اثرات تولوالدوکسیم بر اسپرماتوژنز موش بالغ

کاظم پریور، هما محسنی کوچصفهانی، محمدعلی بیگدلی، قدرت عبادی:
دانشگاه تربیت معلم

چکیده

اکسیم‌ها، از مهم‌ترین ترکیبات آلی محافظت کنندهٔ کربونیل هستند. و در کنترل جمعیت حشرات، کنه‌ها و قارچ‌ها کاربرد دارند. تأثیر برخی از اعضای اکسیم‌ها در گذشته بر کاهش اسپرماتوژنز و اووژنز گزارش شده است؛ با توجه به تشابه ساختاری تولوالدوکسیم (سین- پارامتیل بنزالدئیداکسیم) با سایر اکسیم‌ها، که به تازگی در آزمایشگاه شیمی آلی دانشگاه تربیت معلم تهران سنتز شده است، تأثیر این ماده بر فرایند اسپرماتوژنز موش کوچک نژاد Balb/C بالغ بررسی شود تا در صورت بروز تأثیر کاهنده بر این فرآیند، مقدمه‌ای برای تحقیقات آینده در زمینهٔ سنتز داروی ضد باروری مردانه باشد. میزان LD50 در حد ۳۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تعیین شد. و یک دوز زیر کشنده از ترکیب، به میزان۱۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن طی دو هفته پی در پی (روزانه) به موش‌های بالغ (۶۰ روزه) در محدوده وزنی ۳۰ تا ۳۵ گرم به‌صورت درون صفاقی انجام گرفت. و ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق، بررسی شد. بررسی آماری نشان داد که کاهش معنی‌داری در وزن بدن موش، تعداد اسپرماتوگونی‌های نوع A و B، اسپرماتوسیت‌ها و اسپرم($P< 0/005$) در بین گروه‌های آزمایش با گروه کنترل و گروه حلال وجود دارد. هم چنین، اسپرماتید برخی نمونه‌های آزمایشی به‌صورت کیست درآمده، و اسپرماتوسیت‌های اولیه و اسپرماتیدها به مرکز مجرای لوله رهاشده بودند.

مقدمه

پیشرفت‌های علمی و فناوری در دنیای امروز، منجر به کنترل بسیاری از بیماری‌ها، افزایش طول عمر، کاهش میزان مرگ و میر، و در نتیجه افزایش رشد جمعیت در کشورهای در حال پیش‌رفت شده است. امروزه از روش‌های ضدباروری استفاده می‌شود، که در بعضی موارد، عاری از عوارض جانبی و آسیب‌های جسمانی نیست [۱]. از همین روی مشارکت فعال مردان در این امر ضروری به نظر می‌رسد. از سوی دیگر، تا به حال روش ضد باروری مردانه مناسب و قابل برگشتی برای مردان ارائه نشده است [۲] زیرا محدود به استفاده از کاندوم و وازکتومی است. یافتن گوسیپول به‌عنوان ماده‌ای ضد باروری مردانه، پس ازمشاهده کاهش شدید باروری در یکی از روستاهای چین، در بین افرادی که از روغن دانه‌های پنبه همراه با ذرات گیاه استفاده

واژه‌های کلیدی : تولوالدوکسیم، اسپرماتوژنز، موش نژاد Balb/C
دریافت ۸۵/۱/۱۹ پذیرش ۸۷/۵/۲۰

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

می‌کردند مطرح شد [۳]. و مشخص شده است که آن، علت تأثیرمستقیم وغیرمستقیم برآنزیم DNA پلیمراز و سنتز DNA در طول فرآیند اسپرماتوژنز است [۴]. تحقیق در این مورد موجب یافتن اثرات ضد باروری مردانه در بعضی از مشتقات چند گروه دارویی مانند نیتروفوران‌ها، کینین‌ها، سولفونامیدها و اکسیم‌ها شد [۵]، [۱]،[۶].اثرات ضد تشنجی و ضد میکروبی اکسیم‌ها پیش از این بررسی شده است [۷]. و در این تحقیق تولوالدواکسیم یکی از مشتقات اکسیم‌ها بررسی شده است. شاخص‌های مختلف باروری دستگاه تولید مثل در موش کوچک Balb/C ارزیابی شده است، تا در صورت تأثیر کاهنده بر تولید اسپرم یا بلوغ آن بتوان در طراحی و سنتز داروی ضد باروری مردانه استفاده کرد.

