مقاله پژوهشی

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال بیست و هفتم/شماره ۹۷/شهریور ۱۳۸۸

بررسی اثرات تک دوز مت‌آمفتامین بر روی تکثیر و آپوپتوزیس سلول‌های اجدادی اسپرم در موش صحرایی بالغ

دکتر محمد محسن تقوی*، دکتر سید عادل معلم**، دکتر سید حسن علوی***

* آناتومیست، استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، کرمان، رفسنجان، ایران.

** متخصص سم شناسی، دانشیار، گروه فارماکودینامیک و سم شناسی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

*** آناتومیست، استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۴

تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۳۰

چکیده

مقدمه: مت‌آمفتامین یک داروی محرک سیستم عصبی مرکزی می‌باشد که به طور فزآینده‌ای توسط جوانان و نوجوانان مورد سوء استفاده قرار می‌گیرد. اثرات مت‌آمفتامین بر روی سیستم تولید مثل جنس نر ناشناخته می‌باشد. در این مطالعه‌ی تجربی، ما اثرات یک‌بار تزریق سه دوز مختلف این دارو را بر تکثیر و آپوپتوزیس سلول‌های اجدادی اسپرم موش صحرایی بالغ ارزیابی نمودیم.

روش ها: چهار گروه موش صحرایی بالغ به صورت داخل صفاقی تحت تزریق سه دوز مختلف مت‌آمفتامین (۱۵، ۵ و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یا سالین قرار گرفتند. مقاطع مربوط به بیضه‌ی راست و چپ به ترتیب جهت مطالعه‌ی آپوپتوزیس و تکثیر سلولی با استفاده از روش‌های ایمونوهیستوشیمی رنگ‌آمیزی شد. برای سلول‌های در حال تکثیر و آپوپتوتیک ایندکس‌هایی محاسبه گردید.

یافته ها: تکثیر سلولی در گروه آزمایش با بالاترین دوز کاهش معنی‌داری داشت. همین کاهش را در رابطه با نسبت تکثیر به آپوپتوزیس در دو گروه با دوز بالا مشاهده نمودیم، اما وقوع آپوپتوزیس در این دو گروه افزایش یافت. در گروه شاهد بیش از ۹۵٪ اسپرماتوگونی‌ها در حال تکثیر بودند، اما مت‌آمفتامین با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش اسپرماتوگونی‌های در حال تکثیر تا حدود ۸۵٪ گردید. برعکس در بعضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه با دوز بالا تعداد سلول آپوپتوتیک حداقل دو برابر شد. این اختلاف معنی‌دار بین گروه با دوز پایین و گروه‌های با دوز بالاتر نشان دهنده‌ی اثرات تا حدودی وابسته به دوز این دارو می‌باشد.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که حتی مصرف یک‌بار مت‌آمفتامین به ویژه با دوز بالا، می‌تواند باعث تغییر در نسبت تکثیر به آپوپتوزیس در بیضه گردد. بنابراین فرآیند طبیعی اسپرم‌سازی مختل شده، این مسأله می‌تواند منجر به مشکلاتی در باروری مردان شود.

واژگان کلیدی: مت‌آمفتامین، تکثیر سلولی، آپوپتوزیس، سلول‌های اجدادی اسپرم، موش صحرایی

تعداد صفحات: ۱۱

تعداد جدول‌ها: ۱

تعداد نمودارها: ۱

تعداد منابع: ۲۰

آدرس نویسندهٔ مسئول: دکتر محمد محسن تقوی، استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، کرمان، رفسنجان، ایران.

E-mail: taghavi164@yahoo.com

www.mui.ac.ir

مقدمه

مت‌آمفتامین دارویی محرک سیستم عصبی مرکزی است، اما سوء استفاده از مت‌آمفتامین به عنوان یکی از ترکیبات موجود در قرص‌های روان‌گردان در جامعه به‌خصوص در بین جوانان و نوجوانان یعنی گروهی که در سن تولید مثل می‌باشند رو به افزایش بوده، به صورت یک معضل اجتماعی درآمده است (۲-۱).

اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز شامل سلول‌های سرتولی و اجدادی (germ cells) اسپرم می‌باشد. سلول‌های اجدادی اسپرم خود شامل اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت ثانویه و اسپرماتید است. اسپرماتوگونی‌ها، با فعالیت میتوزی شدید تکثیر یافته، سپس وارد تقسیم میوز می‌گردند و در نهایت اسپرم‌ها را تولید می‌نمایند. در هنگام تقسیم سلولی آنتی‌ژنی به نام آنتی‌ژن تکثیر هسته‌ای سلول (PCNA یا proliferating cell nuclear antigen) در هسته‌ی سلول بیان می‌گردد. این آنتی‌ژن یک پروتئین ۳۵ کیلو دالتونی است که بخشی از DNA polymerase δ را تشکیل می‌دهد. این آنزیم در تنظیم سیکل سلولی نقش دارد. سلول‌هایی که در حال تقسیم میتوز بوده، دارای PCNA می‌باشند، از طریق روش ایمنوهیستوشیمی به همین نام قابل رؤیت هستند. در بیضه علاوه بر اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت‌های اولیه نیز این آنتی‌ژن را دارند (۳).

