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام شده است(20). MDA به عنوان محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی در نتیجه افزایش رادیکال‌های آزاد و برهم خوردن تعادل آنتی‌اکسیدان‌ها به وجود می‌آید. دگزامتازون با کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های داخل سلولی منجر به تولید رادیکال آزاد و نهایتا تولید پراکسیداسیون لیپیدی خواهد شد که می‌تواند بر روی عملکرد اسپرم اثرات منفی برجای بگذارد(35).

نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار پنتوکسی‌فیلین توانست غلظت مالون‌دی‌آلدئید سرم خون را کاهش و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام را افزایش دهد. این احتمال وجود دارد که پنتوکسی‌فیلین با ویژگی آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد، اثرات اکسیداتیو دگزامتازون را خنثی می‌کند و از این طریق منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم خون می‌شود(37،36،8). در گروه تیمار همزمان دگزامتازون با پنتوکسی‌فیلین، تعداد و قابلیت حیات اسپرم، درصد اسپرم‌های پیش‌رونده، همچنین تولید روزانه و طول دم اسپرم در مقایسه با گروه دگزامتازون افزایش معنی‌داری یافت. این‌گونه می‌توان توجیه کرد که در واقع پنتوکسی‌فیلین به عنوان مهارکننده غیرانتخابی آنزیم فسفودی‌استراز باعث افزایش سطح cAMP داخل سلولی و متعاقبا باعث ازدیاد گلیکولیز میتوکندریایی و افزایش سطوح ATP داخل سلولی خواهد شد که می‌تواند تحرک اسپرم، واکنش آکروزومی و نفوذ اسپرم به منطقه شفاف اووسیت را بهبود دهد(38،8). پنتوکسی‌فیلین همچنین جریان خون اپیدیدیم و در نتیجه حرکت اسپرم را بهبود می‌بخشد(38). این احتمال نیز وجود دارد که پنتوکسی‌فیلین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی و با مهار TNF-α و کاهش رونویسی از ژن آن به عنوان فاکتورضدالتهابی عمل‌کرده و مانع آپوپتوزسلول‌های جنسی، سلول‌های لیدیگ و افزایش ترشح تستوسترون شود(37،36). در مطالعه حاضر نیز پنتوکسی‌فیلین ممکن است با مهار استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی و ارتقای فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اسپرم و از طرفی دیگر احتمالا با افزایش هورمون تستوسترون و افزایش سطح ATP (37،8) اثرات مثبتی بر روی پارامترهای اسپرمی اعمال کرده و منجر به افزایش قابلیت حیات، تعداد و تحرک و طول دم اسپرم شده است.

در مطالعه حاضر تاثیر پنتوکسی‌فیلین در مقابله با سمیت ناشی از دگزامتازون بر روی پارامترهای اسپرمی و فاکتورهای بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که دگزامتازون دارای اثرات مخربی بر روی تعداد، تحرک و حیات اسپرم، تولید روزانه و طول دم اسپرم و همچنین میزان MDA وظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام دارد و پنتوکسی‌فیلین توانست اثر حفاظتی قوی در بهبود آسیب‌های استرس اکسیداتیو ناشی از دگزامتازون ایفاء کند که می‌توان به ویژگی آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی آن نسبت داد. با این حال بررسی اثرات مخرب داروی دگزامتازون بر روی سیستم تولید مثل نر و مکانیسم‌های دقیق پنتوکسی‌فیلین به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت نیاز به تحقیقات گسترده‌تری دارد.

References

1. Orazizadeh M, Hashemitabar M, khorsandi L. Protective effect of minocycline on dexamethasone induced testicular germ cell apoptosis in mice. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2009; 13(1): 1-5.
2. Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewics

www.SID.ir

Archive of SID

MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility (Protocol). Cocbrane Database Sys Rev 2011; 19(1): CD007411.

