Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

An Evaluation of the Protective Effects of Coenzyme Q10 on Fertility Parameters of Male Mice Treated with Methotrexate

M. Babaei (PhD)[*1], A. Kalantari-Hesari (PhD)[2], M. Yavari (PhD)[1], M. Hallaj (PhD)[3], H. Morovvati (PhD)[4]

1.Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Bu-Ali Sina University, Hamadan, I.R.Iran.
2.Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Bu-Ali Sina University, Hamadan, I.R.Iran.
3.Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, I.R.Iran.
4.Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, I.R.Iran.

Article Type
Research Paper

Received:
Mar 3rd 2023
Revised:
Apr 25th 2023
Accepted:
May 7th 2023

ABSTRACT

Background and Objective: Methotrexate (MTX) is a chemotherapy drug that has destructive effects on body tissues, including the male reproductive system. Since coenzyme Q10 is an antioxidant that can reduce its destructive effects to some extent, this study was conducted to investigate the effects of the simultaneous use of methotrexate and coenzyme Q10 on testis tissue structure and sperm parameters in male mice.

Methods: In this experimental study, 24 male NMRI mice were divided into four groups of six: the control group received 0.2 ml of distilled water intraperitoneally, the MTX group received 20 mg/kg methotrexate once a week intraperitoneally, the CoEnQ10 group received coenzyme Q10 orally at a dose of 200 mg/kg three times a week, and the MTX+CoEnQ10 group, in addition to receiving methotrexate 20 mg/kg intraperitoneally once a week, also received coenzyme Q10 orally at a dose of 200 mg/kg three times a week. All groups were treated for five weeks. After sacrificing the animals, epididymal cauda and testis tissue were sampled and analyzed respectively in order to check sperm parameters and histomorphometry changes and the process of spermatogenesis.

Findings: After treatment with MTX, viability, motility, tubule differentiation index, spermatic index, sperm repopulation index, mean seminiferous tubules diameter, seminiferous tubules lumen diameter, and germinal epithelium height decreased significantly compared to the control group ($p<0.05$). Furthermore, the treatment with MTX significantly led to DNA damage, an increase in the mean diameter of the testicular capsule and the percentage of tubular degeneration, and an increase in the number of abnormal sperms compared to the control group ($p<0.05$). Simultaneous use of coenzyme Q10 with MTX resulted in significant improvement of the mentioned parameters.

Conclusion: The results of the present study showed that MTX has a negative effect on the metabolic activity of sperm, integrity of membrane and DNA, causing a decrease in sperm parameters and changes in testicular tissue and the process of spermatogenesis. Significant improvement of coenzyme Q10 and MTX co-administration enhances the protective effect of coenzyme Q10.

Keywords: *Methotrexate, Coenzyme Q10, Testicular Tissue, Sperm Parameters, Mice.*

Cite this article: Babaei M, Kalantari-Hesari A, Yavari M, Hallaj M, Morovvati H. An Evaluation of the Protective Effects of Coenzyme Q10 on Fertility Parameters of Male Mice Treated with Methotrexate. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2023; 25(1): 567-78.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

•Corresponding Author: M. Babaei (PhD)
Address: Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Bu-Ali Sina University, Hamadan, I.R.Iran.
Tel: +98 (81) 34227350. **E-mail:** mohammad.babaei@basu.ac.ir

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

مطالعه اثرات محافظتی کوآنزیم Q10 بر فراسنج‌های باروری موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر تیمار شده با متوتروکسات

محمد بابائی (PhD)[1*]، علی کلانتری حصاری (PhD)[2]، مرتضی یاوری (PhD)[1]، مهسا حلاج (PhD)[3]، حسن مروتی (PhD)[4]

۱. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۳. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت:
۱۴۰۱/۱۲/۱۲
اصلاح:
۱۴۰۲/۲/۵
پذیرش:
۱۴۰۲/۲/۱۷

چکیده

سابقه و هدف: متوتروکسات (MTX)، یک داروی شیمی درمانی است که اثرات مخربی روی بافت‌های بدن از جمله دستگاه تناسلی نر دارد. از آنجائیکه کوآنزیم Q10، آنتی اکسیدانی است که تا حدودی می‌تواند اثرات تخریبی آن را کاهش دهد، لذا این مطالعه به منظور بررسی اثرات مصرف همزمان داروی متوتروکسات و کوآنزیم Q10 بر ساختار بافت بیضه و پارامترهای اسپرم در موش سوری نر انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش سوری نر نژاد NMRI به چهار گروه شش تایی تقسیم شدند: گروه کنترل با دریافت داخل صفاقی ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر، گروه MTX با دریافت داخل صفاقی ۲۰ mg/kg داروی متوتروکسات یک بار در هفته، گروه CoEnQ10 با دریافت خوراکی کوآنزیم Q10 با دوز ۲۰۰ mg/kg سه بار در هفته و گروه MTX+CoEnQ10 علاوه بر دریافت داخل صفاقی ۲۰ mg/kg داروی متوتروکسات یک بار در هفته، کوآنزیم Q10 را نیز به صورت خوراکی با دوز ۲۰۰ mg/kg سه بار در هفته دریافت کرد. همه گروه‌ها پنج هفته تیمار شدند. بعد از آسان کشی، دم اپیدیدیم و بافت بیضه به ترتیب به منظور بررسی پارامترهای اسپرم و تغییرات هیستومورفومتری و روند اسپرماتوژنز نمونه برداری و بررسی شدند.

یافته‌ها: پس از تیمار با MTX، قدرت زنده‌مانی، تحرک، شاخص تمایز لوله‌ای، شاخص اسپرم‌زایی، ضریب بازسازی اسپرم، میانگین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز و ارتفاع اپیتلیوم زایگر به طور معنی‌دار نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). همچنین تیمار با MTX به طور معنی‌داری منجر به آسیب به DNA، افزایش میانگین قطر کپسول بیضه و درصد دژنراسیون لوله‌ای و بیشتر شدن تعداد اسپرم‌های غیرطبیعی نسبت به گروه کنترل گردید ($p<۰/۰۵$). مصرف همزمان کوآنزیم Q10 به همراه MTX، بهبود معنی‌دار پارامترهای ذکر شده را به همراه داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که MTX با تأثیر منفی روی فعالیت متابولیک اسپرم، یکپارچگی غشاء و DNA، سبب کاهش پارامترهای اسپرم و تغییر بافت بیضه و روند اسپرماتوژنز می‌گردد. بهبود معنی‌دار مصرف همزمان کوآنزیم Q10 و MTX اثر محافظتی کوآنزیم Q10 را تقویت می‌بخشد.

واژه‌های کلیدی: متوتروکسات، کوآنزیم Q10، بافت بیضه، پارامترهای اسپرم، موش سوری.