در هنگام آپوپتوزیس ژنوم سلولی به تعدادی قطعات دو رشته‌ای DNA با وزن ملکولی پایین (مونو و اولیگونوکلئوزوم‌ها) می‌شکند. این قطعات دارای انتهای 3′-OH هستند که می‌توان آن‌ها را با نوکلئوتیدهای نشان‌دار از طریق یک واکنش آنزیمی به نام TUNEL (TdT-mediated X-dUTP nick end labeling) نمایان ساخت. حتی در یک بیضه‌ی سالم تعدادی سلول آپوپتوتیک دیده می‌شود (۴).

در رابطه با اثرات مضر این دارو بر روی دستگاه‌های مختلف فرد بالغ مطالعات زیادی صورت گرفته است (۵). مطالعات چندی نیز در رابطه با تراتوژنیک بودن و اثر سمی این دارو بر جنین وجود دارد. Inoue و همکاران به بررسی تکامل قلب جنین‌های موش صحرایی که مادران آن‌ها در دوران بارداری مت‌آمفتامین دریافت کرده بودند، پرداختند. نتایج نشان داد که دارو باعث آسیب به سلول‌های عضلانی قلب جنین و تکامل غیرنرمال آن می‌گردد (۶). Smith و همکاران در یک مطالعه‌ی گذشته‌نگر محدودیت پارامترهای رشد نوزادانی که مادران آن‌ها در طول بارداری دارو مصرف کرده‌اند را نشان دادند (۷).

اگرچه اثر القایی آپوپتوزیس مت‌آمفتامین در لوله‌های اسپرم‌ساز در مطالعه‌ی Yamamoto و همکاران به اثبات رسیده است (۸)، اما تأثیر این دارو بر روی تکثیر سلول‌های لوله‌های اسپرم‌ساز و نسبت بین سلول‌های در حال تکثیر به سلول‌های آپوپتوتیک (هموستاز سلولی) مطالعه نشده است. در مطالعات مشابه به طور معمول این دو نوع سلول (آپوپتوتیک و در حال تکثیر) با هم مورد ارزیابی قرار می‌گیرند و چه بسا نتایج متفاوتی به دست آید. برای مثال، می‌توان به کار Carmen و همکاران اشاره کرد. آن‌ها در مطالعه‌ی خود اثبات کردند که نهان بیضه‌ای باعث بر هم خوردن نسبت سلول‌های در حال تکثیر به سلول‌های آپوپتوتیک می‌گردد، در حالی‌که در مطالعات قبلی بیان شده بود که سلول‌های آپوپتوتیک در این عارضه چندان تغییری نمی‌یابند (۹). بنابراین از یک طرف با توجه به فرهنگ حاکم در جامعه‌ی ما که جوانان پسر آزادی اجتماعی بیشتری داشته، در نتیجه احتمال سوء استفاده از این

www.mui.ac.ir

دارو در بین آن‌ها بیشتر است و از طرف دیگر این عقیده در بین مصرف‌کنندگان این قبیل داروها وجود دارد که مصرف تفننی این داروها هیچ‌گونه عوارضی ندارد و تولیدکنندگان و پخش‌کنندگان، برای اغفال جوانان از چنین حربه‌هایی استفاده می‌کنند؛ لذا در این مطالعه بر آن شدیم که اثر این دارو بر روی تکثیر و مرگ سلول‌های لوله‌های اسپرم‌ساز و نسبت آن دو بعد از یک‌بار تزریق سه دوز مختلف دارو را بررسی کنیم.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی، تعداد ۲۸ موش صحرایی بالغ نژاد wistar، ۸-۷ هفته‌ای با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم، از حیوان خانه‌ی پژوهشکده‌ی بوعلی مشهد انتخاب شدند. حیوانات در طول مطالعه، دسترسی کافی به آب و غذا داشتند و سیکل نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی برای آن‌ها تأمین گردید.

آماده‌سازی محلول مت‌آمفتامین: مت‌آمفتامین هیدروکلرید خالص با روش یددار کردن نورافیدرین هیدروکلرید و احیای به مت‌آمفتامین در گروه شیمی دارویی دانشکده‌ی داروسازی مشهد تهیه گردید (۱۰). دارو در غلظت‌های مورد نظر با نرمال سالین رقیق شد.

