

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

مهرداد شریعتی*، دکتر کاظم پریور**، دکتر شهربانو عریان**، دکتر عباس شکروی***
ربابه عزیزاده****

چکیده:

فنانترولین ها گروهی از ترکیبات آلی هستند که توانایی ترکیب با یونهای فلزی و انتقال آنها از جداره غشای پلاسمایی را دارند و به علت ویژگیهای یونوفوریک (یون خواهی)، کاربرد گسترده‌ای در پژوهشهای شیمی و بیولوژی دارند. در این پژوهش تأثیر یکی از مشتقات جدید فنانترولین به نام 2,6-Diaminopyridinum یا $(Cu)^{2+}$ -1,10-Phenanthroline-2,9-dicarboxylate که در شرایط مناسب در آزمایشگاه شیمی آلی دانشگاه تربیت معلم تهران سنتز شده بود بر محور هورمونی هیپوفیز-گناد و تغییرات بافت بیضه و اسپرماتوژنز مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به ساختار این ترکیب میتوان آن را به عنوان یک عامل شلاته کننده محسوب کرد. به دلیل جدید بودن این ترکیب تصمیم گرفته شد که از آن، جهت بررسی محور هورمونی هیپوفیز - گناد و اسپرماتوژنز استفاده شود. برای این منظور از موشهای سوری نر بالغ نژاد Balb/C استفاده شد و پس از تعیین مقدار LD_{50} که ۳۵ میلی گرم بر وزن بدن بر حسب کیلو گرم بدست آمد مقادیر ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به عنوان دوزهای زیر کشنده از ترکیب مذکور به صورت داخل صفاقی به مدت بیست روز به حیوانات تزریق شد در حالیکه گروه شاهد فقط حلال دارو (سرم نمکی) را دریافت کردند. نتایج حاصله در مورد سنجش های هورمونی نشان داد مقدار ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از این ترکیب سطح تستوسترون سرم خون را به میزان ۵/۶۸٪ کاهش داد که از نظر آماری معنی دار بود ولی در سطح هورمونهای FSH و LH سرم خون کاهش معنی داری دیده نشد. بررسی های هیستولوژیکی بر روی بافت بیضه نشان داد که تعداد سلولهای اسپرم در غلظت های ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به ترتیب ۲/۲۰٪، ۱/۵۲٪ و ۲/۹۵٪ کاهش یافته اما هیچگونه اثرات جانبی زیان آوری از تزریق این ماده مشاهده نشد. بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق می توان اعلام کرد که این مشتق از ترکیبات 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 اسپرماتوژنز میگردد.

کلید واژه ها: اسپرم سازی / تستوسترون / داروهای پیشگیری از آبستنی / فنانترولین ها / موش

* عضو هیأت علمی گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون

** استاد گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران

*** دانشیار گروه شیمی دانشکده شیمی دانشگاه تربیت معلم تهران

**** دانشجوی دوره دکتری شیمی دانشگاه تربیت معلم تهران

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 زنان اعمال میگردد و با توجه به مضراتی که در بعضی از موارد وجود دارد (۱،۲) لازم است مردان نیز در این امر مشارکت فعال و عملی داشته باشند که در حال حاضر محدود به استفاده از کاندوم و بستن مجرای واژدفران میباشد (۳) که در بعضی افراد استفاده از روشهای مذکور مشکل و گاهی غیر ممکن است. کشف گوسپیول به عنوان یک ماده ضد باروری مردانه پس از مشاهده کاهش شدید باروری در یکی از روستاهای چین که از روغن دانه های پنبه همراه با ذرات گیاه اسـتفاده می کردند، مسئله استفاده مردان را از داروهای ضد باروری مطرح کرد (۴). ادامه این مطالعات منجر به کشف چند گروه دارویی با اثرات ضد باروری مردانه نظیر سولفونامیدها، نیتروفورانها و مشتقات کینین شد (۵-۷). از آنجا که ترکیب فنانترولین به عنوان یک شناساگر آهن در علم شیمی کاربرد دارد (۸) و از نظر بیولوژیکی دارای خاصیت مهارتی بر بلوغ اسپرم می باشد (۹)، اثرات استخلاف جدیدی از این ترکیب بر روند اسپرماتوزن مورد آزمایش قرار گرفت. تاکنون تأثیر مشتقات مختلفی از فنانترولین ها بر حیات اسپرم مورد بررسی قرار گرفته، که بیانگر تضعیف بلوغ اسپرم در اثر استفاده از این ترکیبات بوده است (۱۰).

