گزارش کوتاه
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره دهم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۰، ۲۳۶-۲۳۱

مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های بیضه در موش‌های صحرایی معتاد به تریاک

غلامرضا اسدی‌کرم[۱]، مجید آسیابانها[۲]، امیر رهنما[۳]، زیبا شعبانی شهربابکی[۴]، مهدی محمودی[۵]، حسینعلی ساسان[۶]

دریافت مقاله: ۸۹/۳/۲۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۹/۹/۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۹/۱۱/۶ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۱/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوز توسط انواعی از محرک‌های داخل یا خارج سلولی بر سلول اعمال می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که برخی از مشتقات تریاک باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌گردند. تحقیق حاضر به منظور بررسی تأثیر اعتیاد به تریاک بر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های بیضه در موش صحرایی طراحی شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی، بر روی ۷ سر موش صحرایی معتاد به تریاک انجام شد. تزریق روزانه تریاک به صورت داخل صفاقی در ساعت ۸ صبح و ۸ شب به شرح زیر انجام گرفت: روز اول ۳۰، روز دوم ۶۰ ، روز سوم ۹۰، روز چهارم ۱۲۰، روزهای پنجم، ششم، هفتم و هشتم ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. هفت سر موش صحرایی سالم نیز که به جای محلول تریاک، سرم فیزیولوژی دریافت می‌کردند، به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های بیضه، از دو روش TUNEL و الکتروفورز DNA استفاده گردید. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از آزمون t صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که میزان مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های بیضه موش‌های صحرایی معتاد به تریاک به طور معنی‌داری از گروه موش‌های سالم بیشتر است ($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: اعتیاد به تریاک می‌تواند باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های بیضه و در نتیجه موجب اختلال در عملکرد بیضه‌ها، زاد و ولد و فاکتورهای مترشحه از این ارگان گردد.

واژه‌های کلیدی : مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، سلول‌های بیضه، اعتیاد، تریاک، موش صحرایی

۱- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۲۱۶۶۰، دورنگار: ۰۳۴۱-۳۲۲۲۰۴۸، پست الکترونیکی: asadi_ka@yahoo.com
۲- مربی گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۳- استادیار گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
۴- استادیار گروه داخلی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
۵- استاد گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
۶- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

مقدمه

مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوز فرآیندی طبیعی جهت حذف سلول‌های آسیب‌دیده (در اثر مواد سمی، اشعه، ویروس و یا ....)، سلول‌های پیر اضافی و مضر می‌باشد. انواعی از عوامل خارجی یا داخلی سلول می‌توانند سبب مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی گردند [۱]. اثرات مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی آلکالوئیدهایی از قبیل مورفین، هروئین، کدئین، نوسکاپین و پاپاورین نشان داده شده است [۲]. از تریاک به عنوان ماده خام اولیه جهت تهیه ترکیبات فوق استفاده می‌شود. تریاک حاوی ۱۷٪-۸٪ مورفین، ۱۰٪-۱٪ نوسکاپین، ۱/۵٪- ۰/۵٪ پاپاورین و ۵٪-۰/۷٪ کدئین می‌باشد [۳]. هر چند که اثرات تریاک بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون مورد مطالعه قرار گرفته است [۴] ولی بر اساس اطلاعات موجود، هیچ‌گونه تحقیقی از تأثیر آن بر میزان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی گزارش نشده است.

گزارشات نشان می‌دهند اپیوئیدها ترشح گنادوتروپین‌های LH (Luteinizing hormone) و FSH (Follicle-stimulating hormone) را با مهار هورمون آزادکننده گنادوتروپین (Gonadotropin-releasing hormone) مترشحه از هیپوتالاموس کاهش می‌دهند و از طرفی گنادوتروپین‌ها جهت بقای سلول‌های بیضه، بسیار حیاتی بوده و کاهش آنها منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های بیضه می‌گردد [۵].