حیوانات به صورت تصادفی به چهار گروه ۷ تایی تقسیم شدند. سه گروه دوزهای ۱۵ و ۵ ، ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم مت‌آمفتامین و گروه چهارم به عنوان گروه شاهد، سالین دریافت کردند (۸). مت‌آمفتامین با سالین به صورت داخل صفاقی تزریق گردید و ۲۴ ساعت بعد از تزریق، حیوانات با تیوپنتان (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. قفسه‌ی سینه‌ی آن‌ها با برش جراحی باز شد. با توجه به کوچک بودن شریان بیضه‌ای و احتمال مسدود شدن آن در هنگام عمل پرفیوژن، قبل از تزریق محلول فیکساتیو از یک محلول شستشو استفاده شد. این محلول شامل ۹ گرم نمک طعام، ۲۵ گرم polyvinylpyrrolidone(PVP M.W.40000)، ۰/۲۵ گرم هپارین و ۵ گرم procain-HCL در یک لیتر آب مقطر بود (۱۱). پرفیوژن هر دو محلول شستشو و فیکساتیو با استفاده از یک scale vein متصل به سرنگ ۵۰ سی‌سی از طریق بطن چپ و سوراخ کردن دهلیز راست صورت گرفت. سپس به سرعت بیضه‌ها خارج و با ایجاد ۵ سوراخ در تونیکا آلبوژینای دو قطب بیضه جهت نفوذ فیکساتیو، بیضه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول فیکساتیو فیکس شد. برای خارج نمودن اسید پیکریک، بافت‌ها برای ۴۸ ساعت در الکل ۷۰٪ نگهداری و روزی سه بار الکل تعویض شد. سپس به منظور خنثی نمودن اسید پیکریک باقی مانده، بافت‌ها به محلول اشباع شده‌ی الکل اتیلیک ۷۰٪ و لیتیوم‌کربنات منتقل گردید و این محلول چندین‌بار تعویض شد تا تقریباً به طور کامل رنگ زرد اسید پیکریک از بین رفت (۱۲). مراحل مختلف آب‌گیری، شفاف‌سازی، آغشتگی به پارافین و قالب‌گیری مطابق با پروتوکل استاندارد انجام شد و برش‌های ۴ و ۷ میکرونی به ترتیب برای روش رنگ‌آمیزی PCNA و TUNEL تهیه و از لام‌های کد شده با poly-L-lysine استفاده شد.

رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی با کیت PCNA: کیت PCNA از شرکت Zymed آلمان خریداری شد و بر اساس پروتوکل کیت، رنگ‌آمیزی مقاطع صورت گرفت. به طور خلاصه مراحل رنگ‌آمیزی به ترتیب زیر انجام شد. در ابتدا مراحل آماده‌سازی مقاطع جهت رنگ‌آمیزی، شامل پارافین زدایی، آب‌گیری و خنثی نمودن اندوژن پراکسیدازها صورت گرفت. در مرحله‌ی دوم از محلول‌های مختلف موجود در کیت شامل

www.mui.ac.ir

محلول بلوک‌کننده، آنتی‌بادی اولیه‌ی موشی بیوتینه شده‌ی ضد PCNA، استرپتاویدین پراکسیداز، کروموژن DAB و هماتوکسیلین استفاده شد. در آخر بعد از آب‌گیری و شفاف‌سازی با استفاده از چسب Histomount بر روی مقاطع لامل چسبانده شد. همراه با لام‌های مورد آزمایش چند لام شاهد مثبت موجود در خود کیت رنگ‌آمیزی گردید و با حذف آنتی‌بادی چند لام شاهد منفی نیز رنگ‌آمیزی شد.

رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی با کیت TUNEL:

کیت TUNEL از شرکت Roche آلمان خریداری شد و با توجه به پروتوکل مربوط، رنگ‌آمیزی نمونه‌ها طی مراحل زیر انجام گردید.

در ابتدا مراحل آماده‌سازی مقاطع جهت رنگ‌آمیزی شامل پارافین‌زدایی، آب‌گیری و خنثی نمودن اندوژن پراکسیدازها صورت گرفت. در مرحله‌ی بعد نفوذپذیری بافت‌ها با استفاده از proteinase K افزایش داده شد و سپس از محلول‌های موجود در کیت شامل آنزیم ترمینال دی‌اکسی‌نوکلئوتیدیل ترانس‌فراز، نوکلئوتیدها، محلول Converter-AP (شامل آنتی‌بادی ضد فلوئوروسین کونژوگه شده با آلکالین فسفاتاز) استفاده شد. جهت نمایان شدن محل سلول‌های آپوپتوتیک از محلول سوبسترا (DAB) استفاده و در آخر مقاطع با هماتوکسیلین counterstain شد.

چند لام با DNase I در درجه حرارت اتاق به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید و از آن‌ها به عنوان لام‌های شاهد مثبت استفاده شد. به همین ترتیب لام‌های شاهد منفی با حذف ترمینال ترانس‌فراز رنگ شدند.

نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از میکروسکوپ تحقیقاتی Olympus مدل BX51 و نرم‌افزار کامپیوتری life science مورد مطالعه قرار گرفت؛ به منظور تبدیل داده‌های کیفی به نیمه کمی تعداد ۵۰ لوله‌ی اسپرم‌ساز در هر حیوان به طور تصادفی انتخاب شد و با استفاده از معادله‌ی زیر ایندکس‌هایی به ترتیب برای تعداد سلول‌های در حال تکثیر یا مرگ و نسبت این دو ایندکس به دست آمد:

$$PI = (n^{o}tub+\times n^{o}cell+\times 100)/(n^{o}total\times d)$$

در این معادله PI ایندکس تکثیر سلولی، n tub + درصد لوله‌ها با سلول‌های در حال تکثیر، n cell تعداد سلول‌های درحال تکثیر در هر لوله، n total تعداد کل لوله‌ها و d قطر لوله‌ها می‌باشد. معادله‌ی فوق برای محاسبه‌ی ایندکس مرگ سلولی (AI) نیز استفاده شد. با این تفاوت که این‌بار تعداد سلول‌ها و لوله‌های آپوپتوتیک شمارش و محاسبه گردید. سومین ایندکس محاسبه شده، نسبت ایندکس AI/PI بود (۹).

تجزیه و تحلیل آماری:

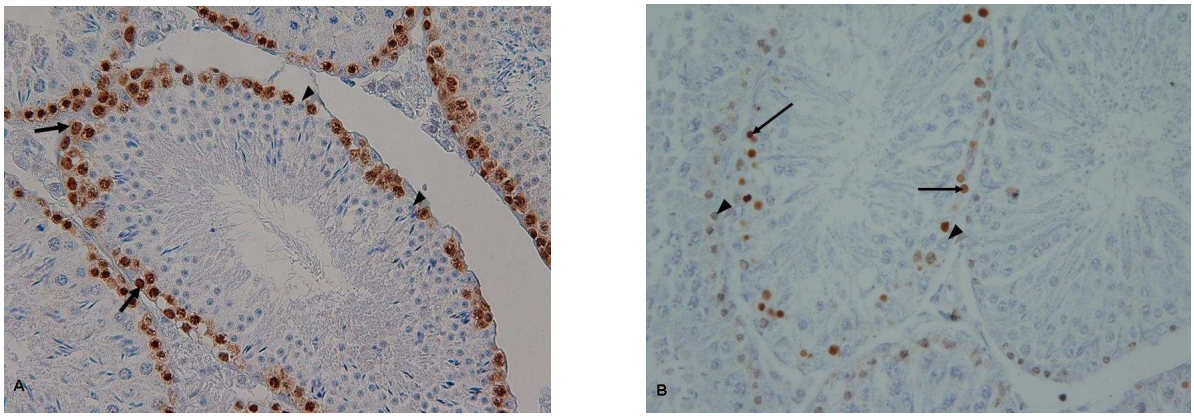
به منظور بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف بین داده‌ها آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و به دنبال آن، آزمون Tukey-Kramer انجام شد. نتایجی که دارای ارزش P کوچک‌تر یا مساوی ۰/۰۵ بود، به عنوان نتایج معنی‌دار در نظر گرفته شدند. کلیه‌ی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ده (version 10; SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد.

یافته‌ها

در رنگ‌آمیزی با روش PCNA لوله‌های اسپرم‌ساز، در گروه شاهد حدود ۹۵٪ سلول‌های اسپرماتوگونیا در حال تکثیر بودند، اما این مقدار برای گروه‌های آزمایش با دوز بالا حدود ۸۵٪ بود (شکل ۱). در مقابل در بعضی از لوله‌های اسپرم‌ساز گروه آزمایش با دوز بالا بیش از ۳ تا ۵ سلول آپوپتوتیک مشاهده گردید، در حالی که در گروه شاهد به ندرت لوله‌های با ۳ سلول

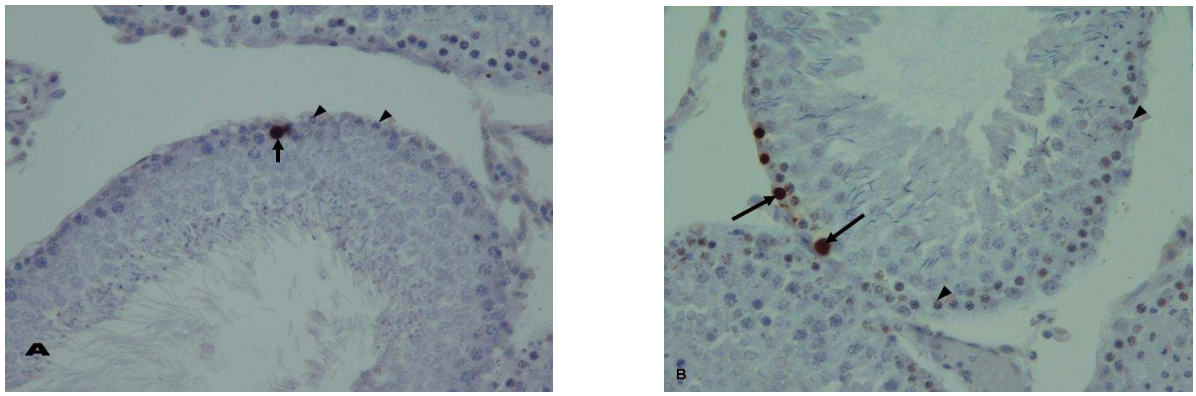
www.mui.ac.ir

در حال مرگ مشاهده نمودیم و اکثر لوله‌ها بدون چنین سلول‌هایی بودند (شکل ۲). در رنگ‌آمیزی با هر دو روش، علاوه بر سلول‌های اسپرماتوگونی، سلول‌های دیگری مانند بعضی از سلول‌های اسپرماتوسیت‌های اولیه و سلول‌های بینابینی لایدیک نیز رنگ گرفتند که نشان‌دهنده‌ی وجود آنتی‌ژن هسته‌ای تکثیر سلولی در این نوع سلول‌ها نیز می باشد، ولی ملاک محاسبه‌ی ما تکثیر و آپوپتوزیس در سلول‌های اسپرماتوگونیا بود.



شکل ۱. مقاطعی از بیضه‌ی موش صحرایی رنگ‌آمیزی شده با روش PCNA

الف: گروه شاهد، ب: گروه آزمایش۳ (گروه با دوز داروی ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم). ۲۴ ساعت بعد از این که حیوانات تحت یک‌بار تزریق دارو یا سالین قرار گرفتند، بیضه‌ی آن‌ها برداشته و مطالعه شد. به کاهش تعداد سلول‌های در حال تکثیر و کاهش رنگ‌پذیری سلول‌ها در گروه آزمایش و در مقایسه با گروه شاهد توجه نمایید. پیکان‌ها سلول‌های در حال تکثیر و نوک پیکان‌ها سلول کمون از نظر تکثیر را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی X ۴۰).



