

اثرات مصرف همزمان متیل فنیدات و نیکوتین بر ساختار و عملکرد بافت بیضه موش‌های صحرایی بالغ

داود کیانی‌فرد^{۱*}، سید میثم موسوی شعار^۲ و مهدی بساکی^۳

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۲

^۱ استادیار، بخش بافت شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

^۲ کارشناس ارشد بافت شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

^۳ استادیار، بخش بیوشیمی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه: Email: kianifard@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: متیل‌فنیدات از مشتقات آمفتامین بوده و مصرف آن با بروز تغییراتی در بافت بیضه و اسپرم‌زایی همراه است. نیکوتین یک آلکالوئید سمی است که با اشکال مختلف در دسترس افراد قرار دارد. اثرات منفی نیکوتین بر اسپرماتوژنز گزارش شده است. **هدف:** استفاده از ترکیبات محرک نظیر متیل‌فنیدات گرایش به مصرف فرآورده‌های حاوی نیکوتین را افزایش می‌دهد. در این مطالعه اثر مصرف همزمان متیل‌فنیدات و نیکوتین بر ساختار و عملکرد بافت بیضه بررسی گردید. **روش کار:** متیل‌فنیدات (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و نیکوتین (۴ میلی‌گرم/کیلوگرم) به مدت هشت هفته به صورت داخل صفاقی بطور جداگانه یا همزمان در ۴۰ سر موش صحرایی بالغ استفاده شد. حیوانات به چهار گروه (۱۰ حیوان در هر گروه) شامل گروه کنترل، متیل‌فنیدات، نیکوتین و متیل‌فنیدات+نیکوتین تقسیم شدند. در انتهای مطالعه، خونگیری از حیوانات جهت آنالیز هورمونی و سنجش استرس اکسیداتیو به عمل آمده سپس موش‌ها آسان‌کشی شده و وزن بدن و بیضه‌ها ثبت گردید. نمونه‌های بافت بیضه جهت مطالعات هیستومورفومتری و نمونه‌های اپی‌دیدیم جهت آنالیز اسپرم آماده‌سازی شد. **نتایج:** استفاده از متیل‌فنیدات و نیکوتین موجب ایجاد تغییرات ساختاری و عملکردی در بافت بیضه در مقایسه با گروه کنترل گردید. کاهش وزن نسبی بیضه‌ها در گروه‌های تحت درمان مشاهده شد. استفاده از متیل‌فنیدات و نیکوتین بطور مجزا موجب افزایش سطح سرمی هورمون FSH و کاهش هورمون LH گردید. در گروه‌های مذکور سطح خونی تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده همزمان این ترکیبات افزایش یافت. شاخص استرس اکسیداتیو در سرم موش‌های تحت درمان افزایش یافت. در مطالعات بافت‌شناسی تغییرات ساختاری نظیر افزایش ضخامت کپسول همبندی، کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش ارتفاع اپی‌تلیوم زایگر و کاهش شاخص‌های میکروسکوپی اسپرماتوژنز در گروه‌های دریافت‌کننده متیل‌فنیدات و نیکوتین مشاهده شد. شاخص‌های آنالیز اسپرم در گروه‌های تحت درمان کاهش یافت. بیشترین میزان کاهش جمعیت اسپرم و درصد تحرک و زنده‌مانی به ترتیب در گروه دریافت‌کننده نیکوتین و گروه دریافت‌کننده همزمان متیل‌فنیدات و نیکوتین ثبت گردید. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج این مطالعه نشان داد در موارد مصرف همزمان متیل‌فنیدات و نیکوتین، اثرات منفی نیکوتین نقش بیشتری در بروز تغییرات ساختاری و عملکردی بافت بیضه داشته باشد.

واژگان کلیدی: بیضه، متیل‌فنیدات، موش صحرایی، نیکوتین

مقدمه

روند تولید اسپرم در بافت بیضه یک فرآیند بسیار پیچیده و سازمان‌یافته‌ای از تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی است که با تقسیمات متوالی میتوزی و میوزی به تعداد بیشماری سلول جنسی تمایز پیدا می‌کنند (ترک زبان و همکاران ۲۰۱۷). بافت بیضه از بافت‌های حساس در برابر عوامل خطر محیطی محسوب می‌گردد. در این زمینه گزارش شده است که ۴۰ درصد از علل ناباروری مربوط به جنس مذکر می‌باشد (آگاروال و همکاران ۲۰۰۸). انواع مختلفی از اختلالات ساختاری و عملکردی در سلول‌های رده اسپرما توژنز رخ می‌دهد که در ارتباط با مشکلات باروری می‌باشد (آیتکن و رومن ۲۰۰۸). متیل‌فنیدات از مشتقات آمفتامین بوده و برای درمان سندرم بیش‌فعالی کودکان و نیز برای درمان اختلالاتی نظیر سندرم تاکی‌کاردی، افسردگی و اختلالات خواب مورد استفاده قرار می‌گیرد (کراوس و همکاران ۱۹۹۲ و لوین و همکاران ۱۹۹۵ و دوسکوچ و همکاران ۲۰۰۲ و جانسو و همکاران ۲۰۱۰). استفاده از متیل‌فنیدات در موش‌های صحرایی موجب اختلال در عملکرد محور مغز-هیپوفیز-گناد می‌گردد (آدریانی و همکاران ۲۰۰۶). عملکرد بافت پوششی زایا بافت بیضه توسط عوامل گوناگونی کنترل می‌گردد. در این میان، گنادوتروپین‌های هیپوفیزی از اهمیت بالایی برخوردار هستند. مسیرهای دوپامینرژیک در آزادسازی هورمون آزادکننده گنادوتروپین‌ها نقش دارند (سیچانوسکا و همکاران ۲۰۱۰).