3. Khorsandi L, Mirhoseini M, Mohamadpour M, Orazizadeh M, Khaghani S. Effect of curcumin on dexamethasone-induced testicular toxicity in mice. Pharm Biol 2013; 51(2): 206-212.
4. Arab Dolatabadi A, Rezaei Zarchii S. The effect of prescription of different dexamethasone on reproductive system. Biomed Res 2015; 26(4): 650-660.
5. Sadi-Guettaf H, Hadj Bekkouche F. Dexamethasone: Impact on testicular activity. Int Scholarly Sci Res Innovation 2014; 8(7): 759-762.
6. Orazizadeh M, Khorsandi LS, Hashemitabar M. Toxic effects of dexamethasone on mouse testicular germ cells. Andrologia 2010; 42(4): 247-253.
7. Zakaria A, Al-busadah KA. Pentoxifylline efficiency in protecting testes against cadmium toxicity. J Anim Vet Adv 2015; 14(1): 18-29.
8. Yao C, Li G, Qian Y, Cai M, Yin H, Xiao L, et al. Protection of pentoxifylline against testis injury induced by intermittent hypobaric hypoxia. Oxid Med Cell Longev 2016; 2: 1-9.
9. Ozkan L, Yardimoglu M, Ozkurkcugil C, Costur P, Yilmaz H, Isken T. Protective effects of pentoxifylline on the seminiferous tubules morphology in smoking rats. Res Web Pub 2013; 1(1): 1-7.
10. Fallahzadeh AR, Rezaei Z, Rahimi HR, Barmak MJ, Sadeghi H, Mehrabi S, et al. Evaluation of the effect of pentoxifylline on cisplatin- induced testicular toxicity in rats. Toxicol Res 2017; 33(3): 255-263.
11. Nouri M, Movassaghi S, Foroumadi A, Soleimani M, Sharifi ZN. Protective effect of pentoxifylline on male wistar rat testicular germ cell apoptosis induced by 3,4-methylenedioxymetham-phetamine. Iran J of Basic Med Sci 2016; 19(6): 646-652.
12. Khalili MA, Vahidi SAD, Soflai N, Heidari AM, The effect of pentoxifytline on motility and morphology of spermatozoa from epididymal and testicular samples of infertile men. J Reproduct Infertil 2000; 1(3): 30-36 (Persian).
13. Moein MR, Khalili MA, Davoudi A. The effect of oral administration of pentoxifylline on sperm motility of asthenozoospermic ejaculates from men with or without testicular varicoceles. Int J Reproduct Biomed (IJRM) 2005; 3(1): 25-29 (Persian).
14. Sadeghzadeh F, Soleimani Mehranjani M, Mahmoodi M. Vitamin C ameliorates the adverse effects of dexamethasone on sperm motility, testosterone level, and spermatogenesis indexes in mice. Hum Exp Toxicol 2019, 38(4):409-418.
15. Malmir M, Soleimani Mehranjani M, Naderi Noreini S, Faraji T. Protective antioxidant effects of N-acetylcysteine against impairment of spermatogenesis caused by paranonylphenol. Andrologia 2018; 50(10): e13114.
16. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation product; Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol 1990; 186: 407-421.
17. Saremi A, Changizi Ashtiani S, Kalantari A. The combination of vitamin E supplementation and intensive exercise on testicular oxidative stress and spermatogenesis in male rats. Sport Physiology 2014; 6(23): 43-54 (Persian).
18. Danek, J. Effect of dexamethasone on the changes of semen quality induced by endotoxin in stallion. Bull Vet Inst Pulawy 2008; 52(4): 581-589.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Khorsandi LS, Hashemitabar M, Orazizadeh M, Albughobeish N. Dexamethasone Effects on Fas Ligand Expression in Mouse Testicular Germ Cells. Pak J Biol Sci 2008; 11(18): 2231-2236.
20. Eid Y, Ebeid T, Younis H. Vitamin E supplementation reduces dexamethasone-induced oxidative stress in chicken semen. Br poult sci 2006; 47(3):350-356.