شکل۲. مقاطعی از بیضه‌ی موش صحرایی رنگ‌آمیزی شده با روش TUNEL

الف: گروه شاهد، ب: گروه آزمایش۳ (۱۵میلی گرم بر کیلوگرم). ۲۴ ساعت بعد از این که حیوانات تحت یک‌بار تزریق دارو یا سالین قرار گرفتند ، بیضه‌ی آن‌ها برداشته و مطالعه شد. به افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه آزمایش و در مقایسه با گروه شاهد توجه نمایید. پیکان‌ها سلول‌های آپوپتوتیک و نوک پیکان‌ها سلول‌های سالم را نشان می‌دهد (بزرگ نمایی X ۴۰).

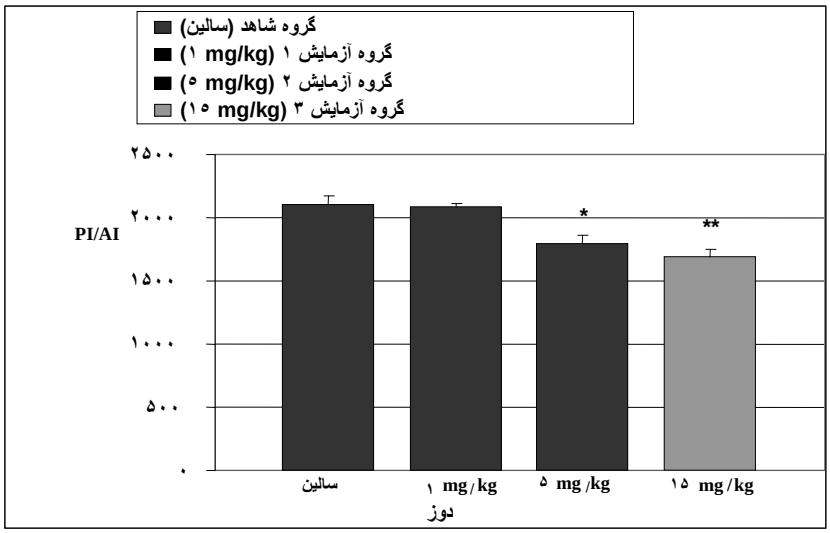
جدول۱. مقادیر عددی ایندکس‌های تکثیر، آپوپتوزیس و نسبت بین آن دو در سلول‌های اسپرماتوگونی گروه‌های شاهد و آزمایش

ایندکس	گروه شاهد	گروه آزمایش ۱	گروه آزمایش۲	گروه آزمایش ۳
تکثیر	۳۵۰/۵±۱/۰۴۱	۳۵۰ ± ۱/۲۹۱	۳۴۶/۲۵±۰/۶۲۹۲	۳۴۳/۲۵±۱/۹۳۱[۱،۲]
آپوپتوزیس	۰/۱۶۶۸۷۵±۰/۰۰۴۵۵۰	۰/۱۶۷۶۸۳ ± ۰/۰۰۱۱۹۸	۰/۱۹۳۴۶۷۷۵±۰/۰۰۶۳۸۵[۱،۲]	۰/۲۰۴۴۱±۰/۰۰۶۹۶۸[۱،۲]
تکثیر بر آپوپتوزیس	۲۱۰۵/۵۲۵±۶۶/۰۴۵	۲۰۸۸±۲۵/۹۶۵	۱۷۹۶±۶۵/۴۳[۱،۲]	۱۶۸۵/۷۵±۶۴/۰۵۶[۱،۲]

[۱] اختلافات معنی‌دار بین گروه شاهد و آزمایش.

[۲] اختلافات معنی‌دار بین گروه آزمایش با دوز پایین و دو گروه آزمایش با دوز بالا.

www.mui.ac.ir



نمودار ۱. اثر یک‌بار تزریق مت‌آمفتامین بر ایندکس نسبت تکثیر بر آپوپتوزیس (PI/AI) در لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه‌ی موش صحرایی. بعد از این‌که حیوانات تحت یک‌بار تزریق سه دوز متفاوت دارو (۱۵، ۵ و ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یا سالین قرار گرفتند، ۲۴ ساعت بعد، بیضه‌ی آن‌ها برداشته شد و مطالعه گردید مت‌آمفتامین نسبت PI/AI را در دو گروه با دوز بالا و در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد

** $P \leq ۰/۰۱$

* $P \leq ۰/۰۵$

مقادیر نشان دهنده‌ی mean ± SEM می‌باشند

در مطالعه‌ی حاضر دو نوع بررسی آماری صورت گرفت. هدف از بررسی اول مقایسه‌ی آماری بین گروه‌های آزمایش و گروه شاهد در ارتباط با تغییرات ایجاد شده در ایندکس‌های فوق و هدف از بررسی دوم مقایسه‌ی آماری ایندکس‌ها در بین خود گروه‌های آزمایش با هم بود. در بررسی اول مشخص شد که تکثیر سلولی و نسبت تکثیر به آپوپتوزیس در دو گروه آزمایش با دوز بالا در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت. بر عکس، آپوپتوزیس در این گروه‌ها افزایش یافت (جدول ۱ و نمودار ۱). تکثیر سلولی در گروه آزمایش با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت ($P \leq ۰/۰۱$). آپوپتوزیس در گروه آزمایش با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P \leq ۰/۰۵$) و در گروه با بالاترین دوز نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($P \leq ۰/۰۱$) (جدول ۱). در مقایسه‌ی گروه‌های آزمایش با هم مشخص شد که اختلاف معنی‌داری در رابطه با ایندکس‌های بالا بین گروه آزمایش که دوز پایین دارو (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و آن‌ها که دوزهای بالای دارو (۱۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را دریافت کرده بودند، وجود داشت. اما چنین اختلافاتی بین دو گروه با دوز بالا وجود نداشت (جدول ۱). در رابطه با تکثیر سلولی و نسبت تکثیر به آپوپتوزیس بین گروه ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۵$) وجود داشت. در رابطه با ایندکس آپوپتوزیس این اختلاف در مقایسه‌ی گروه اول و دوم ($P \leq ۰/۰۵$) و همچنین در مقایسه‌ی گروه اول و سوم ($P \leq ۰/۰۱$) اختلاف معنی‌داری داشت. بنابراین به نظر می‌رسد اختلافات مشاهده شده تا حدودی وابسته به دوز باشد. در بعضی از لوله‌های گروه‌های آزمایش فاصله‌ی مختصری در اپی‌تلیوم بین لایه‌ی سلول‌های اسپرماتوگونی و سایر لایه‌های سلولی یعنی لایه‌های

www.mui.ac.ir

مربوط به سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرم‌ها دیده می‌شد. اگرچه از دست دادن بافت بینابینی در قسمت‌های مرکزی بیضه به دلیل فرآیند آماده‌سازی مقاطع و تعدد مراحل آن امری طبیعی است و در مطالعات مربوطه گزارش گردیده است، اما این مسأله در گروه‌های آزمایش با شدت بیشتری دیده شد. مقاطع شاهد منفی رنگ کروموژن به‌کار رفته (دی‌آمینوبنزیدین یا DAB) را نگرفتند، اما مقاطع شاهد مثبت به خوبی در مناطق مورد انتظار رنگ گرفتند. در مطالعه‌ی راهنما، چندین فیکساتیو مورد آزمایش قرار گرفت که از میان آن‌ها مایع بوئن و مایع تعدیل داده شده‌ی Davidson بهترین فیکساتیو بافت بیضه جهت کارهای ایمنوهیستوشیمی تشخیص داده شد.

بحث

نتایج مطالعه‌ی ما نشان می‌دهد که داروی متآمفتامین از یک طرف باعث کاهش تکثیر سلول‌های اسپرماتوگونیا و نسبت تکثیر به آپوپتوزیس در این سلول‌ها شده (شکل ۱ و نمودار ۱) و از طرف دیگر آپوپتوزیس را در لوله‌های اسپرم‌ساز القاء می‌کند (شکل ۲ و جدول ۱). هموستاز اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز وابسته به مرگ سلولی و فعّالیت تکثیری آن دارد. هر عاملی که تعادل بین این دو فرآیند را بر هم زند، باعث تغییرات بافت‌شناسی آن می‌گردد که عواقب آن ناکارآمدی بیضه در تولید اسپرم و ناباروری خواهد بود. در واقع چنین حالتی را در بیضه‌ی مردان با سن بالا نیز می‌توان مشاهده نمود (۹). همان طور که گفته شد، متآمفتامین از طریق کاهش تعداد سلول‌های در حال تکثیر و افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک باعث کاهش نسبت سلول‌های در حال تکثیر به سلول‌های آپوپتوتیک گردیده، هموستاز طبیعی بیضه را بر هم خواهد زد.

اثرات تراتوژنیک و سمی جنینی متآمفتامین در سال‌های مختلف توسط Yamamoto و همکاران مطالعه شده و به اثبات رسیده است (۱۵-۱۳). پژوهش‌های مختلفی در مورد اثر این دارو بر روی دستگاه تناسلی نر انجام گرفته است که از آن بین می‌توان به یکی دیگر از کارهای Yamamoto وهمکاران اشاره کرد که نشان داد که میل و توانایی جفت‌گیری موش‌های نر با تجویز این دارو کاهش می‌یابد (۱۶). مطالعات دیگر اثرات مهاری آمفتامین دارویی دیگر از این خانواده، بر روی تولید تستوسترون توسط سلول‌های بینابینی بیضه را نشان داد. این اثر از طریق افزایش تولید AMP حلقوی، کاهش فعالیت کانال‌های کلسیم و آنزیم‌های مربوط به تولید این هورمون القاء می‌گردد. همچنین مشخص گردید که آمفتامین با کاهش ترشح گونادوتروپین‌ها مانع از ترشح تستوسترون می‌گردد (۱۷). چندین گزارش موردی در رابطه با اثرات سوء قرص‌های روان‌گردان بر روی دستگاه تولید مثل نر وجود دارد. برای مثال Dubin و همکار یک مورد از Priapism را در یک مرد جوان گزارش نموده است (۱۸).

