

The effect of pentoxifylline in improvement of spermatogenesis and apoptosis reduction in testicular damage induced by torsion in an animal model

Mehrnoush Malekzadeh¹, Omotosho Dhulqarnain Akanji², Tayebeh Rastegar^{3*}

1. Department of Anatomy, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. Department of Anatomy, Faculty of Basic Medical Sciences, Olabisi Onabanjo University, Sagamu, Ogun State, Nigeria
3. Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author e-mail: Rastegar2002@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Torsion leads to the formation of free radicals and eventually apoptosis, which plays an important role in the pathophysiology of testicular damage. Recent reports have focused on the role of pentoxifylline (PTX) against free radicals. Therefore, in this study, we investigated the effect of pentoxifylline on testicular injury due to torsion.

Materials and Methods: 20 male mice (6 weeks) were divided into 4 groups. Control group (Sham torsion operation), T1 (torsion with single-dose of 100 mg/kg of pentoxifylline, T2 (torsion with 25 mg/kg/d for 2 weeks) and T/D (Torsion-Detorsion). Animals in groups T1, T2 and T/D were subjected to 720° rotation of the left testicular spermatic cord clockwise for 2 hours followed by 30 minutes of detorsion. After detour, the drug was administered intraperitoneally. The left testicles of all animals were removed on day 35 after torsion for histopathological and biochemical evaluation. Statistical analysis was done by SPSS software using Tukey's test.

Results: Micromorphological analysis of testicular seminiferous tubules showed that there was a significant increase in mean tubular diameter, Johnson scores and number of germ cells in T1 group as compared to T2 and T/D ($P < 0.05$). However, no significant difference was observed in the number of Sertoli, Leydig and Myoid cells in all groups ($P < 0.05$). Analysis of oxidative stress indices showed that pentoxifylline increased the level of SOD, catalase, mRNA expression of Akt and pi3k genes ($P < 0.05$) and reduced the amount of MDA and caspase-3 levels in T1 and T2 as compared with T/D ($P \leq 0.05$).

Conclusion: Pentoxifylline can be used as a supplementary drug after surgery to treat torsion. However, further studies are needed to evaluate the effects of pentoxifylline in this area.

Keywords: Pentoxifylline, Torsion, Spermatogenesis, Apoptosis

Received: Apr 25, 2023

Revised: Jun 06, 2023

Accepted: Jun 21, 2023

How to cite this article: Malekzadeh M, Akanji OD, Rastegar T. The effect of pentoxifylline in improvement of spermatogenesis and apoptosis reduction in testicular damage induced by torsion in an animal model. Daneshvar Medicine 2023; 31(2):1-15. doi: 10.22070/DANESHMED.2023.17664.1348

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.



نقش پنتوکسی فیلین در بهبود اسپرماتوزن و کاهش آپاپتوز در آسیب بیضه ناشی از تورشن در مدل حیوانی

مهرنوش ملک زاده^۱، امونوشو آکانجی ذوالقرنین^۲، طیبه رستگار^{۳*}

۱. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲. گروه آناتومی، دانشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه اولاییسی اوانباجو، نیجریه
۳. گروه آناتومی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

Email: trastegar2002@gmail.com

*نویسنده مسئول: طیبه رستگار

چکیده

مقدمه و هدف: چرخش طناب بیضه‌ای یا تورشن (Torsion) منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد و نهایتاً آپاپتوز می‌شود که در پاتوفیزیولوژی آسیب بیضه نقش مهمی دارد. گزارش‌های اخیر نقش محافظتی پنتوکسی فیلین (PTX) در برابر رادیکال‌های آزاد را مشخص کرده‌اند؛ بنابراین، ما در این مطالعه اثر پنتوکسی فیلین را در آسیب بیضه ناشی از تورشن بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها: ۲۰ موش نر (۶ هفته) به ۴ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل (در شرایط تورشن بدون جراحی)، T1 (تورشن همراه با تک‌دوز 100 mg/kg/lp پنتوکسی فیلین)، T2 (تورشن همراه با 25 mg/kg/lp پنتوکسی فیلین به مدت ۲ هفته) و T/D (تورشن - دتورشن). حیوانات در گروه‌های T1، T2 و T/D تحت چرخش ۷۲۰ درجه طناب اسپرماتیک بیضه سمت چپ در جهت عقربه‌های ساعت به مدت ۲ ساعت و به دنبال آن ۳۰ دقیقه عدم چرخش قرار گرفتند. پس از دتورشن، تجویز دارو به صورت داخل صفاقی انجام شد. بیضه چپ همه حیوانات در روز ۳۵ پس از تورشن برای سنجش هیستوپاتولوژی و بیوشیمیایی برداشته شدند.

نتایج: تجزیه و تحلیل هیستومورفولوژیکی لوله‌های منی‌ساز بیضه نشان داد که میانگین قطر لوله، نمره جانسون و تعداد سلول‌های زایا در گروه T1 در مقایسه با T2 و T/D افزایش قابل توجهی وجود داشت ($P \leq 0.05$)، اما در تعداد سلول‌های سرتولی، لیدیگ و میوئید در همه گروه‌ها اختلاف معناداری مشاهده نشد ($P \leq 0.05$). تجزیه و تحلیل شاخص‌های استرس اکسیداتیو نشان داد که پنتوکسی فیلین سطح SOD، کاتالاز، بیان mRNA ژن‌های Akt و pi3k را افزایش می‌دهد ($P \leq 0.05$) و میزان MDA و سطح کاسپاز ۳ در T1 و T2 در مقایسه با T/D را کاهش می‌دهد ($P \leq 0.05$). تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SPSS با استفاده از تست Tukey انجام شد.

نتیجه‌گیری: پنتوکسی فیلین می‌تواند به‌عنوان یک درمان کمکی بعد از جراحی در درمان آسیب بیضه مربوط به تورشن استفاده شود. هرچند، مطالعات بیشتری برای ارزیابی اثرات پنتوکسی فیلین در این زمینه لازم است.

واژه‌های کلیدی: پنتوکسی فیلین، تورشن، اسپرماتوزن، آپاپتوز

وصول مقاله: ۱۴۰۲/۰۲/۰۵

اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۰۳/۱۶

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۱

مقدمه

پیچ‌خوردگی طناب بیضه یا تورشن (*Testicular torsion*) یک اورژانس اورولوژیک و دردناک است که معمولاً نوزادان، کودکان و نوجوانان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باید سریعاً تحت درمان قرار گیرند تا از آسیب دائمی به بیضه‌ها جلوگیری شود (۱). طول مدت و درجه تورشن بیضه با سطح آسیب به بیضه‌ها مطابقت دارد. مطالعات نشان داده‌اند که تورشن یک‌طرفه منجر به ایسکمی بیضه با سطح بالای استرس اکسیداتیو، افزایش تولید لیپید پراکسیداسیون، کاهش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش میزان آنزیم‌های میتوکندریایی در رده سلول‌های زایا می‌شود (۲). گزارش شده است که ۶۰ دقیقه تورشن بیضه منجر به آپتوز سلول‌های زایا می‌شود و ۳ ساعت ایسکمی بیضه در حیوانات منجر به سطح بالایی از استرس اکسیداتیو، تخلیه گلوکاتیون بیضه و در نتیجه، اختلال در روند اسپرمتوزن می‌شود (۳). استرس اکسیداتیو ناشی از آسیب بیضه به واسطه خون‌رسانی مجدد (*Reperfusion*) است که با ایجاد ناگهانی پراکسیداسیون لیپید و سرکوب هم‌زمان فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زا از جمله سوپراکسید دیسموتاز (*SOD*)، کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز پشتیبانی می‌شود (۴). درحالی‌که تورشن و ریپرفیوژن هر دو منجر به ایسکمی و آسیب می‌شوند، خون‌رسانی مجدد یا ریپرفیوژن منبع اصلی تشکیل رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپید است (۵). از طرفی رادیکال‌های آزاد اثرات مفیدی در فیزیولوژی اسپرم مانند بلوغ و ظرفیت اسپرم دارند (۶). تخمین زده می‌شود که تورشن بیضه سالانه در هر ۴۰۰۰ مرد زیر ۲۵ سال یک مورد اتفاق می‌افتد و سبب آسیب بیضه و ناباروری در ایالات متحده آمریکا می‌شود. درمان تورشن بیضه شامل مداخله جراحی برای دتورشن و بازگرداندن جریان خون بیضه پس از آسیب ایسکمی است. باین‌حال، بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که ریپرفیوژن به دنبال دتورشن بیشتر منجر به ایسکمی و آسیب مجدد در

بیضه می‌شود. طی چند سال گذشته، مطالعات گسترده‌ای با هدف یافتن استراتژی‌های درمانی دارویی برای کاهش یا حتی جلوگیری از آسیب ایسکمی مجدد در بیضه صورت گرفته است. باین‌حال، به غیر از کاهش دمای کیسه بیضه، هیچ روش دیگری تاکنون با موفقیت در باین استفاده نشده است (۷).