مواد و روش کار

تولوالدوکسیم به‌صورت پودر سفید رنگ در شرایط مناسب آزمایشگاه شیمی آلی دانشگاه تربیت معلم تهران تهیه شده، حلّال این ترکیب روغن زیتون بودار بود، که در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای حل کردن استفاده شده است، رنگ‌آمیزی مورد استفاده نیز برای بافت بیضه‌ها هماتوکسیلین-ائوزین بود. موش‌های نر بالغ از نژاد Balb/C در محدودهٔ وزنی ۳۰ تا ۳۵ گرم از حیوان خانه دانشگاه تربیت معلم تهران تهیه شدند. و تحت شرایط استاندارد (۱۴ ساعت روشنایی، ۱۰ ساعت تاریکی و حرارت ۲±۲۱ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شدند. و حیوانات در این مدت به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. در این تحقیق تعداد ۳۰ سر موش Balb/C بالغ نر به سه گروه ده تایی تقسیم شدند: گروه کنترل هیچ گونه دارویی دریافت نکردند. گروه sham (حلّال)، روغن زیتون بودار به عنوان حلّال دارو دریافت کردند. و گروه آزمایش با دوز mg/kg ۱۷۵ تولوالدوکسیم براساس وزن بدن دریافت کرده‌اند. تزریق به مدت دو هفته پی در پی و به صورت درون صفاقی انجام گرفت. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از آخرین تزریق، موش‌ها پس از توزین با اتر کشته شدند، و خون آن‌ها برای اندازه‌گیری غلظت هورمون تستوسترون در لوله‌های آزمایش تمیزی جمع آوری شد. سپس سرم‌های حیوانات با سانتریفوژ، دور ۲۰۰۰ در دقیقه جدا شد. و تا زمان اندازه‌گیری در سرمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. اندازه‌گیری هورمونی بر اساس روش‌های معمولی با استفاده از روش RIA (Radiometric Immuno Assay) انجام گرفت. شکم حیوانات باز و بیضه‌ها خارج شد. میزان تغییرات وزن بدن، تغییرات در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A,B، تعداد اسپرماتوسیت‌های اولیه و اسپرماتیدها و تعداد اسپرم، تغییرات در تعداد سلول‌های لایدیگ و هورمون تستوسترون تعیین شد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