مطالعات قبلی اثرات متآمفتامین در CNS، وقوع نکروز و آپوپتوزیس در میوسیت‌ها، هپاتوسیت‌ها، نورون‌های سروتونرژیک و دوپامینرژیک موجود در مغز میانی و حتی به صورت in vitro و در غلظت‌های بالا در نورون‌های نئوکورتیکال را نشان می‌دهد و احتمال داده شده است که دارو از طریق تشکیل رادیکال هیدروکسیل و فعال کردن مسیرهای آپوپتوزیس اثرات خود را اعمال می‌کند (۱۹). همچنین Yamamoto و

www.mui.ac.ir

همکاران القای آپوپتوزیس در لوله‌های اسپرم‌ساز را نشان دادند. آن‌ها، هم‌چنین بروز آپوپتوزیس همراه با تشکیل ساختارهای واکوئولی در سلول‌های اپی‌تلیوم لوله‌ها را گزارش کردند و احتمال دادند که سلول‌های واکوئولی همان سلول‌هایی هستند که وارد مسیر آپوپتوتیک شده‌اند. ما نیز در رنگ‌آمیزی مقاطع با روش TUNEL چنین ساختارهایی را مشاهده نمودیم، اما مکانیسم القای آپوپتوزیس توسط دارو برای آن‌ها ناشناخته ماند و تنها تغییرات غلظت تستوسترون در خون را یکی از عوامل احتمالی مؤثر در القای آپوپتوزیس توسط دارو پیشنهاد کردند (۸).

در مطالعه‌ی Yamamoto و همکاران گزارش شده بود که تعداد پلاک‌های واژینال موش‌های ماده‌ی جفت داده شده با نرهایی که این دارو را دریافت کرده‌اند کاهش می‌یابد، حتی چنین حالتی را بعد از قطع دارو و پاک شدن آن از خون مشاهده نموده بودند. احتمال می‌رود تضعیف رفتارهای جفت‌گیری مربوط به کاهش سطح تستوسترون در خون باشد، چرا که این رفتارها ارتباط با غلظت تستوسترون در خون دارد. این هورمون باعث آزاد شدن دوپامین شده، گیرنده‌های دوپامین در ناحیه‌ی پره‌اپتیک را تحریک می‌کنند. این ناحیه از مغز گونه‌های مهره‌داران، ناحیه‌ی اصلی برای رفتارهای جنسی است (۱۶). خانواده‌ی دارویی آمفتامین‌ها از طریق اثر مستقیم روی بیضه باعث کاهش ترشح تستوسترون می‌گردند (۱۷، ۸). این که آیا القای آپوپتوزیس در لوله‌های اسپرم‌ساز توسط دارو اثری بر روی رفتارهای جفت‌گیری دارد یا خیر، هنوز معلوم نیست. با توجه به این که در رابطه با اثر داروی مت‌آمفتامین بر روی تکثیر سلولی در بیضه مطالعه‌ای وجود ندارد، مطالعه‌ی ما نشان داد که این دارو علاوه بر القای آپوپتوزیس، باعث کاهش تکثیر سلولی و برهم خوردن نسبت تکثیر به مرگ سلولی در لوله‌های اسپرم ساز می‌گردد، به طوری که در دوز بالا کاهش تکثیر سلولی حتی به حدود ۸۵٪ (در مقایسه با ۹۵٪ در گروه شاهد) می‌رسد. مکانیسمی که از طریق آن دارو باعث کاهش تکثیر سلولی می‌گردد، مشابه با آپوپتوزیس، چندان روشن نیست. با توجه به این که قسمت‌های مختلف دستگاه تناسلی نر از سیستم عصبی خودکار الیاف آدرنرژیک و کولینرژیک دریافت می‌نماید و نقش الیاف نورآدرنرژیک در اعمال قسمت‌های مختلف دستگاه تناسلی نر از جمله اپیدیدیم مشخص شده است (۲۰) و از طرفی دارو باعث افزایش خالص آزاد شدن مونوآمینونوروترانسمیترها یعنی سروتونین، نورآدرنالین و دوپامین می‌گردند (۵)، ممکن است دارو با تغییر در میزان ترشح نوروترانسمیترهای فوق اثرات خود را القاء کند.

نتایج این مطالعه نشان داد که سوء استفاده از مت‌آمفتامین به شکل قرص‌های روان‌گردان حتی به شکل تفننی و برای یک‌بار، می‌تواند باعث بر هم خوردن هموستاز طبیعی بیضه از طریق کاهش تکثیر و افزایش مرگ سلولی شود که احتمال دارد پیامد آن ناتوانی در باروری باشد؛ اثبات این موضوع نیاز به تحقیق بیشتر به خصوص در نمونه‌های انسانی دارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد بابت تصویب طرح پژوهشی و حمایت‌های مالی و از آقای دکتر هادی‌زاده بابت ساخت داروی مت‌آمفتامین و از خانم فریبا متجدد بابت کمک‌های عملی خود تشکر می‌نماییم.