استناد: محمد بابائی، علی کلانتری حصاری، مرتضی یاوری، مهسا حلاج، حسن مروتی. مطالعه اثرات محافظتی کوآنزیم Q10 بر فراسنج‌های باروری موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر تیمار شده با متوتروکسات. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۱۴۰۲؛ ۲۵(۱): ۷۸-۵۶۷.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]

▣ این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی به شماره IR.BASU.REC.1399.002 دانشگاه بوعلی سینا می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمد بابائی
آدرس: همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی. تلفن: ۰۸۱-۳۴۲۲۷۳۵۰
رایانامه: mohammad.babaei@basu.ac.ir

مقدمه

در دهه‌های اخیر، پیشرفت در درمان سرطان باعث افزایش بقای طولانی مدت بیماران سرطانی شده است (۲و۱). باروری آینده بیماران سرطانی پس از درمان یک نگرانی جدی در میان بیماران سرطانی است (۴و۳). در شیمی درمانی از یک یا چند داروی ضد سرطان (عوامل شیمی درمانی) به عنوان بخشی از یک رژیم شیمی درمانی استاندارد برای درمان استفاده می‌شود. اکثر داروهای شیمی درمانی باعث ایجاد سمیت‌های کوتاه مدت و بلند مدت می‌شوند (۵و۱). متوترکسات (MTX) داروی شیمی درمانی با ویژگی آنتاگونیستی اسید فولیک است که با موفقیت در درمان بدخیمی‌های مختلف (مانند لوسمی لنفوبلاستیک حاد، لنفوم نان‌هوتچکین، استئوسارکوم و سرطان سینه) و اختلالات خود ایمنی (مانند آرتریت روماتوئید و پسوریازیس) تجویز می‌شود (۷و۶). با توجه به اهمیت درمانی MTX، سمیت آن در سیستم‌های مختلف بدن از جمله سیستم خون سازی، دستگاه گوارش و سیستم عصبی مرکزی بررسی شده است (۸). MTX متابولیسم فولات را مهار کرده، با سنتز اسید نوکلئیک تداخل می‌کند و از این طریق، اثرات سیتوتوکسیک خود را در سلول‌های با سرعت تکثیر بالا، اعمال می‌نماید (۹و۱). MTX با اثرات تخریبی ذکر شده، می‌تواند باعث سمیت طولانی مدت یا دائمی غدد جنسی در مردان تحت درمان با این دارو گردد (۱۰). اثرات ژنوتوکسیک MTX در سلول‌های سوماتیک با استفاده از آزمایش میکرونوکلئوس و انحراف کروموزوم به اثبات رسیده است (۱۱و۸). MTX باعث افزایش تولید اسپرم با سر غیرطبیعی و کاهش تعداد اسپرم می‌شود (۸). استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم‌های اصلی MTX در آسیب بافت بیضه است. به طور کلی، آنتی اکسیدان‌ها از بافت‌های مختلف در برابر اثرات تخریبی استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند. در دهه اخیر، در مطالعات متعدد استفاده از عوامل آنتی اکسیدانی طبیعی جهت بهبود عوارض جانبی ناشی از مصرف MTX بررسی شده است (۱).

در بدن انسان، کوآنزیم Q10 به طور طبیعی از تیروزین سنتز می‌شود. کوآنزیم Q10 جزء حیاتی غشای داخلی میتوکندری محسوب گردیده و در مهار پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون DNA نقش مهم وکلیدی ایفا می‌نماید (۱۲). کوآنزیم Q10 همچنین نقش اساسی در انتقال الکترون در زنجیره تنفسی میتوکندری و فسفریلاسیون اکسیداتیو داشته و به عنوان یک آنتی اکسیدان محلول در چربی در غشای سلولی و لیپوپروتئین‌ها عمل می‌نماید (۱۴و۱۳). کوآنزیم Q10 همچنین در تولید آدنوزین تری فسفات در تنفس هوازی شرکت می‌کند (۱۵). کوآنزیم Q10 به عنوان ماده کمک دارویی در کنترل اختلالات پاتولوژیک مختلف مانند دیابت، سرطان، بیماری پارکینسون، بیماری هانتینگتون، اختلالات قلبی و ناباروری استفاده شده است (۱۶).

مطالعات متعددی اثربخشی مکمل کوآنزیم Q10 را در افزایش باروری مردان و عملکرد قلبی- عروقی بررسی و اثبات نموده‌اند (۱۷). کوآنزیم Q10 با مهار پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل می‌کند. کوآنزیم Q10 در میتوکندری‌های قسمت میانی اسپرم وجود دارد و در تمام فرآیندهای تنظیم انرژی سلولی اسپرم شرکت می‌کند (۱۸).

در یک مطالعه بالینی که اثرات تجویز خوراکی کوآنزیم Q10 بر غلظت مایع منی، غلظت اسپرم و تحرک اسپرم بررسی گردید، نتایج نشان داد که مکمل کوآنزیم Q10 منجر به افزایش قابل توجهی در هر سه پارامتر غلظت منی، غلظت اسپرم و تحرک اسپرم گردیده است (۱۹).

از آنجائیکه تاکنون هیچ مطالعه‌ای پیرامون اثرات کوآنزیم Q10 بر اختلال عملکرد بیضه‌ای ناشی از داروی MTX انجام نشده است، مطالعه حاضر به منظور بررسی تعیین اثر بهبودی کوآنزیم Q10 در برابر آسیب بیضه‌ای ناشی از MTX انجام شد.

مواد و روش ها

این مطالعه پس از تایید در کمیته اخلاق دانشگاه بوعلی سینا با کد IR.BASU.REC.1399.002 انجام شده است.

معرف‌های شیمیایی: آمپول MTX از شرکت (PubChem, EBEWE Pharma Ges.m.b.H) و کوآنزیم Q10 (PubChem) خریداری شد.

حیوانات: برای آزمایش از موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI (وزن ۲۰ تا ۲۵ گرم با سن ۸ تا ۱۰ هفته) استفاده شد. موش‌ها در مرکز پرورش حیوانات دانشگاه بوعلی سینا در شرایط استاندارد (دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۶۰-۵۵٪ و چرخه نور/ تاریکی ۱۲ ساعت) نگهداری شدند. آب و رژیم غذایی پلت استاندارد به طور آزاد در دسترس حیوانات قرار داده شد.

پروتکل آزمایشی: ۲۴ موش نر به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل با دریافت داخل صفاقی ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر، ۲- گروه MTX با دریافت داخل صفاقی ۲۰ mg/kg داروی متوتروکسات یک بار در هفته، ۳- گروه CoEnQ10 با دریافت خوراکی کوآنزیم Q10 با دوز ۲۰۰ mg/kg سه بار در هفته و ۴- گروه MTX+CoEnQ10 علاوه بر دریافت داخل صفاقی ۲۰ mg/kg داروی متوتروکسات یک بار در هفته، کوآنزیم Q10 را نیز به صورت خوراکی با دوز ۲۰۰ mg/kg سه بار در هفته دریافت کرد.