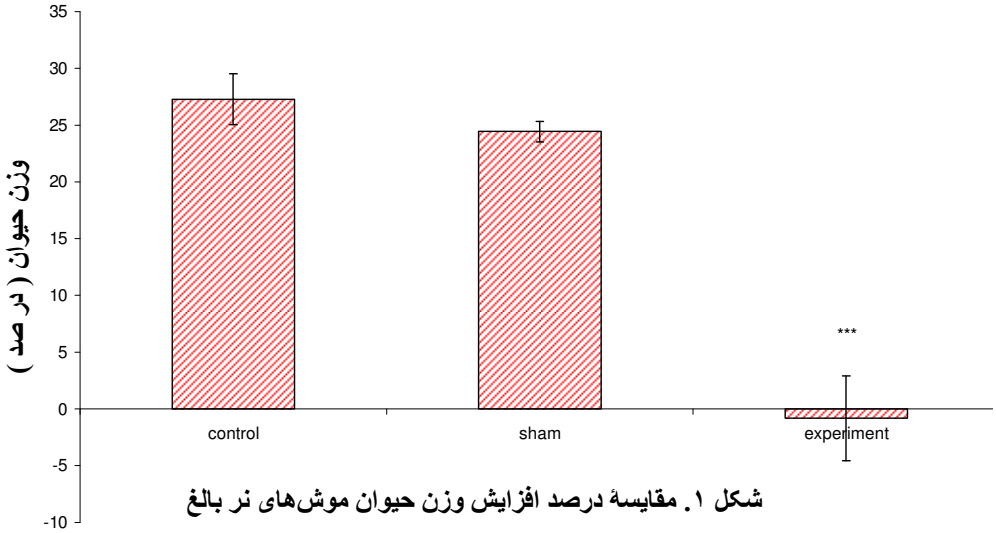
نتایج

اعداد مربوط به نتایج این بررسی در جدول‌ها و نمودارهای ۱ تا ۸ آورده شده است. نتایج به دست آمده از بررسی تفاوت‌های وزنی نشان می‌دهد، که میزان درصد افزایش وزن بدن حیوانات در گروه کنترل ۲/۲ ±۲۷/۲۸ گرم و در گروه تجربی ۸۲/ ۰- ± ۳/۷ گرم است (جدول۱)، که این تفاوت در P<۰/۰۰۰۱ معنی‌دار است(شکل۱). نتایج حاصل از بررسی سلول‌های بینابینی نشان می‌دهد، که میانگین آن‌ها در گروه کنترل ۰/۶۸ ±۱۳/۵ و در گروه تجربی ۵۴/ ۰ ±۵۳/ ۱۰ سلول در ۰/۲ میلی مترمربع است(جدول ۲). که این تفاوت در P<۰/۰۵ معنی‌دار است (شکل ۲). هم چنین نتایج حاصل از بررسی تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A نشان می‌دهد، که تعداد آن‌ها در گروه کنترل ۰/۱۴ ±۳/۱۵ و در گروه تجربی ۰/۳ ± ۲/۰۷ سلول در ۰/۲ میلی‌مترمربع است (جدول۳)، که این کاهش از نظر آماری در P< ۰/۰۵ معنی دار است (شکل۳). بررسی نتایج سلول‌های اسپرماتوگونی نوع B نشان می‌دهد، که در گروه کنترل ۰/۳۷± ۶/۲۶ و در تجربی‌ها ۰/۵۴± ۴/۲ سلول در ۰/۲ میلی مترمربع است (جدول۴). بنا بر این تعداد سلول‌ها به طور معنی‌داری در P<۰/۰۵ کاهش یافته است (شکل ۴). نتایج حاصل از تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه نشان می‌دهد، که این نوع سلول‌ها در گروه کنترل ۰/۴۲ ± ۹/۸ و در گروه تجربی ۰/۶ ± ۶/۳ در ۰/۲ میلی‌مترمربع ا ست (جدول۵). لذا تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه به طورمعنی دار در P<۰/۰۰۰۱ کاهش یافته است (شکل ۵). بررسی نتایج حاصل ازتعداد سلول‌های اسپرماتید نشان می‌دهد که تعداد آن‌ها در موش‌های شاهد ۷۹/ ۰ ± ۲۰/۴۶ و در موش‌های مورد آزمایش ۴/ ۱ ± ۱۲/۲ سلول در ۰/۲ میلی‌مترمربع است (جدول ۶). بنا بر این تعداداسپرماتیدهای گروه تجربی نسبت به شاهد به طور معنی‌داری در P< ۰/۰۰۰۱ کاهش یافته است (شکل ۶). بررسی نتایج تجربی‌ها برروی اسپرم نشان می‌دهد، که تعداد اسپرم‌ها درگروه کنترل ۱/۸ ± ۲۶/۶ و در تجربی۱/۴± ۱۶سلول در ۰/۲ میلی‌مترمربع است (جدول ۷). بنا بر این تعداد اسپرم گروه تجربی نسبت به کنترل در p <۰/۰۰۱ به طور معنی‌داری کاهش یافته است (شکل ۷). بررسی نتایج حاصل از سنجش مقدار هورمون تستوسترون نشان می‌دهد که مقدار آن در گروه کنترل ng/ml ۰۲/ ۰ ± ۳۴۶/ ۰ و در گروه‌های تجربی ng/ml ۰۱۸/ ± ۲۸۶/ ۰ است (جدول ۸)، که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نیست (شکل ۸).

جدول۱. نتایج تحلیل آماری درصد افزایش وزن موش‌های نر بالغ($\bar{x}$ ±SE)

گروه‌ها	درصد افزایش وزن (گرم)
کنترل	۲۷/۲۸ ± ۲/۲۶
حلال(شم)	۲۴/۴۳ ± ۰/۸۹
آزمایش	۳/۷۴ ± −۰/۸۲

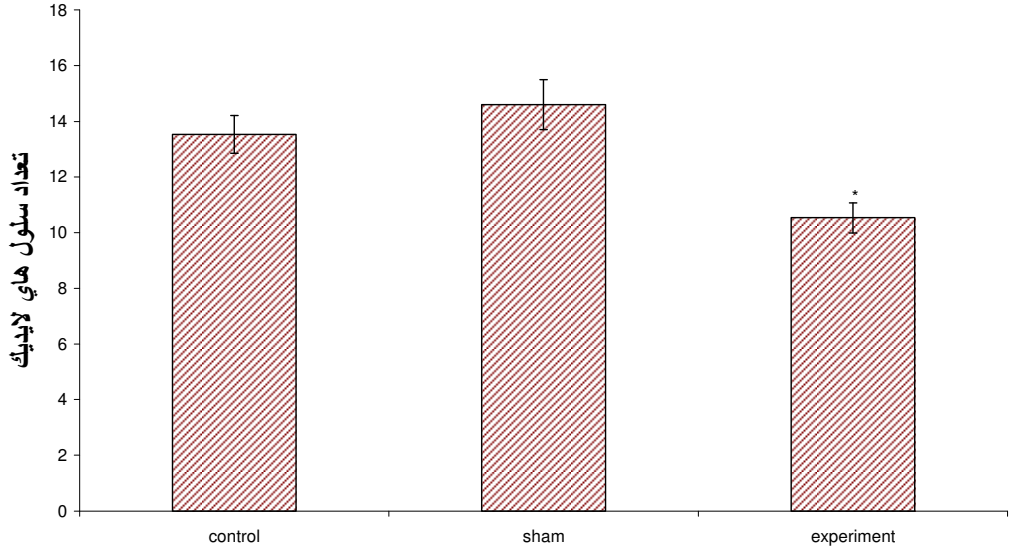
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]



شکل ۱. مقایسهٔ درصد افزایش وزن حیوان موش‌های نر بالغ

جدول ۲. نتایج تحلیل آماری تعداد سلول‌های لایدیگ موش‌های نر بالغ($\bar{X}$ ±SE)

گروه‌ها	تعداد سلول‌های لایدیگ در ۰/۲ میلی مترمربع
کنترل	۱۳/۵۳ ± ۰/۶۸
حلّال	۱۴/۶ ± ۰/۸۹
آزمایش	۱۰/۵۳ ± ۰/۵۴

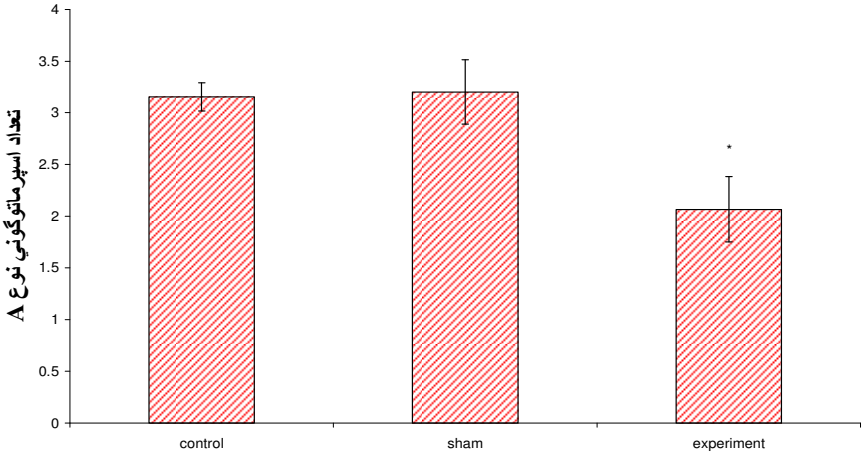


شکل ۲. مقایسهٔ تعداد سلول‌های لایدیک موش‌های نر بالغ

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

جدول ۳. نتایج تحلیل آماری تعداد اسپرماتوگونی نوع A موش‌های نر بالغ ($\bar{X}$ ±SE)

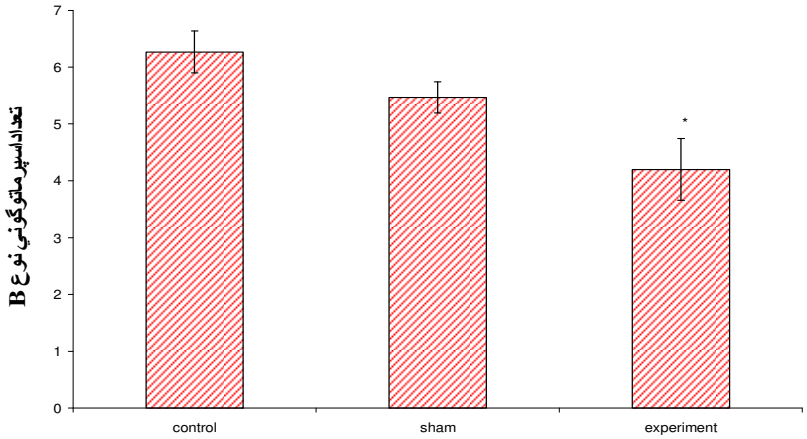
گروه‌ها	تعداد اسپرماتوگونی نوع A در۰/۲ میلی مترمربع
کنترل	۳/۱۵±۰/۱۴
حلال	۳/۲±۰/۳۱
آزمایش	۲/۰۷±۰/۳۱