با توجه به این که تریاک مخلوطی از ۲۰ نوع آلکالوئید و ۷۰ نوع ترکیب مختلف می‌باشد [۳] انتظار است که اثرات آن متفاوت از تأثیرات تک‌تک اجزاء آن باشد. به علاوه، نظر به این که شایعه اثرات مثبت دارویی تریاک باعث روی آوردن برخی افراد به آن می‌شود [۴] این تحقیق جهت مشخص نمودن تأثیر تریاک بر میزان مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های بیضه در موش صحرایی طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، تعداد ۱۴ سر موش صحرایی نر بالغ (با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم) نژاد ویستار، از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی خریداری شد و غذا و آب به صورت آزاد در دسترس حیوانات قرار گرفت. موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به دو گروه مساوی شاهد و مورد تقسیم شدند. به گروه مورد، روزانه در ساعات ۸ صبح و ۸ شب به مدت ۸ روز به شرح زیر محلول تریاک (که از اداره مبارزه با مواد مخدر شهرستان رفسنجان تهیه شد) به صورت صفاقی تزریق شد: روز اول ۳۰، روز دوم ۶۰، روز سوم ۹۰، روز چهارم ۱۲۰، روزهای پنجم، ششم، هفتم و هشتم ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (حداکثر میزان مورد تحمل محلول تریاک در موش‌ها ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود). شواهد نشان داد که موش‌ها بعد از این مدت معتاد به تریاک شده بودند و علایم وابستگی به تریاک از قبیل ترشح بزاق؛ تحریک‌پذیری و ... در آنها ظاهر شد. در روز نهم، مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به حیوانات تزریق و سه ساعت بعد کشته شدند. در گروه کنترل به جز این که به جای محلول تریاک، محلول سرم فیزیولوژی تزریق می‌شد، تمامی موارد دیگر مشابه بود.

تهیه بافت جهت مطالعات بافت‌شناسی: بیضه‌های حیوانات سریعاً برداشته شد و در درجه حرارت اتاق در بافر PBS (Phosphate-buffered-saline)، PBS; 0.1 M.Sodium Phosphate, 0.14 M Nacl, pH=7.4) حاوی

۳/۷٪ پارافرمالدئید به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس بافت‌ها به پارافرمالدئید (۳/۷٪) تازه منتقل و به مدت ۷/۵ ساعت نگهداری شدند. آنگاه بیضه‌ها در اتانل ۷۵٪ قرار داده شدند و پس از یک ساعت اتانل ۷۵٪، سپس ۹۵٪ و آنگاه ۱۰۰٪ تعویض گردید. سپس بافت‌ها به گزیلین منتقل شدند و دو بار گزیلین تعویض گردید. پس از یک ساعت بافت‌ها از گزیلین خارج شده و به مدت یک ساعت در پارافین ذوب شده (۵۸ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند و آنگاه بافت‌ها به پارافین ذوب شده تازه منتقل و جهت مطالعات بعدی استفاده گردیدند.

مطالعات مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی: مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های بیضه با استفاده از کیت تانل (TUNEL، شرکت Roche آلمان) که قطعه قطعه شدن DNA هسته‌ای در نتیجه مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را نشان می‌دهد (مطابق دستورالعمل کیت) مورد بررسی قرار گرفت. از بافت‌های بیضه موجود در پارافین مقاطع ۵ میکرومتری تهیه شد و به آنها پروتئیناز K (۲ میکروگرم در میلی‌لیتر در PBS، شرکت Roche آلمان) اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به PBS منتقل و ۵ دقیقه در آن نگهداری شدند. آنگاه به برش‌ها ۵۰ میکرولیتر از محلول مخلوط کیت تانل (TUNEL Label Mix) اضافه گردید و در اتاقک مرطوب ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت در تاریکی قرار گرفتند. سپس برش‌ها در PBS فرو برده شدند که این عمل ۴ بار با محلول‌های PBS تازه تکرار شد. شدت فلورسانس نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسانت (Micros Austria) با طول موج تحریکی ۵۰۰-۴۵۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت و برای هر نمونه ۳۰ میدان میکروسکوپی (با بزرگ‌نمایی ۱۰۰) شمارش گردید.