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]

یک روز بعد از آخرین تیمار، موش‌ها با روش جابجایی مهره‌های گردن آسان کشی شده و بعد از وزن کشی، دم اپیدیدیم خارج شده و در ۱ سی سی محیط کشت HTF (Human Tubular Fluid) قرار داده شد. سپس پارامترهای اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند. بافت بیضه راست جهت فیکس بافتی به فرمالین بافری ۱۰٪ منتقل گردید و شاخص گنادوسوماتیک (GSI) بر اساس فرمول ۱۰۰× (وزن بدن / وزن هر دو بیضه) =GSI محاسبه گردید.

بررسی پارامترهای اسپرم: به منظور مطالعه تعداد، زنده‌مانی، تحرک و مورفولوژی اسپرم، دم اپیدیدیم برش داده شده و به میکروتیوب حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط HTF از قبل گرم شده منتقل شدند. سوسپانسیون اسپرم جهت آنالیز پارامترهای مختلف اسپرم استفاده گردید. بررسی‌های انجام شده شامل شمارش میانگین تعداد اسپرم در واحد حجمی و رقت ثابت با استفاده از لام نئوبار، تعیین میزان درصد تحرک اسپرم، درصد زنده‌مانی اسپرم (رنگ آمیزی ائوزین نگروزین)، میزان آسیب DNA (با روش رنگ آمیزی آکریدین اورنج) و میزان بلوغ هسته (با روش رنگ آمیزی آنیلین بلو) می‌باشد.

بررسی‌های بافت شناسی: نمونه‌های بافت بیضه فیکس شده در فرمالین بافری ۱۰٪ پس از پاساژ بافتی و تهیه مقاطع بافتی (ضخامت ۷ میکرومتر) توسط هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شد، تمامی نمونه‌ها با بزرگنمایی چندگانه (۴۰۰× و ۱۰۰۰×) مورد ارزیابی تغییرات بافتی و مورفومتریک قرار گرفتند (۲۰).

میانگین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (STsD)، قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز (STsLD)، ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال (GEH)، قطر کپسول بیضه (TCD) برحسب میکرومتر و توسط دوربین Dino late و نرم‌افزار Dino Capture (ورژن ۲) مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی شاخص تمایز لوله‌ای (TDI)، درصد لوله‌های اسپرم‌ساز با بیش از سه لایه سلول‌های ژرمینال تمایز یافته از اسپرماتوگونی نوع A شمارش و TDI مثبت در نظر گرفته شد. همچنین برای محاسبه ضریب بازسازی اسپرم (RI)، نسبت اسپرماتوگونی فعال (اسپرماتوگونی نوع B با هسته‌های تیره) به اسپرماتوگونی غیرفعال (اسپرماتوگونی نوع A با هسته‌های روشن) در لوله‌های اسپرم‌ساز محاسبه گردید. جهت تعیین شاخص اسپرم‌زایی (SI) نیز درصد لوله‌های سمینیفر با اسپرماتوژنز طبیعی به عنوان SI مثبت در نظر گرفته شد. همچنین درصد دژنراسیون لوله‌ای (TDP) درگروه‌های مختلف آزمایشی محاسبه گردید.

نتایج حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند و نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شدند. جهت مقایسه بین گروه‌ها آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن تست تکمیلی Tukey مورد استفاده قرار گرفت و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

پارامترهای بیومتریک: مقایسه شاخص GSI و عرض بیضه بین گروه کنترل و گروه‌های تجربی تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در حالی که در بررسی میزان طول بیضه گروه MTX و MTX+CoEnQ10 نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه میانگین پارامترهای بیومتریک بیضه، تعداد، زنده‌مانی و تحرک اسپرم، درصد اسپرم‌های بالغ، درصد اسپرم‌های با DNA آسیب دیده و درصد اسپرم‌های غیرنرمال در گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها / پارامترها	کنترل Mean±SD	MTX Mean±SD	CoEnQ10 Mean±SD	MTX+CoEnQ10 Mean±SD
شاخص گنادوسوماتیک (GSI)	۰/۰۶±۰/۷۲^{a}	۰/۱±۰/۶۹^{a}	۰/۱۴±۰/۶۸^{a}	۰/۰۶±۰/۷۲^{a}
طول بیضه راست (mm)	۱/۵۱±۸/۵۴^{a}	۰/۴۷±۶/۲۸^{b}	۰/۶۵±۷/۱۱^{ab}	۰/۳۱±۶/۳۶^{b}
عرض بیضه راست (mm)	۲/۴۱±۶/۷۱^{a}	۰/۳۵±۴/۸۹^{a}	۰/۷۷±۵/۲۸^{a}	۰/۴۷±۵/۱۱^{a}
تعداد اسپرم ($۱۰^{۶}$/ml)	۲/۴۹±۱۴/۴۱^{a}	۱/۰۷±۳/۹۶^{b}	۱/۶۲±۱۵/۸۸^{a}	۱/۴۶±۸/۷۴^{c}
زنده‌مانی اسپرم (٪)	۵/۵۷±۷۸/۱۷^{a}	۴/۶۳±۳۵/۳۳^{b}	۵/۱۱±۸۰/۱۷^{a}	۴/۴۶±۵۵/۶۷^{c}
تحرک اسپرم (٪)	۵/۱۷±۸۳/۵^{a}	۴/۷۲±۳۴/۳۳^{b}	۴/۵۸±۸۵/۱۷^{a}	۶/۷۲±۵۷/۵^{c}
بلوغ اسپرم (٪)	۱/۷۵±۹۶/۶۷^{ac}	۳/۰۸±۸۷/۶۷^{b}	۱/۶۳±۹۸/۳۳^{a}	۴/۸۲±۹۲^{cb}
اسپرم با DNA آسیب دیده (٪)	۲/۷۳±۸/۶۷^{a}	۳/۱۴±۲۹/۳۳^{b}	۲/۷۳±۱۰/۳۳^{a}	۳/۲±۱۸/۶۷^{c}
اسپرم غیرنرمال (٪)	۲/۶۶±۹/۶۸^{a}	۵/۱۷±۳۰/۶۷^{b}	۲/۱۶±۸/۶^{a}	۱/۸۶±۱۵/۳۳^{c}

حروف انگلیسی غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد ($p<۰/۰۵$)

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]

پارامترهای اسپرم: تزریق MTX به طور معنی‌داری سبب کاهش تعداد اسپرم در مقایسه با گروه کنترل گردید (p<۰/۰۵). همچنین در این گروه قدرت تحرک و زنده‌مانی اسپرم به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش و درصد اسپرم‌های غیرنرمال افزایش یافت (p<۰/۰۵). در مقایسه با گروه MTX، تیمار با کوآنزیم Q10 از تغییرات نامطلوب پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک و زنده‌مانی اسپرم، اسپرم‌های غیرطبیعی) در گروه (MTX+CoEnQ10) جلوگیری نمود.