در این بررسی اثرات مشتق جدیدی از ترکیبات فنانترولین با نام شیمیائی:

$1,10\text{-Phenanthroline-2,9-dicarboxylate}(\text{Cu})^{2+}$ یا $2,6\text{-Diaminopyridinum}$ بر فرآیند تولید اسپرم و محور هورمونی هیپوفیز - گناد در موش های 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.

روش کار:

مشتق جدید فنانترولین 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 گردید (۱۱). حلال این ترکیب سرم فیزیولوژی بود که در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای حل کردن و تزریق استفاده شد. رنگ آمیزی مورد استفاده نیز جهت بافت بیضه هماتوکسیلین - اتوزین بود.

موش های نر بالغ از نژاد Balb/C در محدوده وزنی ۲۵-۳۰ گرم از حیوان خانه دانشکده علوم پزشکی شیراز تهیه شدند و تحت شرایط استاندارد (۱۴ ساعت روشنایی، ۱۰ ساعت تاریکی و حرارت 21 ± 2 درجه سانتیگراد) نگه داری شده و حیوانات به آب و غذا به مقدار کافی دسترسی داشتند.

تعداد ۵۰ سر موش سوری نر به پنج گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل که هیچگونه دارویی دریافت نکردند، گروه شم سرم فیزیولوژی به عنوان حلال دارو دریافت کردند و سه گروه تجربی که دارو به مقادیر ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. به این دلیل که دوره زمانی تکامل اسپرم در موش ۳۵ روز به طول می انجامد و در بیست روز اول تغییرات تمایزی زیادی انجام می پذیرد (۱۲)، تزریق به مدت بیست روز یک روز در میان انجام شد. تزریق در گروه شم و گروههای تجربی به صورت داخل صفاقی صورت گرفت. بعد از گذشت بیست روز از اولین تزریق موشها پس از توزین با گیوتین کشته شده و خون آنها برای اندازه گیری غلظت هورمونهای تستوسترون، LH و FSH در لوله های آزمایش تمیز جمع آوری شد، سپس سرمهای حیوانات با سانتریفوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه جدا شده و تا زمان اندازه گیری در سرمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. اندازه گیری هورمونی بر اساس روشهای معمول با استفاده از روش RIA انجام گرفت. همچنین شکم حیوانات بازگردیده و هر دو بیضه خارج شدند تا شاخصهای زیر تعیین گردند:

تغییرات حجم و وزن بیضه، تغییرات تعداد سلولهای سرتولی، لیدیک، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید.

برای تعیین حجم بیضه ابتدا قطر بزرگ و کوچک بیضه ها توسط کولیس اندازه گیری شده و با استفاده از فرمول (۱۳):

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

، $D =$ قطر کوچک، $V =$ حجم، $K =$ ضریب

بررسی تغییرات تعداد سلولهای سرتولی و لیدیگ: باتوجه به جدول ۳ میانگین تعداد سلولهای سرتولی در گروههای مختلف آزمایش اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند، در حالی که میانگین تعداد سلولهای لیدیگ در گروه تجربی ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به سایر گروههای آزمایش کاهش معنی داری یافته است ($P \leq 0/05$) ولی در گروههای تجربی ۱۵ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اختلاف معنی داری در مقایسه با سایر گروههای آزمایش وجود ندارد.