شکل ۳. مقایسهٔ تعداد اسپرماتوگونی نوع A موش‌های نر بالغ

جدول ۴. نتایج تحلیل آماری تعداد اسپرماتوگونی نوع B موش‌های نر بالغ ($\bar{X}$ ±SE)

گروه‌ها	تعداد اسپرماتوگونی نوع B در۰/۲ میلی مترمربع
کنترل	۶/۲۶±۰/۳۷
حلال	۵/۴۶±۰/۲۷
آزمایش	۴/۲±۰/۵۴

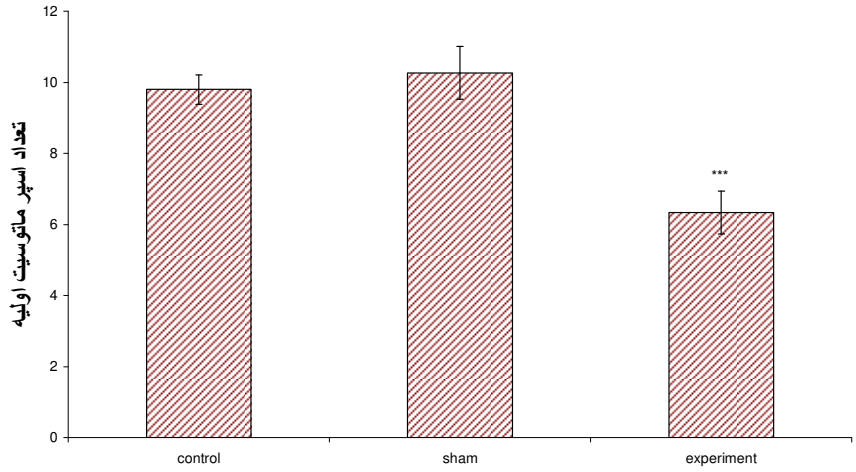


شکل ۴. مقایسهٔ تعداد اسپرماتوگونی نوع B دموش‌های نر بالغ

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

جدول ۵. نتایج تحلیل آماری تعداد اسپرماتوسیت اولیه موش‌های نر بالغ ($\bar{X}$ ±SE)

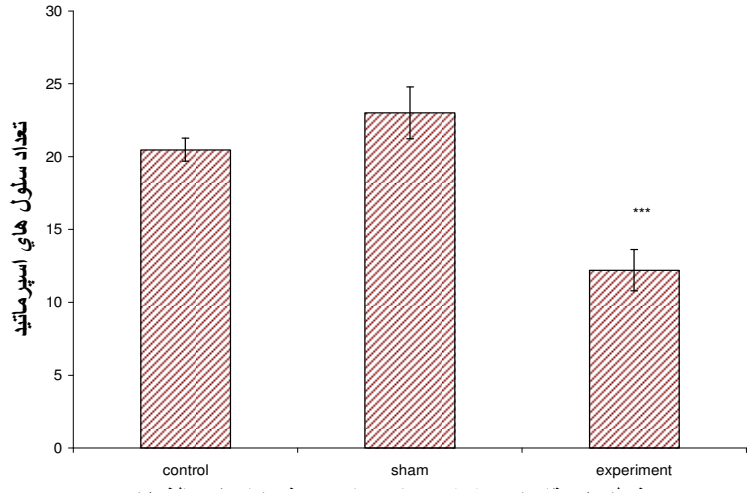
گروه‌ها	تعداد اسپرماتوسیت اولیه در۰/۲میلی مترمربع
کنترل	۹/۸±۰/۴۲
حلال	۱۰/۲۶±۰/۷۴
آزمایش	۶/۳۳±۰/۶۰



شکل ۵. مقایسهٔ تعداد اسپرماتوگونی اولیه موش‌های نر بالغ

جدول ۶. نتایج تحلیل آماری تعداد اسپرماتیدها در موش‌های نر بالغ($\bar{X}$ ±SE)

گروه‌ها	تعداد اسپرماتید در۰/۲ میلی‌مترمربع
کنترل	۲۰/۴۶±۰/۷۹
حلال	۲۳±۱/۷۸
آزمایش	۱۲/۲±۱/۴

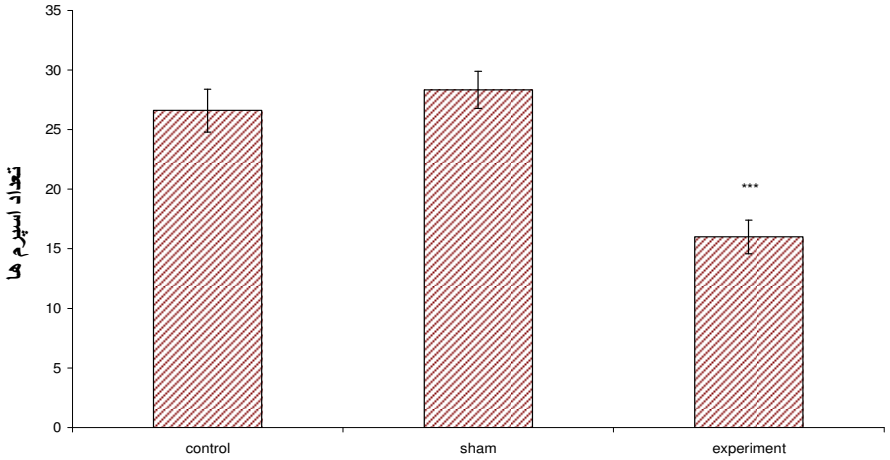


شکل ۶. مقایسهٔ تعداد اسپرماتیدها موش‌های نر بالغ

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

جدول ۷. نتایج تحلیل آماری تعداد اسپرم موش‌های نر بالغ ($\bar{x}$ ±SE)

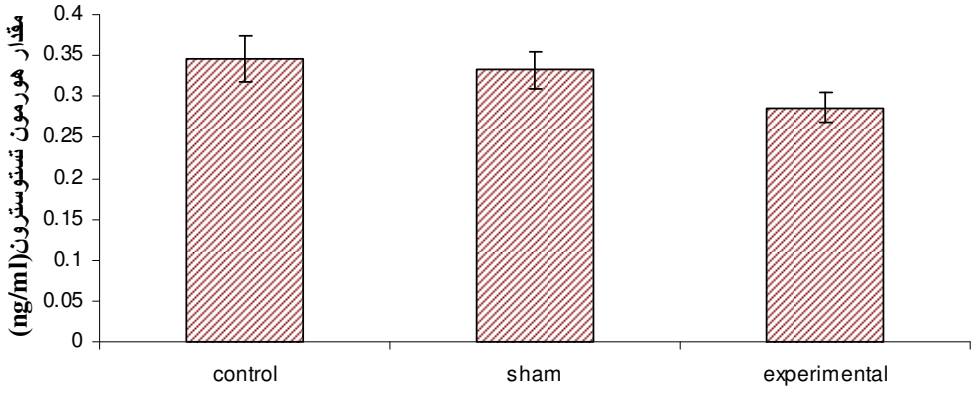
گروه‌ها	تعداد اسپرم در ۰/۲ میلی مترمربع
کنترل	۲۶/۶ ± ۱/۸
حلال	۲۸/۳۳ ± ۱/۵۵
آزمایش	۱۶ ± ۱/۴۱



شکل ۷. مقایسه تعداد اسپرم‌های موش‌های نر بالغ

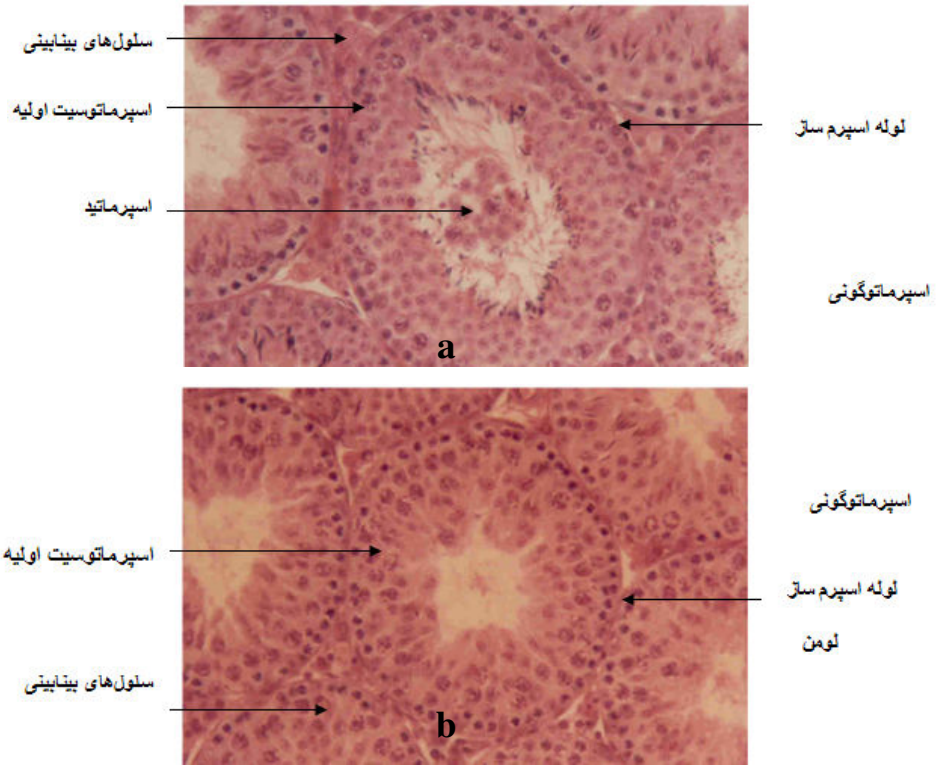
جدول ۸. نتایج تحلیل آماری هورمون تستوسترون موش‌های نر بالغ ($\bar{x}$ ±SE)