تزریق MTX، یک بار در هفته طی دوره ۵ هفته، منجر به افزایش معنی‌دار آسیب DNA هسته سلول‌های اسپرم در گروه‌های دریافت کننده MTX گردید (p<۰/۰۵) (در گروه MTX میزان آسیب به DNA سه برابر و در گروه MTX+CoEnQ10، ۲ برابر بیشتر از گروه کنترل). اما مصرف همزمان کوآنزیم Q10 سبب کاهش چشمگیر آسیب DNA سلول‌های اسپرم متعاقب مصرف MTX گردید (p<۰/۰۵). همچنین تزریق MTX سبب کاهش بلوغ هسته سلول‌های اسپرم در مقایسه با تمام گروه‌های آزمایشی شد (p<۰/۰۵). بلوغ هسته‌ای سلول‌های اسپرم در گروه‌های دریافت کننده کوآنزیم Q10 اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشته و سبب بهبود اثرات MTX گردید (p<۰/۰۵) (جدول ۱).

هیستومورفومتری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میانگین ضخامت ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال (GEH)، در گروه MTX نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵). در گروه MTX+CoEnQ10 مصرف کوآنزیم Q10 به همراه تجویز MTX سبب بهبود میانگین ضخامت ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال به طور معنی‌دار در مقایسه با گروه MTX گردید (p<۰/۰۵). در گروه MTX اندازه‌گیری ضخامت کپسول بیضه (TCD) نشان دهنده افزایش ضخامت در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی بود. بررسی قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (STsD) و قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز (STsLD) نشان داد که میانگین هر دو پارامتر در گروه MTX کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل و سایر گروه‌ها نشان داد (p<۰/۰۵). همچنین نتایج حاصل از این بررسی نشان داد مصرف همزمان کوآنزیم Q10 به همراه MTX، سبب بهبود میانگین پارامترهای مذکور می‌گردد (p<۰/۰۵). همچنین بین گروه کنترل و گروه CoEnQ10 که کوآنزیم Q10 را به تنهایی دریافت کرده بودند اختلاف معنی‌داری در پارامترهای مذکور مشاهده نشد (جدول ۲).

MTX به طور معنی‌داری شاخص تمایز لوله‌ای (TDI) را در مقایسه با گروه‌های کنترل و کوآنزیم Q10 کاهش داد (p<۰/۰۵). در گروه MTX، شاخص‌های ضریب بازسازی اسپرم (RI)، ضریب اسپرم‌زایی (SI) نیز در مقایسه با گروه کنترل و کوآنزیم Q10 به طور معنی‌داری کاهش نشان داد (p<۰/۰۵). تجویز کوآنزیم Q10 به همراه داروی MTX، سبب بهبود معنی‌دار اثرات سوء MTX گردید (p<۰/۰۵) (جدول ۲).

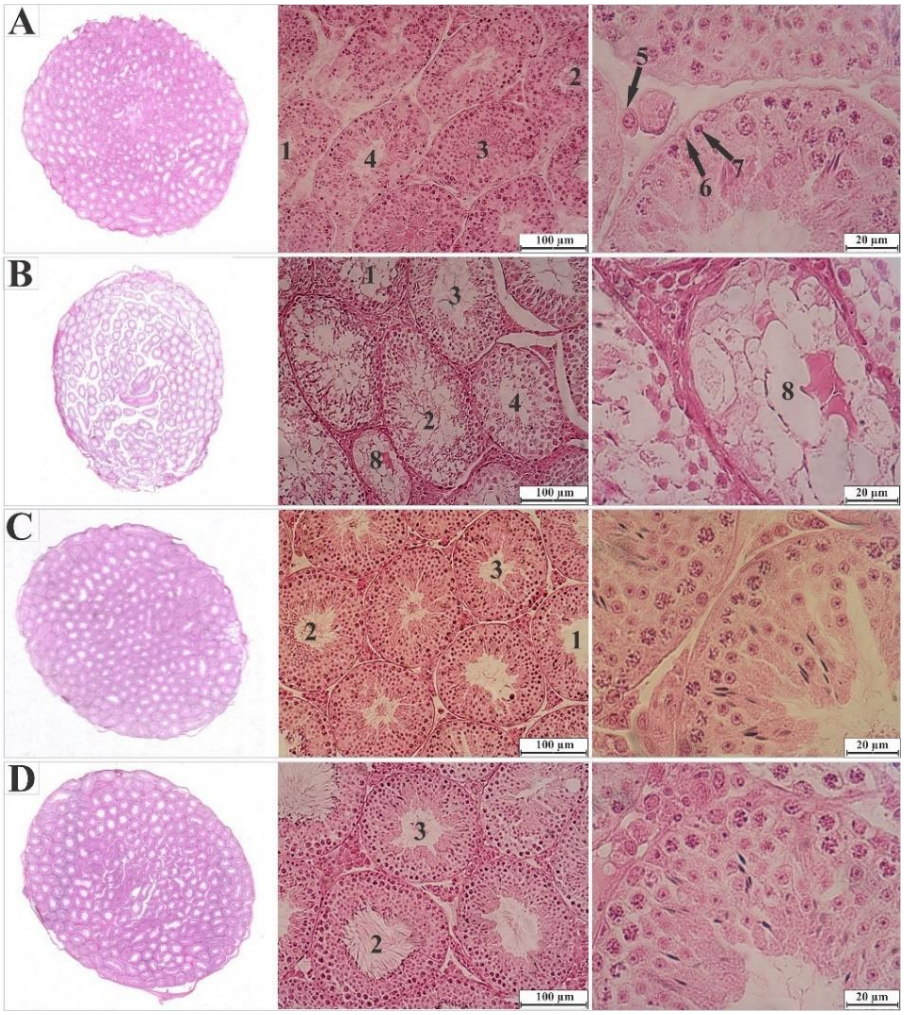
جدول ۲. مقایسه میانگین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز، ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال، قطر کپسول بیضه، درصد دژنراسیون لوله‌ای، شاخص تمایز لوله‌ای، ضریب بازسازی اسپرم و شاخص اسپرم‌زایی در گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها پارامترها	کنترل Mean±SD	MTX Mean±SD	CoEnQ10 Mean±SD	MTX+CoEnQ10 Mean±SD
قطر لوله‌های اسپرم ساز (STsD) (µm)	۱۵/۲۴±۲۱۱/۳۳^{a}	۶/۷۴±۱۳۴/۸۲^{b}	۵/۹۸±۲۰۶/۹۸^{a}	۸/۶۸±۱۷۳/۲۵^{c}
قطر لومن لوله‌های اسپرم ساز (STsLD) (µm)	۴/۶۶±۱۳۵/۸۵^{a}	۶/۱۶±۸۵/۹۳^{b}	۶/۴۴±۱۴۰/۹۴^{a}	۵/۱۷±۱۱۵/۵۱^{c}
ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال (GEH) (µm)	۳/۴۷±۶۲/۶۸^{a}	۵/۰۶±۳۲/۹۵^{b}	۲/۲۸۵±۶۵/۸۵^{a}	۴/۹۵±۴۵/۵۱^{c}
قطر کپسول بیضه (TCD) (µm)	۰/۶۹±۹/۵۸^{a}	۱/۱۱±۱۲/۵۵^{b}	۰/۴۹±۱۰/۰۱^{a}	۰/۵۸±۱۱/۴۲^{b}
درصد دژنراسیون لوله‌ای (TDP) (٪)	۲/۰۷±۳/۶^{a}	۲/۲۴±۱۶^{b}	۱/۱۴±۲/۴^{a}	۲/۰۷±۷/۴^{c}
شاخص تمایز لوله‌ای (TDI) (٪)	۴/۹۵±۸۸^{a}	۵/۹۷±۶۰/۲^{b}	۴/۰۶±۹۰^{a}	۴/۰۴±۷۵/۴^{c}
ضریب بازسازی اسپرم (RI) (٪)	۳/۳۹±۹۲^{a}	۳/۴۹±۵۶/۸^{b}	۳/۵۶±۹۳/۲^{a}	۵/۵۹±۷۳/۴^{c}
شاخص اسپرم زایی (SI) (٪)	۳/۸۹±۹۱/۲^{a}	۴/۷۸±۵۴/۶^{b}	۳/۱۱±۹۳/۸^{a}	۴/۳۸±۷۴/۸^{c}

