

Influence of Pentoxifylline on the Damage of Sperm Parameters Induced by Etoposide in Mice

Monireh Mahmoodi¹,
Zahra Esmaeili²

¹ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak 3848177584, Iran

² MSc in Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak 3848177584, Iran

(Received December 24, 2023; Accepted April 23, 2024)

Abstract

Background and purpose: Although recent advances in cancer treatment have increased patient survival and improved quality of life, exposure to chemotherapy drugs leads to significant fertility problems in children with cancer. Etoposide is a chemotherapy drug that is widely used in the treatment of various types of cancer; However, it destroys healthy cells, especially male germ cells that are multiplying rapidly and continuously, and leads to infertility. In the present study, the antioxidant effect of pentoxifylline on the disorder caused by etoposide on the sperm parameters of adult male NMRI mice was investigated.

Materials and methods: 24 adult male NMRI mice with an average weight of 35 ± 2 gr ($n=6$) were randomly allocated to the following groups ($n=6$): control, etoposide (1mg/kg), pentoxifylline (100mg/kg) and etoposide + pentoxifylline and treated with daily intraperitoneal injection for 35 days. At the end of the treatment period, mice were anesthetized with ketamine-xylazine solution, and the left caudal region of epididymis was transferred to a 3cm plate containing culture medium (HamsF10) in a 37°C incubator to examine sperm parameters including the number, motility, morphology, viability and tail length of the sperm. The denaturation of sperm DNA using acridine orange staining and the maturation rate of sperm nucleus using aniline blue staining method was measured. The left testicle was removed and used to calculate daily sperm production. After taking blood from the heart and preparing serum, total antioxidant capacity and malondialdehyde level were also measured. The data were statistically analyzed with SPSS software, one-way ANOVA, and Tukey's test, and the difference in means was considered significant at the $P<0.05$ level.

Results: A significant decrease in the mean percentage of progressive sperms and a significant increase in the mean percentage of in situ and immotile sperms were observed in the etoposide group compared to the control group ($P<0.001$). Also, a significant decrease in the mean count, viability, daily sperm production, tail length, and normal morphology of sperm was observed in the etoposide group compared to the control group ($P<0.001$). The total antioxidant capacity also decreased significantly in the etoposide group compared to the control group ($P<0.001$). The level of serum malondialdehyde showed a significant increase in the etoposide group compared to the control group ($P<0.001$). There was no significant difference in the mean percentage of sperm DNA damage and sperm nucleus maturation in the etoposide group compared to the control group ($P<0.05$). Simultaneous treatment of pentoxifylline with etoposide significantly improved the aforementioned parameters compared to the etoposide group.

Conclusion: The results in the etoposide treatment group showed a significant decrease in sperm parameters and total antioxidant capacity, as well as a significant increase in malondialdehyde levels. The toxicity induced by etoposide through the induction of apoptosis, oxidative stress, and lipid peroxidation is considered the primary cause of the resulting damage, as evidenced by the study results. Pentoxifylline is believed to have mitigated the harmful effects of etoposide on sperm parameters and oxidative stress by leveraging its antioxidant properties to reduce oxidative stress.

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

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (233): 28-38 (Persian).

Corresponding Author: Monireh Mahmoodi - Faculty of Science, Arak University, Arak 3848177584, Iran.
(E-mail: m-mahmoodi@araku.ac.ir)

تاثیر پنتوکسی فیلین بر آسیب پارامترهای اسپرمی القاء شده توسط اتوپوزاید در موش

منیره محمودی^۱زهرا اسماعیلی^۲

چکیده

سابقه و هدف: اگرچه پیشرفت‌های اخیر در درمان سرطان باعث افزایش بقای بیماران و بهبود کیفیت زندگی شده است، قرار گرفتن در معرض داروهای شیمی درمانی منجر به مشکلات باروری قابل توجهی در کودکان سرطانی می‌شود. اتوپوزاید یک داروی شیمی درمانی است که به‌طور گسترده در درمان انواع سرطان استفاده می‌شود؛ اما با این حال سلول‌های سالم، به ویژه سلول‌های زایای مردانه را که در حال تکثیر سریع و مداوم هستند از بین می‌برد و منجر به ناباروری می‌شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر آنتی اکسیدانتی پنتوکسی فیلین بر اختلال ناشی از اتوپوزاید بر پارامترهای اسپرمی موش‌های نر بالغ نژاد NMRI، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش نر بالغ نژاد Naval Medical Research Institute (NMRI) با میانگین وزنی 35 ± 2 گرم ($n=6$) به‌طور تصادفی به چهار گروه کنترل، اتوپوزاید (1 mg/kg)، پنتوکسی فیلین (100 mg/kg) و اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین تقسیم‌بندی و روزانه به مدت ۳۵ روز به صورت تزریق داخل صفاقی تیمار شدند. در پایان دوره تیمار، موش‌ها با محلول ترکیبی کتامین زایلانزین، بی‌هوش و ناحیه دمی اپیدیدیم چپ به پلست ۳ سانتی‌متری حاوی محیط کشت (HamsF10) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد تا جهت بررسی پارامترهای اسپرمی شامل تعداد، تحرک، مورفولوژی، قابلیت حیات و طول دم اسپرم مورد استفاده قرار گیرد. دنا توره شدن DNA اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنژ و همچنین میزان بلوغ هسته اسپرم به روش رنگ آمیزی آتیلین بلو سنجش شد. بیضه چپ خارج و جهت محاسبه تولید روزانه اسپرم (Daily sperm production (DSP) استفاده شد. هم‌چنین بعد از خون‌گیری از قلب و آماده‌سازی سرم، میزان ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام (Total antioxidant capacity (TAC) و سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) سنجیده شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS، روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: کاهش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های پیش‌رونده و افزایش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های درجا و ساکن در گروه اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0.001$). هم‌چنین کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد، قابلیت حیات، تولید روزانه، طول دم و مورفولوژی طبیعی اسپرم در گروه اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0.001$). ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام نیز در گروه اتوپوزاید در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.001$)، در حالی که سطح مالون دی‌آلدئید سرم در گروه اتوپوزاید در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.001$). تفاوت معنی‌داری در میانگین درصد آسیب DNA اسپرم و هم‌چنین بلوغ هسته اسپرم در گروه اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ($P > 0.05$). تیمار همزمان پنتوکسی فیلین با اتوپوزاید پارامترهای فوق‌الذکر را در مقایسه با گروه اتوپوزاید به‌طور معنی‌داری بهبود بخشید.

