

اثرات حفاظتی ویتامین D₃ بر تغییرات فیزیولوژیک و آسیب‌شناسی بیضه در موش‌های صحرایی بالغ تیمار شده با پنکونازول

نویسندگان:

اعظم نوروزی^۱، حبیب‌اله جوهری^{۲*}، مهرداد شریعتی^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
 ۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد داراب، دانشگاه آزاد اسلامی، داراب، ایران
 ۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.3, Fall 2023

چکیده:

مقدمه: قارچ‌کش‌های سیستمیک تری‌آزول همچون پنکونازول دارای اثر منفی بر بافت‌های مختلف بدن هستند. در مطالعه حاضر، اثرات حفاظتی ویتامین D₃ بر تغییرات بافت و محور هیپوفیز-بیضه در موش‌های صحرایی بالغ تیمار شده با پنکونازول بررسی شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی نر از نژاد ویستار به شش گروه شش‌تایی شامل: گروه کنترل، گروه شاهد (یک میلی‌لیتر آب مقطر)، گروه تجربی ۱ (۱۰۰ mg/kg پنکونازول)، گروه تجربی ۲ (۱۰۰۰ IU/kg ویتامین D₃)، گروه تجربی ۳ (۱۰۰ mg/kg پنکونازول + ۵۰۰ IU/kg ویتامین D₃) و گروه تجربی ۴ (۱۰۰ mg/kg پنکونازول + ۱۰۰۰ IU/kg ویتامین D₃) در انتهای روز بیست و هشتم، نمونه خونی برای سنجش میزان سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون به روش الیزا گرفته شد و بافت بیضه نیز برای بررسی آسیب‌شناسی خارج شد.

یافته‌ها: میزان سرمی LH و FSH در گروه تجربی ۱ در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد افزایش معناداری نشان داد ($P < 0.05$)، اما میزان سرمی تستوسترون کاهش داشت ($P < 0.05$). میزان سرمی LH و FSH در گروه‌های تجربی ۳ و ۴ در مقایسه با گروه تجربی ۱ کاهش ($P < 0.05$) و میزان تستوسترون سرم افزایش معناداری داشت ($P < 0.05$). بررسی آسیب‌شناسی بافتی نیز نشان داد که بافت بیضه در گروه تجربی ۱، تخریب و در گروه‌های تجربی ۳ و ۴ ترمیم شده است.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این مطالعه، ویتامین D₃ می‌تواند آسیب بیضه ناشی از پنکونازول را در موش‌های صحرایی بهبود دهد.

Pars J Med Sci 2023;21(3):21-29

واژگان کلیدی: ویتامین D₃، موش صحرایی، تستوسترون، گنادوتروپین، پنکونازول

مقدمه:

اسپرماتوژنز می‌تواند منجر به نابرابری در مردان شود [۲]. بیشتر مواد شیمیایی مصنوعی موجود در محیط زیست انسان بی‌ضرر هستند، اما برخی از آن‌ها از جمله آفت‌کش‌ها باعث ایجاد اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و اسپرماتوژنز می‌شوند. قرار گرفتن در معرض مواد شیمیایی مصنوعی و سموم ممکن است برای تولید مثل مضر بوده و روی باروری تأثیر منفی داشته

اسپرماتوژنز در پستانداران یک فرآیند چند مرحله‌ای و بسیار پیچیده است که توسط گروه‌ای از سلول‌های زایا با توانایی خودنوزایی به نام سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی حفظ می‌شود. نگهداری و تنظیم عملکرد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی به شدت وابسته به یک کنام حمایتی است که از چندین نوع سلول تشکیل شده است [۱]. کوچکترین انحراف از روند طبیعی

* نویسنده مسئول، نشانی: استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد داراب، دانشگاه آزاد اسلامی، داراب، ایران.