www.mui.ac.ir

References

1. Comer SD, Hart CL, Ward AS, Haney M, Foltin RW, Fischman MW. Effects of repeated oral methamphetamine administration in humans. Psychopharmacology (Berl) 2001; 155(4): 397-404.
2. O'Malley P. Ecstasy for intimacy: potentially fatal choices for adolescents and young adults: update for the clinical nurse specialist. Clin Nurse Spec 2005; 19(2): 63-4.
3. Jarvis S, Elliott DJ, Morgan D, Winston R, Readhead C. Molecular markers for the assessment of postnatal male germ cell development in the mouse. Hum Reprod 2005; 20(1): 108-16.
4. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev 2001; 15(22): 2922-33.
5. Kalant H. The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. CMAJ 2001; 165(7): 917-28.
6. Inoue H, Nakatome M, Terada M, Mizuno M, Ono R, Iino M, et al. Maternal methamphetamine administration during pregnancy influences on fetal rat heart development. [corrected]. Life Sci 2004; 74(12): 1529-40.
7. Smith L, Yonekura ML, Wallace T, Berman N, Kuo J, Berkowitz C. Effects of prenatal methamphetamine exposure on fetal growth and drug withdrawal symptoms in infants born at term. J Dev Behav Pediatr 2003; 24(1): 17-23.
8. Yamamoto Y, Yamamoto K, Hayase T, Abiru H, Shiota K, Mori C. Methamphetamine induces apoptosis in seminiferous tubules in male mice testis. Toxicol Appl Pharmacol 2002; 178(3): 155-60.
9. Bernal-Manas CM, Morales E, Pastor LM, Pinart E, Bonet S, Rosa PL, et al. Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpuberal boar (Sus domesticus) testes with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism. Acta Histochem 2005; 107(5): 365-72.
10. Boswell RF, Richmond V, Lo YS, Chester V. Preparation of amphetamines from phenylpropanolamines. US Patent: 6399828. 2002.
11. Forssmann WG, Ito S, Weihe E, Aoki A, Dym M, Fawcett DW. An improved perfusion fixation method for the testis. Anat Rec 1977; 188(3): 307-14.
12. Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol Pathol 2002; 30(4): 524-33.
13. Yamamoto Y, Yamamoto K, Fukui Y, Kurishita A. Teratogenic effects of methamphetamine in mice. Nihon Hoigaku Zasshi 1992; 46(2): 126-31.
14. Yamamoto Y, Yamamoto K. The Teratogenicity of Methamphetamine is Influenced by Housing Conditions of Pregnant Mice. Cong Anom 2004; 34(4): 337-43.
15. Yamamoto Y, Yamamoto K, Abiru H, Fukui Y, Shiota K. Effects of methamphetamine on rat embryos cultured in vitro. Biol Neonate 1995; 68(1): 33-8.
16. Yamamoto Y, Yamamoko K, Hayase T. Effect of methamphrtamine on male mice fertility. J Obstet Gynecol Res 1999; 25(5): 353-8.
17. Tsai SC, Chen JJ, Chiao YC, Lu CC, Lin H, Yeh JY, et al. The role of cyclic AMP production, calcium channel activation and enzyme activities in the inhibition of testosterone secretion by amphetamine. Br J Pharmacol 1997; 122(5): 949-55.
18. DubinN N, Razack AH. Priapism: ecstasy related? Urology 2000; 56(6): 1057.
19. Stumm G, Schlegel J, Schafer T, Wurz C, Mennel HD, Krieg JC, et al. Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. FASEB J 1999; 13(9): 1065-72.
20. Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, et al. Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. Biol Reprod 1998; 59(4): 890-6.

www.mui.ac.ir

Orginal Article

Journal of Isfahan Medical School
Vol 27, No 97, September 2009

Received: 2008.8.25
Accepted: 2009.5.20

The Evaluation of Single Dose Effects of Methamphetamine on Proliferation and Apoptosis of Sperm Germ Cells in Mature Rat

Mohammad Mohsen Taghavi PhD[*], Seyed Adel Moallem PhD[**], Seyed Hasan Alavi PhD[***]

[*] Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
[**] Associate Professor, Department of Pharmacodynamy & Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
[***] Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Abstract

Background: Methamphetamine (MAMP) is a central nervous system stimulant that is increasingly abused by teenagers and young adults. The MAMP effects on the male reproductive system are not clear. In this experimental study, we evaluated the effects of single injection of three different doses of MAMP on the proliferation and apoptosis of the sperm germ cells in the mature rat.

Methods: A single dose of MAMP in different doses (1, 5 or 15 mg/kg) or normal saline was administered intraperitoneally in four groups of mature male rats. The right and left tissue sections were immunostained with immunohistochemical methods for proliferation and apoptosis, respectively. Indexes were calculated for proliferating and apoptotic cells.

Findings: Cell proliferation decreased significantly in the group which treated with the highest dose. The ratio of proliferation to apoptosis decreased significantly in two groups with the highest doses. Conversely, apoptosis occurrence was increased in these groups. In the control group, more than 95% of spermatogonia were proliferating cells; however, 15mg/kg of MAMP caused an 85% reduction in the number of proliferating spermatogonia. On the contrary, the number of apoptotic cells at least doubled in some tubules of these groups. There were significant differences between the lower dose group and the higher doses groups. Therefore, the observed differences were relatively dose-dependent.

Conclusion: This study revealed that one exposure to MAMP particularly at the high dose can change the proliferation/apoptosis ratio of spermatogonia in rat testis. Therefore, this would adversely affect the normal spermatogenesis process and could lead to disturbances in male fertility.

Key words: **Methamphetamine, Cell proliferation, Apoptosis, Sperm germ cells, Rat.**

Page count: 11
Tables: 1
Figures: 1
References: 20

Address of Correspondence: Mohammad Mohsen Taghavi PhD, Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Kerman, Iran.
E-mail: taghavi164@yahoo.com

www.mui.ac.ir