

تأثیر ترکیب جدیدی از فنانترولین بر میزان تستوسترون و اثرات ضد باروری آن در موش‌های نر بالغ نژاد Balb/C

مهرداد شریعتی^۱، کاظم پریور^۲، شهربانو عریان^۲، عباس شکروی^۳، ربابه علیزاده^۴

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به مشکل رشد جمعیت و گسترش روش‌های پیش‌گیری از باروری در مردان، استفاده از ترکیبات شیمیایی با خاصیت کاهش باروری به شکل برگشت پذیر در مردان مد نظر قرار گرفته است. در این پژوهش تأثیر یکی از مشتقات جدید فنانترولین به نام ۲ و ۶-دی آمینو پیریدینیوم که در شرایط مناسب در آزمایشگاه شیمی آلی دانشگاه تربیت معلم سنتز شده است، بر محور هورمونی هیپوفیز-گناد و تغییرات بافت بیضه و تولید اسپرم در سال ۸۲-۱۳۸۱ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی که در محیط آزمایشگاهی انجام شد، تعداد ۵۰ موش سوری نر بالغ نژاد Balb/C انتخاب و به پنج گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه اول هیچ دارویی دریافت نکرده و به گروه دوم سرم نمکی تزریق شد و سه گروه تجربی دیگر مقادیر ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از ترکیب ۲ و ۶-دی آمینو پیریدینیوم به عنوان دوزهای زیرکشنده به صورت داخل صفاقی به مدت بیست روز به شکل یک روز در میان دریافت کردند. سپس مقادیر هورمون‌های FSH و LH و تستوسترون در سرم اندازه‌گیری و بیضه‌ها خارج و از نظر هیستولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج با آزمون آماری آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد مقدار ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از ترکیب ۲ و ۶-دی آمینو پیریدینیوم، سطح تستوسترون سرم را به طور معنی داری کاهش می‌دهد ولی در سطح سرمی هورمون‌های FSH و LH کاهش معنی داری دیده نشد. بررسی‌های هیستولوژیکی بر روی بافت بیضه، کاهش معنی داری را در تعداد انواع سلول‌های جنسی نشان داد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان بیان کرد که این مشتق از ترکیب مس‌دار فنانترولین با دوز ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در موش‌ها، احتمالاً از طریق تأثیر مستقیم بر بافت بیضه باعث تضعیف عملکرد آن و کاهش میزان تستوسترون و تولید اسپرم می‌گردد.

واژگان کلیدی: فنانترولین، محور هیپوفیز-گناد، بافت بیضه، اسپرماتوژنز

مقدمه

تحولات علمی و پیشرفت‌های فن آوری منجر به کنترل بسیاری از بیماری‌ها، افزایش طول عمر، کاهش میزان مرگ و میر و در نتیجه افزایش رشد جمعیت در کشورهای در حال توسعه شده است. امروزه اکثر روش‌های جلوگیری از باروری توسط خانم‌ها اعمال می‌شود و با توجه به مضراتی که در بعضی از موارد وجود دارد (۲،۱) لازم است آقایان نیز در این امر مشارکت فعال و عملی داشته باشند. در حال حاضر این

مشارکت محدود به استفاده از کاندوم و بستن مجرای وازو دفران می‌باشد (۳). در بعضی افراد استفاده از روش‌های مذکور مشکل و گاهی غیر ممکن است. کشف گوسیپول به عنوان یک ماده‌ی ضد باروری مردانه، پس از مشاهده‌ی کاهش شدید باروری در یکی از روستاهای چین که استفاده از روغن دانه‌های پنبه همراه با ذرات گیاه، مرسوم بود، مطرح شد (۴). ادامه‌ی این مطالعات منجر به کشف چند گروه دارویی با اثرات ضد باروری مردانه نظیر سولفونامیدها،

^۳ دکترای شیمی، دانشیار دانشگاه تربیت معلم تهران

^۴ دانشجوی دکترای شیمی، دانشگاه تربیت معلم تهران

^۱ دانشجوی دکترای زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^۲ دکترای زیست شناسی، استاد دانشگاه تربیت معلم تهران

نیتروفوران‌ها و مشتقات کینین شد (۷،۶،۵).

از آنجا که ترکیب فنانترولین به عنوان یک نشان‌گر آهن در علم شیمی کاربرد دارد (۸) و از نظر بیولوژیکی دارای خاصیت مهارتی بر بلوغ اسپرم می باشد (۹)، و همچنین قبلاً مشتق دیگری از آن که حاوی کبالت می باشد نیز مورد آزمایش قرار گرفته است (۱۰)، اثرات استخلاف جدید حاوی مس از این ترکیب بر روند تولید اسپرم مورد آزمایش قرار گرفت. تاکنون تأثیر مشتق‌های گوناگونی از فنانترولین بر حیات اسپرم مورد بررسی قرار گرفته است، که نشان‌گر تضعیف بلوغ اسپرم در اثر استفاده از این ترکیب‌ها بوده است (۱۱). در این بررسی اثرات مشتق جدیدی از ترکیب مس‌دار فنانترولین با نام شیمیایی ۶و۲ - دی آمینو پیریدینیوم - ۱ و ۱۰ - فنانترولین - ۹و۲ - دکربوکسیلات^۱ بر فرآیند تولید اسپرم و محور هورمونی هیپوفیز - گناد در موش‌های سوری نر بالغ مورد بررسی قرار گرفت تا از نتایج حاصل بتوان در طراحی و سنتز داروهای جدید ضد باروری مردانه با فعالیت اختصاصی تر استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ی تجربی در محیط آزمایشگاهی در سال ۸۱-۱۳۸۰ انجام شد. ابتدا مشتق جدیدی از ترکیب مس‌دار فنانترولین (۶و۲ - دی آمینو پیریدینیوم ۱ و ۱۰ - فنانترولین - ۹و۲ - دکربوکسیلات) به صورت پودر سبزرنگ و بی بو در شرایط مناسب در آزمایشگاه شیمی آلی دانشگاه تربیت معلم تهران تهیه شد و به روش ترکیب نوبلور در آب مقطر تعیین خلوص شد (۱۲). حلال این ترکیب سرم فیزیولوژی بود، که در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد برای حل کردن و تزریق استفاده شد. موش‌های نر بالغ از نژاد Balb/C در محدوده‌ی وزنی ۲۵-۳۰ گرم از حیوان‌خانه‌ی دانشکده‌ی علوم پزشکی شیراز تهیه شدند و تحت شرایط استاندارد (۱۴ ساعت روشنایی، ۱۰ ساعت تاریکی و حرارت

۲۱±۲ درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شده و به آب و غذا به مقدار کافی دسترسی داشتند. ۵۰ سر موش سوری نر به پنج گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. یک گروه به عنوان گروه کنترل هیچ دارویی دریافت نکردند، گروه دوم به عنوان گروه شام سرم فیزیولوژی به عنوان حلال دارو دریافت کردند و سه گروه تجربی دیگر به مدت بیست روز، یک روز در میان دارو به مقادیر ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن دارو دریافت کردند. این کار پس از تعیین دوز کشنده‌ی دارو^۲ که ۳۵ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن بود، انجام شد. تزریق در گروه دوم و گروه‌های تجربی به صورت داخل صفاقی انجام شد. به این دلیل که دوره‌ی زمانی تکامل اسپرم در موش در حدود ۳۵ روز به طول می انجامد و در بیست روز اول تغییرات تمایزی زیادی انجام می پذیرد (۱۳)، تزریق به مدت بیست روز، به صورت یک روز در میان انجام شد. بعد از گذشت بیست روز از اولین تزریق، موش‌ها را پس از توزین با گیوتین کشته و خون آن‌ها برای اندازه‌گیری غلظت هورمون‌های تستوسترون، LH و FSH در لوله‌های آزمایش تمیز جمع‌آوری شد. سپس سرم با سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰ در دقیقه جدا شده و تا زمان اندازه‌گیری در سرمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. کیت‌های سنجش هورمونی با استفاده از روش رادیوایمونواسی ساخت شرکت Radim با دقت ۰/۱ توسط دستگاه گاماکانتر مدل Kentron ساخت سوئیس به کار رفت. همچنین شکم حیوانات باز شده و هر دو بیضه خارج شد. ابتدا حجم و وزن بیضه اندازه‌گیری و پس از رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، تعداد سلول‌های سرتولی، لیدینگ، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید تعیین شد.

