Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Protective effect of vitamin D on Luteinizing Hormone (LH), Follicle-Stimulating Hormone (FSH), testosterone hormones and testicular tissue changes induced by methotrexate in adult male rats

Mahnaz Dehghani[1], Mehrdad Shariati[1], Davood Moghadamnia[1]*

ABSTRACT

Background and Aims: Vitamin D has antioxidant and anti-inflammatory activities. The present study aimed to investigate the protective effect of vitamin D on Luteinizing Hormone (LH), Follicle-Stimulating Hormone (FSH), testosterone hormones and testicular tissue changes induced by methotrexate in adult male rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 30 adult male Wistar rats weighing 230-260 g were divided into six groups (n=5). Control group: They received no extract or solvent, sham group: 1 ml of distilled water as a solvent, treatment group 1: methotrexate (5 mg/kg) (gavage), treatment group 2: vitamin D (1000 IU/kg), treatment group 3: methotrexate (5 mg/kg) + vitamin D (500 IU/kg), and treatment group 4: methotrexate (5 mg/kg) + vitamin D (1000 IU/kg). After 28 days of treatment in the form of gavage, blood was taken directly from the heart to measure the serum concentration of LH, FSH, and testosterone hormones. The testes were removed and tissue changes were examined with hematoxylin-eosin staining. The collected data were analyzed using SPSS (version 18), one-way analysis of variance, and post hoc Tukey's test.

Results: In the group receiving methotrexate, the level of testosterone hormone, the number of spermatogonia ($P<0.001$), spermatocytes ($P<0.001$), sperm ($P<0.001$) and Leydig cells ($P<0.001$) decreased and the serum level of LH ($P<0.001$) and FSH ($P<0.001$) increased significantly compared to the control and sham groups. In groups receiving methotrexate + vitamin D, vitamin D was able to compensate for the adverse effects caused by methotrexate.

Conclusion: Our results showed that vitamin D could improve LH, FSH, testosterone hormones, and testicular tissue changes induced by methotrexate in adult male rats.

Keywords: FSH, LH, Methotrexate, Testis, Testosterone, Vitamin D

Citation: Dehghani M, Shariati M, Moghadamnia D. [Protective effect of vitamin D on LH, FSH, testosterone hormones and testicular tissue changes induced by methotrexate in adult male rats]. J Birjand Univ Med Sci. 29(3): 185-194. [Persian]

DOI https://www.doi.org/10.34785/bums024.2023.007

Received: August 4, 2022 **Accepted:** April 30, 2022

[1] Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

***Corresponding author:** Department of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
Tel: +989173874503 Fax: +987142230508 E-mail: davood.moghadamnia@gmail.com

[DOI: 10.34785/bums024.2023.007]

مقاله اصیل پژوهشی

اثر محافظتی ویتامین D بر هورمون‌های LH,FSH و تستوسترون و تغییرات بافت بیضه القاء شده توسط متوترکسات در موش صحرایی نر بالغ

مهناز دهقانی[1]، مهرداد شریعتی[1]، داوود مقدم نیا[1]*

چکیده

زمینه و هدف: ویتامین D دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی است. هدف از این پژوهش بررسی اثر محافظتی ویتامین D بر هورمون‌های لوتئینی (LH)، محرکه فولیکول (FSH)، تستوسترون و تغییرات بافت بیضه القاشده توسط متوترکسات در موش صحرایی نر بالغ بود.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن ۲۶۰-۲۳۰ گرم به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل: عصاره یا حلالی دریافت نکردند، گروه شاهد: ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به عنوان حلال، گروه درمان ۱: متوترکسات (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (گاواژ)، گروه درمان ۲: ویتامینD (۱۰۰۰IU/kg)، گروه درمان ۳: متوترکسات (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) + ویتامینD (۵۰۰IU/kg)، گروه درمان ۴: متوترکسات (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) + ویتامینD (۱۰۰۰IU/kg). پس از ۲۸ روز تیمار به‌صورت گاواژ، خون‌گیری مستقیم از قلب جهت اندازه‌گیری غلظت سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون انجام شد. بیضه‌ها خارج و تغییرات بافتی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی Tukey تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: در گروه دریافت‌کننده متوترکسات نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد سطح هورمون تستوسترون (P<۰/۰۰۱)، تعداد اسپرماتوگونی (P<۰/۰۰۱)، اسپرماتوسیت (P<۰/۰۰۱)، اسپرم (P<۰/۰۰۱) و لایدیگ (P<۰/۰۰۱) کاهش و سطح سرمی FSH (P<۰/۰۰۱) و LH (P<۰/۰۰۱) به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. در گروه‌های دریافت‌کننده متوترکسات+ ویتامین D، ویتامین D توانست اثرات نامطلوب ایجاد شده توسط متوترکسات را جبران کند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه ما نشان داد که ویتامین D توانست هورمون‌های تستوسترون، FSH، LH و تغییرات بافت بیضه القاشده توسط متوترکسات در موش‌های صحرایی نر بالغ بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: FSH، LH، متوترکسات، بیضه، تستوسترون، ویتامین D

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۱؛ ۲۹ (؟): در حال انتشار.

دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۱۳ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۲

[1] گروه زیست‌شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

***نویسنده مسئول:** گروه زیست‌شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

آدرس: کازرون- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد کازرون- گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۹۱۷۳۸۷۴۵۰۳ نمابر: ۰۷۱۴۲۲۳۰۵۰ پست الکترونیکی: davood.moghadamnia@ gmail.com

[DOI: 10.34785/bums024.2023.007]

مقدمه

اسپرماتوژنز یک فرآیند بسیار پیچیده است که طی آن یک سلول دیپلوئیدی نسبتاً تمایز نیافته به نام اسپرماتوگونی به یک سلول هاپلوئید بسیار تخصصی به نام اسپرماتوزوا تبدیل می‌شود (۱). هدف از اسپرماتوژنز تولید یک گامت نر از نظر ژنتیکی منحصر به فرد است که می‌تواند تخمک را بارور کند. اسپرماتوژنز شامل یک سری مراحل پیچیده سلولی، تکثیر و رشد است. اسپرماتوژنز از طریق محور عصبی توسط هیپوتالاموس آغاز می‌شود که هورمون آزادکننده گنادوتروپین[1]را آزاد می‌کند که به نوبه خود منجر به رهاسازی هورمون محرک فولیکول[2] و هورمون لوتئینی[3]می‌گردد تا در نهایت باعث انتقال پیام به دستگاه تناسلی (بیضه) شود. LH با سلول‌های لایدیگ برای تولید تستوسترون و FSH با سلول‌های سرتولی که حمایت و تغذیه برای تکثیر و رشد اسپرم را فراهم می‌کنند، تعامل دارند (۲).