استنتاج: نتایج حاضر در گروه تیمار با اتوپوزاید نشان دهنده، کاهش معنی‌داری در پارامترهای اسپرم و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام و هم‌چنین افزایش معنی‌داری در سطح مالون‌دی‌آلدئید بود. به نظر می‌رسد که سمیت القاء شده توسط اتوپوزاید از طریق ایجاد آپوپتوز، القاء استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی، اصلی‌ترین عامل ایجادکننده آسیب‌های وارد شده باشد، که با توجه به نتایج حاصل، پنتوکسی فیلین احتمالاً با پتانسیل آنتی اکسیدانتی و کاهش استرس اکسیداتیو، اثر سوء اتوپوزاید را بر پارامترهای اسپرمی و استرس اکسیداتیو کاهش داده است.

واژه‌های کلیدی: اتوپوزاید، پنتوکسی فیلین، اسپرم، استرس اکسیداتیو، موش

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

مؤلف مسئول: منیره محمودی - اراک: اراک ۳۸۴۸۱۷۷۵۸۴، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه

۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک ۳۸۴۸۱۷۷۵۸۴، ایران

۲. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک ۳۸۴۸۱۷۷۵۸۴، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۲/۹ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۲/۴

مقدمه

سرطان یک بیماری با تکثیر غیرطبیعی و کنترل نشده سلولی، سرکوب آپوپتوز و متاستاز می باشد. جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی به طور کلاسیک از روش های مورد استفاده در درمان سرطان هستند که یکی از علل اصلی مرگ و میر بشر در قرن اخیر است (۲،۱). پیشرفت در این روش ها به طور قابل توجهی میزان موفقیت در درمان سرطان را افزایش داده است، در حالی که پروتکل های شیمی درمانی به ویژه استفاده از داروهای سیتوتوکسیک قوی باعث عوارض جانبی جدی و آسیب بافتی در اندام های غیر هدف می شود. در واقع، بسیاری از مطالعات در گذشته نشان داده اند که شیمی درمانی می تواند به طور قابل توجهی بر اسپرم زایی و در نتیجه باروری مردان تأثیر بگذارد (۳،۲). اتوپوزاید یک آلکالوئید مشتق از گیاه *Podophyllum peltatum* و به عنوان یک داروی ضد سرطان است که فعالیت توپوایزومراز II را مهار می کند و از آن جایی که داروهای آسیب رسان به DNA بر سلول هایی که قدرت تقسیم بیش تری دارند تأثیر می گذارند، بنابراین، می توانند اثرات خود را بر اسپرماتوگونی های بیضه نیز اعمال کند (۴). اتوپوزاید از طریق آسیب به DNA، تداخل در تکثیر DNA و مهار رونویسی آن می تواند باروری را تحت تأثیر قرار دهد (۵). هم چنین اتوپوزاید می تواند با تولید رادیکال آزاد و کاهش سوپر اکسید دیسموتاز و گلوکاتیون منجر به تخریب سلول های لیدیگ و مهار ترشح تستوسترون و اختلال در روند اسپرماتوژنز شود (۶).

مطالعات مختلف نشان داده که ترکیبات آنتی اکسیدانی ممکن است با کاهش استرس اکسیداتیو که به عنوان یک عامل مهم القاء کننده تغییرات پاتولوژیک در بسیاری از بیماری ها می باشد، سیستم تولید مثلی را در برابر سمیت سلولی ناشی از داروهای شیمی درمانی محافظت کند (۶). پنتوکسی فیلین (Pentoxifylline (PTX) پنتوکسی فیلین یک مشتق متیل گرانترین و عامل وازواکتیو است که با کاهش ویسکوزیته و افزایش میکروسیر کولاسیون، جریان