مطالعه مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی با استفاده از الگوی الکتروفورزی DNA: الکتروفورز ژل آگارز روش ساده‌ای برای تشخیص مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌باشد. استخراج DNA مطابق دستورالعمل سازندگان کیت (کیت استخراج DNA شرکت سیناژن ایران) صورت گرفت. به طور خلاصه: ۱۰۰ میکرولیتر پروتئیناز K به ۵۰ میلی‌گرم بافت بیضه اضافه و به شدت به هم زده (ورتکس) شد. سپس ۵ میکرولیتر از پروتئیناز اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از انکوباسیون، ۴۰۰ میکرولیتر محلول لیزان اضافه و به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه به خوبی به هم زده شد. آنگاه ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رسوب‌دهنده اضافه گردید و به مدت ۵-۳ ثانیه به شدت به هم زده شد و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۱۲۰۰ دور در دقیقه). پس از خارج نمودن فاز آبی، محلول شستشو به رسوب اضافه و مجدداً در ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس فاز آبی خارج گردید. این عمل یکبار دیگر تکرار شد. رسوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر از بافر حل‌کننده، اضافه و به آرامی به هم زده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و آنگاه به مدت ۳۰ ثانیه با ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد که در این حالت DNA به صورت محلول و بقیه مواد به صورت رسوب می‌باشند. الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز ۱/۸٪ در شرایط ۵ V/cm با بافر TE (pH=۸، ۱ میلی‌مول EDTA، ۱۰ میلی‌مول Tris)

حاوی ۱۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید انجام شد.

آنالیز آماری: آنالیز نتایج تانل و شمارش سلول‌های مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و بکارگیری آزمون t صورت گرفت. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار محاسبه و گزارش گردید و $p<۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اختلاف معنی‌داری در میزان مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های بیضه حیوانات گروه کنترل (غیر معتاد) (۰/۳۸±۳/۲۰٪) و حیوانات معتاد به تریاک (۰/۴۳±۷/۴٪) مشاهده شد ($p<۰/۰۰۱$).

بحث

تحقیق حاضر نشان داد که اعتیاد به تریاک باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های بیضه می‌شود. برخی از مردم اعتقاد دارند تریاک در بسیاری از اختلالات، اثرات درمانی دارد [۴] و با همین شایعه به این ماده مخدر روی آورده و مشکلات عدیده‌ای را برای خود و اجتماع ایجاد می‌نمایند. به طوری که طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی ۲/۸٪ افراد بالغ در ایران معتاد به این ماده می‌باشند [۶]. علی‌رغم قدمت و گستردگی استفاده از تریاک، مطالعات ملکولی انجام گرفته قابل استناد در مورد آن بسیار محدود می‌باشد. اما درباره اثرات مولکولی مهم‌ترین اجزای تریاک نظیر مورفین، کدئین، نوسکاپین و پاپاورین، گزارشات متعددی وجود دارد که به ویژه اثرات مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی این مشتقات را در بافت‌ها و سلول‌های مختلف مطالعه نموده‌اند. به طور خلاصه می‌توان گفت که تزریق مزمن مورفین به عنوان ترکیب اصلی موجود در تریاک باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود [۲].

از طرفی نشان داده شده است که در موش‌های معتاد به مورفین، گنادوتروپین‌ها کاهش می‌یابند [۷] و کاهش گنادوتروپین‌ها همراه با افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های زاینده بیضه می‌باشد [۸]. البته گزارشاتی در خصوص تأثیر مستقیم مورفین بر سلول‌های بیضه نیز وجود دارد [۹، ۲].

نتایج مطالعه حاضر مؤید مطالعات مذکور [۹-۸] می‌باشد که مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های بیضه را در موش‌های صحرایی معتاد به مورفین گزارش نموده‌اند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتیجه این مطالعه که نشان داد تریاک باعث افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در بافت بیضه می‌شود و از این طریق می‌تواند اختلالاتی را در این ارگان جنسی ایجاد نموده و عملکرد آن را مختل نماید، لازم است جهت شناخت سازوکار عمل تریاک در بافت بیضه و دیگر اثرات احتمالی آن، مطالعات جامعی انجام گیرد تا ضمن شناخت اختلالات ناشی از آن در معتادان، سازوکارهای درمانی جهت مقابله با آن معرفی شوند و به شایعات غلط درباره تریاک نیز پاسخ داده شود.