متوترکسات (۴-آمینو-۱۰-متیل فولیک اسید، MTX)، یک آنتی‌فولات است که برای اولین بار برای درمان انواع خاصی از سرطان ساخته شد. این دارو در دوزهای بالاتر به‌عنوان درمان سرطان مورد استفاده قرار گرفت و از سال ۱۹۹۰ در دوزهای بسیار پایین‌تر برای درمان بیماری‌های روماتیسمی استفاده شد (۳). در مطالعه Ozcicek و همکاران در سال ۲۰۲۰ مشخص گردید که متوترکسات منجر به موکوزیت روده کوچک در موش صحرایی می‌گردد. در این مطالعه متوترکسات منجر به افزایش قابل ملاحظه‌ای در سطوح مالون دی آلدئید (MDA)، میلوپراکسیداز (MPO) و اینترلوکین-۶ (IL-6) گردید، در حالی که سطوح گلوتاتیون تام (tGSH) به‌طور قابل توجهی کاهش یافت. همچنین، در این مطالعه متوترکسات منجر به افزایش معنی‌دار سطوح بیان ژن IL-1β و TNF-α گردید. علاوه بر این، متوترکسات منجر به انفیلتراسیون سلولی التهابی و آسیب به پرز از نظر هیستوپاتولوژیک گردید (۴). مسمومیت بیضه‌ای یکی از عوارض جانبی متوترکسات می‌باشد که ممکن است منجر به ناباروری گردد. در مطالعه Felemban و همکاران در سال ۲۰۲۰ مشخص شده است که متوترکسات، منجر به کاهش معنی‌دار وزن بدن و وزن بیضه و همچنین مقادیر هورمون‌های تستوسترون پلاسما، هورمون لوتئینیزه کننده (LH) و هورمون محرک فولیکولی (FSH) می‌شود. علاوه براین، در موش‌های صحرایی دریافت‌کننده متوترکسات تعداد اسپرم، زنده ماندن، شاخص مورفولوژی، تحرک کل و تحرک پیشرونده کاهش می‌یابد. همچنین، متوترکسات منجر به کاهش معنی‌دار مقادیر گلوتاتیون، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و همچنین بیان پروتئین آنتی‌ژن هسته‌ای سلول در حال تکثیر در بافت بیضه گردید. علاوه بر این، در این مطالعه متوترکسات منجر به آسیب بافت بیضه گردید (۵). در مطالعات حیوانی نشان داده شده است که متوترکسات باعث ایجاد صدمه در DNA اسپرم می‌شود (۶). همچنین متوترکسات منجر به کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، افزایش فضاهای بینابینی در گروه‌های تجربی در طرح‌های وابسته به دوز می‌شود (۸ و۷).

ویتامین D یک ویتامین محلول در چربی است که به‌عنوان یک هورمون استروئیدی عمل می‌کند. در انسان، منبع اولیه ویتامین D تبدیل ۷-دهیدروکلسترول به ویتامین D در اثر مجاورت با اشعه UVB نور خورشید در پوست است (۹). ویتامین D بر استخوان‌ها، روده‌ها، سیستم ایمنی و قلبی عروقی، پانکراس، عضلات، مغز و کنترل چرخه‌های سلولی تأثیر می‌گذارد (۱۰). دستگاه تناسلی مردانه به‌عنوان بافت هدف ویتامین D شناسایی شده است و داده‌های قبلی ارتباط ۲۵ هیدروکسی ویتامینD با مقدار تستوسترون در مردان را نشان می‌دهد. نتایج مطالعات نشان داده‌اند که مکمل ویتامین D ممکن است سطح تستوسترون را افزایش دهد (۱۰).

با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی ویتامین D (۱۱) در این پژوهش به بررسی اثر حفاظتی ویتامین D بر هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون و تغییرات بافت بیضه القاشده توسط داروی متوترکسات در موش صحرایی نر بالغ پرداخته شده است.

[1] Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)
[2] Follicle-Stimulating Hormone (FSH)
[3] Luteinizing Hormone (LH)

[DOI: 10.34785/bums024.2023.007]

روش تحقیق

حیوانات

در این مطالعه تجربی از ۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۳۰ تا ۲۶۰ گرم و سن ۲/۵ تا ۳ ماه استفاده شد. این موش‌های صحرایی از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شیراز خریداری شدند. حیوانات به‌طور تصادفی در ۶ گروه ۵ تایی تا زمان انجام آزمایش در قفس‌های استاندارد و تحت شرایط یکسان با دمای ۲۲-۲۰درجه سانتی‌گراد و با چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. آب و غذای کافی در اختیار آن‌ها قرارگرفت و ملاحظات اخلاقی در مورد حیوانات رعایت شد. مدت زمان این مطالعه ۲۸ روز در نظر گرفته شد. پروتکل مطالعه توسط دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد کازرون با کد اخلاق IR.IAU.KAU.REC.1401.112 مورد تأیید قرار گرفت.

تیمار حیوانات

حیوانات به ۶ گروه ۵ تایی تقیسم شدند که عبارتند از: گروه کنترل: حیوانات در این گروه هیچ گونه دارو یا حلال دارو دریافت نکردند. گروه شاهد: حیوانات در این گروه روزانه ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به‌عنوان حلال دارو دریافت کردند. گروه درمان ۱: حیوانات در این گروه متوترکسات با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ دریافت کردند. گروه درمان ۲: حیوانات در این گروه ویتامین D3 با دوزIU/kg ۱۰۰۰ دریافت‌کردند. گروه درمان ۳: حیوانات در این گروه متوترکسات با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ویتامین D3 با دوزIU/kg ۵۰۰ دریافت‌کردند. گروه درمان ۴: حیوانات در این گروه متوترکسات با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ویتامین D3 با دوزIU/kg ۱۰۰۰ دریافت‌کردند. مدت زمان مداخله ۲۸ روز و از طریق گاواژ انجام شده است. دوزهای انتخاب شده متوترکسات (ساخت شرکت سیگما آلدریچ آلمان) و ویتامین D (ساخت شرکت داروسازی دانا ایران) بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شده است (۱۲).

پس از پایان یافتن دوره تیمار حیوانات تحت تأثیر بی‌هوشی با اتر قرار گرفتند. قفسه سینه باز شد. خونگیری از بطن چپ قلب به‌عمل آمد. نمونه‌های خونی به‌دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاهی نگه‌داری شدند و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس سرم هر لوله جمع‌آوری شد. پس از جداسازی سرم میزان غلظت سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون به روش معمول آزمایشگاهی یعنی رادیوایمونواسی (RIA) با کیت‌های مخصوص اندازه‌گیری شدند. کیت‌های هورمونی مورد استفاده در این تحقیق که شامل محلول‌های استاندارد، یدرادیواکتیو، آنتی‌بادی و بافر شستشو بود که همگی از شرکت کاوشیار خریداری و تهیه شدند. همچنین در پایان آزمایش بیضه‌ها جداشدند و از آن‌ها مقاطع بافتی تهیه شد و سپس به مدت ۱۷ تا ۱۸ ساعت در محلول فرمالین ۱۰ درصد جهت تثبیت و جلوگیری از تخریب بافتی قرار گرفتند و پس از رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین، اسلایدهای بافتی تهیه شده و مطالعات بافتی با میکروسکوپ نوری (نیکون ساخت ژاپن) با بزرگنمایی ۴ صورت گرفت و شاخص‌های تراکم و آرایش لوله‌های اسپرم‌ساز، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید، سلول‌های سرتولی و لایدیگ و همچنین تراکم اسپرم در لومن بین گروه‌های درمان ۲، ۳ و ۴ با گروه درمان ۱ و همچنین گروه درمان ۱ با گروه‌های کنترل و شاهد مورد مقایسه قرار گرفتند (۱۳). تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش‌ها کاملا خالص و بدون آلودگی استفاده شدند.

آنالیز آماری

نتایج حاصله براساس برنامه SPSS نسخه ۱۸ مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA انجام گردید و با روش تستTukey تجزیه و تحلیل گردید. مرز استنتاج آماری برای بررسی اختلاف معنی‌دار میانگین بین گروه‌های درمان در مقایسه با گروه کنترل سطح $P<۰/۰۵$ بوده است. در این پژوهش نتایج به‌دست آمده از آزمایشات انجام شده به همراه محاسبات آماری مربوطه در قالب جداول آورده شده‌اند.

[DOI: 10.34785/bums024.2023.007]

یافته‌ها

نتایج بررسی‌های بیوشیمیایی

میانگین غلظت سرمی FSH و LH در گروه درمان ۱(متوترکسات، ۵mg/kg) نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱). همچنین میانگین غلظت سرمی FSH و LH در گروه درمان ۲ (ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg) نسبت به گروه درمان ۱(متوترکسات، ۵mg/kg) کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱). علاوه بر این میانگین غلظت سرمی FSH و LH در گروه درمان ۲ (ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg) نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱).

میانگین غلظت سرمی هورمون تستوسترون در گروه‌های درمان ۱ (متوترکسات، ۵mg/kg) نسبت به گروه کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱). همچنین میانگین غلظت سرمی هورمون تستوسترون در گروه درمان ۲ (ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg) نسبت به گروه درمان ۱ (متوترکسات، ۵mg/kg) افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱). علاوه بر این میانگین غلظت سرمی هورمون تستوسترون در گروه درمان ۲ (ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg) نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین غلظت سرمی هورمون تستوسترون در گروه‌های درمان ۳ و ۴ نسبت به گروه تجربی ۱ (متوترکسات، ۵mg/kg) افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱) (جدول ۱).

میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه‌های درمان ۱ (متوترکسات، ۵mg/kg) نسبت به گروه کنترل و شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد. همچنین میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه تجربی ۲ (ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg) نسبت به گروه درمان ۱ (متوترکسات، ۵mg/kg) تغییر معنی‌داری نشان نداد. علاوه بر این میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه درمان ۲ (ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg) نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه‌های درمان ۳ و ۴ نسبت به گروه درمان ۱ (متوترکسات، ۵mg/kg) تغییر معنی‌داری نشان نداد. همچنین میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه‌های درمان ۳ و ۴ نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱).

میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرم و لایدیگ در گروه‌های درمان ۱ (متوترکسات، ۵mg/kg) نسبت به گروه کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱). همچنین میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرم و لایدیگ در گروه درمان ۲ (ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg) نسبت به گروه درمان ۱ (متوترکسات، ۵mg/kg) افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱). علاوه بر این میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرم و لایدیگ در گروه درمان ۲ (ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg) نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد. میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرم و لایدیگ در گروه‌های درمان ۳ و ۴ نسبت به گروه درمان ۱ (متوترکسات، ۵mg/kg) افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

[DOI: 10.34785/bums024.2023.007]

جدول ۱- مقایسه میانگین و انحراف استاندارد میانگین غلظت سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون در گروه‌های مختلف