مدل حیوانی تجربی تورشن بیضه به‌طور گسترده‌ای به‌منظور بررسی اثر بالقوه عوامل مختلف آنتی‌اکسیدانی در جلوگیری از آسیب بیضه ناشی از استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود. مطالعات مختلف اثر حفاظتی عواملی مانند عصاره سیر، اسید کافئیک، پنتوکسی فیلین، رزوراترول، دکسپانتنول، ال‌کارنیتین و پروپوفول در بیضه‌ها را گزارش کرده‌اند (۸-۱۰). بسیاری از مطالعات تأثیر پنتوکسی فیلین در مدیریت استرس اکسیداتیو را در اختلالات بیضه اثبات کرده‌اند. پنتوکسی فیلین آسیب ناشی از جریان خون مجدد را در مدل حیوانی تورشن بیضه کاهش می‌دهد. مطالعه چن و همکاران نشان داد که تجویز خوراکی پنتوکسی فیلین با سرکوب استرس اکسیداتیو از آسیب پاتولوژیک به بیضه جلوگیری می‌کند (۱۱). سلحشور و همکاران گزارش کردند که پنتوکسی فیلین موش‌ها را در برابر دی‌متیل‌نیتروزآمین (*DMN*) ناشی از تخریب بیضه محافظت و سبب بهبود تحرک و زنده‌مانی اسپرم می‌شود (۱۲). این مطالعات، در کنار هم، نقش محافظتی بالقوه پنتوکسی فیلین در برابر آسیب بیضه ناشی از استرس اکسیداتیو را نشان می‌دهد. باین‌حال گزارش‌ها به‌عنوان کاندید درمانی برای تورشن بیضه و همچنین مطالعات در مورد مکانیسم‌های مولکولی آسیب بیضه و مسیر سیگنالینگ زنده‌مانی سلول‌ها کم است؛ بنابراین، هدف از این مطالعه تعیین اثر محافظتی آنتی‌اکسیدانی پنتوکسی فیلین بر استرس اکسیداتیو و آپتوز سلول‌های زایا ناشی از تورشن بیضه و بررسی مسیر سیگنالینگ آن است.

مواد و روش‌ها

نگهداری حیوانات و ایجاد مدل

تعداد ۲۰ موش نر بالغ (Naval Medical Research Institute) 6 (NMRI) هفته‌ای (۲۰ تا ۲۵ گرم) از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران خریداری شد. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور/۱۲ ساعت تاریکی با دما 25 ± 3 درجه سانتی‌گراد و متوسط رطوبت نسبی ۵۰ درصد نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. همه مراحل مطابق با دستورالعمل‌های مصوب برای استفاده و مراقبت از حیوانات توسط دانشگاه علوم پزشکی تهران و شناسنامه گواهی اخلاق IR.TUMS.VCR.REC.1398.637 مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت. حیوانات برای مدت ۲ هفته سازگار شدند و پس از آن به‌طور تصادفی به چهار گروه ۵ تایی کنترل، T1 (حیوانات در این گروه پس از تورشن-دتورشن بی‌فاصله با تک‌دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پنتوکسی‌فیلین تحت درمان قرار گرفتند)، T2 (حیوانات در T2 پس از تورشن-دتورشن به مدت ۲ هفته ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پنتوکسی‌فیلین در روز (IP) دریافت کردند و Torsion-detorsion (T/D) تقسیم شدند.

برای ایجاد مدل، جراحی در موش‌های ۸ هفته در گروه‌های T1، T2 و T/D از طریق برش ایلویانگونیال طبق روش ترنر و همکاران تحت بیهوشی عمیق هیدروکلرید کتامین (۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، داخل صفاقی) انجام شد. پس از تراشیدن پوست و برش دیواره شکم و استفاده از محلول ۱۰ درصد پویدون-ید بیضه چپ پیدا شد. تورشن با چرخاندن طناب بیضه‌ای یا اسپرماتیک سمت چپ (۷۲۰ درجه در جهت عقربه‌های ساعت) ایجاد شده و با ثابت کردن آن روی بیضه با نخ بخیه ۰/۵ ادامه یافت. پس از ۲ ساعت از آسیب ایسکمی، طناب بیضه برگردانده و در کیسه بیضه جایگزین شد و به مدت ۳۰ دقیقه ریپرفیوژن انجام و برش شکم بخیه زده شد. حیوانات گروه کنترل تحت عمل ساختگی قرار گرفتند و تنها برش در ناحیه شکم بدون چرخاندن طناب اسپرماتیک انجام شد. در پایان هفته ۵ پس از تورشن-دتورشن، همه حیوانات با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته و بیضه چپ در تمام حیوانات در شرایط استریل خارج شد. بیضه‌ها توزین و

ثبت شدند و سپس از نظر طولی به دو نیمه تقسیم شدند: یکی برای ارزیابی هیستوپاتولوژیک و قسمت دیگر برای ارزیابی وضعیت استرس اکسیداتیو و آپوپتوز. نمونه‌ها برای ارزیابی هیستوپاتولوژیک در فیکساتیو فرمالدئید غوطه‌ور شدند؛ درحالی‌که نمونه‌ها برای سایر سنجش‌ها در بطری‌های شیشه‌ای با درپوش لاستیکی قرار گرفته، برچسب‌گذاری شده و تا زمان آزمایش در -80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۳).

ارزیابی هیستوپاتولوژی بافت بیضه

پس از ۴۸ ساعت، نمونه‌های ثابت‌شده در فرمالدئید، تحت پاسازبافتی قرار گرفتند. آبیگری با درجه‌های الکلی صعودی و سپس در ۲ تغییر زایلن شفاف‌سازی شدند. پس از آن، نمونه‌ها با پارافین قالب‌گیری و مقاطع نازک ۵ میکرومتر با میکروتوم به دست آمد و پس از چسباندن مقاطع با H&E رنگ‌آمیزی شدند. ۵ فیلد لوله منی‌ساز گرد در هر مقطع با کمک میکروسکوپ نوری (Olympus IX71) مجهز به دوربین (Olympus E-30) مورد بررسی قرار گرفت. سپس لوله‌ها با روش جانسون به شرح زیر درجه‌بندی شدند: نمره ۱۰- اسپرماتوزن کامل با لوله‌های معمولی منظم؛ نمره ۹- اسپرم فراوان با وجود اپیتلیوم زایای نامنظم؛ نمره ۸- وجود تعداد کمی اسپرم؛ نمره ۷- لوله‌های اسپرم‌ساز بدون اسپرم اما تعداد زیادی اسپرماتید؛ نمره ۶- وجود چند اسپرماتید؛ نمره ۵- بدون اسپرم یا اسپرماتید؛ نمره ۴- حضور تعداد کمی اسپرماتوسیت‌ها؛ نمره ۳- وجود اسپرماتوگونی؛ نمره ۲- وجود سلول‌های سرتولی؛ و نمره ۱- هیچ سلولی وجود ندارد. نتایج به‌عنوان میانگین و خطای استاندارد میانگین (SEM) برای هر گروه بیان شد. سپس، تعداد سلول‌های مختلف زایا (اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتیدهای گرد، اسپرماتیدهای کشیده، سلول‌های سرتولی، میوئید و لیدینگ در اپیتلیوم لوله منی‌ساز شمارش شد و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز با کمک نرم‌افزار ImageJ اندازه‌گیری شد.

ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو

SOD (Superoxide Dismutase)

فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بافت با توجه به روش Paoletti and Mocali تعیین شد. به‌طور خلاصه، سطح فعالیت SOD بر اساس توانایی آن در مهار اکسیداسیون NADH در مخلوط واکنش و تبدیل

شد. این محلول خنک شد و سپس در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب در ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Biospect) خوانده شد (۱۶).