تشکر و قدردانی

هزینه این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان تأمین گردیده است. بدین وسیله از مساعدت‌های معاونت محترم پژوهشی و کارکنان محترم آن حوزه تقدیر می‌شود. همچنین از معاونت محترم غذا و دارو جناب آقای دکتر علی روحبخش و کارشناس محترم معاونت جناب آقای علی دانشور و دیگر همکارانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر به عمل می‌آید.

References

[1] Hashemi M, Ghavami S. Methods of studing the apoptosis. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2008; 7(1): 71-8. [Farsi]

[2] Li J, Yan B, Liu Y. Effect of nitric oxide synthase inhibitor on the testis cell apoptosis in morphine-dependent rats. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2004 ;10(11):836-40.

[3] Schiff PL. Opium and its alkaloids. *Am J Pharm Educ* 2002; 66: 186-94.

[4] Asadi Karam G, Reisi M, Kaseb AA, Khaksari M, Mohammadi A, Mahmoodi M. Effects of opium addiction on some serum factors in addicts with non-insulin-dependent diabetes. *Addict Biol* 2004; 9(1):53-8.

[5] Cicero TJ. Effects of exogenous and endogenous opiates on the hypothalenic-piturarg-gonadal axis in the male. *Fed proc* 1980; 39(8):2551-4.

[6] Chawla S, Korenblik A, Kunnen S. Annual prevalence of drug abuse. In: Wold drug report, United Nations Publication, United Nations Office on Drugs and Crime Vienna, Austria, 2005; 363-6.

[7] Cicero TJ, Meger ER, Wiest WG. Effects of chronic morphine administration on the reproductive system of male rat. *J pharmacol EXP ther* 1975; 192(3):542-8.

[8] Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJ. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995; 136(1):5-12.

[9] Adams ML, Sewing B, Forman JB, Meyer ER, Cicero TJ. Opioid-induced suppression of rat testicular function. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266 (1): 323-8.

Testicular Cells Apoptosis in Opium-Addicted Rats: (Short Report)

Gh.R. Asadikaram[1], M. Asiabanha[2], A. Rahnema[3], Z. Shaebani Shahrbabaki[4], M. Mahmoodi[5], H.A. Sasan[6]

Received: 12/06/2010 Sent for Revision: 27/11/2010 Received Revised Manuscript: 26/01/2011 Accepted: 03/02/2011

Background and Objectives: Apoptosis is a physiological mechanism of cell death and it can be triggered by a variety of internal and external stimuli. It has been shown that some opium derivatives promote cell apoptosis. This study was designed to examine the influence of opium addiction on testicular cell apoptosis in Wistar rats.

Materials and Methods: This experimental study was performed on 7 opium-addicted as case group and 7 normal rats as control group. In the case group, animals treated with peritoneal injections of opium twice a day at 8 a.m and 8 p.m for 8 days based on the following regimen; at the first day 30 mg/kg, second day 60 mg/kg, third day 90 mg/kg, fourth day 120 mg/kg, and from fifth to eighth day 150 mg/kg. The control group received only normal saline. Apoptosis was then evaluated by TUNEL and DNA fragmentation assays.

Results: The results of this study showed that the rate of testicular cells apoptosis in opium-addicted rats were significantly higher than the normal rats ($p<0.001$).

Conclusion: These results indicated that opium addiction may play an important role in testicular cells apoptosis and as a result can cause testicula dysfunction and reduced testosterone production which may culminate in infertility.

Key words: Apoptosis, Testis Cells, Addiction, Opium, Rat

Funding: This research was funded by Rafsanjan University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Rafsanjan University of Medical Sciences approved the study.

How to cite this article: Asadikaram Gh.R, Asiabanha M, Rahnema A, Shaebani Shahrbabaki Z, Mahmoodi M, Sasan H.A. Testicular Cells Apoptosis in Opium-Addicted Rats: (Short Report). *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2011; 10(3): 231-6. [Farsi]

1- Associate Prof. Dept of Biochemistry and Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran (Corresponding Author) Tel: (0341) 3221660, Fax: (0341) 3222048, E-mail: asadi_ka@yahoo.com

2- Academic Member, Dept. of Biochemistry and Biophysics, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

3- Assistant Prof., Dept. of Pathology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

4- Assistant Prof., Dept. of Internal Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

5- Prof., Dept. of Biochemistry and Biophysics, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

6- Assistant Prof., Dept. of Biology, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran