

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

Monireh Mahmoodi¹,
Malek Soleimani Mehranjani²,
Nasrin Kheradmand³

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)

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

منیره محمودی¹
ملک سلیمانی مهرنجانی²
نسرین خردمند³

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 بیمار شده با دگزامتازون بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، 24 سر موش نر بالغ نژاد Naval Medical Research Institute (NMRI) (35±2 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 به طور 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 دنا توره 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.

واژه‌های کلیدی: دگزامتازون، پنتوکسی‌فیلین، اسپرم، استرس اکسیداتیو، موش

مقدمه

حدود 10 تا 15 درصد زوجین در سراسر دنیا از مشکلات ناباروری رنج می‌برند و نیمی از این مشکلات، مربوط به اختلالات ناباروری در مردان است (2،1). 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

E-mail: m-mahmoodi@araku.ac.ir

مؤلف مسئول: منیره محمودی - گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک، ایران

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

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 به علت دارا بودن اثرات ضد التهابی و سرکوب کننده سیستم ایمنی به طور گسترده‌ای در درمان التهاب، اختلالات خودایمنی و آلرژی، 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 (3,4,6) و از آنجایی که وجود تستوسترون برای عملکرد طبیعی و بقای سلول‌های جنسی در لوله‌های منی‌ساز ضروری است، موقعی که محیط بیضه نتواند فرایند اسپرماتوژنیز 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 اسپرماتوژنیز شود (4,6). بنابراین گلوکوکورتیکوئیدها از طریق عملکرد مستقیم بر روی سلول‌های لیدینگ (تأثیر بر روی P450scc، 3βHSD و P450c17) و عملکرد غیرمستقیم بر روی هیپوتالاموس و غده هیپوفیز، استروئیدوژنیز بیضه را مهار می‌کنند (5) که می‌تواند در نهایت منجر به ناباروری گردد.

پنتوکسی‌فیلین (Pentoxifylline, PTX) یک مشتق متیل گزانتینی با ویژگی‌های همورولوژی متعدد می‌باشد که بر روی گزانتین اکسیداز به عنوان محرک تشکیل رادیکال آزاد اکسیژن در سلول، اثرات مهاری دارد (7,8). از طرفی اثر آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی پنتوکسی‌فیلین

در مطالعات متعددی نشان داده شده است (7,9,10). پنتوکسی‌فیلین همچنین به عنوان یک مهارکننده فسفودی‌استراز، آدنوزین مونوفسفات حلقوی (1^{c}AMP) داخل سلولی را افزایش، آنیون‌های سوپراکسید را کاهش و فاکتور نکروز تومور $\alpha\text{-TNF}^{(2)}$ ، IL-1، IL-6 و $\text{TGF-}\beta$ را مهار می‌کند (7,10,11). 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 (10,11,13). به طوری که این دارو در موارد کلینیکی برای جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی که منجر به آپوپتوز و آسیب غشای اسپرم می‌شوند، استفاده می‌گردد (11). بنابراین پنتوکسی‌فیلین بخاطر ویژگی آنتی‌اکسیدانتی‌اش که به عنوان یک جاروب کننده ROS عمل می‌کند، تحریک کننده اسپرم در نظر گرفته می‌شود (11). از آنجایی که 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 آدنوزین تری فسفات (ATP) اندوژن می‌شود که موتیلیتی اسپرم را تحریک و بر توانایی لقاح تأثیر 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

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه، 24 سر موش نر بالغ نژاد (NMRI)³ با میانگین وزنی 35 ± 2 گرم از مرکز انیستیتو پاستور (تهران - ایران) خریداری و در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد (دمای 21 ± 2 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 6 تایی شامل: گروه کنترل، گروه دگزامتازون (7 mg/kg , Sigma Germany) (۱،۶)، گروه پنتوکسی‌فیلین (200 mg/kg , Sigma Germany) و گروه تیمار همزمان دگزامتازون و پنتوکسی‌فیلین تقسیم شدند. تیمار به صورت 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 1397.17.ir.arakmu.res).

سنجش پارامترهای اسپرمی

سنجش تحرک اسپرم

24 ساعت پس از آخرین تزریق، موش‌ها توسط دی‌اتیل اتر بیهوش شدند (1) و پس از کالبدگشایی، ناحیه دمی‌اپی‌دیدیم 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 $\times 200$ و بر اساس دستورالعمل WHO (World Health Organization) سنجش شد و درصد اسپرم‌های دارای حرکات پیش‌رونده (اسپرم‌هایی که به صورت 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 بزرگ‌نمایی $\times 40$ 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 اتوزین 1 درصد (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 $\times 1000$ بررسی و درصد نسبت اسپرم‌های مرده که سرشان به رنگ قرمز یا صورتی کمرنگ بود به اسپرم‌های زنده با سر سفید محاسبه شد (15).

اندازه‌گیری تولید روزانه اسپرم (Daily sperm production, DSP)

پس از خروج بیضه چپ و حذف کپسول آن، پارانشیم بیضه در 2 میلی‌لیتر بافر (تریئون 0/05 X-100 درصد در نرمال سالین) هموژن شد و برای رنگ‌آمیزی اسپرماتیدها، چند قطره اتوزین 1 درصد به محلول اضافه گردید، سپس تعداد اسپرماتیدها توسط لام نئوبار با میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی $\times 40$ 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).

اندازه گیری طول دم اسپرم

برای تخمین طول دم اسپرم، سوسپانسیون اسپرمی با ائوزین-نیگروزین رنگ آمیزی شد و گسترش های 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 اسپرم هایی که داخل فریم شمارش قرار گرفته بودند و به خطوط ممنوعه تماس نداشتند، مورد شمارش قرار می گیرند. جزء بعدی، گرید مرز است که یک منحنی با دو نیم دایره مساوی است. با استفاده از رابطه زیر طول دم اسپرم بر حسب μm محاسبه شد:

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

که در آن "a/l" ثابت گرید مرز است. "asf" (area sampling fraction) مساحت کسر نمونه برداری است که با تقسیم مساحت مستطیل چهار گوشه به مساحت فریم شمارش محاسبه می شود. "ΣI" مجموع کل برخورد های دم اسپرم به نیم دایره ها است. "ΣN" تعداد کل اسپرم های شمارش شده داخل فریم شمارش می باشد (14).

ارزیابی های بیوشیمیایی

سنجش غلظت مالون دی آلدئید (MDA)

برای اندازه گیری مالون دی آلدئید، از روش Buege و Aust استفاده شد. برای اینکار ابتدا یک محلول شامل تری کلرواستیک اسید 15 درصد، تیوباریو تیک اسید 0/375 درصد و اسید کلریدریک 0/25 نرمال تهیه شد. سپس 50 میکرو لیتر از نمونه سرم خون با 100 میکرو لیتر از محلول فوق مخلوط و به مدت 15 دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت. نمونه ها 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 مالون دی آلدئید با

استفاده از فرمول زیر و بر حسب نانومول بر میلی لیتر محاسبه گردید (16).

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

بررسی میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام

برای اندازه گیری آنتی اکسیدان های تام سرم از روش (Ferric Reducing Ability of Plasma; FRAP) استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سرم در احیای یون های Fe^{+3} به Fe^{+2} در حضور ماده ای به نام تری پیریدیل تریازین (TPTZ) استوار است. میزان احیاء کنندگی هر نمونه از طریق افزایش غلظت کمپلکس $TPTZ - Fe^{+2}$ در طول موج 593 نانومتر توسط دستگاه اسپکترو فوتومتر اندازه گیری شد (17).

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

جهت ارزیابی تمامیت DNA، گسترش های نازکی از اسپرم تهیه و در محلول فیکساتور متانول - اسید استیک گلاسیال به نسبت 1:3 به مدت 14 ساعت در دمای 4 درجه سانتی گراد تثبیت و سپس با محلول آکریدین اورنژ به مدت 10 دقیقه رنگ آمیزی شد. لام ها بعد از شستشو با آب مقطر، در دمای آزمایشگاه خشک و به وسیله میکروسکوپ فلورسنس با بزرگنمایی 1000× مورد بررسی قرار گرفتند. اسپرم های با سر سبز رنگ بیانگر DNA دورشته ای یا سالم و اسپرم های با سر زرد و قرمز بیانگر DNA تک رشته ای یا دنا توره می باشد. در هر لام حداقل 100 اسپرم شمارش شد تا درصد اسپرم های دورشته ای و تک رشته ای تعیین گردد (15).