خون را بهبود می بخشد. PTX یک مهار کننده آنزیم سفو دی استراز است که باعث تجمع آدنوزین مونوفسفات حلقوی (Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) و در نتیجه بهبود تحرک اسپرم می شود (۸،۷). در واقع PTX در سال ۱۹۷۹ به علت خواص خون رسانی و افزایش حرکت اسپرم به عنوان درمان جدید برای ناباروری مردان استفاده شد (۹). یائو و همکاران نشان دادند که PTX با حفظ هموستاز ردوکس از استرس اکسیداتیو ناشی از هیپوکسی در بافت بیضه جلوگیری می کند (۱۰). علاوه بر این، سلحشور و همکاران گزارش کردند که پنتوکسی فیلین موش ها را در برابر آسیب بیضه ناشی از دی متیل نیتروزامین محافظت می کند و تحرک و زنده ماندن اسپرم را بهبود می بخشد (۱۱). PTX با خاصیت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی خود موجب حذف رادیکال های آزاد، کاهش فاکتورهای التهابی از جمله سیتو کین های پیش التهابی و بیان *inducible nitric oxide synthase (iNOS)* و کاهش آپوپتوز سلولی و در نتیجه بهبود روند اسپرماتوژنز می شود (۱۳،۱۲). بنابراین پنتوکسی فیلین با افزایش سطح آنزیم های آنتی اکسیدانی (*dismutase superoxide:SOD*) و کاتالاز، سرکوب نشانگر استرس اکسیداتیو (MDA) و کاهش تولید *Tumournecrosis factor-α (TNF-α)* می تواند در بهبود عملکرد دستگاه تولید مثل نر موثر باشد (۱۵،۱۴). بنابراین با توجه به این که اتوپوزاید در درمان انواع مختلف سرطان موثر است، اما باعث مرگ سلول های در حال تکثیر طبیعی از جمله سلول های زایای مردانه می شود و با نظر به ویژگی های آنتی اکسیدانی، آنتی آپوپتوزی و ضد التهابی پنتوکسی فیلین، این مطالعه به منظور بررسی اثرات احتمالی پنتوکسی فیلین در برابر عوارض نامطلوب ناشی از اتوپوزاید بر روی پارامترهای اسپرمی و شاخص های استرس اکسیداتیو در موش انجام شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، با کد اخلاق،

IR.ARAKMU.REC.1399.169، سرموش نربالغ نژاد NMRI (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 ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و دسترسی آزاد به آب و غذا، نگهداری شدند. موش‌ها به صورت تصادفی به ۴ گروه کنترل، اتوپوزاید (1mg/kg, Sigma, Germany)، پنتوکیسی‌فیلین (100mg/kg, Sigma, Germany) و گروه تیمار همزمان اتوپوزاید و پنتوکیسی‌فیلین تقسیم شدند (۱۶،۱۴). تیمار به صورت داخل صفاقی و به مدت ۳۵ روز انجام گرفت. در تمام مراحل انجام کار، اصول اخلاقی کار با حیوانات رعایت گردید.

سنجش پارامترهای اسپرمی

پس از ۲۴ ساعت از آخرین تزریق، موش‌ها توسط محلول ترکیبی کتامین (Ketamine 100mg/kg; Ketamine 10% alfasan. Woerden-Holand زایلازین (Xylazine 10 mg/kg; xylazine 2% alfasan. Woerden-Holand) بیهوش شدند و پس از کالبد گشایی، ناحیه دمی اپیدیدیم چپ خارج و در محیط کشت Ham's F10 در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. تحرک و تعداد اسپرم بر اساس دستورالعمل WHO با استفاده از میکروسکوپ نوری (BH-2, Olympus, Japan) و بزرگنمایی ۴۰X سنجش شد. گسترش‌های اسپرم با محلول اتوزین-نیگروزین (مرک، آلمان) رنگ آمیزی و قابلیت حیات و درصد ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰X محاسبه شد (۲).

سنجش تولید روزانه اسپرم (Daily sperm production, DSP)

پس از خروج بیضه چپ و حذف کپسول آن، پارانیشیم بیضه در ۲ میلی لیتر بافر (تریئون X-100)

هموژن و پس از رنگ آمیزی با اتوزین ۱ درصد، با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X تولید روزانه اسپرم در هر گرم بافت بیضه محاسبه شد (۲).

تخمین طول دم/اسپرم

برای تخمین طول دم اسپرم، اسپرهای رنگ آمیزی شده با اتوزین-نیگروزین با استفاده از گرید مرز و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X بررسی و به طور میانگین ۲۰۰ اسپرم شمارش گردید و طول دم اسپرم بر حسب μm محاسبه شد (۲).

سنجش بلوغ اسپرم

گسترش‌های اسپرم با آنیلین بلو رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰X مورد بررسی قرار گرفتند. درصد اسپرم‌هایی که سر آن‌ها به رنگ آبی روشن بود، به عنوان درصد اسپرم بالغ در نظر گرفته شد (۱۷).

ارزیابی کیفیت کروماتین اسپرم از طریق رنگ آمیزی هسته به روش آکریدین اورنژ

گسترش‌های اسپرم با فیکساتیو کارنوی فیکس و با محلول آکریدین اورنژ رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ فلورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰X مورد بررسی قرار گرفتند. اسپرم‌های با سر سبز رنگ دارای DNA دو رشته‌ای یا سالم و اسپرم‌های با سر زرد و قرمز دارای DNA تک رشته‌ای یا دناتوره می‌باشند (۱۷).

سنجش MDA

برای اندازه گیری مالون دی آلدئید، از روش Buege و Aust استفاده شد. جذب نمونه‌های سرم با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی (extinction coefficient) بر حسب نانومول بر میلی لیتر (nmol/ml) محاسبه شد (فرمول شماره ۱) (۱۸).

فرمول شماره ۱:

$$\text{Extinction coefficient (extinction)} = \frac{\text{چگالی}}{1/\text{cm}} = \frac{\text{Mol/l}}{x} \times 10^6 = \text{nmol/ml}$$

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین درصد تحرک اسپرم در گروه‌های مختلف موش پس از ۳۵ روز تیمار با اتوپوزاید (۱ mg/kg/day)، پنتوکسی فیلین (۱۰۰ mg/kg/day) و اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین، مقادیر به صورت mean±SD می‌باشند.

گروه‌ها	حرکت جلورونده	حرکت درجا	حرکت ساکن
کنترل	۷۳/۳۰ ± ۲/۱۱	۱۱/۹۷ ± ۱/۲۶	۱۴/۷۳ ± ۱/۳۷
اتوپوزاید	۴۰/۵۷ ± ۱/۴۵ *	۲۳/۱۷ ± ۱/۰۱*	۳۶/۲۵ ± ۰/۹۱*
اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین	۷۰/۸۹ ± ۱/۲۵ [#]	۱۳/۲۵ ± ۱/۴۹ [#]	۱۵/۸۵ ± ۰/۹۸ [#]
پنتوکسی فیلین	۷۲/۲۵ ± ۰/۸۸	۱۲/۹۰ ± ۱/۱۴	۱۴/۸۵ ± ۰/۱

(one way ANOVA, Tukey's test, P<۰/۰۵)

*: نشان دهنده P<۰/۰۰۱، درمقایسه گروه اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل،
نشان دهنده P<۰/۰۰۱ در مقایسه گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه اتوپوزاید می‌باشد.

تعداد و قابلیت حیات اسپرم

میانگین تعداد و قابلیت حیات اسپرم در گروه اتوپوزاید در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱). در گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین افزایش معنی‌داری در تعداد (P<۰/۰۱) و قابلیت حیات اسپرم (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه اتوپوزاید مشاهده شد. به‌طوری‌که در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵) (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: مقایسه میانگین تعداد و قابلیت حیات اسپرم در گروه‌های مختلف موش پس از ۳۵ روز تیمار با اتوپوزاید (۱ mg/kg/day)، پنتوکسی فیلین (۱۰۰ mg/kg/day) و اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین، مقادیر به صورت mean±SD می‌باشند.

گروه‌ها	تعداد اسپرم (×۱۰ ^۶)	قابلیت حیات اسپرم (درصد)
کنترل	۱۲/۰۸ ± ۰/۹۲	۶۸/۷۲ ± ۲/۲۵
اتوپوزاید	۷/۷۵ ± ۱/۲۱*	۳۱/۱۳ ± ۲/۵۸*
اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین	۱۰/۳۶ ± ۱/۱۶ [#]	۶۴/۷۲ ± ۲/۸۵**
پنتوکسی فیلین	۱۱/۳۹ ± ۱/۰۷	۶۶/۷۱ ± ۲/۱۸

(one way ANOVA, Tukey's test, P<۰/۰۵)

*: نشان دهنده P<۰/۰۰۱، درمقایسه گروه اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل،
نشان دهنده P<۰/۰۱ و **: نشان دهنده P<۰/۰۰۱ در مقایسه گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه اتوپوزاید می‌باشد.

تولید روزانه و طول دم اسپرم

میانگین تولید روزانه و طول دم اسپرم در گروه اتوپوزاید در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری

سنجش میزان ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام (FRAP)

ابتدا محلول استاندارد سولفات آهن (Feso4, 7H2o) با غلظت ۱mM آماده و رقت‌های مختلف تهیه شد، سپس جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد رسم گردید. با استفاده از فرمول رگرسیون حاصل، میزان ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام نمونه‌های سرم محاسبه گردید (۱۹).

آنالیز آماری

داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۶ 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 میانگین‌ها در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

قابلیت تحرک اسپرم

کاهش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های پیش‌رونده و افزایش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های درجا و ساکن در گروه اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). در گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه اتوپوزاید افزایش معنی‌داری در حرکت پیش‌رونده اسپرم و کاهش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت درجا و ساکن دیده شد (P<۰/۰۰۱) که در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵). با مقایسه میانگین حرکت پیش‌رونده، درجا و ساکن در گروه پنتوکسی فیلین نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵) (جدول شماره ۱).

نشان داد ($P < 0.001$). افزایش معنی داری در میانگین تولید روزانه اسپرم و طول دم اسپرم در گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه اتوپوزاید مشاهده شد ($P < 0.001$). از مقایسه میانگین تولید روزانه اسپرم در گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P > 0.05$), در حالی که میانگین طول دم اسپرم در گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0.001$). مقایسه میانگین تولید روزانه و طول دم اسپرم در گروه پنتوکسی فیلین در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی داری نداشت ($P > 0.05$) (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: مقایسه میانگین تولید روزانه و طول دم اسپرم در گروه‌های مختلف موش پس از تیمار ۳۵ روز با اتوپوزاید (1 mg/kg/day)، پنتوکسی فیلین (100 mg/kg/day) و اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین، مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشد

گروه‌ها	تولید روزانه اسپرم ($10^6/\text{g}$)	طول دم اسپرم (μm)
کنترل	25.71 ± 1.95	119.94 ± 2.67
اتوپوزاید	$17.83 \pm 1.29^*$	$91.53 \pm 2.86^*$
اتوپوزاید + پنتوکسی فیلین	$23.53 \pm 1.37^\#$	$106.28 \pm 2.96^{\#*}$
پنتوکسی فیلین	24.32 ± 1.56	115.73 ± 2.11

(one way ANOVA, Tukey's test, $P < 0.05$)

*: نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه گروه اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل، #: نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه اتوپوزاید، +: نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

مورفولوژی اسپرم

میانگین درصد مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم در گروه اتوپوزاید در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0.001$). از مقایسه میانگین درصد مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم در گروه تیمار همزمان اتوپوزاید با پنتوکسی فیلین نسبت به گروه اتوپوزاید کاهش معنی داری دیده شد ($P < 0.001$), اما به حد گروه کنترل نرسید، به طوری که، افزایش معنی داری

در درصد مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم در گروه تیمار همزمان اتوپوزاید با پنتوکسی فیلین نسبت به گروه کنترل وجود داشت ($P < 0.001$) (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۴: مقایسه میانگین درصد مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم در گروه‌های مختلف موش پس از ۳۵ روز تیمار با اتوپوزاید (1 mg/kg/day)، پنتوکسی فیلین (100 mg/kg/day) و اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین، مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشند

گروه‌ها	مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم (درصد)
کنترل	17.04 ± 1.93
اتوپوزاید	$45.92 \pm 1.36^*$
اتوپوزاید + پنتوکسی فیلین	$20.28 \pm 1.34^{\#*}$
پنتوکسی فیلین	16.25 ± 1.70

(one way ANOVA, Tukey's test, $P < 0.05$)

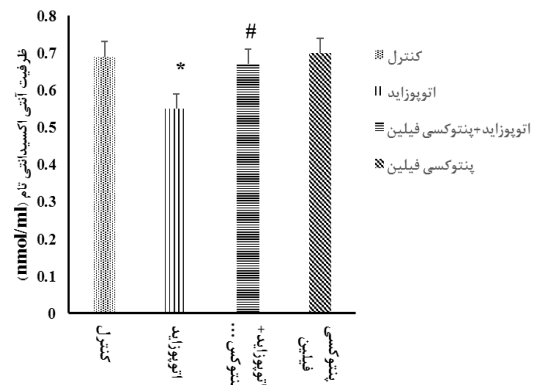
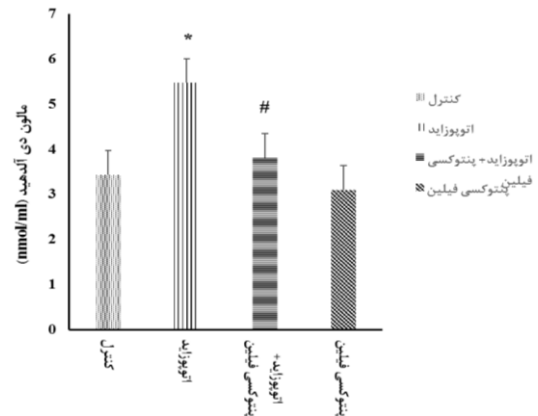
*: نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه گروه اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل، #: نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه اتوپوزاید، +: نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

ارزیابی تمامیت ساختار دو رشته‌ای DNA و تغییرات هیستون در فرآیند بلوغ اسپرم

با مقایسه تمامیت ساختار دو رشته ای DNA و بلوغ اسپرم در گروه اتوپوزاید نسبت به کنترل تفاوت معنی داری مشاهده نگردید ($P > 0.05$).

بررسی میزان غلظت مالون دی آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام

افزایش معنی داری در سطح MDA و کاهش معنی داری در ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام در گروه اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ($P < 0.001$). مقایسه گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه اتوپوزاید کاهش معنی دار سطح MDA و افزایش معنی دار ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام را نشان داد ($P < 0.001$). از مقایسه سطح MDA و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام در گروه اتوپوزاید+پنتوکسی فیلین نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($P > 0.05$) (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۵: مقایسه سطح MDA و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در گروه‌های مختلف موش پس از ۳۵ روز تیمار با اتوپوزاید (۱ mg/kg/day)، پنتوکسی فیلین (۱۰۰ mg/kg/day) و اتوپوزاید + پنتوکسی فیلین، مقادیر به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ می‌باشند (one way ANOVA, Tukey's test, $P < 0.05$)

*: نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه گروه اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل، # نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه گروه اتوپوزاید + پنتوکسی فیلین نسبت به گروه اتوپوزاید.

بحث

نتایج حاضر کاهش معنی داری در تعداد اسپرم و درصد اسپرم‌های زنده و دارای حرکت پیش‌رونده و افزایش معنی داری در درصد اسپرم‌های دارای حرکت درجا و ساکن در گروه اتوپوزاید در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که نتایج مطالعات قبلی نیز این یافته‌ها را تایید می‌کند (۲۱، ۲۰، ۱۶). در واقع اتوپوزاید با تولید رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو باعث افزایش بیان پروتئین‌های پرو آپوپتوتیک BAX و کاهش بیان پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک خانواده BCL2 می‌گردد.

اتوپوزاید هم‌چنین با ایجاد پراکسیداسیون لیپید، باعث تغییر در نفوذپذیری غشاء و تجزیه شدن اندامک‌هایی همچون، میتوکندری می‌گردد، این تغییر در پتانسیل غشاء میتوکندری منجر به آزاد شدن فاکتورهای آپوپتوسیتوزیک مثل سیتوکروم c و فاکتورهای القاء کننده آپوپتوزیس می‌شود، که سیتوکروم c برای فعال کردن Apaf-1 (فاکتور القاء کننده آپوپتوز) ضروری است که باعث شروع فعالیت کاسپازها و نهایتاً راه اندازی مسیر آپوپتوز می‌شود که در نتیجه کاهش تعداد، قابلیت حیات اسپرم و درصد اسپرم‌های پیش‌رونده را موجب می‌گردد (۲۴-۲۲). از طرفی اثرات مخربی که اتوپوزاید بر سلول‌های لیدیک دارد باعث کاهش هورمون تستوسترون می‌شود که نهایتاً می‌تواند منجر به کاهش تعداد اسپرم گردد (۲۵). شواهد نشان می‌دهد که تیمار با اتوپوزاید از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش سطح ROS با اسیدهای چرب اشباع نشده در قسمت میانی اسپرم واکنش داده و با ایجاد تغییر در سیستم آنزیمی سلول‌های اسپرم نهایتاً منجر به افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد. این آسیب به اسپرم با کاهش سیالیت و تراوایی غشاء باعث تخریب میتوکندری و تخلیه ATP می‌شود که در نتیجه قابلیت تحرک اسپرم را کاهش می‌دهد (۲۶، ۲۷). از طرفی از پیامدهای مخرب آپوپتوز می‌توان به، اختلالات غشاء سلول، افزایش ناهنجاری‌های سر اسپرم، متراکم شدن هسته و شکسته شدن DNA اشاره کرد که مجموع این فرایندها ممکن است قابلیت حیات اسپرم‌ها را کاهش دهند (۲۸).

در مطالعه‌ای که انجام شد، میانگین درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم در گروه تیمار اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری یافت. در تائید مطالعات قبلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اتوپوزاید با افزایش سطح MDA و کاهش سطح ظرفیت آنتی اکسیدانی تام موجب القاء پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۲۸، ۲۹). وجود فراوان اسیدهای چرب اشباع نشده، پلاسماالوزن‌ها، و اسفنگومیلین‌ها در غشای اسپرم

و پایین بودن سطح مواد آنتی اکسیدانت، اسپرم را در برابر پراکسیداسیون لیپیدی بسیار حساس نموده است (۳۰). از اثرات مخرب پراکسیداسیون لیپیدی در سلول‌ها می‌توان به تخریب ساختار غشای پلاسمایی اسپرم و تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع اشاره کرد که در نهایت ممکن است منجر به آسیب ساختار لیپیدی غشاء، آپوپتوز یا مرگ سلولی و نهایتاً تغییرات مورفولوژیکی در سر و دم اسپرم گردد (۲۱).

مطالعات گوناگون هم‌چنین نشان داده است که بین اختلال در عملکرد طبیعی اسپرم و استرس اکسیداتیو ایجاد شده در مایع منی ارتباط وجود دارد، ترکیبات آنزیمی و غیر آنزیمی که برای محافظت از اسپرم در برابر ROS با یکدیگر تعامل دارند، سیستم آنتی اکسیدانتی محافظی را در مایع منی ایجاد می‌کنند (۳۱). بنابراین طبق نتایج پژوهش حاضر می‌توان گفت که احتمالاً اتوپوزاید با ایجاد استرس اکسیداتیو در مایع منی موجب تغییر مورفولوژی و عملکرد طبیعی اسپرم شده است. از طرفی مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم همراه با افزایش تولید ROS ممکن است به عنوان یک شاخص مفید برای آسیب احتمالی به DNA اسپرم عمل کند (۲۱). با این حال بررسی فرآیند بلوغ اسپرم و تمامیت ساختار دو رشته‌ای DNA اسپرم در بیضه موش‌های تیمار شده با اتوپوزاید، تفاوت معنی‌داری نشان نداد که می‌تواند به دلیل کوتاه بودن طول دوره تیمار، عدم اثر بخشی دوز دارو در حالت *in vivo* و یا حذف اسپرم‌های نابالغ در طی فرآیند اسپرماتوژنز به وسیله سلول‌های سرتولی به دلیل برخورداری از ویژگی فاگوسیتوزی آن‌ها باشد.

نتایج مطالعه حاضر همچنین کاهش معنی‌داری در طول دم و تولید روزانه اسپرم موش‌های تیمار شده با اتوپوزاید را نشان داد. تجویز اتوپوزاید منجر به کاهش سطح تستوسترون، FSH و هورمون لوتئینیزه می‌شود که نشان‌دهنده اختلال در محور هورمونی هیپوفیز-بیضه به دلیل ایجاد استرس اکسیداتیو توسط اتوپوزاید است (۳۲). که می‌تواند به علت اختلال عملکرد سلول‌های لیدیگ

ناشی از استرس اکسیداتیو باشد که خود با تغییرات محور هیپوفیز-بیضه مرتبط است (۲۱). بنابراین کاهش سنتز و ترشح تستوسترون که نقش مهمی در تکامل و تمایز سلول‌های اسپرم ایفا می‌کند، ممکن است عامل مؤثری جهت اختلال در اسپرماتوژنیز و اختلال در بلوغ و کیفیت اسپرم شده به طبع آن کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی، تولید روزانه و طول دم اسپرم باشد.