برای تعیین حجم بیضه ابتدا قطر بزرگ و کوچک بیضه‌ها توسط کولیس اندازه‌گیری شده و با استفاده از فرمول:

$$V = \left(\pi \times \frac{D^2}{4} \right) L K$$

که در آن V معادل حجم، D معادل قطر

^۱ Lethal Dose 50

^۲ 2,6-Diaminopyridinum 1,10-Phenanthroline-2,9-dicarboxylate

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار غلظت هورمون های تستوسترون، LH و FSH پس از تجویز دوزهای مختلف ۲ و ۶- دی آمینو پیریدینیوم در مقایسه با گروه کنترل در موش های نر

گروه ها	میزان دریافت فنانترولین (میلی گرم بر کیلوگرم)	تستوسترون (نانوگرم بر میلی لیتر)	LH (میلی واحد بر میلی لیتر)	FSH (میلی واحد بر میلی لیتر)
کنترل	—	$3/3 \pm 0/1$	$0/78 \pm 0/03$	$2/1 \pm 1$
شم	—	$3/4 \pm 0/1$	$0/77 \pm 0/03$	$2/1 \pm 0/1$
تجربی ۱	۱۵	$3/2 \pm 0/2$	$0/74 \pm 0/03$	$2/1 \pm 0/1$
تجربی ۲	۲۰	$3 \pm 0/1$	$0/72 \pm 0/04$	$2/1 \pm 0/1$
تجربی ۳	۲۵	$1 \pm 0/04^*$	$0/71 \pm 0/04$	$2/1 \pm 0/2$

* $P \leq 0/05$

بزرگ و ضریب K معادل ۰/۹ است، محاسبه شد (۱۴). تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد و میانگین و انحراف معیار گروه ها تعیین و تفاوت بین گروه ها با آزمون تی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها

آزمون های هورمونی: بررسی سطح هورمون های تستوسترون، LH و FSH در سرم نشان داد که میانگین غلظت هورمون تستوسترون در گروه تجربی پس از دریافت ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از ترکیب فوق، در مقایسه با سایر گروه های آزمایش و نیز گروه کنترل و گروه شم کاهش معنی داری یافته ($P \leq 0/05$) و به $1/03 \pm 0/04$ نانوگرم بر میلی لیتر رسید، در حالی که اختلاف میانگین غلظت هورمون های LH و FSH در گروه های مختلف آزمایش معنی دار نبود (جدول ۱).

حجم و وزن بیضه: نتایج نشان داد که هیچ گونه اختلاف معنی داری در میانگین حجم بیضه و وزن آن در گروه های مختلف آزمایش وجود نداشت. هم چنین وزن بدن در موش های دریافت کننده ترکیب با گروه کنترل و نیز با زمان قبل از دریافت ترکیب فوق تفاوت معنی داری نداشت. **نتایج بافت شناسی بیضه:** میانگین تعداد سلول های سرتولی در گروه های مختلف آزمایش اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۲).

نتایج نشان داد که تعداد سلول های لیدیگ در گروه تجربی با تزریق ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از ترکیب فوق نسبت به سایر گروه های آزمایش کاهش معنی داری داشت ($P \leq 0/05$)، ولی در دو گروه تجربی دیگر با تزریق ۱۵ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از ترکیب سنتز شده اختلاف معنی داری از نظر تعداد سلول های لیدیگ در مقایسه با سایر گروه های آزمایش وجود نداشت (جدول ۳).

میانگین تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری داشت ($P \leq 0/05$) به طوری که در گروه تجربی با تزریق ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار تعداد سلول های سرتولی در یک لوله پس از تجویز داخل صفاقی دوزهای مختلف ۲ و ۶- دی آمینو پیریدینیوم در مقایسه با گروه کنترل در موش های نر

گروه ها	میزان دریافت فنانترولین (میلی گرم بر کیلوگرم)	سلول های سرتولی
کنترل	—	$21/1 \pm 0/8$
شم	—	$19/3 \pm 1/1$
تجربی ۱	۱۵	$20/5 \pm 0/9$
تجربی ۲	۲۰	$17/5 \pm 1/1$
تجربی ۳	۲۵	$16 \pm 0/9$

P:NS

جدول ۳ - میانگین و انحراف معیار تعداد سلول‌های لیدیگ در لوله پس از تجویز داخل صفاقی دوزهای مختلف ۷۲- دی آمینو پیریدینیوم در مقایسه با گروه کنترل در موش‌های نر

گروه‌ها	میزان دریافت فنانتروлін (میلی گرم بر کیلو گرم)	سلول‌های لیدیگ
کنترل	—	70.0 ± 2.9
شم	—	71.6 ± 2.7
تجربی ۱	۱۵	71.5 ± 1.3
تجربی ۲	۲۰	57.9 ± 1.4
تجربی ۳	۲۵	$44.0 \pm 1.2^*$

* $P \leq 0.05$

ترکیب فوق بیشترین اختلاف معنی دار در میانگین تعداد اسپرماتوزوئید در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایش دیده شد ($P \leq 0.01$) (جدول ۴).