حروف انگلیسی غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد (p<۰/۰۵)

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]

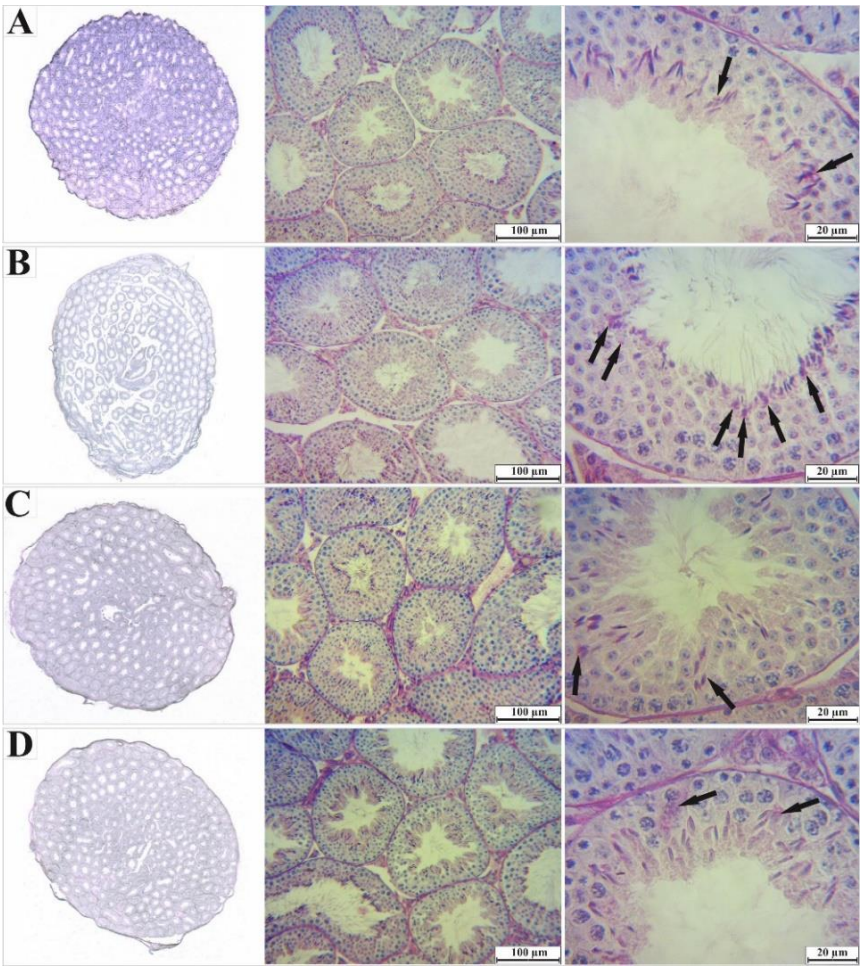
نتایج رنگ آمیزی هماتوکیسلن- ائوین: در بررسی مقاطع بافتی بیضه در گروه کنترل، ساختار کپسول بیضه، لوله‌های اسپرم‌ساز و سلول‌های لیدیگ حالت طبیعی را نشان می‌داد. این در حالی بود که در گروه MTX تعداد لوله‌ها به شدت کاهش یافته بود. همچنین در این گروه تعداد زیادی از لوله‌های اسپرم‌ساز دژنره شده نیز مشاهده شدند. این در حالی بود که در هر دو گروه CoEnQ10 و MTX+CoEnQ10 نیز ساختار بافتی طبیعی بود (شکل ۱).



شکل ۱. مقاطع بافت بیضه در گروه کنترل، کنترل شم و تجربی. رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (بزرگنمایی ٤٠٠× و ١٠٠×). A: گروه کنترل، B: گروه MTX، C: گروه CoEnQ10، D: گروه MTX+CoEnQ10. اعداد ١: لوله SI منفی، ٢: لوله SI مثبت، ٣: لوله TDI مثبت، ٤: لوله TDI منفی، ٥: سلول لیدیگ، ٦: اسپرماتوپونی نوع A، ٧: اسپرماتوگونی نوع B، ٨: لوله دژنره شده.

نتایج رنگ آمیزی PAS: مطالعه وجود مواد حاوی کربوهیدرات یا قندی در داخل سیتوپلاسم سلول‌های بافت بیضه به روش PAS انجام شد. این مشاهدات نشان داد که واکنش PAS در داخل سیتوپلاسم سلول‌های لیدیگ و بافت همبند احاطه کننده دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز همراه با غشای پایه نسبت به این واکنش با وجود رنگ قرمز براق جواب مثبت نشان داد. همچنین در گروه کنترل، دانه‌های پاس مثبت داخل سیتوپلاسم سلول‌های سری اسپرماتوژنز در رده‌های مجاور لایه بازال و به ندرت رده‌های بالاتر مشاهده گردید. این در حالی بود که استفاده از MTX باعث گردید که وجود دانه‌های پاس مثبت در سلول‌های سرتولی کاهش نشان دهد. همچنین این دانه‌ها در سری سلول‌های اسپرماتوژنز در ردیف‌های مجاور حفره میانی با تراکم بیشتری مشاهده گردید. همچنین تجویز CoEnQ10 در دو گروه دریافت کننده آن به طور مشخص باعث گردیده که دانه‌های پاس مثبت در رده‌های فوقانی سری اسپرماتوژنز کمتر شود (شکل ۲).