در مطالعه حاضر، افزایش معنی‌داری در میزان مالون‌دی‌آلدئید و کاهش معنی‌داری در ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در گروه اتوپوزاید نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. با توجه به نتایج تحقیقات گذشته می‌توان بیان کرد که، اتوپوزاید موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی از جمله گلوتاتیون (GSH) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز CAT می‌شود، که این فرایند باعث افزایش پراکسیداسیون لیپید و افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) می‌گردد (۲۸، ۳۳). در این مطالعه مشخص شد که تیمار هم‌زمان اتوپوزاید با پنتوکسی‌فیلین توانست اثرات مخرب اتوپوزاید بر روی پارامترهای اسپرم را بهبود ببخشد که پژوهش‌های پیشین نیز نتایج حاضر را تایید می‌کند (۷، ۳۴). پنتوکسی‌فیلین به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی، احتمالاً با افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی قادر است آسیب‌های ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد (ROS) در غشاء سلول را مهار کند و بدین صورت موجب افزایش تعداد اسپرم‌ها، بهبود روند اسپرماتوژنز و حفظ مورفولوژی طبیعی اسپرم گردد (۱۴، ۱۵). هم‌چنین احتمالاً پنتوکسی‌فیلین با افزایش جریان خون اپیدیدیم، مهار فسفودی استراز و افزایش سطح cAMP داخل سلول، به دنبال آن افزایش گلیکولیز میتوکندری و افزایش سطح ATP داخل سلول، موجب بهبود روند اسپرماتوژنز، افزایش تعداد اسپرم‌ها و هم‌چنین افزایش قابلیت حیات و تحرک اسپرم گردد (۸).

مطالعه، می‌توان به کاهش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و افزایش غلظت مالون‌دی‌الدئید نیز اشاره کرد. به نظر می‌رسد که سمیت القاء شده توسط اتوپوزاید از طریق ایجاد آپوپتوز و القاء استرس اکسیداتیو اصلی‌ترین عامل ایجادکننده‌ی آسیب‌های وارد شده باشد. پنتوکسی فیلین با افزایش قابل توجه سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و کاهش سطح MDA که خواص آنتی‌اکسیدانی آن را تایید می‌کند، در کاهش اثرات سیتوتوکسیک اتوپوزاید بر پارامترهای اسپرم موثر بوده که شواهدی را برای پنتوکسی فیلین به‌عنوان یک درمان بالینی احتمالی در برابر سمیت گنادی مرتبط با اتوپوزاید ارائه می‌دهد. اما با این حال ارزیابی توانایی سیتوپروتکتور آن در برابر اتوپوزاید و سایر انواع داروهای شیمی درمانی و هم‌چنین مکانیسم‌های احتمالی آن‌ها نیاز به تحقیقات بیش‌تری می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی با اخذ کد اخلاق (IR.ARAKMU.REC.1399.169) از دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه اراک به جهت حمایت مالی طبق قرارداد طرح پژوهشی به شماره ۹۹/۵۱۰ تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- Gurel G, CerenKuscu G, Buhur A, Dagdeviren M, Oltulu F, UlkuKarabayYavasoglu N, et al. Fluvastatin attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats by reducing oxidative stress and regulating the blood–testis barrier via mTOR signaling pathway. *Hum Exp Toxicol* 2019; 38(12): 1329-1343.
- Mahmoodi M, Bakhshi S, Sadeghzadeh F. Neutralizing the adverse effects of cyclophosphamide on the mouse testis and sperm parameters through pentoxifylline: A molecular and stereological study. *Andrologia* 2022; 54(10): e14543.
- Ren D, Villeneuve N. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc Natl AcadSci U S A* 2011; 108(4): 1433-1438.
- Saied M, Ali K, Mosayeb A. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil alleviates testis failure induced by Etoposide in male rats. *Tissue Cell* 2023; 9: 102016.