بحث

نتایج مطالعه نشان داد که استفاده از ترکیب ۲ و ۶ دی آمینو پیریدینیوم بدون کاهش در وزن و حجم بیضه‌ها می‌تواند تعداد سلول‌های لیدیگ و سلول‌های دودمان اسپرماتوزوئید را کاهش داده و از سطح سرمی تستوسترون بکاهد. برخی از ترکیبات دارویی می‌توانند نقش یک رهبر و راهنما را ایفا کنند، زیرا تغییر و اصلاح ساختمان شیمیایی آن‌ها منجر به تولید مشتقاتی می‌شود که خصوصیات مورد نظر را در حد

ایده آلی داشته باشند. همان‌گونه که حدود دو دهه پس از کشف سولفونامیدها در سال ۱۹۳۰، مطالعه‌ی اثرات جانبی آن‌ها منجر به عرضه‌ی داروهای مهار کننده آنزیم انیدراز کربنیک مانند استازولامید و مواد کاهش دهنده‌ی قند خون مانند کلرپروپامید شد. بررسی‌های به عمل آمده نشان داده است که مواد مختلفی از قبیل ترکیبات ضد سرطان و کادمیوم می‌تواند تولید اسپرماتوزوئید را متوقف کنند ولی اثرات غیر قابل برگشت و سمیت بعضی از آن‌ها مانع از استفاده آن‌ها در بالین می‌شود (۱۵). هم‌چنین مشخص شده است که تری متوپریم بدون تأثیر بر غلظت تستوسترون سرم سبب کاهش باروری می‌شود (۱۶).

در این مطالعه اثرات ضد باروری مشتق جدیدی از ترکیب مس‌دار فنانتروлін بر موش سوری بالغ مورد پژوهش قرار گرفت تا از نتایج حاصل از آن در طراحی و سنتز داروهای جدید ضد باروری مردانه استفاده شود (۱۷). بررسی میانگین تغییرات وزن بدن و بیضه‌ها در گروه‌های پنج گانه این مطالعه نشان دهنده‌ی طبیعی بودن روند رشد و نمو حیوانات بود و شاید عدم تأثیر این دارو بر روی وزن بدن و بیضه‌ها را بتوان از امتیازات تجویز این ترکیب جدید به شمار آورد.

با توجه به نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌شود که این ترکیب جدید سنتز شده احتمالاً می‌تواند با تأثیر مستقیم

جدول ۴ - میانگین و انحراف معیار تعداد سلول‌های دودمان اسپرم در یک لوله پس از تجویز داخل صفاقی دوزهای مختلف ۷۲- دی آمینو پیریدینیوم در مقایسه با گروه کنترل در موش‌های نر

گروه‌ها	میزان دریافت فنانتروлін (میلی گرم بر کیلو گرم)	اسپرماتوگونی	اسپرماتوسیت	اسپرماتید	اسپرماتوزوئید
کنترل	—	48 ± 1.6	82 ± 2.5	148 ± 4.8	675 ± 9.9
شم	—	49 ± 2.1	81 ± 3.2	149 ± 6.3	660 ± 31.4
تجربی ۱	۱۵	$41 \pm 1.4^*$	$65 \pm 2.6^*$	$108 \pm 3.8^*$	$539 \pm 13.2^*$
تجربی ۲	۲۰	$33 \pm 1.1^*$	$42 \pm 1.9^*$	$88 \pm 4.1^*$	$324 \pm 21.6^*$
تجربی ۳	۲۵	$22 \pm 1.4^*$	$17 \pm 0.6^*$	$54 \pm 3.8^*$	$33 \pm 3^{***}$

* نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار با گروه کنترل است ($P < 0.05$).

**نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار با گروه کنترل است ($P < 0/01$).

حداکثر (۲۵ میلی گرم بر کیلو گرم) از دارو می باشد. بنابراین بررسی های فراساختاری بیضه، مطالعه رفتارهای جنسی، تغییرات هورمونی در سطح هیپوتالاموس و تغییرات رشد و نمو جنینی تحت تأثیر این ترکیب جدید در پژوهش های آینده کمک کننده بوده و می تواند راهنمای خوبی برای ارزیابی داروهای ضد باروری مردانه باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولان و کارکنان محترم دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده پزشکی و دامپزشکی شیراز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران صمیمانه سپاس گزاری می شود.