متغیر / گروه	میانگین غلظت هورمون تستوسترون (ng/mL)	میانگین غلظت هورمون FSH (mIU//mL)	میانگین غلظت هورمون LH (mIU//mL)	میانگین تعداد سلول‌های سرتولی ×۱۰^۶
گروه کنترل (بدون تیمار)	۱/۸۸ ±۰/۱۲	۲۳/۶۰ ±۱/۲۰	۳۳/۲۰ ±۱/۲۸	۱۸/۲۰ ± ۱/۰۶
گروه شاهد (حلال آب مقطر)	۱/۶۸ ±۰/۱۷	۲۶/۴۰ ±۱/۰۲	۳۶/۲۰ ±۱/۷۱	۲۰/۲۰ ± ۱/۰۱
گروه درمان۱ (متوترکسات، ۵ mg/kg)	۰/۵۸ ±۰/۰۳ [a]	۵۲/۸۰ ±۱/۸۰ [a]	۶۸/۰۰ ±۱/۵۸ [a]	۱۹/۸۰ ± ۰/۸۶
گروه درمان۲ (ویتامینD، ۱۰۰۰ IU/kg)	۱/۹۴ ±۰/۱۰ [b]	۲۶/۰۰ ±۱/۷۸ [b]	۳۶/۴۰ ±۱/۳۶ [b]	۱۸/۲۰ ±۰/۵۸
گروه درمان ۳ (متوترکسات ۵ mg/kg و ویتامینD، ۵۰۰ IU/kg)	۰/۸۱ ±۰/۰۳ [ab]	۴۲/۲۰ ±۱/۱۷ [ab]	۵۵/۶۰ ±۲/۰۱ [ab]	۱۹/۴۰ ±۰/۸۱
گروه درمان ۴ (متوترکسات ۵ mg/kg و ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg)	۱/۰۸ ±۰/۰۷ [ab]	۳۳/۴۰ ±۲/۱۱ [ab]	۴۷/۲۰ ±۱/۰۶ [ab]	۱۸/۴۰ ±۱/۰۷

علامت a نشان دهنده اختلاف معنی‌دار گروه درمان ۱ دریافت کننده متوترکسات با گروه‌های درمان در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.
علامت b نشان دهنده اختلاف معنی‌دار گروه‌های درمان ۲و ۳و ۴ با گروه درمان ۱ دریافت کننده متوترکسات در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.
داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین و انحراف‌استاندارد میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌اولیه، اسپرماتید و لایدیگ در گروه‌های‌مختلف

متغیر / گروه	میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی ×۱۰^۶	میانگین تعداد سلول های اسپرماتوسیت ×۱۰^۶	میانگین تعداد سلول های اسپرم ×۱۰^۶	میانگین تعداد سلول های لایدیگ ×۱۰^۶
گروه کنترل (بدون تیمار)	۳۷/۸۰ ± ۱/۵۲	۷۱/۴۰ ± ۱/۲۸	۱۱۸/۰۰ ± ۱/۷۶	۱۴/۰۰ ± ۰/۷۰
گروه شاهد (حلال آب مقطر)	۳۷/۰۰ ± ۱/۷۶	۷۱/۶۰ ± ۱/۸۶	۱۱۸/۲۰ ± ۱/۸۵	۱۴/۲۰ ± ۱/۰۶
گروه درمان۱ (متوترکسات، ۵mg/kg)	۱۵/۴۰ ± ۰/۹۲ [a]	۲۸/۰۰ ± ۱/۸۱ [a]	۵۱/۲۰ ± ۱/۴۶ [a]	۴/۶۰ ± ۰/۶۷ [a]
گروه درمان۲ (ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg)	۳۵/۶۰ ±۲/۱۸ [b]	۷۰/۲۰ ±۰/۸۰ [b]	۱۱۷/۸۰ ±۲/۵۵ [b]	۱۳/۲۰ ±۰/۸۶ [b]
گروه درمان ۳ (متوترکسات ۵ mg/kg و ویتامینD، ۵۰۰IU/kg)	۲۶/۴۰ ±۱/۲۸ [ab]	۵۸/۲۰ ±۱/۰۶[ab]	۸۳/۰۰ ±۴/۱۵ [ab]	۸/۶۰ ±۰/۹۲ [ab]
گروه درمان ۴ (متوترکسات ۵ mg/kg و ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg)	۳۱/۲۰ ±۱/۰۱ [ab]	۴۸/۲۰ ±۱/۴۲[ab]	۱۰۶/۲۰ ±۲/۶۹ [ab]	۱۰/۰۰ ±۰/۷۰ [ab]

علامت a نشان دهنده اختلاف معنی‌دار گروه درمان ۱ دریافت کننده متوترکسات با گروه‌های درمان در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.
علامت b نشان دهنده اختلاف معنی‌دار گروه‌های درمان ۲و ۳و ۴ با گروه درمان ۱ دریافت کننده متوترکسات در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.
داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شده است.

[DOI: 10.34785/bums024.2023.007]

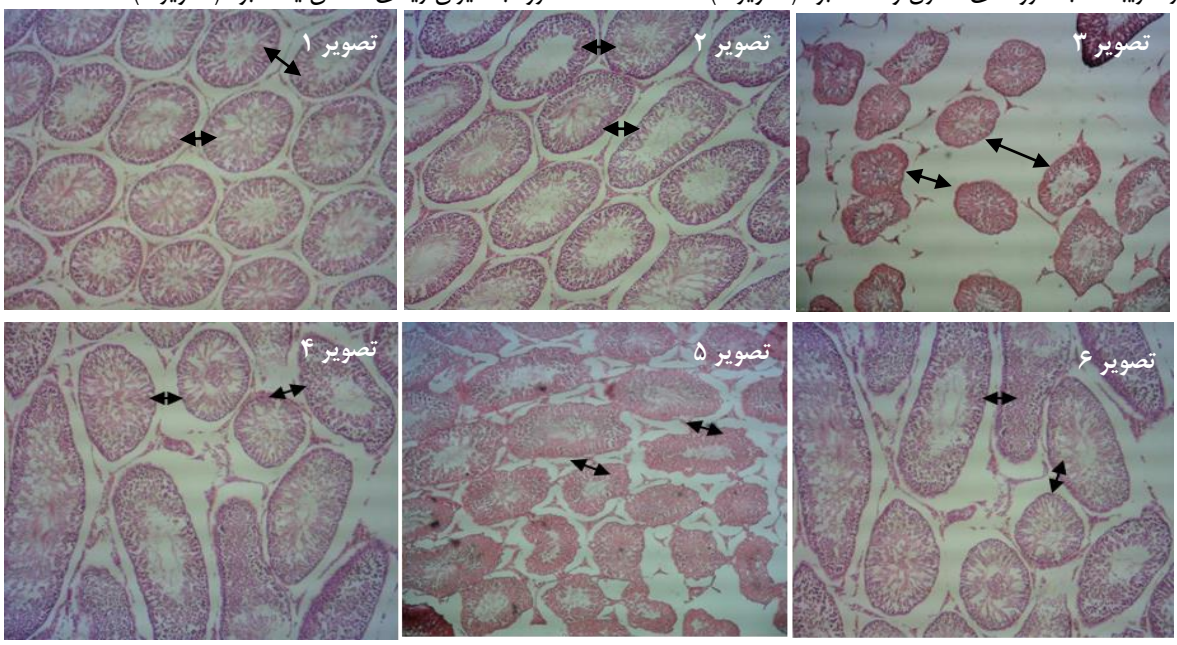
نتایج حاصل از مطالعات بافت‌شناسی بیضه

بررسی فتومیکروگراف تهیه شده از لوله‌های اسپرم ساز نشان داد که در گروه‌های کنترل و شاهد لوله‌های اسپرم‌ساز با تراکم زیاد، فاصله کم و بسیار مرتب در بافت بیضه دیده شدند. اپی‌تلیوم زایشی لوله‌ها شکل طبیعی خود را حفظ کرده و سلول‌ها دارای نظم و ترتیب و به هم پیوستگی بودند (تصاویر ۲ و ۱).

در گروه درمان ۱ دریافت‌کننده متوترکسات در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد (تصاویر ۲ و ۱) آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده گردید. علاوه براین تغییرات افزایش وسعت بافت بینابینی به همراه ادم بافتی، تخریب اسپرماتوژنز و کاهش تراکم اسپرم‌ها مشاهده شد. در این گروه ضخامت اپی‌تلیوم زایشی نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافته و آثاری از واکوئل‌زایی در آن دیده شد (تصویر ۳). در گروه درمان ۲ (ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg) ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز تقریباً مشابه گروه‌های کنترل و شاهد بود (تصویر ۴).

بررسی بافت شناسی بیضه موش در گروه درمان ۳ (متوترکسات ۵ mg/kg و ویتامینD، ۵۰۰IU/kg) و مقایسه آن با گروه درمان ۱(متوترکسات)، نشان داد که تغییرات بافتی از نظر ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز، تعداد، اندازه فضای بینابینی و تراکم سلول‌های درون لوله‌های اسپرم ساز صورت گرفته است و از آسیب بافتی کاسته شده است (تصویر ۵).

بررسی فتومیکروگراف تهیه شده از لوله‌های اسپرم‌ساز گروه درمان ۴ (متوترکسات ۵ mg/kg و ویتامینD، ۱۰۰۰IU/kg) و مقایسه آن با گروه درمان ۱ (متوترکسات)، نشان داد که اکثر تغییرات تخریبی بافتی و بی نظمی‌های ایجاد شده توسط متوترکسات با تجویز ویتامینD برگشت و تعدیل یافته بود به‌طوری که اپی‌تلیوم زایشی لوله‌های اسپرم ساز تا حدودی دارای ساختار طبیعی بوده و تا حدودی اسپرماتوژنز طبیعی داشتند. همچنین ادم میان بافتی در این گروه به میزان زیادی کاهش یافته بود (تصویر ۶).



تصاویر- تصاویر میکروسکوپی از بافت بیضه موش‌های صحرایی نر بالغ در گروه‌های مختلف. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین ، بزرگنمایی × ۴ (به ترتیب از بالا سمت چپ به راست)

تصویر ۱- تصویر میکروسکوپی بافت بیضه در گروه کنترل، تصویر ۲- تصویر میکروسکوپی بافت بیضه در گروه شاهد، تصویر ۳- تصویر میکروسکوپی بافت بیضه در گروه درمان ۱ (متوترکسات،mg/kg ۵)، تصویر ۴- تصویر میکروسکوپی بافت بیضه در گروه درمان۲ (ویتامینD، IU/kg ۱۰۰۰)، تصویر ۵- تصویر میکروسکوپی بافت بیضه در گروه درمان۳ (متوترکسات mg/kg ۵ و ویتامینD، IU/kg ۵۰۰) ، تصویر ۶- فتومیکروگراف لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه درمان۴ (متوترکسات mg/kg ۵ و ویتامینD، IU/kg ۱۰۰۰)

[DOI: 10.34785/bums024.2023.007]

بحث

این تحقیق با هدف بررسی اثر محافظتی ویتامینD بر هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون و تغییرات بافت بیضه القاءشده توسط متوترکسات در موش نر بالغ انجام شد.

نتایج ما کاهش قابل توجهی در تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرم در همه موش‌های صحرایی دریافت کننده متوترکسات در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد نشان داد. با این حال، افزایش قابل توجهی در تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرم پس از درمان متوترکسات با ویتامینD وجود داشت. در این رابطه، نتایج ما با یافته Güvenç و همکارانش در سال ۲۰۱۸ همخوانی دارد که دریافتند تجویز متوترکسات به پارامترهای اسپرم آسیب می‌رساند (۱۴).

علاوه بر این، منصور و همکاران در سال ۲۰۲۱ دریافتند که متوترکسات باعث کاهش قابل توجه کیفیت اسپرم همراه با کاهش اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری در پلاسمای منی شده است. در این مطالعه متوترکسات باعث کاهش معنی‌دار تستوسترون سرم گردید (۱۵). این اثر ممکن است ناشی از مهار اسپرماتوژنز توسط متوترکسات از طریق تأثیر آن بر تکثیر و تمایز سلولی باشد (۱۶).