Quantitative real-time PCR

بیان ژنهای PI3K و AKT در مسیر سیگنالینگ ضد آپوپتوز PI3K/AKT توسط Real Time-PCR ارزیابی شد. استخراج RNA از سلولها با استفاده از معرف Trizol انجام شد (Roche، آلمان). ۱ میکروگرم در میلی لیتر DNase I (Fermentas، آلمان) برای جلوگیری از آلودگی به DNA اضافه شد. اندازه گیری غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (Eppendorf، آلمان). پس از آن سنتز DNA مکمل (cDNA) با توجه به دستورالعمل سازنده توسط کیت سنتز cDNA (PrimeScript™ RT Reagent Kit Fast) انجام شد. PCR با استفاده از ترموسایکلر (Bio-Rad) و ترکیب SYBR Green SYBR TaKaRa-Premix Ex Taq II (Tli Plus)، آغازگر (RR820L)، آغازگر رو به جلو، آغازگر معکوس و ۱۰ نانوگرم از cDNA الگو انجام شد. نمونهها در مرحله ذوب اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد و سپس مرحله ذوب (۴۰ دوره) برای ۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد و سنتز به مدت ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. کیفیت واکنش PCR با استفاده از آنالیز منحنی ذوب با β -اکتین به عنوان یک ژن مرجع تعیین شد. آستانه چرخه (Ct) ژن مرجع از Ct ژن هدف کم شد تا ΔCt به دست آید و سپس $\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد تا بیان نسبی ژنهای مورد نظر اندازه گیری شود. توالی آغازگرهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است (۱۷).

آنیونهای سوپراکسید (O⁻²) به H₂O₂ و اکسیژن مولکولی (O₂) تعیین شد. فعالیت آنزیمی SOD با کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر در واکنش تعیین شد (۱۴).

کاتالاز (Catalase)

فعالیت کاتالاز با روش تغییر یافته که Aebi در سال ۱۹۷۴ توصیف کرده است، مورد سنجش قرار گرفت. به طور خلاصه، ۱۰ UL اتانول ۱۰۰ درصد در ۵۰۰ IL نمونه مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ انکوبه شد. سپس ۴۵۰ IL مخلوط اتانول-بافت به ۵۰ تریتون X-100 (۱۰ درصد v/v) اضافه شد و پس از آن مقدار ۱۰۰ IL از این نمونه به همراه ۲/۸ میلی لیتر بافر فسفات (۵۰ میلی مولار، pH 7.00) برای اندازه گیری کاتالاز مورد استفاده قرار گرفت. تغییر در دانسیته نوری بی فاصله پس از افزودن ۱۰۰ IL سوپسترا H₂O₂ (۶۰ میلی مولار) در ۲۴۰ نانومتر انجام شد (۱۵).

(Malondialdehyde) MDA

تجمع مالون دی آلدئید (MDA) در بافتها نشان دهنده میزان پراکسیداسیون لیپیدها و سطح استرس اکسیداتیو است. MDA یک محصول نهایی پراکسیداسیون اسید چرب در فرایند پراکسیداسیون لیپیدهاست و سطح آن برای تعیین آسیب اکسیداتیو در بیضه ناشی از آسیب با یک کیت تجاری موجود (Bioxytech MDA-586 TM) مطابق با دستورالعمل تولیدکننده اندازه گیری شد. به طور خلاصه، ۲ گرم بافت هموزن بیضه در ۱۰ میلی گرم بافر فسفات حل شد (۲۰ میلی مولار؛ PH 7.4) و ۳۷۵ میلی گرم اسید تیوباربتوریک (TBA) در ۲ میلی لیتر HCl حل شد، با اسید تری کلرواستیک (TCA) (۱۰۰ میلی لیتر) ۱۵ درصد مخلوط شد و سپس در حمام آب ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بافت بیضه در محلول ۵/۱ درصد KCl هموزن و در نتیجه مخلوط همگن ۱۰ درصد به دست آمد. پس از آن، ۱ میلی لیتر از مخلوط بافت همگن با ۲ میلی لیتر محلول TBA-TCA-HCl مخلوط شده و سپس در آب جوش به مدت ۴۵ دقیقه گرم شده و محلول صورتی نارنجی تولید

جدول ۱. توالی پرایمرها

| Gene name | Amplicon length(bp) | Reverse (3' -5') | Forward (5' -3') | Gene name |
|-----------|---------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------|
| AKT1 | 140 | TCGTCTCTCTCTC CTGCCTCTT | CACCTTTA TCATCCGC TGCCT | AKT1 |
| Pik3k | 171 | AGGGAGCTGTAG AGGTTGTAGG | GGAGAAC CTATTGCG AGGGAAG | Pik3k |

شد. واکنش ایمنی و سیگنال‌ها توسط کمولومینسانس اندازه‌گیری و نتایج با نرم‌افزار NIH Image J کمی شد (۱۸).

آنالیز آماری

داده‌های تجربی توسط نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۳) و Microsoft Excel نسخه ۲۰۲۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمام نتایج به‌عنوان \pm SEM mean بیان شد. اختلاف معناداری آماری بین گروه‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه ارزیابی شد. مقایسه‌های چندتایی با استفاده از تست Tukey به‌عمل آمد. آزمون و تفاوت در $P \leq 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از GraphPad Prism (نسخه ۸/۰/۱، La Jolla، CA، USA) ترسیم شدند.

نتایج

تعداد سلول‌های رده زایا در هر گروه شمارش شد و نتیجه به‌صورت \pm SEM Mean (n = 5) و تفاوت معنادار در بین گروه‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. سلول اسپرما توگونی، اسپرما توسیت، اسپرما تید و اسپرم مشاهده شد، اما تعداد آنها در گروه تورشن نسبت به T1 و T2 کاهش یافته درحالی‌که سلول‌های سرتولی، لیدینگ و مایوئید طبیعی بودند.

Western blotting

از وسترن بلات برای ارزیابی فعالیت کاسپاز ۳ استفاده شد. به‌طور خلاصه، ۱۰۰ میلی‌گرم بافت بیضه در بافر لیزکننده سرد حاوی 50tris-HCl (pH 8.0)، mM 150 میلی مولار NaCl، 1 درصد Nonidet P-40، 10 درصد گلیسرول، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر فنیل متیل سولفونیل فلوراید، ۰/۵ درصد سدیم کوکسیل مهارکننده دی‌اکسیکلات، ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین و مهارکننده پروتئاز (Roche Applied Science) همگن شد. بافت بیضه هموژن در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و مایع رویی جمع شد. سپس ۱۰۰ میکروگرم پروتئین مایع رویی در هر لاین بارگذاری شد و روی ژل الکتروفورز ۱۰ درصد SDS-PAGE قرار داده شد و پس از آن پروتئین به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق روی غشاهای نیتروسولوز منتقل و با PBS حاوی ۵ درصد شیر خشک بدون چربی به مدت ۲ ساعت بلاک شد. غشاهای با استفاده از بافر 1 tris درصد حاوی Tween 20 شسته شدند و سپس با آنتی‌بادی مونوکلونال anti-caspase-3 (۱:۱۰۰۰؛ St. Abcam، USA، MO، Louis) یک شب انکوبه شدند. پس از آن، آنتی‌بادی ثانویه anti-rabbit akp-linked (۱:۱۰۰۰۰؛ Abcam) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق اضافه شد و سپس غشاهای با BCIP/NBT رنگ‌آمیزی شدند. GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی مثبت برای بارگذاری پروتئین استفاده

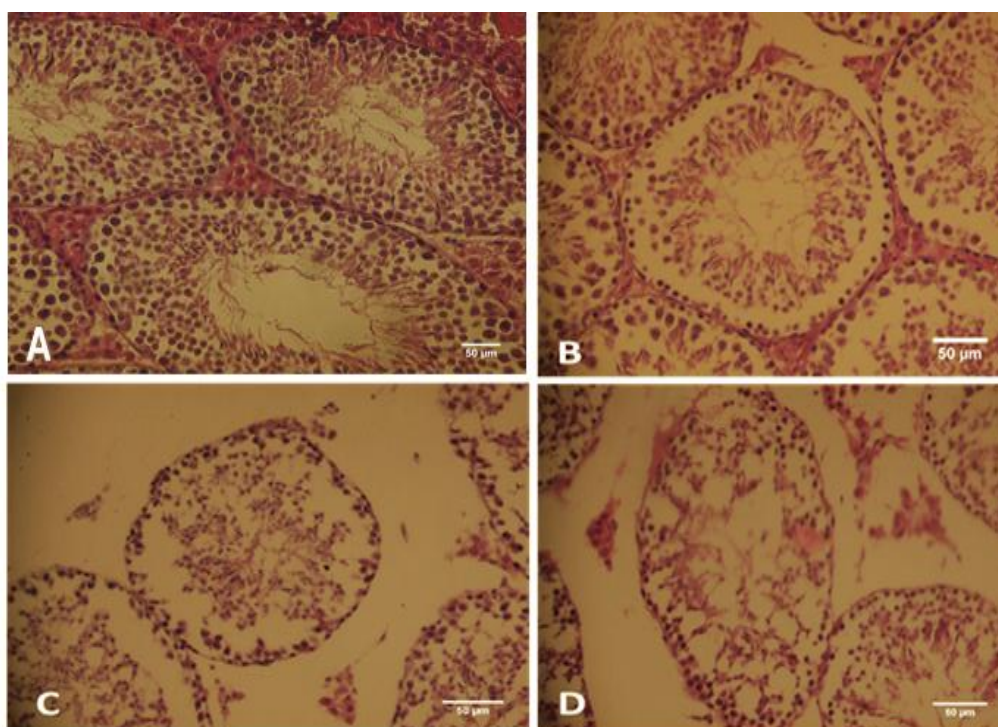
جدول ۲. پارامترهای توبول‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های کنترل، T1، T2 و TD، $a = P \leq 0.001$.

| Parameters | Control \pm SEM | 100mg \pm SEM | 25mg \pm SEM | T/D \pm SEM |
|--|--------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Diameter of seminiferous tubule (μ m) | 109.676 \pm 1.97 | 103.948 \pm 1.48 ^g | 91.453 \pm 1.20 ^{a, b} | 90.898 \pm 1.336 ^a |
| Johnson score | 8.33 \pm 0.16 | 7.55 \pm 0.20 ^{e, f} | 5.38 \pm 0.21 ^a | 4.28 \pm 0.16 ^{a, f} |
| Abnormal sperm (%) | 4.3 \pm 0.11 | 5.26 \pm 0.27 ^e | 6.6 \pm 0.24 ^{a, c} | 7.16 \pm 0.42 ^{a, b} |
| Spermatogonial count | 21.85 \pm 1.45 | 20.45 \pm 1.15 ^g | 13.85 \pm 11.32 ^{a, b} | 11.8 \pm 0.98 ^{a, b} |
| Spermatocytes count | 41.45 \pm 4.16 | 33.45 \pm 2.78 ^g | 21.7 \pm 1.72 ^{a, c} | 20.55 \pm 2.00 ^a |
| Round spermatids count | 78.15 \pm 5.45 | 65.15 \pm 4.96 ^g | 33.45 \pm 3.14 ^{a, b} | 15.85 \pm 1.72 ^{a, d} |
| Elongated spermatids count | 29.6 \pm 2.91 | 18.55 \pm 2.17 ^e | 15.25 \pm 2.93 ^a | 12.35 \pm 2.17 ^a |
| Sertoli cell count | 10.65 \pm 0.79 | 9.85 \pm 0.81 | 9.05 \pm 0.94 | 9.15 \pm 0.99 |
| Myoid cell count | 13.75 \pm 1.21 | 12.45 \pm 0.97 | 11.95 \pm 1.01 | 10.95 \pm 1.05 |
| Leydig cell count | 10.6 \pm 0.88 | 9.5 \pm 0.922 | 9.9 \pm 1.67 | 9.05 \pm 0.95 |

نتایج

اسیدوفیل، دیده می‌شوند. تغییرات ظاهری واضحی در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه حیوانات در گروه‌های T2 و TD وجود دارد که با تغییر شکل لوله‌ها، تعداد کم سلول زایا، هسته پیکنوتیک و اعوجاج و درهم‌ریختگی گسترده توبول‌ها مشخص می‌شود. در گروه TD، کاهش قابل توجهی در اسپرماتوزنز وجود دارد. اپیتلیوم ژرمینال به هم ریخته و در سیتوپلاسم سلول‌های لیدیگ واکوئل بسیاری با هسته ضعیف دیده شده و هسته‌ها در مقایسه با شاهد به شکل بیضی و کوچک‌تر بودند. در گروه T2، بی‌نظمی سلول‌ها وجود داشت اما این در مقایسه با گروه TD کاهش یافت، اگرچه سلول‌های لیدیگ طبیعی به نظر می‌رسند اما افزایش فضا‌های بینابینی مشاهده شدند. بعضی از قسمت‌ها احتقان عروقی را نشان می‌دهد (شکل ۱).

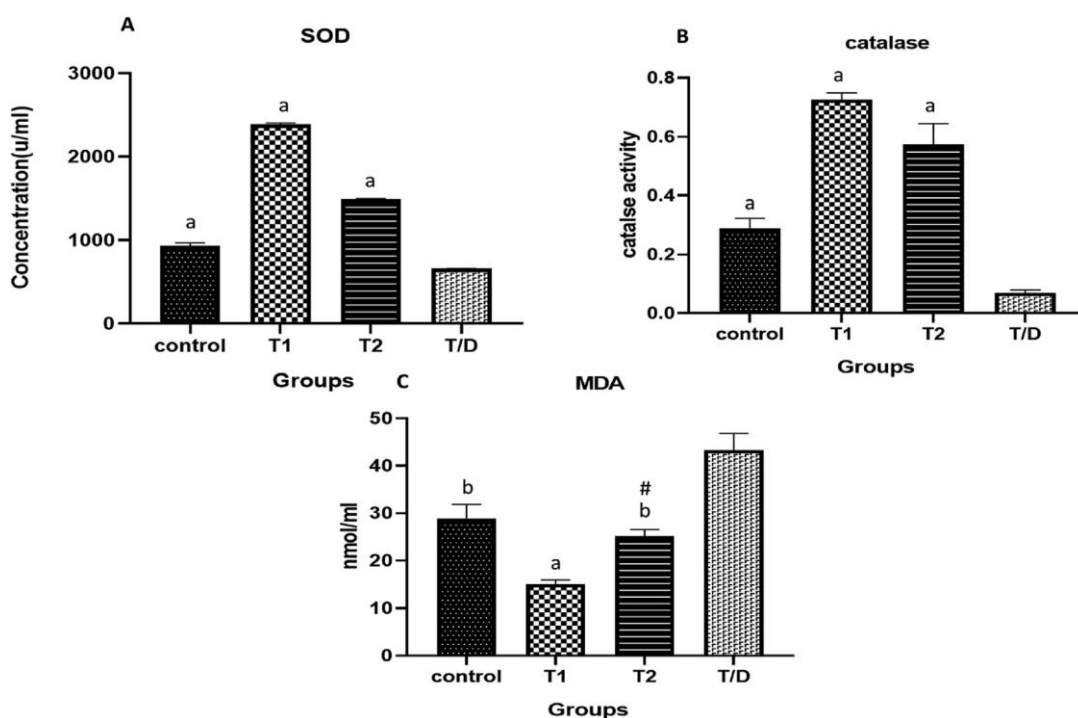
در مقایسه با کنترل، $b = P \leq 0.001$ در مقایسه با T1؛ $c = P \leq 0.05$ در مقایسه با T1؛ $d = P \leq 0.05$ در مقایسه با T2؛ $e = P < 0.05$ در مقایسه با کنترل؛ $f = P < 0.01$ در مقایسه با T2؛ $g = P > 0.05$ در مقایسه با کنترل بررسی هیستوپاتولوژیک توبول‌های اسپرم‌ساز نشان داد که قطر اپیتلیوم زایای توبول‌های اسپرم‌ساز کاهش یافته است و از نظر میانگین نمره جانسون بین کنترل، T2 و TD تفاوت معناداری وجود داشت. در سیستم درجه‌بندی جانسون، بیضه حیوانات در گروه کنترل دارای رده سلول‌های زایا و مورفولوژی طبیعی بودند. بافت همبند سست در فضای بینابینی با رگ‌های خونی، فیبروبلاست‌ها و سلول لیدیگ، سلول‌های بزرگ چندوجهی با هسته‌های یوکروماتیک حاوی هستک با سیتوپلاسم کم‌رنگ