آنالیز آماری

داده های حاصل توسط نرم افزار 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 به صورت Means ± SD گزارش شد. تفاوت میانگین ها در سطح $P < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

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 پنتوکسی‌فیلین 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، 7 روز پس از تیمار با دگزامتازون (7mg/kg/day) و پنتوکسی‌فیلین (200mg/kg/day).

گروه‌ها	اسپرم‌های پیش‌رونده (%)	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 به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ 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 به‌علاوه پنتوکسی‌فیلین نسبت به گروه دگزامتازون افزایش معنی‌داری نشان داد ($P<0/001$). به طوری که میانگین آن‌ها 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 ($P<0/001$)، در حالی که 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).

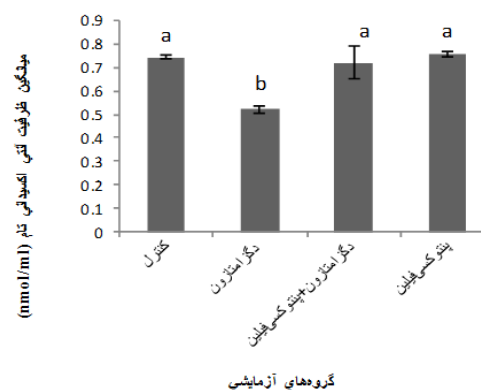
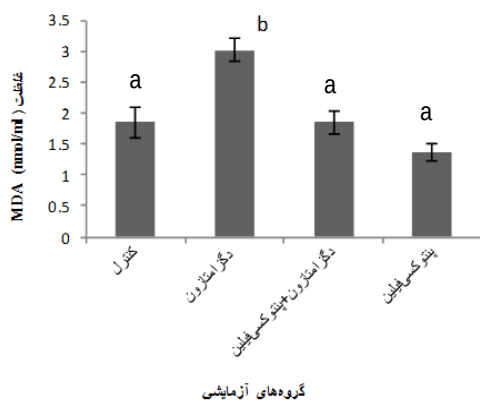
جدول شماره 2: مقایسه میانگین تعداد، حیات، تولید روزانه و طول دم اسپرم در گروه‌های مختلف، 7 روز پس از تیمار با دگزامتازون (7mg/kg/day) و پنتوکسی‌فیلین (200mg/kg/day).

گروه‌ها	میانگین تعداد اسپرم $\times 10^6$	میانگین حیات اسپرم (%)	DSP/g (10^9)	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 ± 0/6 (c)	90/81 ± 0/35 (c)

مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ 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 شماره 1).



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 $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشند. میانگین‌ها با کدهای مختلف دارای تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر می‌باشند ($P < 0/05$) و (one way ANOVA , Tukey's test).

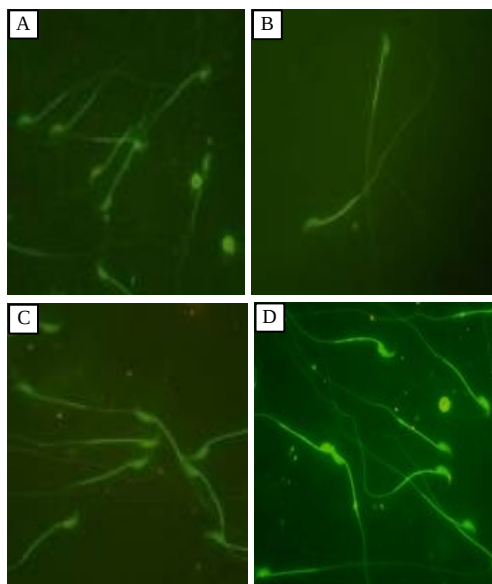
نمودار شماره 1: مقایسه میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم (nmol/ml) در گروه‌های مختلف، 7 روز پس از تیمار با دگزامتازون (7mg/kg/day) و پنتوکسی‌فیلین (200 mg/kg/day). هر ستون نشان دهنده $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشند. میانگین‌ها با کدهای مختلف دارای تفاوت معنی داری نسبت به یکدیگر می‌باشند ($P < 0/05$) 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 (نمودار شماره 2).