گروه‌ها	مقدار هورمون تستوسترون(ng/ml)
کنترل	۰/۳۴۶ ± ۰/۰۲۸۷۴
حلال	۰/۳۳۲ ± ۰/۰۲۳۱۰
آزمایش	۰/۲۸۶ ± ۰/۰۱۸۰۵

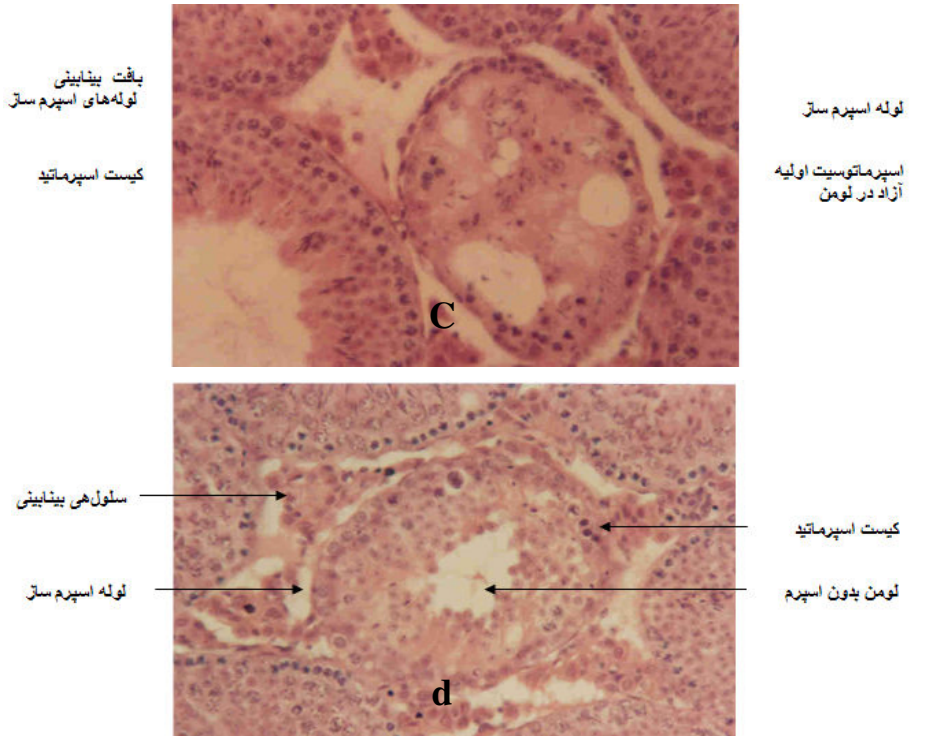


شکل ۸. مقایسهٔ هورمون تستوسترون موش‌های نر بالغ

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]



شکل ۹. عکس‌های میکروسکوپی از مقطع عرضی بیضه موش تجربی (a) وکنترل (b) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ ×
که در موش تجربی عدم وجود نظم بافتی، آزاد شدن اسپرماتیدها مشاهده می‌شود.



شکل ۱۰. عکس‌های میکروسکوپی (c و d) از مقطع عرضی بیضه موش تجربی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰×
که در آن‌ها کیست‌های اسپرماتیدی مشاهده می‌شود.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق تولوالدوکسیم با مقدار ۱۷۵میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن با تأثیر برروی دستگاه تولید مثل موش‌های کوچک نر بررسی شده است. بیضه‌های موش‌ها از نظر بافتی بررسی شده و نتایج حاصل تجزیه و تحلیل آماری شده و نشان داده شده است، که این ماده با دوز به کار برده شده، موجب کاهش معنی‌دار در انواع مختلف سلول‌های اسپرماتوژنیک شده است، هریک از آن‌ها را مورد بحث قرار می‌دهیم.