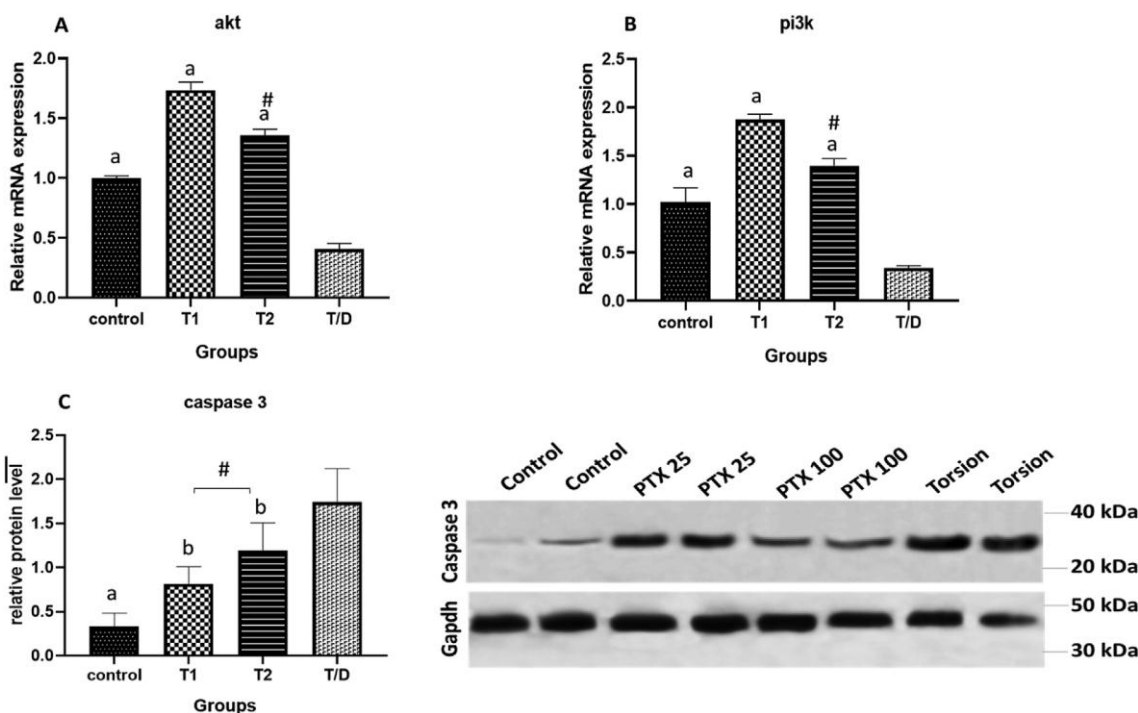
شکل ۱. ساختار هیستوپاتولوژیک لوله‌های منی‌ساز بافت بیضه در گروه‌های مختلف با میکروسکوپ نوری و رنگ‌آمیزی **H & E** در گروه‌های آزمایشی ۵ هفته پس از چرخش **A: کنترل** - بافت‌شناسی بیضه طبیعی، دارای رده سلول‌های زایا و مورفولوژی طبیعی هستند. بافت همبند سست در فضای بینابینی با رگ‌های خونی، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های بزرگ چندوجهی با هسته‌های یوکروماتیک حاوی هستک با سیتوپلاسم کم‌رنگ اسیدوفیل دیده می‌شوند. **B: T1** - افزایش سلول‌ها در ساختار لوله‌ای که تا حدی سازمان یافته و بهبود یافته است، **C: T2** - کاهش و درهم‌ریختگی سلولی در اپیتلیوم (→) و از هم گسیختگی ساختار بافت بینابینی (*). **D: T/D** - کاهش و درهم‌ریختگی سلولی در اپیتلیوم (→)، و از هم گسیختگی ساختار بافت بینابینی (*).

سایر گروه‌ها کاهش یافته بود ($P < 0.01$ یا 0.05) (شکل ۲). این به معنای اثر آنتی‌اکسیدانی پنتوکسی‌فیلین در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از پیچ‌خوردگی بیضه است. ارزیابی مارکر آپوپتوتیک کاسپاز ۳ توسط وسترن بلات انجام شد. بیان پروتئین کاسپاز ۳ در **T/D** در مقایسه با گروه‌های کنترل، **T1** و **T2** زیاد ($P < 0.01$ یا 0.05) بود که وجود سلول‌های زایای آپوپتوتیک را در تورشن تأیید می‌کند. **T1** و **T2** تفاوت معناداری ($P > 0.05$) نشان ندادند (شکل ۳).

برای ارزیابی سطح مارکرهای آنتی‌اکسیدانی (**SOD** و کاتالاز) و پراکسیداسیون لیپیدی، نشانگر استرس اکسیداتیو (**MDA**) الایزا انجام شد. فعالیت **SOD** و کاتالاز در گروه‌های شاهد، **T1** و **T2** به‌طور معناداری بیشتر از گروه **T/D** بود ($P \leq 0.05$). نشانگرهای آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با گروه کنترل در **T1** و **T2** نیز به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. همان‌طور که انتظار می‌رفت، در گروه **T/D** سطح نشانگر استرس اکسیداتیو (**MDA**) به میزان قابل توجهی ($P < 0.01$) نسبت به سایر گروه‌ها بالا بود. در گروه **T1** فعالیت **MDA** به‌طور قابل توجهی در مقایسه با



شکل ۲. نتایج ELISA برای ارزیابی مارکرهاى آنتى اکسیدانی و استرس اکسیداتیو: A SOD (سوپراکسید دیسموتاز)، B کاتالاز، C: MDA (مالون دی آلدئید). control: شش جراحی، T1: تورشن همراه با دریافت تک دوز پنتوکسی فیلین 100 mg/kg، T2: تورشن همراه با دریافت پنتوکسی فیلین ۲۵ mg/kg به مدت ۲ هفته، T/D: تورشن - دتورشن. $a = P < 0.01$ در مقایسه با T/D، $b = P < 0.05$ در مقایسه با T/D، $\# = P > 0.05$ در مقایسه با کنترل.



شکل ۳. بیان akt (A) و pi3k mRNA (B) و روش وسترن بلات برای کاسپاز ۳ پنج هفته پس از تورشن بیضه. β -کتین و GAPDH به عنوان کنترل داخلی عمل هستند. نمودار نسبت کمی سازی نشانگر آپاپتوز (کاسپاز ۳) به GAPDH را نشان می دهد. نتایج به صورت میانگین \pm SEM نشان داده شده است. $a = P < 0.01$ در مقایسه با T/D، $b = P < 0.05$ در مقایسه با T/D، $\# = P > 0.05$ در مقایسه با کنترل ارائه شده است.

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر نقش پنتوکسی فیلین را در اختلال روند اسپرمزایی و آسیب بیضه در نتیجه تورشن بیضه نشان داد. بر اساس مطالعه ما، پنتوکسی فیلین سلول‌های زایا را بازیابی کرد، ساختار بافتی در لوله‌های اسپرم‌ساز بهبود یافته، و سطح استرس اکسیداتیو را کاهش داده است و از آپتوز سلول‌های زایای بیضه ناشی از پیچ‌خوردگی و آسیب بیضه جلوگیری کرده است.

آسیب ایسکمی-ریپرفیوژن مجدد در بیضه‌ها معمولاً منجر به از بین رفتن سلول‌های زایا و در نتیجه منجر به ناباروری می‌شود. مطالعه ما نشان داد که چرخش ۷۲۰ درجه طناب اسپرماتیک بیضه به مدت ۲ ساعت سبب آپتوز می‌شود که با کاهش قابل توجه تعداد اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتیدهای گرد، کشیده و تخریب ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز همراه هست که با بسیاری از مطالعات گذشته مطابقت دارد. کاظمی و همکاران نشان دادند که آسیب ایسکمی ریپرفیوژن مجدد (IR) در بیضه‌ها باعث ناباروری در مردان می‌شود (۱۰). در مطالعه مشابه نشان داد که پیچ‌خوردگی ۷۲۰ درجه باعث ایسکمی می‌شود و مدت‌زمان یک ساعت تورشن و به دنبال آن دتورشن باعث از بین رفتن دائمی اسپرماتوزن می‌شود (۱۹). به همین ترتیب، بوزلو و همکاران گزارش دادند که چرخش ۷۲۰ درجه طناب اسپرماتیک به مدت ۲ ساعت منجر به از دست دادن برگشت‌ناپذیر اسپرماتوزن در موش صحرایی می‌شود. همچنین، کوزنتینو و همکاران تأثیر تغییرات جریان خون بیضه را در بافت‌شناسی بیضه همان طرف بررسی کردند، آنها ۷۲۰ درجه پیچش طناب را در دوره‌های ۱، ۳، ۵، ۹ و ۱۲ ساعت انجام دادند و سپس بیضه‌ها را در پایان دوره ایسکمیک برداشتند. آنها بیضه‌ها را در ۴ درجه‌بندی هیستوپاتولوژیک طبقه‌بندی کرده و آسیب به بیضه‌ها حتی پس از ۱ ساعت چرخش را مشاهده کردند. علاوه‌براین، مشاهده شده است که چرخش یک‌طرفه بیضه در نیمی از بیماران به‌طور جدی با اختلال اسپرماتوزن همراه هست (۲۰). در مطالعه دیگری،

شواهدی از آسیب‌شناسی در ۵۷ تا ۸۸ درصد نمونه‌های بیضه طرف مقابل پس از چرخش مشاهده شد که با هیالینزاسیون لوله‌ای، توقف بلوغ، تخریب سلول‌های زایا، ضخیم‌شدگی کانونی غشاء پایه و لوله‌های نابالغ مشخص شده بودند (۲۱). از دست‌دادن سلول‌های زایا و اسپرماتوزن مشاهده شده در این مطالعات با یافته‌های ما ارتباط دارد، اگرچه هیچ تغییر قابل توجهی در میانگین وزن بیضه‌ها، تعداد سلول‌های سرتولی، میوئید و لیدیگ مطابق با نتیجه مطالعه تسونایی وجود ندارد (۲۲).

بسیاری از مطالعات اثر حفاظتی پنتوکسی فیلین را بر آسیب بافت بیضه ناشی از تورشن را گزارش کرده‌اند. به‌عنوان مثال، مطالعه‌ای که توسط تخت‌فولادی و همکاران انجام شده، نشان داد که تجویز ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پنتوکسی فیلین به‌طور قابل توجهی باعث کاهش آسیب بیضه در مدل موش آسیب ایسکمی یک‌طرفه اندام عقبی می‌شود. در گروه تحت درمان با PTX، ویژگی‌های هیستوپاتولوژیک مانند ادم، احتقان، خونریزی و نکروز سلول‌های زایا در مقایسه با گروه ایسکمی ریپرفیوژن به‌طور قابل توجهی کمتر بود (۲۳). به همین ترتیب، در مطالعه حاضر، اثرات محافظتی پنتوکسی فیلین را در یک دوز حاد (۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و مزمن (۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم به مدت ۲ هفته) در برابر آسیب بیضه در مدل تورشن-دتورشن ۲ ساعته مشاهده کردیم که قادر به تغییرات برگشت‌پذیر اسپرماتوزن است. آسیب بیضه به‌طور قابل ملاحظه‌ای توسط تک‌دوز پنتوکسی فیلین ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کاهش یافته است که با بهبود ساختار هیستوپاتولوژیک، افزایش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و افزایش قابل توجه تعداد سلول‌های زایا بود، اگرچه تغییرات در دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پنتوکسی فیلین برای ۲ هفته کمتر مشاهده شد.

بیضه‌ها به آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو رادیکال‌های آزاد بسیار حساس هستند. اختلال در تعداد اسپرم، تحرک و مورفولوژی با سطح بالای ROS در اسپرم ارتباط دارد.

سلولی را نشان دهد یا این آنزیم‌ها ممکن است مکانیسم‌های جبرانی ارائه دهند. SOD یکی از اصلی‌ترین آنزیم‌های داخل سلولی است که از آسیب بافت جلوگیری می‌کند و می‌تواند به‌طور انتخابی و سریع آنیون‌های سوپراکسید رادیکال آزاد (O^-) را به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) کاهش دهد (۳۰). در این مطالعه، ما نشان دادیم که ۲ ساعت چرخش بیضه باعث افزایش قابل توجه پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود که سطح بالای MDA نشانگر آن در گروه T/D است. با این حال، پنتوکسی فیلین، یک عامل آنتی‌اکسیدانی شناخته شده، سطح MDA را تا حد قابل توجهی در گروه‌های تجربی (T1 و T2) سرکوب می‌کند، البته در T1 بارزتر است.

مطالعات تجربی آسیب ایسکمی-خون‌رسانی مجدد نشان داده است که آنتی‌اکسیدان‌ها آسیب کوتاه‌مدت در پیچ‌خوردن بیضه را کاهش می‌دهند. از نظر تئوری، آنتی‌اکسیدان‌ها نقشی دوگانه در ایسکمی- جریان خون مجدد در آسیب بیضه دارند. اولاً، آنها با کاهش مقدار رادیکال‌های آزاد تولیدشده توسط پراکسیداسیون لیپیدها، میزان آسیب را محدود می‌کنند و ثانیاً، آنها واکنش‌های التهابی ناشی از ROS را خنثی می‌کنند. درحالی‌که هیچ گزارشی از کاربرد درمانی آنتی‌اکسیدان‌ها در انسان وجود ندارد، بسیاری از مطالعات اثبات محافظت از چندین عامل آنتی‌اکسیدانی در مدل‌های حیوانی تجربی تورشن بیضه را اثبات کرده‌اند (۳۱). آتیلا و همکارانش نشان دادند که تجویز روی و ملاتونین تا حدی در برابر آسیب بیضه ناشی از ایسکمی و خون‌رسانی مجدد ۱ ساعته محافظت می‌کنند (۳۲). همچنین، Belhan و همکاران نشان دادند که دریافت کرایسین از بیضه‌ها در برابر نشانگرهای اکسیداتیو و التهاب در آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن بیضه در موش صحرائی محافظت می‌کند (۳۳). در مطالعه ترنر و همکاران، پاک‌کننده‌های رادیکال اکسیژن قبل از چرخش به حیوانات تزریق شد. وزن بیضه و تولید اسپرم روزانه آنها ۳۰ روز پس از جراحی بررسی شد. نتایج نشان داد که

ویگوراس و همکاران، فیلهو و همکاران مشاهده کردند که پاسخ اصلی پاتوفیزیولوژیک در ایسکمی بیضه است تولید ROS است (۲۴، ۲۵). Ozmen و همکارانش نشان دادند که پس از آسیب و جریان خون مجدد، مقادیر زیاد رادیکال‌های آزاد منجر به آسیب بافتی و عوارض سیستمیک ناشی از یک واکنش تکان‌دهنده می‌شود. آسیب بافتی که طی جریان خون مجدد اتفاق می‌افتد شدیدتر از آن است که در هنگام ایسکمی اتفاق می‌افتد (۲۶). پاسخ التهابی که در آسیب بیضه بروز می‌کند با افزایش سطح سیتوکین‌های پیش‌برنده التهاب، مولکول‌های چسبندگی عروقی و مهاجم ناگهانی نوتروفیل‌ها و تولید سریع ROS مشخص می‌شود. سرکوب تولید ROS به‌عنوان یک استراتژی درمانی مؤثر در برابر ایسکمی-جریان خون مجدد در بیماری‌هایی مانند سکته مغزی و سکته قلبی شناخته شده است.