جدول ۳: میانگین تعداد سلولهای سرتولی و لیدیگ در گروههای مختلف و مقایسه آماری آنها با گروه کنترل

گروهها	میانگین تعداد سلولهای سرتولی در یک لوله ($\chi \pm SEM$)	میانگین تعداد سلولهای لیدیگ ($\chi \pm SEM$)
کنترل	۲۱/۱۰ ± ۰/۷۶	۷۰/۱۰ ± ۲/۹۳
شم	۱۹/۳۰ ± ۱/۰۷	۷۱/۶۰ ± ۲/۶۵
۱۵ mg/kgB.W.	۲۰/۵۰ ± ۰/۹۲	۷۱/۵۰ ± ۱/۲۹
	۱۷/۵۰ ± ۱/۰۲	۵۷/۹۰ ± ۱/۴۴
	۱۶/۰۰ ± ۰/۹۱	۴۴/۰۰ ± ۱/۲۰*

* نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار با گروه کنترل است. ($P \leq 0/05$)

بررسی تغییرات تعداد سلولهای دودمان اسپرم: همانگونه که در جدول ۴ نشان داده شده است میانگین تعداد سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید در گروههای تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری دارد ($P \leq 0/05$) که در گروه تجربی ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن بیشترین اختلاف معنی دار در میانگین تعداد اسپرماتوزوئید در مقایسه با سایر گروههای آزمایش دیده میشود ($P \leq 0/01$).

جدول ۴: میانگین تعداد سلولهای دودمان اسپرم در گروههای مختلف و مقایسه آماری آنها با گروه کنترل

گروهها	میانگین تعداد سلولهای اسپرماتوسیت اولیه در یک لوله ($\chi \pm SEM$)	میانگین تعداد سلولهای اسپرماتوسیت اولیه در یک لوله ($\chi \pm SEM$)	میانگین تعداد سلولهای اسپرماتوزوئید در یک لوله ($\chi \pm SEM$)	میانگین تعداد سلولهای اسپرماتوزوئید در یک لوله ($\chi \pm SEM$)
کنترل	۴۷/۸۰ ± ۱/۵۸	۸۱/۵۰ ± ۲/۵۳	۱۴۷/۶۰ ± ۴/۸۳	۶۷۴/۸۰ ± ۹/۹۳
شم	۴۹/۲۰ ± ۲/۰۷	۸۰/۸۰ ± ۳/۲۵	۱۴۸/۸۰ ± ۶/۳۸	۶۶۰/۴۰ ± ۳/۱۳۹
۱۵mg/kgB.W.	۴۰/۷۰ ± ۱/۳۸*	۶۵/۱۰ ± ۲/۵۷*	۱۰۷/۵۰ ± ۳/۸۵*	۵۳۸/۸۰ ± ۱۳/۱۷*
	۳۲/۸۰ ± ۱/۱۵*	۴۱/۷۰ ± ۱/۹۲*	۸۸/۲۰ ± ۴/۱۵*	۳۲۳/۷۰ ± ۲۱/۵۹*
	۲۵mg/kgB.W.	۲۱/۸۰ ± ۱/۳۸*	۱۷/۵۰ ± ۰/۵۶*	۵۳/۷۰ ± ۳/۷۶*

* نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار با گروه کنترل است ($P \leq 0/05$)

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

L= قطر بزرگ و ضریب $K=0/9$ حجم نهایی بیضه ها محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها: آزمون آماری مورد استفاده آنالیز واریانس یک طرفه بوده و میانگین و انحراف معیار به صورت $Mean \pm SEM$ بیان گردید. در ضمن، تفاوت بین گروهها با $P \leq 0/05$ و $P \leq 0/01$ به صورت یک ستاره و دو ستاره نشان داده شد.

نتایج:

بررسی سطح هورمونهای تستوسترون، LH و FSH در سرم: همانگونه که در جدول ۱ نشان داده شده است میانگین غلظت هورمون تستوسترون در گروه تجربی ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با سایر گروههای آزمایش کاهش معنی داری یافته ($P \leq 0/05$)، در حالی که اختلاف میانگین غلظت هورمونهای LH و FSH در گروههای مختلف آزمایش معنی دار نیست.