بر سلول های بینابینی باعث کاهش تعداد و فعالیت آنها شده و ترشح هورمون تستوسترون را کاهش دهد ولی بر روی غده هیپوفیز از جهت ترشح گنادوتروپین ها بی تأثیر است (۱۸).

همچنین به نظر می رسد این دارو با مقادیر تزریق شده به علت اثر مستقیم آن برایی تلوم لوله های منی ساز احتمالاً باعث کاهش تعداد سلول های دودمانی سازنده اسپرم می شود و حداکثر دوز دارو، بیشترین کاهش تعداد سلول ها را القاء می کند. کاهش معنی دار روند تولید اسپرم ($P \leq 0/05$) در بین گروه های تجربی در مقایسه با یکدیگر و گروه های کنترل و شم نشان دهنده بیشترین تأثیر در شرایط استعمال دوز

منابع

۱ - وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - وزارت آموزش و پرورش، آموزش مفاهیم جمعیت. *مجله دانشکده پزشکی تهران* ۱۳۷۵؛ سال ۲، شماره ۳: صفحه ۲۳.

- 2-Wu FCW. Male contraception: current status and future prospect. *Clin Endocrinol* 1981; 29: 443-65.
- 3- Stephan A. Prospects for pharmacological male contraception. *Drugs* 1994 ;48:851-63.
- 4- Taylor GT, Griffin MG, Bardgett M. Search for a male contraceptive: the effect of gossypol on sexual motivation and epididymal sperm. *J Med* 1991; 22: 29-43.
- 5- Costenito MJ, Pakyz RE, Fried J. An approach to the development of a male contraceptive. *Natl Acad Sci* 1990; 87:1431-5.
- 6- Karol HJ. Nitrofurans in treatment of malignant testicular tumors. *J Jrol* 1960; 84:120-2.
- 7- Natalie PGS. Inhibition of the metabolism and motility of human spermatozoa by various alkaloids. *Contraception* 1982; 25: 69-87.
- 8 - Skoog D, West D, Holler F. *Analytical Chemistry*. 5 th ed. New York: W.B. Saunders Co; 1988: 326.
- 9 - Gottlieb E, Meizel S. Biochemical studies of metalloendoprotease activity in the spermatozoa of three mammalian species. *Andrology* 1987; 8: 14 - 24.
- 10- Shockravi A, Alizadeh R, Aghabozorg H, Moghimi A. Synthesis & crystal structure determination of the first 1,10-Phenanthroline-2,9- dicarboxylate containing complex, using a novel 1:1 proton- transfer compound of 1,10-Phenanthroline-2,9- dicarboxylic acid with 2,6- diaminopyridine. *Inorg Chem* 2003; 42: 1616-24.
- 11 - Sadeghipour Roodsarie H, Vosooghi M, Zahraie M. The synthesis and evaluation of new derivatives of 2,4 diaminopyridines with male contraceptive activity. *MJIRI* 1999;13: 27 - 32.
- 12- Moghimi A, Alizadeh R, Shokrollahi A, Shamsipur M, Aghabozorg H, Shockravi A. A new strategy for the one-post synthesis of metal Complex- Organo- Networks employing a proton- transfer compound derived from the 1,10-Phenanthroline-2,9- dicarboxylic acid, The case of copper (II). *Inorg Chem* 2003; In press.
- 13 - Gilbert SF. *Developmental Biology*. 5 th ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc; 1997: 855-8.

- 14- Courtade M, Lagorce C, Bujan L. Clinical characteristics and light and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. *Fertile Steril* 1998; 70 : 297-304.
- 15- Willson JD. *Androgens*. in: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. New York: MC GrawHill Co; 1996: 1454.
- ۱۶- صادقی پور رودسری حمید رضا. ارزیابی اثرات ضد باروری مردانه تری متوپریم و ۲ و ۴ - دی آمینو - ۵ (۳و۴- دی کلروفیل) - ایزوپروپیل اکسی متیل پریمیدین در موش صحرایی نر. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران* ۱۳۷۷؛ سال ۵، تک شماره: صفحات ۴۰-۳۶.
- 17-Dony Y, Cruz OJ, Uckun FM. Spermicidal activity of oxovanadium Complexes of 1,10- Phenanthroline, 2,2-bipyridil and derivatives in human. *Biol Reprod* 1999; 60:435-44.
- 18-Grizard G, Artonne C. Effect of short term starvation on leydig cell function in adult rat. *Andrology* 1997;38:207-17.