رادیکال‌های آزاد باعث آپوپتوز سلول‌های زیای بیضه می‌شوند. گرچه رادیکال‌های آزاد حاصل از اکسیژن دلیل اصلی آسیب بافتی پس از جریان خون مجدد است، اما یک سیستم دفاعی درون‌زا برای جلوگیری از تولید ناگهانی رادیکال‌های آزاد به‌منظور کنترل آسیب در بافت ایسکمیک وجود دارد و در حالت عادی، تولید ROS در سیستم فیزیولوژیک بدن با سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان درون‌زا تنظیم می‌شود. اما در شرایط بالای استرس اکسیداتیو، مانند آسیب ناشی از جریان خون مجدد، این رادیکال‌های آزاد به‌طور غیرطبیعی زیاد می‌شوند و می‌توانند به بافت‌ها آسیب برسانند (۲۷). نشان داده شد که طی آسیب IR، فعالیت چندین آنزیم آنتی‌اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GSH-Px) و کاتالاز (CAT) افزایش می‌یابد (۲۸). پکستین و همکاران گزارش کردند که SOD و گلوکاتایون پراکسیداز به‌عنوان آنزیم‌های اصلی در مهار ROS مضر در اندام‌های تولیدمثل مردان هستند (۲۹). افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و GSH-Px در بافت بیضه ممکن است استرس اکسیداتیو

یک واسطه و نشانگر شناخته شده آپوپتوز است. نتیجه گیری ترنر و همکاران هم نشان داد که یک ساعت چرخش ۷۲۰ درجه بیضه در مدل موش منجر به آپوپتوز سلول های زایا می شود که توسط TUNEL ارزیابی شد (۳۴). با این حال، مسیر سیگنالینگ مرتبط با بقای سلول ها تحت استرس اکسیداتیو تا حدی به تنظیم مجدد مسیرهای سیگنالینگ PI3K و AKT نسبت داده می شود (۴۲-۴۴). مطالعه در کشت سلول های اسپرما توگونی هم نشان داده که پنتوکسی فیلین در زنده مانی و کاهش آپاپتوز نقش دارد (۴۵).

مطالعه ما نشان داد که تجویز داخل صفاقی یک دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم پنتوکسی فیلین، اسپرما توژن مختل شده ناشی از پیچ خوردگی بیضه ۲ ساعته ۷۲۰ درجه (در جهت عقربه های ساعت) را بازیابی می کند. افزایش سطح آنزیم های آنتی اکسیدان (SOD و کاتالاز)، سرکوب نشانگر استرس اکسیداتیو (MDA)، افزایش بیان ژن های ضد آپوپتوز (akt و pi3k)، کاهش بیان مارکر آپوپتوتیک (کاسپاز-۳) و مهار رادیکال های آزاد از مکانیسم های احتمالی خاصیت آنتی اکسیدانی پنتوکسی فیلین است؛ بنابراین، می تواند به عنوان یک درمان کمکی برای ترمیم جراحی آسیب بیضه ناشی از پیچ خوردگی بیضه استفاده شود. هرچند مطالعات بیشتری در مورد نقش محافظتی پنتوکسی فیلین در برابر آسیب ایسکمی و جریان خون مجدد ناشی از پیچ خوردگی بیضه در انسان ضروری به نظر می رسد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تشکر می کنند. این مقاله تحت حمایت دانشگاه با شماره گرنت ۴۱۷۵۹ انجام شده است.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

برداشت کننده های ROS به طور قابل توجهی عملکرد بیضه را بهبود می بخشد (۳۴). سلحشور و همکارانش گزارش دادند که پنتوکسی فیلین در سمیت کبدی برای بهبود خون استفاده شده است (۳۵). در حالی که تحت فولادی و دیگران گزارش دادند که فعالیت SOD و CAT در ایسکمی / ریرفیوژن بافت بیضه کاهش می یابد، اما تجویز پنتوکسی فیلین باعث افزایش سطح این آنزیم ها می شود (۲۳). بر این اساس، در مطالعه ما، سطح پایین آنزیم های آنتی اکسیدان در حیوانات T/D در مقایسه با گروه کنترل می تواند به عنوان یک سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی در بافت بیضه باشد که به طور قابل توجهی با درمان پنتوکسی فیلین در گروه های حیوانی T1 و T2 ترمیم می شود.

بسیاری از مطالعات نشان داده اند که ایسکمی و خون رسانی مجدد بیضه منجر به آپوپتوز سلول های زایا ناشی از تولید ROS می شود (۳۶). مسیر PI3K/AKT برای تنظیم آپوپتوز، تکثیر و بقای سلول های زایا و تولید اسپرم شناخته شده است. AKT، یک سرین-ترئونین کیناز، پروتئین پایین دستی PI3K بوده و مهار AKT می تواند پایین دست کاسپاز ۳ را فعال کرده و فرایند آپوپتوز را آغاز کند (۳۷). همچنین نشان داده شد که مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT می تواند چرخه سلولی، سنتز پروتئین و متابولیسم انرژی سلول را تنظیم کند (۳۸). کاسپازها در هر دو مسیر آپوپتوز عمل می کنند و کاسپاز ۳، به عنوان کاسپاز اقدام کننده اصلی شناخته می شود و مسئول تغییرات مورفولوژیکی سلول مانند تراکم کروماتین، DNA و تجزیه پروتئین غشایی است (۳۹، ۴۰). لی و همکاران افزایش بیان کاسپاز ۳ فعال در سلول های زایای بیضه را پس از ایجاد واریکوسل گزارش کردند (۴۱). این مطالعه نشان داد که پس از چرخش بیضه، میزان بیان mRNA PI3K و AKT در گروه تورشن - دتورشن به گروه کنترل به مراتب کمتر بود، که نشان دهنده مهار عملکرد ضد آپوپتیک مسیر PI3K/AKT است. ضمناً تورشن منجر به افزایش قابل توجه سطح کاسپاز ۳- در گروه T/D شد که

منابع

1. D Dokmeci - Folia medica. Testicular torsion, oxidative stress and the role of antioxidant therapy. Folia Medica. 2006; 48:16-21
2. Taneli F, Vatansever S, Ulman C, Yılmaz Ö, Giray G, Genç A, Taneli C . The effect of spermatic vessel ligation on testicular nitric oxide levels and germ cell-specific apoptosis in rat testis. Acta histochemica. 2005;106(6):459-466 .
3. Tusat M, Mentese A, Demir S, Alver A, Imamoglu M. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. International Brazilian Journal of Urology. 2017; 43(6): 1160-1166 .
4. Anim J, Kehinde E, Prasad A, Varghese R. Morphological responses of the rabbit testis to ischemic/reperfusion injury due to torsion. Urologia internationalis. 2005; 75(3):258-63.5 .
5. Chan F, Oatley MJ, Kaucher AV, Yang Q-E, Bieberich CJ, Shashikant CS, et al. Functional and molecular features of the Id4+ germline stem cell population in mouse testes. Genes & development. 2014; 28(12):1351-62 .
6. Orazizadeh M, Hashemitabar M, Khorsandi L. Protective effect of minocycline on dexamethasone induced testicular germ cell apoptosis in mice. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2009; 13(1): 1-5 .
7. Ringdahl EN, Teague L. Testicular torsion. American family physician. 2006; 74(10): 1739-43 .
8. Ünsal A, Eroglu M, Avci A, Cimentepe E, Guven C, Derya Balbay M, Durak I. Protective role of natural antioxidant supplementation on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. Scandinavian journal of Urology and Nephrology. 2006; 40(1): 17-22 .
9. Etensel B, Özkısacık S, Özkara E, Serbest YA, Öztan O, Gürsoy H. The protective effect of dexpanthenol on testicular atrophy at 60th day following experimental testicular torsion. Pediatric surgery international. 2007; 23(3): 271-5 .
10. Kazemi-Darabadi S, Asadpour R, Shahbazfar AA, Alizadeh S, editors. Effects of L-carnitine and betamethasone on ischemia-reperfusion injuries and sperm parameters following testicular torsion in a rat model. Veterinary Research Forum. 2019; 10(2): 125-132 .
11. Chen Yao, Gang Li, Yeyong Qian, Ming Cai, Hong Yin, Li Xiao, Wei Tang, Fengjie Guo, and Bingyi Shi . Protection of pentoxifylline against testis injury induced by intermittent hypobaric hypoxia. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016; <https://doi.org/10.1155/2016/3406802> .
12. Salahshoor MR, Famarzi A, Roshankhah S, Jalili C. The protective effect of Pentoxifylline on testopathy in male rats following Dimethyl Nitrosamine administration: An experimental study. International Journal of Reproductive BioMedicine. 2019; 17(10): 727-34 .
13. Savas C, Dindar H, Bilgehan A, Ataoglu O, Yucesan S. Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in testicular torsion. Scandinavian journal of urology and nephrology. 2002; 36(1):65-70 .
14. Akanji Omotosho Dhulqarnain , Nasrin Takzaree , Golamreza Hassanzadehb, Heidar Tooli , Mehrnoush Malekzadeh, Nasrin Khanmohammadi, Mahsa Yaghobinejad, Somayeh Solhjoo, Tayebeh Rastegar. 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): 7-14
15. Jeena K, Liju VB, Kuttan R. Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of essential oil from ginger. Indian Journal Physiology and Pharmacology. 2013; 57(1):51-62 .
16. Stephen A. McCartney, Larissa B. Thackray, Leonid Gitlin, Susan Gilfillan, Herbert W. Virgin IV, Marco Colonna. MDA-5 Recognition of a Murine Norovirus. PLOS Pathogens. 2008; 4(10): <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000108> .
17. Solhjoo S, Akbari M, Toolee H, Mortezaee K, Mohammadipour M, Nematollahi-Mahani SN, Shahrokhi, Sayadi M, Rastegar T. Roles