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]



شکل ۲. مقاطع بافت بیضه در گروه کنترل، کنترل شم و تجربی. رنگ آمیزی PAS (بزرگنمایی ۴۰۰× و ۱۰۰×). A: گروه کنترل، B: گروه MTX، C: گروه CoEnQ10، D: گروه MTX+CoEnQ10. مناطقی که نسبت به رنگ آمیزی PAS واکنش مثبت داشتند با فلش نشان داده شده‌اند.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، نتایج نشان داد که کوآنزیم Q10 با داشتن اثر محافظتی باعث جلوگیری از آسیب پارامترهای باروری موش نر مانند کیفیت اسپرم (تعداد، زنده‌مانی، مورفولوژی و تحرک، بلوغ و DNA)، هیستومورفومتری بافت بیضه (میانگین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز، ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال و قطر کپسول بیضه) و نیز شاخص‌های اسپرماتوژنز (شاخص تمایز لوله‌ای، ضریب بازسازی اسپرم و شاخص اسپرم‌زایی) می‌شود. MTX سبب افزایش تولید گونه‌های آزاد اکسیژن (ROS) و پراکسیداسیون لیپیدی و در نتیجه آسیب به غشای سلولی می‌گردد (۱). بنابراین، استفاده از مکمل‌های آنتی اکسیدانی در برابر سمیت باروری ناشی از MTX در سالیان اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است.

MTX متابولیسم فولات را مهار می‌کند، با سنتز اسید نوکلئیک تداخل می‌نماید و از این طریق، اثرات سیتوتوکسیک خود را در سلول‌هایی که به سرعت تقسیم می‌شوند، اعمال می‌کند (۲۱و۹) و از این رو، می‌تواند باعث سمیت طولانی مدت یا دائمی غدد جنسی در بیماران مرد گردد (۱۰). نتایج مطالعه Heidari Khoei و همکاران نشان می‌دهد که مصرف MTX سبب کاهش معنی‌دار پارامترهای اسپرم و تغییر پروفایل اکسیدانی/ پراکسیدانی بافت بیضه و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد. افزایش سطوح پراکسیداسیون لیپیدی در بیماران تحت تیمار با MTX سبب ناکارآمدی دفاع آنتی اکسیدانی و در نهایت افزایش استرس اکسیداتیو در بافت بیضه می‌شود (۱).

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]

در حالی که وقوع بیماری‌های سرطانی همراه با توسعه جامعه بشری افزایش یافته است، میزان مرگ و میر بیماران سرطانی به دلیل استفاده از عوامل ضد سرطان کاهش نشان می‌دهد (۲۳و۲۲). باروری پس از درمان برای بیماران سرطانی جوان حائز اهمیت می‌باشد. علاوه بر تجویز MTX به عنوان داروی شیمی درمانی، این دارو در دوزهای پایین، برای درمان انواع بیماری‌های مختلف دیگر نیز استفاده می‌شود و علاوه بر اثرات مفید آن، تاکنون سمیت MTX در سیستم‌های مختلف بدن گزارش شده است (۲۴و۲۲). مسمومیت باروری از عوارض جانبی مهم MTX در بیماران جوان است که اثرات مضری مانند کاهش تعداد اسپرم، مورفولوژی طبیعی و تحرک را ایجاد می‌نماید (۲۷-۲۵و۸). بنابراین محافظت در برابر مسمومیت بیضه ناشی از MTX طی دوره مصرف این دارو از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

اگرچه سطوح پایین ROS دارای برخی عملکردهای فیزیولوژیکی در بلوغ و ظرفیت‌یابی اسپرم می‌باشد، عدم تعادل بین ROS و آنتی اکسیدان‌های مایع منی، عملکرد تولید مثل مردان را مختل می‌نماید (۲۸). به طور مشابه، واکنش آکروزومی و ظرفیت‌یابی نیز توسط رادیکال‌های آنیون سوپراکسید تقویت می‌شود (۲۹). با این حال، تولید بیش از حد ROS منجر به استرس اکسیداتیو و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی اسپرم خواهدگردید (۳۰و۱۵). آنتی اکسیدان‌های آنزیمی موجود در مایع منی شامل کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز هستند، و آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل کوآنزیم Q10، گلوتاتیون پراکسیداز، ویتامین‌های A، B کمپلکس، C و E، ال‌کارنیتین و مواد معدنی (کروم، سلنیوم، روی و مس) را شامل می‌شوند (۳۱و۱۷و۱۵). عدم تعادل بین تولید ROS و ظرفیت آنتی اکسیدانی منجر به افزایش قرار گرفتن اسپرم در معرض استرس اکسیداتیو می‌شود که نقش مهمی در پاتوژنز ناباروری مردان ایفا می‌کند و عملکرد اسپرم را مختل می‌نماید (۳۲). از جمله آنتی اکسیدان‌های مورد مطالعه و تایید شده برای درمان ناباروری مردان کوآنزیم Q10 می‌باشد (۱۷).

در مطالعه حاضر تزریق MTX با دوز ۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، یک بار در هفته طی دوره ۳۵ روزه، منجر به افزایش قابل توجه آسیب DNA هسته سلول‌های اسپرم در گروه‌های دریافت کننده MTX گردید. همچنین در گروه‌های MTX پارامترهای باروری اسپرم از جمله تعداد، زنده‌مانی، مورفولوژی، تحرک و بلوغ به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد. تولید بیش از حد ROS با تخریب DNA از طریق القای شکستن رشته‌های DNA، پیوند متقابل کروماتین، و تغییرات پایه و پتانسیل پایین غشای میتوکندری همراه است (۳۳و۳۰و۱۵). غشای پلاسمایی اسپرم از لیپیدها تشکیل شده است و سطح بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع چند گانه و سطح بیش از حد ROS غشاء را مستعد آسیب ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی می‌کند (۳۴). در اسپرم، تحرک و کاهش سیالیت غشاء ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی با ظرفیت لقاح کمتر مرتبط است (۳۵). از سوی دیگر MTX یک داروی آنتی متابولیک قوی است. این دارو آنالوگ اسید فولیک است که سنتز پورین و پریمیدین را مهار می‌کند و تاثیرات درمانی و سمیتی آن در ارتباط با همین عملکرد است. اسید فولیک در سنتز اسید تیمیدیلیک و نوکلئوتیدهای پورین و در نهایت برای تولید DNA لازم می‌باشد. MTX برای اشغال جایگاه فعال آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز با اسید فولیک رقابت کرده و از تبدیل دی هیدروفولات به تتراهیدروفولات ممانعت می‌کند و در نتیجه آن عوامل دهنده متیل ساخته نمی‌شود. تمایل متوترکسات برای این جایگاه صد هزار مرتبه بیشتر از اسید فولیک است و اتصال آن با آنزیم دائمی است. متوترکسات با ایجاد اختلال در این مرحله، از سنتز مواد هسته‌ای جلوگیری کرده و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود (۳۷و۳۶). کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم در گروه MTX در مطالعه حاضر نیز تایید کننده این مساله می‌باشد.

نتایج مطالعه Coleshowers و همکارانش نشان داد که MTX با کاهش فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون ردوکتاز سبب القای استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۸). در مطالعه دیگری، Yulug و همکاران بیان نمودند که MTX مقدار سطوح MDA را افزایش داده و به طور قابل توجهی فعالیت‌های SOD و CAT را کاهش می‌دهد و از این طریق منجر به آسیب بافت بیضه می‌گردد. همچنین در مطالعات قبلی گزارش کرده‌اند که چندین عامل آنتی اکسیدانی مانند تیموکینون، رسوراترول و بتاکاروتن با کاهش غلظت MDA و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در بافت‌های مختلف، استرس اکسیداتیو ناشی از MTX را کاهش می‌دهند (۳۹و۲۷و۲۶). در مطالعه حاضر نیز مصرف همزمان کوآنزیم Q10 با داروی MTX با داشتن اثر محافظتی باعث جلوگیری از آسیب پارامترهای هیستومورفومتری از جمله میانگین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز، ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال و قطر کپسول بیضه و نیز شاخص‌های اسپرماتوژنز (شاخص تمایز لوله‌ای، ضریب بازسازی اسپرم و شاخص اسپرم‌زایی) گردید.