21. Oseni OA, Kayode DM, Sijuade AO. Achatina Fulica Exoskeleton derived Chitosan attenuates Liver and Kidney toxicities in Dexamethasone induced Hypertensive Male Wistar Albino rats. Eur J Res Med Sci 2015; 3(2): 34-44.
22. Allamaneni SS, Agarwal A, Nallella KP, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Sikka, SC. Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species levels in whole semen and isolated spermatozoa. Fertil Steril 2005; 83(3): 800-803.
23. Karbalay-Doust S,Noorafshan A, Dehghani F, Panjeshahin M.R, Monabati A. Effec of hydroalchoholic extract of Matricaria chamomilla on serum testosterone and esteradiol levels, spermatozoon quality,and tail length in rat. Iran J Med Sci 2015; 35(2): 122-128.
24. Badade ZG, Samant PM. Role of oxidative stress in male infertility. J Biomed Sci Res 2011; 3(2): 385-391.
25. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. Hum Reprod Update 2008; 14(3): 243-258.
26. Hoseini A, Ahmadi A, Ghaderi Pakdel F, Zare S. Effects of chronic low-dose treatment with cyclophosphamide on the rat testis. Physiol Pharmacol 2011; 15(3): 351-360 (Persian).
27. Silva EJ, Vendramini V, Restelli A, Bertolla RP, Kempinas WG, Avellar MC. Impact of adrenalectomy and dexamethasone treatment on testicular morphology and sperm parameters in rats: insights into the adrenal control of male reproduction. Andrology 2014; 2(6): 835-846.
28. Fan Q, Li W, Shen L. Adverse effects of exposure to p-nonylphenol on reproductive system of young male rats. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 2001; 35(5): 344-346.
29. Gametchu B, Watson CS. Correlation of membrane glucocorticoid receptor levels with glucocorticoid induced apoptotic competence using mutant leukemic and lymphoma cells lines. J Cell Biochem 2002; 87(2): 133-146.
30. Khorsandi LS, Hashemitabar M, Orazizadeh M. The expression of BAX in mouse testicular germ cell apoptosis following Dexamethasone injection. Med Sci J Islamic Azad Univ 2008; 18(3): 141-148 (Persian).
31. Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. Toxicology 2006; 217(1): 71-78.
32. McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. Recent Prog Horm Res 2002; 57: 149-179.
33. Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: Knobil E, Neill JD, editors. The physiology of reproduction. New York: Raven Press; 1987.
34. Ghobadi E, Moloudizargari M, Asghari MH, Abdollahi M. The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity

www.SID.ir

Archive of SID

and the protective agents. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2017; 13(5): 525-536.

35. Jalili C, Salahshoor MR, Jalili F, Kakabaraei S, Akrami A, Sohrabi M, et al. Therapeutic Effect of Resveratrol on Morphine-Induced Damage in Male Reproductive System of Mice by Reducing Nitric Oxide Serum Level. Int J Morphol 2017; 35(4): 1342-1347.
36. Piryaei A, Najar A, Bayat M. Effects of pentoxifylline administration on histomorphological parameters of streptozotocin-induced diabetic rat testes. Lab Anim Res 2015; 31(3): 111-116.
37. Zakaria A, Al-Busadah KA. Pentoxifylline efficiency in protecting testes against cadmium toxicity. J Anim Vet Adv 2015; 14(1): 18-29.
38. Nasimi Doost Azgomi R, Nazemiyeh H, Sadeghi Bazargani H, Fazljou SMB, Nejatbakhsh F, Moini Jazani A, et al. Comparative evaluation of the effects of Withania somnifera with pentoxifylline on the sperm parameters in idiopathic male infertility: A triple-blind randomised clinical trial. Andrologia 2018; 50(7): e13041.

www.SID.ir