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 دنا توره 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 پنتوکسی‌فیلین (200mg/kg/day). A: گروه کنترل. B: گروه دگزامتازون. C: گروه دگزامتازون + پنتوکسی‌فیلین. D: گروه پنتوکسی‌فیلین (رنگ آمیزی آکریدین‌اورانژ، بزرگ نمایی $\times 1000$).

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 بی‌حرکت در گروه دگزامتازون نسبت به گروه کنترل نشان داد که مطابق با نتایج دیگران می‌باشد (14، 18). 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 لیدینگ 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 (3، 19). همچنین دگزامتازون با افزایش سطح ROS می‌تواند موجب تغییر در سیستم آنزیمی سلول‌های اسپرم، افزایش پراکسیداسیون فسفولیپیدها و کاهش سیالیت و تراوایی غشاء سلول‌ها شود که تغییرات ناشی از پراکسیداسیون اجزاء غشاء اسپرم‌ها منجر به کاهش فعالیت پمپ $Na^+/K^+-ATPase$ و در نهایت 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 تراوانی غشاء، از میزان فعالیت و تحرک سلول‌های اسپرم کاسته می‌شود (20-22). همچنین از آن جایی که 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 (24، 25). همچنین با افزایش استرس اکسیداتیو، سطح آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی مهم در سلول‌های لیدینگ کاهش می‌یابد و باعث کاهش سنتز و

ترشح تستوسترون می‌شود که عامل موثری جهت اختلال در اسپرمیوز و به طبع آن کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم‌های اپیدیدی 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 تأیید می‌کند (14، 27). به‌طور کلی، پتانسیل تولید روزانه اسپرم به دو پارامتر مهم تعداد سلول‌های سوماتیک از جمله سلول‌های سرتولی و لیدینگ و تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک بستگی دارد (28). از آن‌جاکه سلول‌های لیدینگ گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید را سنتز می‌کنند، بنابراین اولین هدف گلوکوکورتیکوئیدها در بافت بیضه خواهد بود. از طرف دیگر، سطح تستوسترون خون توسط سلول‌های لیدینگ بیضه تأمین می‌شود، که نقش مهمی در تکوین و تمایز سلول‌های اسپرم در فرآیند اسپرماتوژن دارد (29). در نتیجه، می‌توان احتمال داد که DEX از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در سلول‌های اسپرماتوژنیک، سلول‌های سرتولی و لیدینگ و همچنین کاهش سطح تستوسترون خون منجر به ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژن و کاهش تولید روزانه اسپرم می‌شود (20، 30). کاهش طول دم اسپرم نیز می‌تواند به دلیل کاهش هورمون تستوسترون ترشحی از سلول‌های لیدینگ باشد. همان‌طور که گزارش شده است هورمون استروئیدی تستوسترون نقش مهمی در تکامل و تمایز سلول‌های اسپرم ایفا می‌کند (31، 32) و سطح پایین تستوسترون علاوه بر مختل کردن اسپرماتوژن، 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 استرس اکسیداتیو، بیان HSP70 را القا می‌کند. HSP70 در فلاژلوم یوکاریوتی متمرکز شده و در ساختار آکسونم تاژکی دخالت دارد (34). بنابراین تصور می‌شود که دگزامتازون نیز با القاء استرس اکسیداتیو و بیان زیاد HSP70 ها بر ساختار

تاژک‌ها و تحرک اسپرم تأثیر 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 نهایتاً 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 مالون‌دی‌آلدنید 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 (36, 37). 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 متعاقباً 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). 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 $TNF-\alpha$ و کاهش رونویسی از ژن آن به عنوان فاکتور ضد التهابی عمل کرده و مانع آپوپتوز سلول‌های جنسی، سلول‌های لیدینگ و افزایش ترشح تستوسترون شود (36, 37). 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 احتمالاً با افزایش هورمون تستوسترون و افزایش سطح ATP (37, 38) 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 تأثیر 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 و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام دارد و پنتوکسی‌فیلین توانست اثر حفاظتی قوی در بهبود آسیب‌های استرس اکسیداتیو ناشی از دگزامتازون ایفاء کند که می‌توان به ویژگی آنتی‌اکسیدانی 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

- 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 pentoxifylline 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.

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. Effect of hydroalcoholic extract of *Matricaria chamomilla* on serum testosterone and estradiol 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 cell 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

- 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. Piryaee 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.