بهبود قابل توجهی در پارامترهای اسپرم و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (TAC) در مردان تحت درمان با کوآنزیم Q10 با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در روز به مدت ۳ ماه گزارش شده است (۴۰). به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مکمل کوآنزیم Q10 بر شاخص‌های اسپرماتوژنز مانند شاخص تمایز لوله‌ای، ضریب بازسازی اسپرم و شاخص اسپرم‌زایی تاثیر گذاشته و با داشتن اثر محافظتی باعث جلوگیری از آسیب پارامترها در سمیت ناشی از مصرف داروی MTX می‌گردد.

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]

شکسته شدن DNA اسپرم یکی از اصلی‌ترین اختلالات سطح مولکولی سلول اسپرم است. استرس اکسیداتیو به عنوان مکانیسم کلیدی ایجاد شکست DNA در نظر گرفته می‌شود. ROS بیش از حد باعث ایجاد شکاف و شکستگی در DNA می‌شود که نیاز به ترمیم و بازسازی دارد. تراکم بیشتر کروماتین DNA اسپرم را در برابر آسیب در حین انتقال در دستگاه تناسلی نر و ماده مقاوم‌تر می‌کند. با این حال، شکسته شدن DNA ممکن است در اثر قرار گرفتن در معرض ROS منی در اپیدیدیم یا متراکم سازی غیرطبیعی کروماتین ایجاد شود (۴۳-۴۱).

تکه تکه شدن DNA می‌تواند با تغییر عملکرد اسپرم منجر به ناباروری شود. مردانی که میزان شکسته شدن DNA بالایی دارند، احتمال کمتری برای باردار شدن به طور طبیعی دارند. بر این اساس، بیمارانی که درصد بالایی از اسپرم‌ها تحت تأثیر تکه تکه شدن DNA قرار دارند، دارای سطوح بالای ROS منی و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی هستند (۴۴). مطالعات گزارش کرده‌اند که کمبود کوآنزیم Q10 با افزایش آسیب DNA اسپرم و تعداد و تحرک کم اسپرم مرتبط است (۴۵و۱۹و۱۳). کوآنزیم Q10 منی، با خواص آنتی اکسیدانی و متابولیک، نقش عمده‌ای در بیوانرژیتیک میتوکندری و حفظ وضعیت پایدار سمینال ایفا می‌کند. در مطالعه حاضر شکست DNA اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج بررسی شده و نتایج نشان دهنده بهبود معنی‌دار شکست DNA در گروه مصرف همزمان MTX با کوآنزیم Q10 در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

در حالت سلامت سلول‌های سری اسپرماتوژنز مستقر روی غشای پایه لوله‌های منی‌ساز از منابع کربوهیدراتی و سلول‌های سری بالاتر از چربی‌ها جهت متابولیسم استفاده می‌کنند. ولی در حالات پاتولوژیک و بر هم خوردن چرخه‌های متابولیسمی تغییراتی در نوع متابولیسم‌های سلولی رخ می‌دهد. یکی از اثرات تغییر چرخه‌های متابولیکی استفاده سلول از سایر منابع غذایی موجود در محیط و یا عدم ذخیره مواد در سلول‌های مورد انتظار می‌باشد (۴۶). همانطور که در این مطالعه نشان داده شد، سلول‌های رده اسپرماتوژنز در گروه MTX ذرات کربوهیدرات که با رنگ آمیزی PAS مشخص شدند در رده سلول‌های نزدیک به مرکز لوله اسپرم‌ساز با تراکم بیشتری مشاهده شد که نشان از تغییر چرخه‌های متابولیکی این سلول‌ها بودند. در اینجا نیز CoEnQ10 تا حدودی توانسته بود اثرات سوء ناشی از تجویز MTX را جبران کند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درمان با کوآنزیم Q10 از اثرات سمی MTX در سیستم تولید مثل موش‌های نر جلوگیری می‌کند. همچنین از کاهش پارامترهای باروری موش نر از جمله پارامترهای کیفیت اسپرم (تعداد، زنده‌مانی، مورفولوژی و تحرک، بلوغ و DNA)، هیستومورفومتری بافت بیضه (میانگین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (STsD)، قطر لومن لوله‌های اسپرم‌ساز (STsLD)، ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال (GEH) و قطر کپسول بیضه (TCD) و نیز شاخص‌های اسپرماتوژنز (شاخص تمایز لوله‌ای (TDI)، ضریب بازسازی اسپرم (RI) و شاخص اسپرم‌زایی (SI)) جلوگیری می‌نماید. با توجه به مطالعه حاضر، نتایج حاصل از کوآنزیم Q10 همانند گروه کنترل بوده و تأثیر مضاعفی نداشته است. ولی MTX از از طریق آسیب اکسیداتیو، باروری مردان را مختل می‌کند. از سوی دیگر، درمان همزمان کوآنزیم Q10 با جلوگیری از اختلالات باروری ناشی از استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط MTX و با داشتن اثر محافظتی باعث جلوگیری از آسیب پارامترهای باروری مردان می‌گردد.

تضاد منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافعی در انتشار این مقاله وجود ندارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه بوعلی سینا همدان (گرنت شماره ۹۹-۱۵۳) به دلیل حمایت مالی از تحقیق، قدردانی می‌گردد.

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]