جدول ۱: میانگین غلظت هورمون های اندازه گیری شده در گروههای مختلف و مقایسه آماری آنها با گروه کنترل

گروهها	میانگین غلظت تستوسترون (ng/ml) ($\chi \pm SEM$)	میانگین غلظت LH (mIU/ml) ($\chi \pm SEM$)	میانگین غلظت FSH (mIU/ml) ($\chi \pm SEM$)
کنترل	۳/۲۷ ± ۰/۰۹	۰/۷۷۸ ± ۰/۰۳	۲/۱۴۱ ± ۰/۰۹
شم	۳/۴۳ ± ۰/۱۰	۰/۷۷۵ ± ۰/۰۳	۲/۱۳۴ ± ۰/۱۴
۱۵ mg/kgB.W.	۳/۲۲ ± ۰/۱۵	۰/۷۳۶ ± ۰/۰۳	۲/۱۰۷ ± ۰/۰۵
	۲/۹۷ ± ۰/۱۲	۰/۷۱۹ ± ۰/۰۴	۲/۱۲۸ ± ۰/۱۲
	۱/۰۳ ± ۰/۰۴*	۰/۷۰۸ ± ۰/۰۴	۲/۰۹۷ ± ۰/۱۹

* نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار با گروه کنترل است ($P \leq 0/05$)

بررسی تغییرات حجم و وزن بیضه: نتایج حاصل از جدول ۲ نشان میدهد که هیچ گونه اختلاف معنی داری در میانگین حجم و وزن بیضه در گروههای مختلف آزمایش وجود ندارد.

جدول ۲: میانگین حجم و وزن بیضه در گروههای مختلف و مقایسه آماری آنها با گروه کنترل

گروهها	میانگین حجم بیضه (mm) ³ ($\chi \pm SEM$)	میانگین وزن بیضه (mg) ($\chi \pm SEM$)
کنترل	۴/۱۲۱ ± ۰/۰۴	۰/۱۸۸ ± ۰/۰۰۵
شم	۳/۹۸۴ ± ۰/۱۰	۰/۱۸۶ ± ۰/۰۰۴
۱۵ mg/kgB.W.	۴/۰۰۱ ± ۰/۰۵	۰/۱۸۴ ± ۰/۰۰۴
	۳/۹۶۱ ± ۰/۰۵	۰/۱۸۶ ± ۰/۰۰۵
	۳/۸۱۶ ± ۰/۰۴	۰/۱۷۸ ± ۰/۰۰۳

وزن بدن و بیضه ها را بتوان از امتیازات تجویز این ترکیب جدید به شمار آورد.

با توجه به نتایج بدست آمده می توان پیشنهاد نمود که این ترکیب جدید ممکن است با تأثیر مستقیم بر سلولهای بینابینی باعث کاهش تعداد و فعالیت آنها شده و ترشح هورمون تستوسترون را کاهش دهد ولی بر روی غده هیپوفیز در جهت ترشح گنادوتروپین ها بی تأثیر است (۱۷). همچنین این دارو با مقادیر تزریق شده به علت اثر مستقیم آن بر اپیتلیوم لوله های سمینفر احتمالاً باعث کاهش تعداد سلولهای دودمانی سازنده اسپرم می شود که دوز ماکزیمم دارو بیشترین اثر کاهنده تعداد سلولها را القاء می نماید.

کاهش معنی دار روند اسپرماتوژنز در سطح ($P \leq 0.05$) در بین گروههای تجربی در مقایسه با گروههای کنترل و شم نشان دهنده بیشترین تأثیر در شرایط استعمال دوز حداکثر (25 mg/kg B.W) 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 مناسبی برای ارزیابی داروهای ضد باروری مردانه باشد.

سپاسگزاری:

بدینوسیله از مسئولان و کارکنان محترم دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده پزشکی و دامپزشکی شیراز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران صمیمانه سپاسگزاری می شود.

منابع:

۱. وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی. آموزش مفاهیم جمعیت. سال دوم، شماره ۳، ۱۳۷۵: ۲۳.
۲. Wu FCW. Male Contraception: Current status and future prospect. Clin Endocrinol 1981; 29: 443-65.
۳. Stephan A. Prospects for pharmacological male contraception. Drugs 1994; 48: 851-63.
۴. 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.