کد پستی: ۷۴۸۱۷-۸۳۱۴۳

تلفن: ۰۷۳۲۶۲۳۳۹۹۱، فاکس: ۰۷۳۲۶۲۳۳۹۰۰، پست الکترونیک: hjowhary@yahoo.co.uk

اصلاح: ۱۴۰۲/۰۸/۲۰ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۲

دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۷

باشد [۳]. در طول چند دهه گذشته، ترکیبات مصنوعی متعددی از جمله آفت‌کش‌ها و مواد شیمیایی صنعتی به محیط زیست وارد شده‌اند، با این تصور که این مواد هیچ‌گونه عوارض منفی روی انسان ندارند و می‌توانند استانداردهای زندگی را بهبود بخشند. در صورتی که بسیاری از این ترکیبات اثرات نامطلوب و زیان‌باری بر محیط زیست و سلامت انسان دارند [۴]. در سراسر جهان قارچ‌کش‌ها در کشاورزی برای کنترل آفات و افزایش بهره‌وری محصولات استفاده می‌شوند. در بین قارچ‌کش‌ها، بسیاری از کونازول‌ها برای درمان عفونت‌های قارچی موضعی و سیستمیک و همچنین برای جلوگیری از رشد قارچ در انواع محصولات زراعی استفاده می‌شوند که این کار باعث انتشار در محیط و انباشته شدن احتمالی در بدن موجودات زنده می‌شود. این موضوع باعث نگرانی جدی در خصوص اثرات مضر روی اکوسیستم‌ها و مهمتر از همه، بر سلامت انسان شده است [۵]. با قرار گرفتن در معرض کونازول‌ها پیامدهای نامطلوبی همچون سرطان کبد و تومورهای تیروئید مشاهده شده است. علاوه بر این، کونازول‌ها به عنوان مهارکننده آنزیم‌های استروئیدوژنز همچون استرول α -14-دمتیلاز که توسط ژن *CYP51* کدگذاری می‌شود و آروماتاز که توسط ژن *CYP19* کدگذاری می‌شود، عمل می‌کنند و تاثیر بالقوه‌ای در اختلال غدد درون‌ریز دارند [۶، ۷]. در واقع، برخی مطالعات درون‌تنی و برون‌تنی اثرات مضر کونازول‌ها را روی رشد تولید مثلی و حتی آسیب‌زایی در جنین و سمیت عصبی پس از مواجهه پری‌ناتال نشان داده‌اند [۵]. پنکونازول [۱- (۲،۴- α -14-دمتیلاز-1,2,4-triazole-1H-1-yl)-propan-2-yl] متعلق به گروه قارچ‌کش‌های سیستمیک تری‌آزول است که معمولاً در حوزه‌های باغبانی، کشاورزی و جنگل‌داری برای کنترل و درمان پاتوژن‌های برگ استفاده می‌شود. خواص قارچ‌کشی از طریق مهار فعالیت α -14-دمتیلاز وابسته به سیتوکروم P450 مورد نیاز در تبدیل لانوسترول به ارگوسترول، جزء ضروری غشاهای بیولوژیکی قارچ و تجزیه غشای سلولی به دست می‌آید. در سطوح بالا، این دسته از قارچ‌کش‌ها دارای انواع پیامدهای سمی در پستانداران از جمله سرطان زایی، سمیت تولید مثلی و سمیت کبدی هستند [۸-۱۰]. این قارچ‌کش‌ها معمولاً به صورت مستقیم روی گیاهان اسپری می‌شوند و به سرعت جذب و در داخل برگ‌ها پخش می‌شوند. با این حال، بخشی از آفت‌کش‌های استفاده شده می‌تواند به دلیل بارش باران و همچنین شسته شدن از روی شاخ و برگ و گیاه به خاک برسند. بدین ترتیب، قارچ‌کش‌های تری‌آزول با ورود به خاک می‌توانند خطراتی برای اکوسیستم‌های خاک و همچنین برای آب‌های زیرزمینی و سطحی ایجاد کنند [۸]. جذب پنکونازول ممکن است از راه‌های متعددی از جمله پوست، استنشاق و بلع رخ دهد. کارگران کشاورزی که مستقیماً با

این قارچ‌کش‌ها تماس دارند، افرادی که در مجاورت مناطق زراعی زندگی می‌کنند و همچنین افراد عادی که مواد غذایی آلوده به باقی مانده‌های آن‌ها را مصرف می‌کنند، محتمل‌ترین گروه‌هایی هستند که در معرض پنکونازول قرار می‌گیرند [۱۱]. با وجود اثربخشی بالای پنکونازول به عنوان یک آفت‌کش، پنکونازول اثرات خطرناکی را در پستانداران نشان داده است. مشاهده شده است این قارچ‌کش باعث اختلال عملکردی و ساختاری بیضه موش‌های صحرایی نر آلبینو می‌شود. علاوه بر این، نشان داده شده است تجویز داخل صفاقی پنکونازول باعث ایجاد سمیت کبدی و سمیت قلبی در موش‌های صحرایی می‌شود [۱۲]. همچنین بر اساس پژوهش‌های انجام شده، پیکونازول در بافت کبد با فعال کردن یک سری از گیرنده‌های هسته‌ای سبب القا سیتوکروم‌های خاصی در بافت هدف شده که منجر به افزایش استرس اکسیداتیو می‌شوند [۱۳]. استرس اکسیداتیو ناشی از تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، به عنوان سازوکار اصلی و زیربنایی تظاهرات سمی ناشی از پنکونازول پیشنهاد شده است [۱۲].

زمانی که تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها به نفع اکسیدان‌ها مختل شود، استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود. ویتامین D₃ هم توانایی اثر آنتی‌اکسیداتیو و هم توانایی اثر پرواکسیداتیو دارد [۱۴]. این ویتامین یک ریزمغذی است که به هورمون سکوستروئیدی چند عملکردی ضروری برای سلامت انسان متابولیزه می‌شود. در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های زیادی در درک فیزیولوژی و بیولوژی ویتامین D₃ و اکولوژی گیرنده آن پدیدار شده است. متابولیسم و عملکرد ویتامین D₃ با عوامل مختلفی تعدیل می‌شود. شواهد جمع‌آوری شده حاکی از ارتباط بیولوژیکی ویتامین D₃ با کاهش خطر برخی بیماری‌ها و نیز بهبود عملکردهای فیزیکی و ذهنی است [۱۵]. شکل فعال ویتامین D₃، 1,25(OH)₂D₃ دی‌هیدروکسی کلستریول [1,25(OH)₂D₃]، نه تنها در سلول‌های لوله‌های کلیوی (عملکرد غدد درون‌ریز به عنوان یک هورمون) بلکه در سلول‌های بافت هدف خارج کلیوی نیز تولید می‌شود که عملکردهای اتوکراین و پاراکراین را نشان می‌دهد [۱۶]. عملکرد غیر کلاسیک ویتامین D₃ شامل تنظیم چند فرآیند فیزیولوژیکی از جمله تکثیر سلولی، تمایز و تعدیل ایمنی است. ویتامین D₃ با اتصال به گیرنده ویتامین D₃ (VDR) که عضوی از خانواده گیرنده‌های هورمون هسته‌ای است، عملکرد خود را واسطه می‌کند [۱۷]. هنگامی که میزان ویتامین D₃ کافی باشد، بسیاری از فعالیت‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو درون سلولی کاهش می‌یابد. داشتن غلظت کمتر از حد مطلوب در سرم می‌تواند شرایط استرس اکسیداتیو را تحت‌الشعاع قرار دهد و آسیب اکسیداتیو داخل سلولی و سرعت مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را

میزان هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون انجام شد. همچنین بافت بیضه به منظور آسیب‌شناسی بافتی خارج شد.

پنکونازول:

پنکونازول ۲۰٪ (فارمر شارپ، ایران) به صورت پودر تهیه شد. از آب مقطر نیز به عنوان حلال دارو استفاده شد. انتخاب مقدار ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم دوز دارو براساس مطالعات قبلی بود [۱۰].

ویتامین D₃:

ویتامین D₃ (هلت اید، انگلستان) به صورت قرص تهیه شد. از آب مقطر نیز به عنوان حلال دارو استفاده شد. دوزهای ۵۰۰ IU/kg و ۱۰۰۰ براساس مطالعات قبلی به عنوان دوزهای حداقل و حداکثر انتخاب شدند [۲۲].

روش سنجش هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون:

سنجش میزان سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون با استفاده از کیت‌های مناسب (Bioassay Technology Laboratory, China) و دستورالعمل شرکت سازنده به روش الایزا انجام شد.

بررسی آسیب‌شناسی بافت بیضه:

پس از خون‌گیری، با برش در ناحیه پایین شکم، بیضه راست و چپ حیوان خارج و با سرم فیزیولوژی شستشو شد. بافت‌های بیضه برای فیکساسیون در محلول فرمالین به مدت دو ساعت قرار داده شدند و سپس مراحل آب‌گیری تدریجی با اتانول (CarloErba، فرانسه)، شفاف‌سازی با زایلین (Alfazyne، Woerden، هلند) و قالب‌گیری با پارافین (Aisan، چین) انجام شد. در ادامه از قالب‌های آماده شده، برش‌های پشت سر هم ۵ میکرونی توسط دستگاه میکروتوم (Leitz، آلمان) تهیه و با روش هماتوکسیلین-آئوزین (مرک، آلمان) رنگ آمیزی شدند. پس از رنگ آمیزی، لام‌های میکروسکوپی تهیه شدند و با استفاده از میکروسکوپ نوری (Nikon، ژاپن) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ بررسی انجام شد. از نرم افزار Dinaocapture 2 برای مطالعه عکس‌های بافتی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری:

داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزاری آماری SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شدند. از آزمون تحلیل واریانس‌ها و آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شدند. سطح معناداری

افزایش دهد [۱۸]. شواهد نشان می‌دهند که ویتامین D₃ به طور مستقیم در آندروژن بیضه نقش دارد. نشان داده شده است که این ویتامین تولید تستوسترون و بیان mRNA آنزیم‌های دخیل در تولید آندروژن و پیش‌سازهای آن‌ها را افزایش می‌دهد [۲۱-۱۹]. با توجه به نقش مهم آفت‌کش‌ها در حوزه کشاورزی از یک سو و تاثیرات منفی آن‌ها بر سلامتی و باروری در انسان و حیوانات از سوی دیگر؛ مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر پنکونازول و آنتی‌اکسیدانی همچون ویتامین D₃ بر تغییرات فیزیولوژیک و آسیب‌شناسی بافت بیضه در موش‌های صحرایی انجام شد. نظر به اندک بودن تعداد پژوهش‌ها در خصوص تاثیر پنکونازول بر بافت بیضه و همچنین هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون، این مطالعه سعی دارد میزان سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون و همچنین تغییرات آسیب‌شناسی بافت بیضه را بین گروه‌های کنترل و تجربی مورد بررسی قرار دهد.

روش کار:

حیوانات:

در این مطالعه تجربی از ۳۶ موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی 20 ± 220 گرم و سن ۲/۵ تا ۳ ماه استفاده شد. موش‌ها از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون تهیه و در تمام طول مدت پژوهش در قفس‌های پلاستیکی مخصوص نگهداری به ابعاد ۱۵×۲۰×۴۰ سانتی‌متر از جنس پلی‌کربنات نگهداری شدند. در هر قفس تعداد شش موش صحرایی قرار داشت. در تمام مدت بیست و هشت روز مطالعه، موش‌ها طی دوره ۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی، دمای 25 ± 2 سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد قرار داشتند. موش‌ها در طول مطالعه دسترسی آزاد به آب و غذای کافی داشتند.

پروتکل مطالعه:

موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به شش گروه مساوی (n=6) تقسیم شدند. گروه کنترل هیچ‌گونه تیمار دارویی دریافت نکرد. گروه شاهد روزانه ۱ میلی لیتر آب مقطر به عنوان حلال دارو به صورت درون صفاقی، گروه تجربی ۱، ۱۰۰ mg/kg پنکونازول به صورت گاواژ، گروه تجربی ۲، ۱۰۰۰ IU/kg ویتامین D₃ به صورت گاواژ، گروه تجربی ۳، ۱۰۰ mg/kg پنکونازول و ۱۰۰۰ IU/kg ویتامین D₃ و گروه تجربی ۴، ۱۰۰ mg/kg پنکونازول و ۱۰۰۰ IU/kg ویتامین D₃ دریافت کردند. طول دوره مطالعه بیست و هشت روز بود و در پایان حیوانات با اتر (مرک، آلمان) بی‌هوش شدند و خون‌گیری به صورت مستقیم از قلب به منظور تعیین

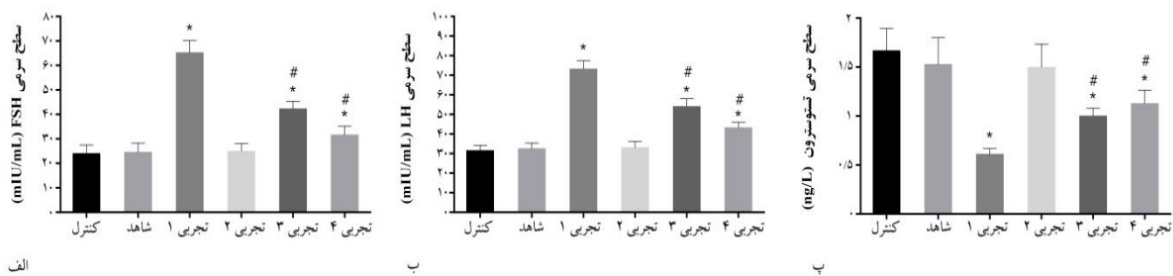
و شاهد داشت ($P < 0.05$). با این حال، میزان سرمی تستوسترون در گروه‌های تجربی ۳ و ۴ افزایش معناداری در مقایسه با گروه تجربی ۱ نشان داد ($P < 0.05$).

یافته‌های آسیب‌شناسی بافتی نشان داد که در گروه‌های کنترل (شکل ۲ الف)، شاهد (شکل ۲ ب) و تجربی ۲ (شکل ۲ ت) بیضه دارای ساختار طبیعی بوده و لوله‌های سمینی فرس به صورت منظم و با تراکم طبیعی قابل مشاهده است. در گروه تجربی ۱ (شکل ۲ پ) ساختار آتروفی لوله‌های منی‌ساز و کاهش ضخامت اپیتلیوم زایا مشاهده شد. همچنین بافت بیضه به مقدار زیادی تخریب شده بود. در گروه تجربی ۳ (شکل ۲ ج) در مقایسه با گروه تجربی ۱، آتروفی کمتری مشاهده شد و ضخامت اپیتلیوم زایا تا حدودی ترمیم شده بود. در گروه تجربی ۴ (شکل ۲ چ) در مقایسه با گروه تجربی ۱، لوله‌های منی‌ساز بهبود یافته بودند و اسپرماتوژنز فعال مشاهده شد.

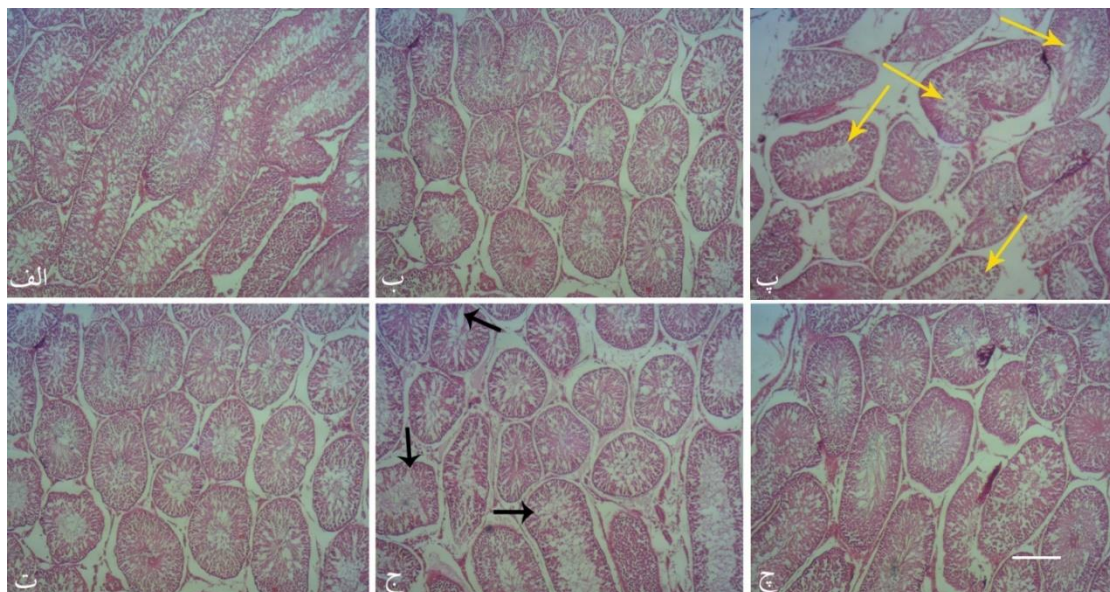
$P < 0.05$ در نظر گرفته شد. از نرم افزار GhraPhPad نسخه ۶ برای رسم نمودارها استفاده شد.

یافته‌ها:

شکل ۱ میانگین و خطای استاندارد میزان سرمی LH، FSH و تستوسترون را نشان می‌دهد. میزان سرمی LH، FSH و تستوسترون در گروه‌های تجربی ۲، اختلاف معناداری با گروه‌های کنترل و شاهد نشان نداد ($P > 0.05$). میزان سرمی LH و FSH (شکل ۱ الف و ب) در گروه‌های تجربی ۱، ۳ و ۴ افزایش معناداری در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد نشان داشت ($P < 0.05$). با این حال، میزان سرمی LH و FSH در گروه‌های تجربی ۳ و ۴ کاهش معناداری در مقایسه با گروه تجربی ۱ داشتند ($P < 0.05$). میزان سرمی تستوسترون (شکل ۱ پ) در گروه‌های تجربی ۱، ۳ و ۴ کاهش معناداری در مقایسه با گروه‌های کنترل



شکل ۱: میانگین و خطای استاندارد میزان سرمی FSH (الف)، LH (ب) و تستوسترون (پ) در گروه‌های مختلف. * در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد ($P < 0.05$), # در مقایسه با گروه تجربی ۱ ($P < 0.05$).



شکل ۲: ساختار بافت بیضه در گروه‌های مختلف. در گروه‌های کنترل (الف) و شاهد (ب) بافت بیضه و اسپرماتوژنز طبیعی است. در گروه تجربی ۱ (پ)، آتروفی و کاهش ضخامت اپیتلیوم زایا مشاهده گردید (فلش‌های زرد). بافت بیضه تخریب شده و اسپرماتوژنز کاهش یافته است. در گروه تجربی ۲ (ت)، بافت بیضه و اسپرماتوژنز طبیعی است. در گروه تجربی ۳ (ج)، آتروفی اندکی مشاهده می‌شود و ضخامت اپیتلیوم زایا تا حدودی بهبود یافته است (فلش‌های سیاه). در گروه تجربی ۴ (چ)، بافت بیضه تا حدود زیادی بهبود یافته است و اسپرماتوژنز طبیعی است. نوار سفید: ۵۰ میکرومتر.

بحث:

تجویز پنکونازول به موش‌های صحرایی نر باعث اختلال در هورمون‌های محور هیپوفیز-بیضه و همچنین آسیب بافت بیضه شد. آفت‌کش‌ها که به دلیل استفاده وسیع، حضور گسترده ای در محیط زیست دارند، از جمله مواد شیمیایی هستند که موجب اختلال در غدد درون‌ریز می‌شوند [۲۳]. شواهد نشان داده که پنکونازول می‌تواند موجب سمیت تولید مثلی شود. پنکونازول با تأثیر بر پارامترهای اسپرم و هورمون‌های جنسی می‌تواند سمیت تولید مثلی را القا کند [۲۴] که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. مشخص شده است که اختلال در تولید اسپرم و افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم نشانگرهای مهم آسیب ژنتیکی در پستانداران در معرض آفت‌کش‌ها هستند [۲۵]. همچنین، غلظت‌های فیزیولوژیک FSH، LH و تستوسترون نقش مهمی در اسپرماتوزن داشته و هرگونه اختلال در این هموستاز، تعداد و عملکرد سلول‌های سوماتیک و زایای بیضه‌ها را کاهش می‌دهد [۲۶]. به نظر می‌رسد پنکونازول می‌تواند سنتز و یا آزادسازی گنادوتروپین‌ها را مسدود کند. همچنین پنکونازول با اتصال به گیرنده FSH روی سلول‌های سرتولی از تولید و آزادسازی پروتئین اتصال‌دهنده آندروژن جلوگیری می‌کند یا بازخورد منفی را در محور هیپوفیز-گنادال القا می‌کند که متعاقباً موجب کاهش مقدار سرمی LH و FSH و در نتیجه اختلال در فرآیند اسپرماتوزن می‌شود [۲۴]. مطالعات در زمینه تأثیر قارچ‌کش پنکونازول روی بافت بیضه موش صحرایی نشان می‌دهد که تجویز طولانی مدت پنکونازول با دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث اختلالات ساختاری و عملکردی بیضه می‌شود. تغییرات تخریبی و مرگ برنامه ریزی شده سلول‌های اسپرماتوگونی از شاخصه‌های مهم تأثیر پنکونازول بر بافت بیضه است. کاهش مقدار تستوسترون ناشی از پنکونازول می‌تواند از طریق مهار فعالیت آنزیم‌های متعدد در مسیر بیوسنتزی تستوسترون القا شود [۱۰]. مهار آنزیم‌های سیتوکروم P450 در این مسیرها می‌تواند با کاهش استروئیدزایی همراه باشد که منجر به تغییر در محیط بیوشیمیایی دستگاه تناسلی حیوان نر می‌شود [۲۷]. نتایج این مطالعات با نتایج مطالعه حاضر همسو است. سازوکاری که در آن پنکونازول باعث سمیت سلولی می‌شود القای استرس اکسیداتیو است. تجویز پنکونازول به موش‌های صحرایی باعث افزایش ROS و کاهش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در بافت‌های مختلف می‌شود. تولید بیش از حد ROS می‌تواند به مولکول‌های حیاتی همچون پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک آسیب رسانیده و منجر به مهار چرخه سلولی و مرگ برنامه ریزی شده سلول شود [۱۲، ۲۸].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز ویتامین D₃ موجب بهبود هورمون‌های محور هیپوفیز-بیضه و ترمیم بافت بیضه در

موش‌های صحرایی نر تیمار شده با پنکونازول می‌شود. به خوبی نشان داده شده است که آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان پاک‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد می‌توانند از راه بهبود پارامترهای اسپرم، موجب افزایش باروری شوند [۲۴، ۲۹]. اخیراً مطالعات زیادی انجام شده است که نشان می‌دهند ویتامین D₃ علاوه بر تنظیم هموستازی کلسیم و معدنی شدن استخوان در سیستم تولید مثل مردان نیز نقش به‌سزایی ایفا می‌کند. یافته‌ها نشان می‌دهند که این ویتامین از طریق اتصال به VDR و فعال سازی آن می‌تواند تأثیرات بیولوژیکی مثبت وسیعی بر سلامت دستگاه تولید مثل داشته باشد. میزان Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2) درون سلولی با ROS تجمع یافته در میتوکندری و همچنین تشدید استرس اکسیداتیو همبستگی معکوس دارد. بنا بر این، Nrf2 نقش کلیدی در محافظت از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند. این نقش می‌تواند توسط ویتامین D₃ تعدیل شود [۱۸، ۳۰]. علاوه بر این، ویتامین D₃ با حفظ عملکرد طبیعی میتوکندری از اکسیداسیون سلولی و کنترل ردوکس پشتیبانی می‌کند. اختلال در کنترل ردوکس چرخه سلولی ممکن است منجر به تکثیر نابجای سلولی، مرگ سلولی، توسعه بیماری‌های عصبی و تسریع پیری شود. کلسیتریول دارای اثرات مفید فراگیر در تنظیم بیان برخی آنتی‌اکسیدان‌ها و سایتوکین‌های آنتی‌التهابی است و در نتیجه از بافت‌ها در برابر سموم، ناهنجاری‌های مرتبط با کمبود ریزمغذی‌ها و آسیب‌های ناشی از میکروب‌های درون‌سلولی و انگل‌ها محافظت می‌کند [۳۱، ۳۲]. ویتامین D₃ میزان ROS را از طریق اثرات آنتی‌التهابی و بیان آنتی‌اکسیدان‌های مبتنی بر میتوکندری از راه مسیرهای سیگنال دهی سلولی تنظیم می‌کند [۳۳، ۳۴].

تأثیر این ویتامین روی باروری مردان به پیامدهای عملکرد بیضه بستگی دارد. هورمون‌های اصلی تولید شده توسط بیضه عبارتند از تستوسترون، استرادیول، هورمون آنتی‌مولرین، اینهیبین B و پپتید شبه انسولینی ۳. به طور گسترده نشان داده شده است که عملکرد پاراکرین و اتوکرین هورمون‌های داخل بیضه‌ای نقش کلیدی در تنظیم اسپرماتوزن دارند [۳۵]. همچنین شواهد نشان می‌دهند که ویتامین D₃ به طور مستقیم در آندروژن بیضه نقش دارد. نشان داده شده است که ویتامین D₃ تولید تستوسترون و بیان mRNA آنزیم‌های دخیل در تولید آندروژن و پیش سازهای آن‌ها را افزایش می‌دهد [۱۹]. گزارش شده است که تجویز همزمان ویتامین D₃ با سرب در موش‌های صحرایی به طور قابل توجهی آسیب‌های کلیوی و بیضه را کاهش می‌دهد که ممکن است به دلیل ترمیم بیان مولکول‌های مرتبط با این ویتامین، ارتقاء نشانگرهای آنتی‌اکسیداتیو و ضد التهابی باشد. بنا بر این، به

استرس اکسیداتیو را روشن کند [۳۸]. از محدودیت های این مطالعه می‌توان به دوره کوتاه مطالعه، عدم اندازه‌گیری عوامل التهابی و میزان مرگ برنامه ریزی شده سلول در بافت بیضه اشاره کرد. از این رو پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی موارد فوق مد نظر قرار گیرد.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز پنکونازول با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش‌های صحرایی نر بالغ به مدت بیست و هشت روز موجب اختلال در هورمون‌های محور هیپوفیز - بیضه و همچنین آسیب بافت بیضه می‌شود. از سوی دیگر، تجویز ویتامین D₃ موجب بهبود مقادیر هورمون‌های محور هیپوفیز - بیضه و همچنین بهبود بافت بیضه می‌شود. بنا براین، پیشنهاد می‌شود از ویتامین D₃ به عنوان یک مکمل با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی برای افرادی که در برابر آفت‌کش‌هایی همچون پنکونازول قرار می‌گیرند با رعایت مقدار ویتامین D₃ افراد، استفاده شود.

تشکر و قدردانی:

در این مطالعه قوانین و مقررات کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون با کد اخلاق IR.IAU.KAU.REC.1402.055 رعایت شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری تمام افراد دخیل در انجام مطالعه تشکر و قدردانی نمایند.

تضاد منافع:

نویسندگان اعلام می‌دارند که تضاد منافی ندارند.

نظر می‌رسد اثرات محافظتی بالقوه ویتامین D₃ در برابر آسیب‌های کلیوی و بیضه ناشی از سرب از راه سازوکارهای آنتی‌التهابی و آنتی‌اکسیداتیو اعمال می‌شود [۳۶]. سازوکارهای متعددی در خصوص چگونگی اعمال اثرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین D₃ پیشنهاد شده است [۳۷]. به نظر می‌رسد که این ویتامین به دلیل شباهت ساختاری به کلسترول و ارگوسترول می‌تواند به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی غشایی عمل کرده و پراکسیداسیون لیپوزومی وابسته به آهن را مهار کند [۳۷، ۳۸]. این ویتامین همچنین می‌تواند پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داده و فعالیت سوپراکساید دیسموتاز را در موش‌ها بهبود بخشد. شواهد نشان می‌دهند که ویتامین D₃، توانایی کاهش استرس اکسیداتیو را از راه تنظیم مثبت گلوکاتایون سلولی و سوپراکساید دیسموتاز دارد. سوپراکساید دیسموتاز خط اولیه دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی با وجود استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط رادیکال‌های سوپراکساید است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یک دفاع اصلی سلولی در برابر حمله رادیکال‌های آزاد هستند که از غشاء و اجزای سیتوزولی در برابر آسیب ناشی از ROS محافظت می‌کنند. سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز برخی از مهمترین آن‌ها هستند [۳۸]. علاوه بر این، مطالعات حیوانی نشان داده که ویتامین D₃ اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به ویتامین E و ملانین دارد [۳۷]. همچنین مشخص شده‌است که ویتامین D₃ و شکل فعال آن می‌توانند با مهار بیان عامل رونویسی پیش‌التهابی عامل هسته‌ای کاپا (NF-κB) فعالیت آنتی‌التهابی قوی داشته باشد. NF-κB یک تنظیم کننده حیاتی واکنش‌های ایمنی، التهابی و استرس است. بنابراین، به نظر می‌رسد که ویتامین D₃ به نوبه خود می‌تواند تولید سایتوکاین‌های التهابی و رادیکال‌های آزاد را با غیرفعال کردن مسیرهای وابسته به NF-κB کاهش دهد که ممکن است اثرات مطلوب آن بر

References:

1. La HM, Hobbs RM. Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76(20): 4071-4102.
2. Babakhanzadeh E, Nazari M, Ghasemifar S, Khodadadian A. Some of the Factors Involved in Male Infertility: A Prospective Review. *Int J Gen Med*. 2020; 13: 29-41.
3. Krzastek SC, Farhi J, Gray M, Smith RP. Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential. *Transl Androl Urol*. 2020; 9(6): 2797-2813.
4. Malmir M, Soleimani Mehranjani M, Naderi Noreini S, Faraji T. Protective antioxidant effects of N-acetylcysteine against impairment of spermatogenesis caused by Paranonylphenol. *Andrologia*. 2018; 50(10): e13114.
5. Perdichizzi S, Mascolo MG, Silingardi P, Morandi E, Rotondo F, Guerrini A, et al. Cancer-related genes transcriptionally induced by the fungicide Penconazole. *Toxicol In Vitro*. 2014; 28(1): 125-30.
6. Roelofs MJE, Temming AR, Piersma AH, van den Berg M, van Duursen MBM. Conazole fungicides inhibit Leydig cell testosterone secretion and androgen receptor activation in vitro. *Toxicol Rep*. 2014; 1:271-283.
7. Zarn JA, Bruscheweiler BJ, Schlatter JR. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environ Health Perspect*. 2003; 111: 255-261.

8. Husak VV, Mosiichuk NM, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. Acute exposure to the Penconazole-containing fungicide ToPas Partially augments antioxidant Potential in goldfish tissues. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2017; 193: 1-8.
9. Meng Z, Liu L, Xi Y, Jia M, Yan S, Tian S, et al. Different effects of exposure to Penconazole and its enantiomers on hepatic glycolipid metabolism of male mice. *Environ Pollut*. 2020; 257: 113555.
10. El-Sharkawy EE, El-Nisr NA. Testicular dysfunction induced by Penconazole fungicide on male albino rats. *Comp Clin Pathol*. 2013; 22: 475e480.
11. Chaâbane M, Koubaa M, Soudani N, Elwej A, Grati M, Jamoussi K, et al. The Protective Potential of *Nitraria retusa* on Penconazole-induced hepatic injury in adult rats. *Toxicol Environ Chem*. 2015; 97: 1253-1264.
12. Chaâbane M, Elwej A, Ghorbel I, Chelly S, Mnif H, Boudawara T, et al. Penconazole alters redox status, cholinergic function and lung's histoarchitecture of adult rats: Reversal effect of vitamin E. *Biomed Pharmacother*. 2018; 102: 645-652.
13. Nesnow S, Grindstaff RD, Lambert G, Padgett WT, Bruno M, Ge Y, et al. Propiconazole increases reactive oxygen species levels in mouse hepatic cells in culture and in mouse liver by a cytochrome P450 enzyme mediated process. *Chem Biol Interact*. 2011; 194: 79-89.
14. Timar A, Saberi-Karimian M, Ghazizadeh H, Reza Parizadeh SM, Sabbaghzadeh R, Emadzadeh M, et al. Evaluation of the serum prooxidant-antioxidant balance before and after vitamin D supplementation in adolescent Iranian girls. *Adv Med Sci*. 2019; 64: 174-80.
15. Wimalawansa SJ. Vitamin D Deficiency: Effects on Oxidative Stress, Epigenetics, Gene Regulation, and Aging. *Biology (Basel)*. 2019; 8(2): 30.
16. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007; 357:266-281.
17. Umar M, Sastry KS, Chouchane AI. Role of vitamin D beyond the skeletal function: a review of the molecular and clinical studies. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(6): 1618.
18. Berridge MJ. Vitamin D deficiency: Infertility and neurodevelopmental diseases (attention deficit hyperactivity disorder, autism, and schizophrenia). *Am J Physiol Cell Physiol*. 2018; 314: C135-C151.
19. Hofer D, Münzker J, Schwetz V, Ulbing M, Hutz K, Stiegler P, et al. Testicular synthesis and vitamin D action. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99(10): 3766-73.
20. Costanzo PR, Knoblovits P. Vitamin D and male reproductive system. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2016; 28: 151-9.
21. de Angelis C, Galdiero M, Pivonello C, et al. The role of Vitamin D in male fertility: a focus on the testis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017; 18: 285-305.
22. Nourozi A, Shariati M. Protective effect of vitamin D on spermatogenesis and testicular tissue changes in adult rats treated with thioacetamide. *AUMJ*. 2020; 9(2): 107-122. [Persian]
23. Haraux E, Braun K, Buisson P, Stéphan-Blanchard E, Devauchelle C, et al. Maternal exposure to domestic hair cosmetics and occupational endocrine disruptors is associated with a higher risk of hypospadias in the offspring. *Int J Environ Res Public Health*. 2017; 14: 27.
24. Ibrahim HB, Azza AA, Afaf AE, Rania AM, Mahmoud MS. Ameliorative effects of sesame seed oil against Penconazole-induced testicular toxicity and endocrine disruption in male rats. *Biomed J Sci & Tech Res*. 2019; 14(1): 10365-10375.
25. Uzunhisarikli M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ogutcu A, et al. Acute, subacute and subchronic administration of methyl Parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pesticide Biochem Physiol*. 2007; 87(2): 115-122.
26. Selim ME, Aleisa NA, Daghestani MH. Evaluation of the possible protective role of quercetin on letrozole-induced testicular injury in male albino rats. *Ultrastruct Pathol*. 2013; 37(3): 204-217.
27. Makame T, Hokanson R, Chowdhary R, Busbea D. Altered gene expression in human cells induced by the agricultural chemical enable. *Toxicol Ind Health*. 2004; 20(6-10): 89-102.
28. Yahia D, Ali MF. Cytogenetic and genotoxic effects of Penconazole and chlorpyrifos pesticides in bone marrow of rats. *J Adv Vet Res*. 2019; 9(2): 29-38.
29. Amini Mahabadi J, Khodayari M, Hassani Bafrani H, Nikzad H, Taherian A. Effect of diet contains sesame seed on epididymal histology of adult rat. *Int J Morphol*. 2013; 31(1): 264-270.
30. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2014; 39(4): 199-218.
31. George N, Kumar TP, Antony S, Jayanarayanan S, Paulose CS. Effect of vitamin D₃ in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Nutr*. 2012; 108: 1410-1418.
32. Wei R, Christakos S. Mechanisms underlying the regulation of innate and adaptive immunity by Vitamin D. *Nutrients*. 2015; 7: 8251-8260.
33. Berridge MJ. Vitamin D cell signalling in health and disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 460: 53-71.
34. Shelton RC, Claiborne J, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Reddy R, Aschner M, Lewis DA, et al. Altered expression of genes involved in inflammation and

- aPoTosis in frontal cortex in major dePression. *Mol Psychiatry*. 2011; 16: 751-762.
35. Liu Y, He Y, Wang Q, Guo F, Huang F, Ji L, et al. Vitamin D₃ 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): 261-271.
36. 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: 4853.
37. Eftekhari MH, Akbarzadeh M, Dabbaghmanesh MH, Hassanzadeh J. The effect of calcitriol on liPid Profile and oxidative stress in hyPerliPidemic Patients with tyPe 2 diabetes mellitus. *ARYA Atheroscler*. 2014; 10(2): 82-8.
38. SePidarkish M, Farsi F, Akbari-Fakhrabadi M, Namazi N, Almasi-Hashiani A, Maleki Hagiagha A, et al. The effect of vitamin D suPPLEMENTation on oxidative stress Parameters: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Pharmacol Res*. 2019; 139: 141-152.

Investigating the Protective effects of vitamin D₃ on the Physiological and histoPathological changes of the testis in adult rats treated with Penconazole

Azam Nowrozi¹, Habibolla Johari^{2*}, Mehrdad Shariati³

Received: 2023.10.19

Revised: 2023.11.11

Accepted: 2023.12.13

1. Ph.D student, DePartment of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
2. Assistant Professor, DePartment of Biology, Darab Branch, Islamic Azad University, Darab, Iran
3. Associate Professor, DePartment of Biology, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.3, Fall 2023

Pars J Med Sci 2023;21(3):21-29

Abstract:

Introduction: Systemic triazole fungicides such as Penconazole have negative effects on different body tissues. In the Present study, the Protective effects of vitamin D₃ on tissue changes and Pituitary-testicular axis in adult rats treated with Penconazole were investigated.

Materials and Methods: In this exPerimental study, male Wistar rats were divided into 6 grouPs of 6 including: control, sham (1 ml of distilled water), exPerimental 1 (Penconazole 100 mg/kg), exPerimental 2 (vitamin IU/kg 1000 D₃), exPerimental 3 (100 mg/kg Penconazole + 500 IU/kg vitamin D₃) and exPerimental 4 (100 mg/kg Penconazole + 1000 IU/kg vitamin D₃). At the end of day 28, serum levels of LH, FSH and testosterone hormones were measured by ELISA method and the testicular tissue was removed for histoPathological examination.

Results: The serum levels of LH and FSH in exPerimental grouP 1 showed a significant increase comPared to the control and sham grouPs (P< 0.05), but the testosterone serum level decreased (P<0.05). The serum levels of LH and FSH in exPerimental grouPs 3 and 4 showed a significant decrease comPared to exPerimental grouP 1 (P< 0.05), but testosterone serum levels increased (P<0.05). HistoPathological examination showed that in exPerimental grouP 1, the testicular tissue was destroyed; however, in exPerimental grouPs 3 and 4, the testicular tissue was recovered.

Conclusion: Based on the results of this study, vitamin D₃ can imProve testicular damage caused by Penconazole in rats.

Keywords: Vitamin D₃, Rat, Testosterone, GonadotroPin, Penconazole

* Corresponding author Email: hjowhary@yahoo.co.uk