References

1.Heidari Khoei H, Fakhri S, Parvardeh S, Shams Mofarahe Z, Baninameh Z, Vardiani M. Astaxanthin prevents the methotrexate-induced reproductive toxicity by targeting oxidative stress in male mice. Toxin Rev. 2019;38(3):248-54.
2.Dohle GR. Male infertility in cancer patients: Review of the literature. Int J Urol. 2010;17(4):327-31.
3.Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC, et al. Fertility of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. J Clin Oncol. 2010;28(2):332-9.
4.Rosen A, Rodriguez-Wallberg KA, Rosenzweig L. Psychosocial distress in young cancer survivors. Semin Oncol Nurs. 2009;25(4):268-77.
5.Jahnukainen K, Ehmcke J, Hou M, Schlatt S. Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011;25(2):287-302.
6.Green JM. Glucarpidase to combat toxic levels of methotrexate in patients. Ther Clin Risk Manag. 2012;8:403-13.
7.Khan ZA, Tripathi R, Mishra B. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. Expert Opin Drug Deliv. 2012;9(2):151-69.
8.Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid. Mutat Res. 2009;673(1):43-52.
9.Meistrich ML. Male gonadal toxicity. Pediatr Blood Cancer. 2009;53(2):261-6.
10.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.
11.Choudhury RC, Palo AK. Modulatory effects of caffeine on methotrexate-induced cytogenotoxicity in mouse bone marrow. Environ Toxicol Pharmacol. 2004;15(2-3):79-85.
12.de Ligny W, Smits RM, Mackenzie-Proctor R, Jordan V, Fleischer K, de Bruin JP, et al. Antioxidants for male subfertility. Cochrane Database Syst Rev. 2022;5(5):CD007411.
13.Vishvkarma R, Alahmar AT, Gupta G, Rajender S. Coenzyme Q10 effect on semen parameters: Profound or meagre?. Andrologia. 2020;52(6):e13570.
14.Ghanbarzadeh S, Garjani A, Ziaee M, Khorrami A. CoQ10 and L-carnitine attenuate the effect of high LDL and oxidized LDL on spermatogenesis in male rats. Drug Res (Stuttg). 2014;64(10):510-5.
15.Alahmar AT. Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. J Hum Reprod Sci. 2019;12(1):4-18.
16.Banihani SA. Effect of Coenzyme Q_{10} Supplementation on Testosterone. Biomolecules. 2018;8(4):172.
17.Alahmar AT, Calogero AE, Singh R, Cannarella R, Sengupta P, Dutta S. Coenzyme Q10, oxidative stress, and male infertility: A review. Clin Exp Reprod Med. 2021;48(2):97-104.
18.Tiseo BC, Gaskins AJ, Hauser R, Chavarro JE, Tanrikut C; EARTH Study Team. Coenzyme Q10 Intake From Food and Semen Parameters in a Subfertile Population. Urology. 2017;102:100-5.
19.Lafuente R, González-Comadrán M, Solà I, López G, Brassesco M, Carreras R, Checa MA. Coenzyme Q10 and male infertility: a meta-analysis. J Assist Reprod Genet. 2013;30(9):1147-56.
20.Morovvati H, Babaie M, TooTian Z, Fazelipour S, Anbara H, Akbarzadeh A. The Effects of Vitamin E on Liver and Kidney Damage Induced by Dianabol in Small Laboratory Mice. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(9):36-47. [In Persian]

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]

21.Chen YH, Tsai CY, Huang PY, Chang MY, Cheng PC, Chou CH, et al. Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model. Mol Pharm. 2007;4(5):713-22.
22.Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. Ann Oncol. 2005;16(3):481-8.
23.Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015;65(2):87-108.
24.Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. Br J Haematol. 2009;146(5):489-503.
25.Pectasides D, Pectasides E, Papaxoinis G, Skondra M, Gerostathou M, Karageorgopoulou S, et al. Testicular function in poor-risk nonseminomatous germ cell tumors treated with methotrexate, paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin combination chemotherapy. J Androl. 2009;30(3):280-6.
26.Vardi N, Parlakpinar H, Ates B, Cetin A, Otlu A. Antiapoptotic and antioxidant effects of beta-carotene against methotrexate-induced testicular injury. Fertil Steril. 2009;92(6):2028-33.
27.Gökçe A, Oktar S, Koc A, Yonden Z. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. Hum Exp Toxicol. 2011;30(8):897-903.
28.Dutta S, Henkel R, Sengupta P, Agarwal A. Physiological role of ROS in sperm function. In: Parekattil SJ, Esteves SC, Agarwal A, editors. Male infertility: Contemporary clinical approaches, Andrology, ART and antioxidants, 2nd ed. 2020. p. 337-45.
29.Figueroa-Romero C, Sadidi M, Feldman EL. Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy. Rev Endocr Metab Disord. 2008;9(4):301-14.
30.Agarwal A, Arafa M, Chandrakumar R, Majzoub A, AlSaid S, Elbardisi H. A multicenter study to evaluate oxidative stress by oxidation-reduction potential, a reliable and reproducible method. Andrology. 2017;5(5):939-45.
31.Agarwal A, Ahmad G, Sharma R. Reference values of reactive oxygen species in seminal ejaculates using chemiluminescence assay. J Assist Reprod Genet. 2015;32(12):1721-9.
32.Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biol Reprod. 1989;41(1):183-97.
33.Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. Biol Reprod. 2007;77(2):190-201.
34.Kamkar N, Ramezanali F, Sabbaghian M. The relationship between sperm DNA fragmentation, free radicals and antioxidant capacity with idiopathic repeated pregnancy loss. Reprod Biol. 2018;18(4):330-5.
35.Eftekhari A, Ahmadian E, Azami A, Johari-Ahar M, Eghbal MA. Protective effects of coenzyme Q10 nanoparticles on dichlorvos-induced hepatotoxicity and mitochondrial/lysosomal injury. Environ Toxicol. 2018;33(2):167-77.
36.Novaković T, Milošević-Đorđević O, Grujičić D, Marinković D, Janković S, Arsenijević S. Effect of intratumoral application of methotrexate in vivo on frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes. Arch Oncol. 2003;11(1):1-4.
37.Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. Bull NYU Hosp Jt Dis. 2007;65(3):168-73.
38.Coleshowers CL, Oguntibeju OO, Ukpong M, Truter EJ. Effects of methotrexate on antioxidant enzyme status in a rodent model: peer reviewed original article. Med Technol SA. 2010;24(1):4-9.

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]

39.Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C. Effects of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats. Sci World J. 2013;2013:489659.
40.Festa R, Giacchi E, Raimondo S, Tiano L, Zuccarelli P, Silvestrini A, et al. Coenzyme Q10 supplementation in infertile men with low-grade varicocele: an open, uncontrolled pilot study. Andrologia. 2014;46(7):805-7.
41.Panner Selvam MK, Sengupta P, Agarwal A. Sperm DNA fragmentation and male infertility. In: Arafa M, Elbardisi H, Majzoub A, Agarwal A, editors. Genetics of Male Infertility: A Case-Based Guide for Clinicians. Springer, Cham; 2020. p. 156.
42.Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M, Diedrich K, Al-Hasani S. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. Reprod Biomed Online. 2007;14(3):384-95.
43.Nadjarzadeh A, Sadeghi MR, Amirjannati N, Vafa MR, Motevalian SA, Gohari MR, et al. Coenzyme Q10 improves seminal oxidative defense but does not affect on semen parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: a randomized double-blind, placebo controlled trial. J Endocrinol Invest. 2011;34(8):e224-8.
44.Agarwal A, Cho CL, Esteves SC, Majzoub A. Reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. Transl Androl Urol. 2017;6(Suppl 4):S695-6.
45.Garrido-Maraver J, Cordero MD, Oropesa-Avila M, Vega AF, de la Mata M, Pavon AD, et al. Clinical applications of coenzyme Q10. Front Biosci (Landmark Ed). 2014;19(4):619-33.
46.Hesari AK, Shahrooz R, Ahmadi A, Malekinejad H, Saboory E. Crocin prevention of anemia-induced changes in structural and functional parameters of mice testes. J Appl Biomed. 2015;13(3):213-23.

[DOI: 10.22088/jbums.25.1.567]