بررسی تغییرات وزن بدن: بر اساس نتایج جدول ۵ میانگین وزن بدن حیوانات در گروههای مختلف آزمایش هیچ گونه اختلاف معنی داری نسبت به یکدیگر ندارند.

جدول ۵: میانگین وزن بدن در گروههای مختلف و مقایسه آماری آنها با گروه کنترل

میانگین وزن بدن (g) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	گروهها	
$30/60 \pm 0/95$	کنترل	
$31/10 \pm 1/53$	شم	
$30/60 \pm 1/08$	۱۵ mg/kg B.W.	تجربی
$29/60 \pm 1/50$	۲۰ mg/kg B.W.	
$27/50 \pm 0/79$	۲۵ mg/kg B.W.	

بحث:

برخی از ترکیبات دارویی میتوانند نقش یک رهبر و راهنما را ایفا نمایند (Lead Compound) زیرا تغییر و اصلاح ساختمان شیمیایی آنها منجر به تولید مشتقاتی میگردد که خصوصیات مورد نظر را در حد ایده آلی داشته باشند. همانگونه که حدود دو دهه پس از کشف سولفونامیدها در سال ۱۹۳۰، مطالعه اثرات جانبی آنها منجر به عرضه داروهای مهار کننده آنزیم انهیدراز کرینیک مانند استازولامید و مواد کاهش دهنده قند خون مانند کلر پروپامید گردید. بررسی های بعمل 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 کلینیک می گردد (۱۴) و نیز مشخص شده است که تری متوپریم بدون تأثیر بر غلظت تستوسترون سرم سبب کاهش باروری می شود (۱۵).

در این مطالعه اثرات ضد باروری مشتق جدیدی از فنانترولین 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 (۱۶).

نتایج حاصل از آزمایشهای بعمل آمده و مقایسه این نتایج در پنج گروه آزمایش بیانگر تأثیر احتمالی این دارو بر محور هورمونی هیپوفیز - گناد و بافت بیضه و به طور کلی تر بر میزان باروری در موشهای سوری نر می باشد. بررسی میانگین تغییرات وزن بدن و بیضه ها در گروههای پنج گانه نشان دهنده طبیعی بودن روند رشد و نمو حیوانات می باشد، شاید عدم تأثیر این دارو بر روی

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. *Urology* 1960 ; 84:120-122.
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. 5th ed. New York : W.B. Saunders , 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. Sadeghipour Roodsarie H , Vosooghi M , Zahraie M. The synthesis and evaluation of new derivatives of 2 , 4 diamino pyridines with male contraceptive activity. *MJIRI* 1999 ; 13: 27 – 32.
11. Moghimi A , Alizadeh R , Shokrollahi A , Shamsipour M , Aghabozorg H , Shockravi A. A new strategy for the one-post synthesis of metal complex-organ-networks employing a proton-transfer compound derived from the 1,10-phenanthroline-2,2-dicarboxylate, the case of copper (II). *Inorg Chem* 2003; 42: 1616-24.
12. Gilbert SF. *Developmental biology*. 5th ed. Massachusetts : Sinauer Associates , 1997: 855 – 858 .
13. Courtade M, Lagorce C, Bujan L. Clinical characteristics and lighth and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1998; 70: 297-304.
14. Willson JD. *Androgens, Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 9th ed. New York : Mc Graw-Hill, 1996 : 1454.
۱۵. صادقی پور رودسری حمید رضا. ارزیابی اثرات ضد باروری مردانه تری متوپیریم و ۲ و ۴ – دی آمینو ۵- (۳و۴- دی کلروفیل) ۶- ایزوپروپیل اکسی متیل پریمیدین در موش صحرایی نر . مجله دانشگاه علوم پزشکی ایران. سال پنجم ، تک نگاشت ، ۱۳۷۷ : ۳۶-۴۰.
16. 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.
17. Grizard G, Artonne C. Effect of short term starvation on leydig cell function in adult rat. *Andrology*. 1997; 38: 207-17.