5. Zhang W, Gou P, Dupret JM, Chomienne C, Rodrigues-Lima F. Etoposide, an anticancer drug involved in therapy-related secondary leukemia: Enzymes at play. *Transl Oncol* 2021; 14(10): 101169.
6. Mohammadzadeh S, Kiani A, Amiri M. Lycopene modulates hepatic toxicity and testicular injury induced by etoposide in male rats. *F S Sci* 2023; 4(1): 30-35.
7. Kheradmand N, Mehranjani MS, Mahmoodi M. The effect of pentoxifylline on changes in testicular tissue and spermatogenesis indices in mice treated with dexamethasone. *Qom Univ Med Sci J* 2019; 13(7): 29-41 (Persian).
8. Fadl AM, El-Shahat KH, Hashem MF. Effect of pentoxifylline on the testicular hemodynamic, volume, testosterone, nitric oxide levels and semen quality in Ossimi rams during non-breeding-season. *Theriogenology* 2023; 209: 126-133.
9. Tournaye H, Van Steirteghem AC, Devroey P. Pentoxifylline in idiopathic male-factor infertility: a review of its therapeutic efficacy after oral administration. *Hum Reprod* 1994; 9(6): 996-1000.
10. 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; 2016: 3406802.
11. Salahshoor MR, Faramarzi A, Roshankhah S, Jalili C. The protective effect of Pentoxifylline on testopathy in male rats following Dimethyl Nitrosamine administration: An experimental study. *Int J Reprod BioMed* 2019; 17(10): 727-738.
12. 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.
13. 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.
14. Zakaria A, Al-Busadah KA. Pentoxifylline efficiency in protecting testes against cadmium toxicity. *J Anim Vet Adv* 2015; 14(1): 18-29.
15. Dhulqarnain AO, Takzaree N, Hassanzadeh G, Tooli H, Malekzadeh M, Khanmohammadi N, et al. Pentoxifylline improves the survival of spermatogenic cells via oxidative stress suppression and upregulation of PI3K/AKT pathway in mouse model of testicular torsion-detorsion. *Heliyon* 2021; 7(4): e06868.
16. Tousson E, Bayomy MF, Ahmed AA. Rosemary extract modulates fertility potential, DNA fragmentation, injury, KI67 and P53 alterations induced by etoposide in rat testes. *Biomed Pharmacother* 2018; 98: 769-774.
17. Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Shahverdi AR, Ahmadi A, Baeeri M, Mohammadirad A, et al. Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nano-particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 266(3): 356-365.
18. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-310.
19. Biskup I, Golonka I, Sroka Z, Gamian A, Sroka Z. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postepy Hig Med Dosw* 2013; 67: 958-963.
20. Moradi M, Goodarzi N, Faramarzi A, Cheraghi H, Hashemian AH, Jalili C. Melatonin protects rats testes against bleomycin, etoposide, and cisplatin-induced toxicity via mitigating nitro-oxidative stress and apoptosis. *Biomed Pharmacother* 2021; 138: 111481.

21. Alanbaki AA, Mayali HM, Mayali HK. The protective effect of quercetin and hesperidin on etoposide induced toxicity in male rats testicular. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2017; 9(8): 1394-1405.
22. Codelia VA, Cisterna M, Alvarez AR, Moreno RD. p73 participates in male germ cells apoptosis induced by etoposide. *Mol Hum Reprod* 2010; 16(10): 734-742.
23. Ortiz RJ, Lizama C, Codelia VA, Moreno RD. A molecular evaluation of germ cell death induced by etoposide in pubertal rat testes. *Mol Hum Reprod* 2009; 15(6): 363-371.
24. Nooridalui MR, Abdollah zade R. Role of p53 in Apoptosis and Cancer Therapy. *Intern Med Today* 2014; 20(3): 191-201.
25. Bandak M, Jørgensen N, Juul A, Lauritsen J, Kier MGG, Mortensen MS, et al. Longitudinal Changes in Serum Levels of Testosterone and Luteinizing Hormone in Testicular Cancer Patients after Orchiectomy Alone or Bleomycin, Etoposide, and Cisplatin. *Eur Urol Focus* 2018; 4(4): 591-589.
26. Rahman SU, Huang Y, Zhu L, Feng S, Khan IM, Wu J, et al. Therapeutic role of green tea polyphenols in improving fertility: a review. *Nutrients* 2018; 10(7): 834.
27. Attia SM, Ahmad SF, Harisa GI, Mansour AM, El Sayed M, Bakheet SA. Wogonin attenuates etoposide-induced oxidative DNA damage and apoptosis via suppression of oxidative DNA stress and modulation of OGG1 expression. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 59: 724-730.
28. El-Garawani I, Hassab S, Nabi E, El-Ghandour E. The protective effect of (Foeniculum vulgare) oil on etoposide-induced genotoxicity on male albino rats. *Eur J Pharm Med Res* 2017; 4(7): 180-194.
29. Palo AK, Sahu P, Choudhury RC. Etoposide-induced cytogenotoxicity in mouse spermatogonia and its potential transmission. *J Appl Toxicol* 2005; 25(2): 94-100.
30. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2(1): 12.
31. Kurkowska W, Bogacz A, Janiszewska M, Gabrys E, Tiszler M, Bellanti F, et al. Oxidative stress is associated with reduced sperm motility in normal semen. *Am J Mens Health* 2020; 14(5): 1557988320939731.
32. Kilarkaje N, Mousa AM, Al-Bader MM, Khan KM. Antioxidants enhance the recovery of three cycles of bleomycin, etoposide, and cisplatin-induced testicular dysfunction, pituitary-testicular axis, and fertility in rats. *Fertil Steril* 2013; 100(4): 1151-1159.
33. El Nabi SH, Elfiky M, Salman A, El-Shamy S, Ouda R, El-Garawani I. Modulatory Effect of Zingiber Officinale Oil on Oxidative Stress and DNA Damage in Etoposide-Treated Rats. *Scholars Bulletin* 2019; 5(7): 328-335.
34. Feyli S, Ghanbari A, Keshtmand Z. Therapeutic effect of pentoxifylline on reproductive parameters in diabetic male mice. *Andrologia* 2017; 49(1): e12604.
35. Akanji OD, Hassanzadeh G, Malekzadeh M, Khanmohammadi N, Khanezad M, Sadeghiani G, et al. Pentoxifylline promotes spermatogenesis via upregulation of the Nrf2-ARE signalling pathway in a mouse model of germ-cell apoptosis induced by testicular torsion-detorsion. *Reprod Fertil Dev* 2023; 35(7): 423-432.
36. Gholami A, Ataei S. Pentoxifylline Attenuates Arsenic Trioxide-Induced Cardiac Oxidative Damage in Mice. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 6406318.