نتایج حاصل از تجربه‌ها بر وزن موش‌ها نشان می‌دهد، که تولوالدوکسیم با دوز به کاربرده شده، موجب کاهش وزن موش‌های بالغ شده است، که از نظر آماری معنی‌دار بوده است، و به نظر می‌رسد که تولوالدوکسیم با مهار آنزیم‌های توپوایزومراز Π [۸] و تیروزیناز[۹] موجب کاهش تقسیم سلولی در تمامی سلول‌های سوماتیک و اسپرماتوژنیک شده است. چون توپوایزومراز پروتئینی هسته‌ای است، که نقش اساسی در رونوشت برداری، فشردگی و جدایی کروموزم‌ها دارد [۸]، [۱۰]، [۱۱] از این طریق موجب کاهش رشد و کاهش وزن شده است. نتایج حاصل از بررسی تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی‌های نوع A,B نشان می‌دهد، که تولوالدوکسیم با مقدار به کاربرده شده، موجب کاهش این دو نوع سلول اسپرماتوژنیک شده است. که از نظر آماری معنی‌دار بوده و احتمالاً کاهش این دو نوع سلول ناشی از کاهش تقسیم سلولی در این سلول‌ها و سلول‌های زاینده نوع A است. نتایج حاصل از بررسی تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید نشان می‌دهد، که تولوالدوکسیم موجب کاهش تعداد این سلول‌ها شده است. که کاهش این‌ها در نتیجه کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی نوع B است. همچنین نتایج حاصل از بررسی تعداد سلول‌های اسپرم نشان می‌دهد، که تولوالدوکسیم موجب کاهش تعداد سلول‌های اسپرم گروه تجربی در مقایسه با کنترل شده است، که ازنظر آماری معنی‌دار و احتمالاً ناشی از کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتید است. بررسی نتایج سلول‌های لایدیگ نشان می‌دهد، که تولوالدوکسیم با دوز تزریقی موجب کاهش تعداد سلول‌های لایدیگ شده است، که احتمالاً بر اثر بر همکنش این ماده با این سلول‌ها و یا نتیجهٔ سمی بودن این ترکیب است. البته در این مورد و موارد یاد شده به تحقیقات بیش‌تری نیازمندیم. بررسی نتایج به‌دست آمده از مقدار هورمون تستوسترون نشان می‌دهد، که تولوالدوکسیم موجب کاهش هورمون تستوسترون شده است، ولی از نظر آماری معنی‌دار نیست این کاهش ناشی از کاهش تعداد و کاهش فعالیت سلول‌های لایدیگ بر اثر ماده تزریقی است.

منابع

۱. حمید رضا صادقی پور رودسری ، بررسی اثر نیفوراکسیم بر شاخص‌های باروری در موش‌های صحرایی نر، مجله زیست شناسی ایران، جلد۹، شماره ۱تا ۴، (۱۳۷۹).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]

2. G. Wiat, Male Fertility Regulation : The Challanel for The Year 2000. Br.Med.Bull, 49(1993) 210-221.

3. Tanami and Hirokazu ; Effect of Male Oral Contraceptive Gossypol on Testicular DNA Polimeras in Rat Japanease Journal of Fertility and Sterility, 39(3):(1994) 283- 91.

4. T. Taylor George, G. Griffin Michael and M. Bardgett, Search For a Male Contraceptive. The Effect of Gossypol on Sexual Motivation and Epididymal J.Med,22(1) (1991) 29-30 sperm.

5. W.O. Nelson, R.G. Bunge, The Effect of Therapevite Dosages of Nitrofurantion (furadontin) up on Spermatogenesis in Man.J. Urol. 77(2) (1957) 275-281.

6. F.C.W.U, Male Contraception. Currents and Future Prospects Clinical Endocrinology ; 29 (24): (1988) 443-465.

7. A. Karakut,S.Dalkara, Eur.J.Med.chem.36.(2001) 421-433.

8. D.Y.N. Jayaraju, Vashisht Gopal. Anand K.Kondapi ; Archives of Biochemistry and Biophycis Vol. 369 (1) (1999) 68-77.

9. P. Jakob, Ley and Heinz- Jurgen Bertram Bioorganic and Medicinal Chemistry 9 (2001)1879-1885.

10. S. Brill, J. Dinardo, S. Voelkel, K. Meimanam, and, R. Sternglanz. Nature (1987) 326, 414-416

11. J. New port, cell 48 (1987) 219-230.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-07-22]