- for osteocalcin in proliferation and differentiation of spermatogonial cells cocultured with somatic cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2019; 120(4):4924-34.
18. Toolee H, Rastegar T, Solhjo S, Mortezaee K, Mohammadipour M, Kashani IR, Akbari M. Roles for Kisspeptin in proliferation and differentiation of spermatogonial cells isolated from mice offspring when the cells are cocultured with somatic cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2019; 120(4): 5042-54.
 19. Karaguzel E, Kadhasanoglu M, Kutlu O. Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. *Nature Reviews Urology*. 2014; 11(7): 391-9.
 20. Boettcher M, Meier D, Jiménez-Alcázar M, Eschenburg G, Mietzsch S, Vincent D, et al. Degradation of extracellular DNA by DNase1 significantly reduces testicular damage after testicular torsion in rats. *Urology*. 2017; 109: 1-7.
 21. ayatli F, Akkuş D, Kilic E, Saraymen R, Sönmez MF. The protective effects of grape seed extract on MDA, AOPP, apoptosis and eNOS expression in testicular torsion: an experimental study. *World journal of urology*. 2013; 31(3): 615-22.
 22. Panagiota Tsounapi, Motoaki Saito, Fotios Dimitriadis, Shogo Shimizu, Yukako Kinoshita, Kohei Shomori, Itaru Satoh, Keisuke Satoh. Protective effect of sivelestat, a neutrophil elastase inhibitor, on ipsilateral and contralateral testes after unilateral testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. *BJU international*. 2011; 107(2):329-336.
 23. Takhtfooladi MA, Moayer F, Takhtfooladi HA. Beneficial effect of pentoxifylline into the testis of rats in an experimental model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. *International Brazilian Journal of Urology*. 2015; 41(3): 476-83.
 24. Viguera R, Reyes G, Rojas-Castaneda J, Rojas P, Hernandez R. Testicular torsion and its effects on the spermatogenic cycle in the contralateral testis of the rat. *Laboratory animals*. 2004; 38(3): 313-20.
 25. Wilhelm Filho D, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Molecular aspects of medicine*. 2004; 25(1-2): 199-210.
 26. Ozmen S, Ayhan S, Demir Y, Siemionow M, Atabay K. Impact of gradual blood flow increase on ischaemia-reperfusion injury in the rat cremaster microcirculation model. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*. 2008; 61(8): 939-48.
 27. Aguilar A, Alvarez-Vijande R, Capdevila S, Alcobarro J, Alcaraz A. Antioxidant Patterns (Superoxide Dismutase, Glutathione Reductase, and Glutathione Peroxidase) in Kidneys From Non-Heart-Beating-Donors: Experimental Study. *Transplantation Proceedings*. 2007; 39(1): 249-52.
 28. Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009; 2(5): 259-69.
 29. Cetin Pekcetin, Bekir Ugur Ergur, Muge Kiray, Alper Bagriyanik, Kazim Tugyan, Guven Erbil, Candan Ozogul. The protective effects of trimetazidine on testicular ischemia and reperfusion injury in rats. *Pediatric surgery international*. 2007; 23(11): 1108-13.
 30. Elshaari F, Elfagih R, Sheriff D, Barassi I. Oxidative and antioxidative defense system in testicular torsion/detorsion. *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India*. 2011; 27(4): 470-79.
 31. Keseroglu BB, Ozer E, Karakan T, Ozgur BC, Surer H, Ogun E, et al. Protective effects of Ranolazine on testicular torsion and detorsion injury in rats. *Andrologia*. 2020; 52(7): e13616.
 32. Semercioz A, Baltaci AK, Mogulkoc R, Avunduk MC. Effect of zinc and melatonin on oxidative stress and serum inhibin-B levels in a rat testicular torsion-detorsion model. *Biochemical genetics*. 2017; 55(5): 395-409.
 33. Belhan S, Yıldırım S, Karasu A, Kömüroğlu AU, Özdek U. Investigation of the protective role of chrysin within the framework of oxidative and inflammatory markers in experimental testicular ischaemia/reperfusion injury in rats. *Andrologia*. 2020; 52(9): e 13714.
 34. Turner T, Tung KS, Tomomasa H, Wilson LW. Acute testicular ischemia results in germ

- cell-specific apoptosis in the rat. *Biology of reproduction*. 2019; 57(6): 1267-74.
35. Salahshoor MR, Jalili C, Abdolmaleki A, Roshankhah S. Pentoxifylline modulation hepatotoxicity and apoptosis induced by nitrosamine in rats. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*. 2020; 4(3): 251-9.
 36. Cruz-Galvez CC, Ortiz-Lazareno PC, Pedraza-Brindis EJ, Villasenor-Garcia MM, Reyes-Urbe E, Bravo-Hernandez A, et al. Pentoxifylline enhances the apoptotic effect of carboplatin in Y79 retinoblastoma cells. *in vivo*. 2019; 33(2): 401-12.
 37. Guowei Zhang, Kaijun Liu, Xi Ling, Zhi Wang, Peng Zou, Xiaogang Wang, Jianfang Gao, Li Yin, Xi Zhang, Jinyi Liu, Lin Ao, Jia Cao. DBP-induced endoplasmic reticulum stress in male germ cells causes autophagy, which has a cytoprotective role against apoptosis in vitro and in vivo. *Toxicology letters*. 2019; 245:86-98.
 38. Xu G, Zhang W, Bertram P, Zheng XF, McLeod H. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *International journal of oncology*. 2004; 24(4): 893-900.
 39. D'amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death & Differentiation*. 2010; 17(7): 1104-14.
 40. Reza Elmimehr, Ali Motamed-Sanaye, Balal Brazvan, Seyed-Hosein Abtahi-Eivary, Maryam Moghimian, Masoumeh Fani. Effects of hypothermia and pentoxifylline on the adnexal torsion/detorsion injuries in a rat testis model. *Andrologia*. 2021; 53(8): e14143.
 41. Lee J-D, Jeng S-Y, Lee T-H. Increased activated caspase-3 expression in testicular germ cells of varicocele-induced rats. *Journal of Taiwan Urological Association*. 2006; 17(3): 81-6.
 42. Young-Ok Son, Lei Wang, Pratheeshkumar Poyil, Amit Budhraj, J. Andrew Hitron, Zhuo Zhang, Jeong-Chae Lee and Xianglin Shi. Cadmium induces carcinogenesis in BEAS-2B cells through ROS-dependent activation of PI3K/AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012; 264(2): 153-60.
 43. Mi Hyun Seo , Dae Won Kim , Yeon Sook Kim , Suk Keun Lee. Pentoxifylline-induced protein expression change in RAW 264.7 cells as determined by immunoprecipitation-based high performance liquid chromatography. *PLoS One*. 2022; 17(3): 1-44
 44. Mohamed M. Elseweidy, Sousou I. Ali, Mohamed A. Shaheen, Asmaa M. Abdelghafour and Sally K. Hammad. Vanillin and pentoxifylline ameliorate isoproterenol-induced myocardial injury in rats via the Akt/HIF-1 α /VEGF signaling pathway. *Food & Function*. 2023; 14(7): 3067-3082.
 45. Omotosho Dhulqarnain Akanji , Golamreza Hassanzadeh , Mehrnoush Malekzadeh , Nasrin Khanmohammadi , Maryam Khanezad , Ghazaleh Sadeghiani and Tayebeh Rastegar. Pentoxifylline promotes spermatogenesis via upregulation of the Nrf2-ARE signalling pathway in a mouse model of germ-cell apoptosis induced by testicular torsion-detorsion. *Reproduction, Fertility and Development*. 2023; 35(7) 423-432.