نتایج ما کاهش قابل توجهی در تستوسترون سرم و افزایش LH، FSH در گروه متوترکسات در مقایسه با گروه کنترل و شاهد نشان داد. سطح پایین‌تر تستوسترون سرم در موش‌های تحت درمان با متوترکسات را می‌توان به سلول‌های لایدیگ آسیب‌دیده نسبت داد که در مطالعه حاضر مشاهده گردید.

همان‌طور که در این مطالعه گزارش شد، کاهش تستوسترون سرم، تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرم و افزایش LH، FSH در موش‌های دریافت‌کننده متوترکسات مشاهده گردید. با این حال، ویتامینD با مقادیر مختلف قادر به تعدیل این اثر بود. از این رو، ویتامینD نقش محافظتی در کاهش اثرات سمی و آسیب بافت بیضه ناشی از متوترکسات ایفا می‌کند.

مطابق با یافته های تحقیق ما در مطالعه Kyaw و همکاران در سال۲۰۲۰ مشخص گردید که استفاده از دوزتجمعی متوترکسات منجر به افزایش سطوح هورمون‌های گنادوتروپین LH، FSH در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئیدی در سنین تولید مثل می‌شود (۱۷). به نظر می‌رسد متوترکسات از طریق افزایش قابل توجهی در پاسخ‌های اکسیداتیو، التهابی و آپوپتوز، منجر به افزایش سطوح هورمون‌های LH، FSH می‌گردد (۱۸).

نتایج یک مطالعه نشان داد که متوترکسات به‌طور مستقیم با کاهش فعالیت گیرنده‌های سلول‌های بینابینی در بافت بیضه، منجر به کاهش ترشح هورمون تستوسترون می‌شود. این امر اثر فیدبک منفی تستوسترون را بر هیپوفیز کاهش داده و باعث افزایش ترشح هورمون LH از سلول‌های لوتئوتروپ در بخش قدامی هیپوفیز می‌شود (۱۹).

در مطالعه Belhan و همکاران در سال ۲۰۱۹ مشخص شد که در گروه دریافت‌کننده متوترکسات تعداد و تحرک اسپرم، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و فعالیت‌های کاتالاز کاهش یافت، در حالی‌که سطح بیان مالون دی آلدئید، فاکتور نکروز تومور-α، اینترلوکین-β۱ و فاکتور کاپا هسته ای B در موش‌های صحرایی افزایش یافت. علاوه بر این، آسیب به ساختار لوله‌های اسپرم‌ساز شناسایی شد. به نظر می رسد متوترکسات از طریق افزایش استرس اکسیداتیو منجر به القا صدمات بیضه‌ای می‌شود (۲۰).

مطالعات تجربی و بالینی قبلی مکانیسم آسیب بیضه ای القاشده توسط متوترکسات را شرح داده‌اند. این اثرات شامل مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و رهاسازی سیتوکین‌های پیش التهابی و گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد. ثابت شده که استرس اکسیداتیو ناشی از متوترکسات باعث آسیب به مورفولوژی بیضه، آسیب غیر قابل برگشت سلول‌های زاینده و کاهش سطوح هورمون تستوسترون می‌شود (۲۱).

در مطالعه Karabulut و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان داده شد که متوترکسات منجر به کاهش سطح تستوسترون در موش‌های صحرایی می‌گردد (۲۲). کاهش سطح تستوسترون می‌تواند به علت کاهش تعداد محل‌های اتصال هورمون LH در سلول‌های لایدیک باشد.

هچنین در مطالعه Delen و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش

[DOI: 10.34785/bums024.2023.007]

گردید که وزن بدن و بیضه، سطح تستوسترون سرم، قطر لوله اسپرم‌ساز و ضخامت اپیتلیال ژرمینال در گروه دریافت کننده متوترکسات به طور معنی‌داری کاهش یافت (۲۳).

اثـر آنتـی‌اکسـیدانی ویتامینD در مطالعات گذشته در روند اسپرماتوژنز تأییـد شده است. مطابق با یافته‌های تحقیق ما مطالعه امینی و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان داد که دریافت ویتامین D3 تغییری در کیفیت و کمیت اسپرموگرام‌ها و مقادیر سرمی LH، FSH، ایجاد نکرده است، اما بر تستوسترون و گلوبولین متصل به هورمون جنسی[1] تأثیر گذاشته است. هنوز مطالعات بیشتری برای روشن شدن نقش بیولوژیکی ویتامین D3 بر باروری به ویژه در باروری مردان مورد نیاز است (۲۴).

در تحقیق دیگری توسط Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۲ که به بررسی اثر ویتامین D و E بر سمیت ناشی از سدیم فلوراید در عملکرد تولیدمثل خرگوش نر پرداختند. تیمار ترکیبی ویتامین D و E بهبود قابل توجهی را در عملکرد تولید مثل تحت تأثیر فلوراید نشان داده است. با مصرف مکمل ویتامین D، بهبود قابل توجهی در تعداد اسپرم، تحرک و حرکت پیشرونده مشاهده شده است، اما به طور قابل توجهی کمتر از مقادیر کنترل باقی مانده است (۲۵).

همچنین مطالعه Liu و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داد که مکمل ویتامین D3 عملکرد بیضه را در موش‌های دیابتی از طریق گیرنده گاما/فاکتور رشد تبدیل‌کننده بتا ۱/فاکتور هسته‌ای کاپا B فعال‌شده با تکثیرکننده پراکسی‌زومی بهبود می‌بخشد (۲۶). در مطالعه مشابه دیگری BaSalamah و همکاران در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند که ویتامین D آسیب بیضه‌ای ناشی از سرب را با مکانیسم‌های تعدیل کننده ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در موش‌ها کاهش می‌دهد. این مطالعه اثرات محافظتی بالقوه ویتامین D در برابر آسیب بیضه‌ای ناشی از سرب از طریق مکانیسم‌های ضد التهابی و ضد اکسیداتیو را نشان داد (۲۷).

همسو با نتایج مطالعه ما تحقیق Ding و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داد که مکمل ویتامین D عملکرد بیضه را در موش‌های دیابتی بهبود می بخشید. در این مطالعه هیپرگلیسمی طولانی مدت، منجر به افزایش سیتوکین‌های التهابی، آسیب عملکرد تولید اسپرم و کاهش تستوسترون سرم در موش‌های دیابتی گردید. پس از درمان با ویتامین D تمام تغییرات به طور مؤثر نرمال شده است (۲۸). همچنین نتایج تحقیق Jeremy و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داد که ویتامین D3 آپوپتوز و تکثیر سلولی را در بیضه مدل موش مسن القا شده با D-گالاکتوز تنظیم می‌کند. علاوه بر این، ویتامین D3 با بهبود سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی به‌طور قابل توجهی استرس اکسیداتیو را در بیضه موش‌های مسن کاهش می‌دهد (۲۹). تمام این مطالعات با نتایج تحقیق ما همخوانی دارد.

در این مطالعه اثر محافظتی ویتامینD در جلوگیری از اثرات نامطلوب متوترکسات بر بافت بیضه در گروه‌های دریافت‌کننده متوترکسات + ویتامینD مشـاهده شـد. مطالعات نشان داده اند که ویتامینD موجب مهـار تولیـد رادیکال‌های آزاد می‌شود. اثرات آنتی‌اکسیدانی ویتامینD در غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد ثابت شده است (۳۰). به‌نظر می‌رسد ویتامینD بـا توجـه بـه خاصـیت آنتی‌اکسیدانی خود باعث مهار رادیکال‌های آزاد و در نتیجه اصلاح تغییرات بافتی بیضه القا شده توسـط متوترکسات گردیـد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، بررسی فراساختاری سلول‌های لایدیگ و سرتولی توسط میکروسکوپ نوری می‌تواند در جهت درک بهتر مکانیسم اثر حفاظتی ویتامینD بر هورمون‌های تستوسترون، FSH، LH و تغییرات بافت بیضه القاشده توسط متوترکسات در موش‌های صحرایی نر بالغ به‌کار گرفته شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق، متوترکسات منجر به آسیب به پارامترهای اسپرم و بافت بیضه گردید که با تجویز مقادیر مختلف ویتامینD میزان غلظت سرمی تستوسترون افزایش یافت و این امر موجب افزایش در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت اولیه و در نهایت افزایش تعداد سلول‌های اسپرم گردید. یافته‌های این مطالعه نشان داد که ویتامینD قادر است هورمون‌های تستوسترون، FSH، LH و تغییرات بافت بیضه القاشده توسط متوترکسات در موش‌های صحرایی نر بالغ را اصلاح کند.

[1] Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG)

[DOI: 10.34785/bums024.2023.007]

تقدیر و تشکّر

این مقاله حاصل پایان‌نامه با کد ۱۶۲۵۲۷۸۹۴ در مقطع کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری در سال ۱۴۰۱ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون اجرا شد. بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه معاونت پژوهشی تشکّر و قدردانی به عمل می‌آید.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Benedek TG. Methotrexate: from its introduction to non-oncologic therapeutics to anti-TNF-α. Clin Exp Rheumatol. 2010; 28(5 Suppl 61): S3-8. URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21044425/.

2- White-Cooper H, Bausek N. Evolution and spermatogenesis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2010; 365(1546): 1465-80. DOI: 10.1098/rstb.2009.0323.

3- Luddi A, Governini L, Wilmskötter D, Gudermann T, Boekhoff I, Piomboni P. Taste Receptors: New Players in Sperm Biology. Int J Mol Sci. 2019; 20(4): 967. DOI: 10.3390/ijms20040967.

4- Ozcicek F, Kara AV, Akbas EM, Kurt N, Yazici GN, Cankaya M, et al. Effects of anakinra on the small intestine mucositis induced by methotrexate in rats. Exp Anim. 2020; 69(2): 144-52. DOI: 10.1538/expanim.19-0057.

5- Felemban SG, Aldubayan MA, Alhowail AH, Almami IS. Vitamin B17 Ameliorates Methotrexate-Induced Reproductive Toxicity, Oxidative Stress, and Testicular Injury in Male Rats. Oxid Med Cell Longev. 2020; 2020: 4372719. DOI: 10.1155/2020/4372719.

6- Grosen A, Kelsen J, Hvas CL, Bellaguarda E, Hanauer SB. The Influence of Methotrexate Treatment on Male Fertility and Pregnancy Outcome After Paternal Exposure. Inflamm Bowel Dis. 2017; 23(4): 561-9. DOI: 10.1097/MIB.0000000000001064.

7- Shrestha S, Dhungel S, Saxena AK, Bhattacharya S, Maskey D. Effect of methotrexate (MTX) administration on spermatogenesis: an experimental on animal model. Nepal Med Coll J. 2007; 9(4): 230-3. PMID: 18298010

8- Kilinc L, Uz YH. Protective effects of curcumin against methotrexate-induced testicular damage in rats by suppression of the p38-MAPK and nuclear factor-kappa B pathways. Clin Exp Reprod Med. 2021; 48(3): 211-20. DOI: 10.5653/cerm.2020.04105.

9- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. Endocr Rev. 2008; 29(6): 726-76. DOI: 10.1210/er.2008-0004.

10- Pilz S, Frisch S, Koertke H, Kuhn J, Dreier J, Obermayer-Pietsch B, et al. Effect of vitamin D supplementation on testosterone levels in men. Horm Metab Res. 2011; 43(3): 223-5. DOI: 10.1055/s-0030-1269854.

11- Almeida Moreira Leal LK, Lima LA, Alexandre de Aquino PE, Costa de Sousa JA, Jataí Gadelha CV et al. Vitamin D (VD3) antioxidative and anti-inflammatory activities: Peripheral and central effects. Eur J Pharmacol. 2020; 879: 173099. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173099.

12- Nourozi A, Shariati M. Protective Effect of Vitamin D on Spermatogenesis and Testicular Tissue Changes in Adult Rats Treated with Thioacetamide. Alborz Univer Med J. 2020; 9(2): 107-122. [Persian] URL: http://aums.abzums.ac.ir/article-1-1080-en.html. DOI: 10.29252/aums.9.2.107

13- Keshavars M, Takhshid M A, Tavasoli A, Kargar Jahromi H, Meshkibaf M H, Heydari Y. The protective effects of vitamin E and C against oxidative stress induced by sulfasalazine in the testis of male adult rats.J Advanced Biomed Sci. 2011; 1(4): 206-15. [Persian] URL: http://jabs.fums.ac.ir/article-1-93-en.html.

14- Güvenç M, Aksakal M. Ameliorating effect of kisspeptin-10 on methotrexate-induced sperm damages and testicular oxidative stress in rats. Andrologia. 2018; 50(8): e13057. DOI: 10.1111/and.13057.

[DOI: 10.34785/bums024.2023.007]

15- Mansour DF, Saleh DO, Ahmed-Farid OA, Rady M, Bakeer RM, Hashad IM. Ginkgo biloba extract (EGb 761) mitigates methotrexate-induced testicular insult in rats: Targeting oxidative stress, energy deficit and spermatogenesis. Biomed Pharmacother. 2021; 143: 112201. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112201.

16- Hirako A, Takeoka Y, Furukawa S, Sugiyama A. Effects of methotrexate exposure on medaka (Oryzias latipes) testes. J Toxicol Pathol. 2017; 30(4): 283-9. DOI: 10.1293/tox.2017-0029.

17- Kyaw MT, Sakthiswary R, Ani Amelia Z, Rahana AR, Munirah MM. Effects of Methotrexate Therapy on the Levels of Gonadotropic Hormones in Rheumatoid Arthritis Patients of Reproductive Age. Cureus. 2020; 12(4):e7632. DOI: 10.7759/cureus.7632.

18-Owumi SE, Ochaoga SE, Odunola OA, Farombi EO. Protocatechuic acid inhibits testicular and epididymal toxicity associated with methotrexate in rats. Andrologia. 2019; 51(9): e13350. DOI: 10.1111/and.13350.

19- Morsy MA, Abdel-Aziz AM, Abdel-Hafez SMN, Venugopala KN, Nair AB, Abdel-Gaber SA. The Possible Contribution of P-Glycoprotein in the Protective Effect of Paeonol against Methotrexate-Induced Testicular Injury in Rats. Pharmaceuticals (Basel). 2020; 13(9): 223. DOI: 10.3390/ph13090223.

20-Belhan S, Çomaklı S, Küçükler S, Gülyüz F, Yıldırım S, Yener Z. Effect of chrysin on methotrexate-induced testicular damage in rats. Andrologia. 2019; 51(1): e13145. DOI: 10.1111/and.13145.

21-Sukhotnik I, Nativ O, Roitburt A, Bejar D, Coran AG, Mogilner JG, Nativ O. Methotrexate induces germ cell apoptosis and impairs spermatogenesis in a rat. Pediatr Surg Int. 2013; 29(2): 179-84. DOI: 10.1007/s00383-012-3197-0.

22- Karabulut D, Öztürk E, Kaymak E, Kuloglu N, Akin AT, Yakan B. Vitamin B12 suppresses GADD153, prevents apoptosis and regulates the testicular function in methotrexate treated rat testis. Biotech Histochem. 2022; 97(4): 290-297. DOI: 10.1080/10520295.20211.

23-Delen O, Uz YH. Protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate against methotrexate-induced testicular damage. Hum Exp Toxicol. 2021; 40(12_suppl):S164-S177. DOI: 10.1177/09603271211035674.

24-Amini L, Mohammadbeigi R, Vafa M, Haghani H, Vahedian-Azimi A, Karimi L, et al. Evaluation of the effect of vitamin D3 supplementation on quantitative and qualitative parameters of spermograms and hormones in infertile men: A Randomized controlled trial. Complement Ther Med. 2020; 53: 102529. DOI: 10.1016/j.ctim.2020.102529.

25- Kumar N, Sood S, Arora B, Singh M, Beena, Roy PS. To Study the Effect of Vitamin D and E on Sodium-Fluoride-induced Toxicity in Reproductive Functions of Male Rabbits. Toxicol Int. 2012; 19(2): 182-7. DOI: 10.4103/0971-6580.97220.

26- Liu Y, He Y, Wang Q, Guo F, Huang F, Ji L, et al. Vitamin D_3 supplementation improves testicular function in diabetic rats through peroxisome proliferator-activated receptor-γ/transforming growth factor-beta 1/nuclear factor-kappa B. J Diabetes Investig. 2019; 10(2): 261-71. DOI: 10.1111/jdi.12886.

27- BaSalamah MA, Abdelghany AH, El-Boshy M, Ahmad J, Idris S, Refaat B. Vitamin D alleviates lead induced renal and testicular injuries by immunomodulatory and antioxidant mechanisms in rats.Sci Rep. 2018; 8(1): 1-3. URL: https://www.nature.com/articles/s41598-018-23258-w.

28- Ding C, Wang Q, Hao Y, Ma X, Wu L, du M, et al. Vitamin D supplement improved testicular function in diabetic rats. Biochem Biophys Res Commun. 2016; 473(1): 161-7. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.072.

29- Jeremy M, Gurusubramanian G, Roy VK. Vitamin D3 regulates apoptosis and proliferation in the testis of D-galactose-induced aged rat model. Sci Rep. 2019; 9(1): 14103. DOI: 10.1038/s41598-019-50679-y.

30- Tagliaferri S, Porri D, De Giuseppe R, Manuelli M, Alessio F, Cena H. The controversial role of vitamin D as an antioxidant: results from randomised controlled trials. Nutr Res Rev. 2019; 32(1): 99-105. DOI: 10.1017/S0954422418000197.

[DOI: 10.34785/bums024.2023.007]