نیکوتین یک آلکالوئید سمی است که می‌تواند موجب اختلالات عملکردی متعددی در دستگاه تناسلی گردد (میراندا-اسپونر و همکاران ۲۰۱۶). گزارش شده است که استفاده از ترکیبات محرک نظیر متیل‌فنیدات موجب افزایش تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از سیگار می‌گردد (ووترز و همکاران ۲۰۰۸). در این مطالعه اثرات مصرف طولانی‌مدت متیل‌فنیدات و نیکوتین بر ساختار و

عملکرد بافت بیضه در موش‌های صحرایی بالغ بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۴۰ سر موش صحرایی بالغ با میانگین وزنی ۱۳۵ گرم به مدت هشت هفته تحت مطالعه قرار گرفتند. شرایط نگهداری و تغذیه تمام حیوانات یکسان بود. این حیوانات توسط پلت تغذیه‌شده و آب مصرفی آن‌ها از آب معمولی شهری تأمین گردید. موش‌های صحرایی در درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. حیوانات به‌طور تصادفی به چهار گروه شامل گروه کنترل و سه گروه تیمار تقسیم شدند. گروه‌های تیمار شامل گروه دریافت‌کننده متیل‌فنیدات، گروه دریافت‌کننده نیکوتین و گروه دریافت‌کننده همزمان متیل‌فنیدات و نیکوتین بود. در گروه کنترل سرم فیزیولوژی با حجم یکسان با گروه‌های تیمار تزریق گردید.

متیل‌فنیدات به میزان ۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی استفاده گردید (گها و همکاران ۲۰۰۰). همچنین نیکوتین (Sigma-Aldrich, St Louis, MO 63178 USA) به‌میزان ۴ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی استفاده شد (نسیم و همکاران ۲۰۱۰). در انتهای مطالعه ابتدا حیوانات با اتر بیهوش شده و سپس خونگیری از قلب انجام گردید. نمونه‌های سرم جهت اندازه‌گیری سطوح گنادوتروپین‌های هیپوفیزی و هورمون تستوسترون در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شدند. پس از آسان‌کشی حیوانات، بیضه‌های راست و چپ از بدن جدا شده و با استفاده از ترازو با حساسیت یک‌هزارم گرم وزن شدند. پس از توزین گنادها، به‌منظور بررسی ساختار سلول‌های بافت بیضه، نمونه‌برداری از بیضه‌ها در گروه‌های آزمایشی مختلف صورت پذیرفت. غلظت خونی هورمون‌های تستوسترون (FSH, Diaplus Inc. USA)

اسپرمیوژنز، نسبت لوله‌های اسپرم‌ساز حاوی اسپرم به لوله‌های فاقد اسپرم محاسبه شد (میکسویاک و همکاران ۱۹۹۸ و شتی و همکاران ۲۰۰۰). جهت آنالیز اسپرم، بافت بیضه از اپیدیدیم جدا شده و دم اپیدیدیم در پتری‌دیش حاوی دو میلی‌لیتر نرمال سالین قطعه‌قطعه شده و سپس حجم محلول به پنج میلی‌لیتر رسانده شد. پس از ۱۰ دقیقه از انکوباسیون محلول در انکوباتور ۳۷ درجه، شمارش تعداد اسپرم با استفاده از لام نئوبار محاسبه گردید (وایروبک و همکاران ۱۹۸۳). جهت بررسی درصد تحرک اسپرم‌ها تعداد ۱۰ میدان میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. تعیین درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها با روش ائوزین-نگروزین صورت پذیرفت. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از محلول حاوی اسپرم با حجم مساوی از محلول ائوزین و نگروزین مخلوط شده و با درشتنمایی ۴۰۰ برابر تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر نمونه بررسی شد (وایروبک و همکاران ۱۹۸۳). داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ بیان شده و با استفاده از بسته نرم‌افزاری GraphPad PRISM نسخه ۵/۰۴ بررسی گردیدند. جهت مقایسه داده‌های به‌دست‌آمده و مقایسه آن‌ها بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون (آزمون تعقیبی) توکی استفاده شد. مقدار ($P < 0.05$) برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

جدول ۱ میانگین وزن بدن و وزن بیضه‌ها را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. اختلاف معنی‌داری در وزن ابتدایی و انتهای بین گروه‌های تحت مطالعه مشاهده نشد (جدول ۱). میانگین وزن بیضه‌ها در گروه‌های دریافت‌کننده متیل‌فنیدات و نیکوتین در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. این کاهش در گروه دریافت‌کننده نیکوتین در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در این رابطه، نسبت وزن بیضه‌ها به وزن

(DRG Instruments GmbH, Germany) و LH (DRG Instruments GmbH, Germany) با استفاده از روش الیزا با استفاده از کیت‌های اختصاصی اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری سطوح سرمی مالوندی‌آلدهید بر اساس روش کمپلکس مالوندی‌آلدهید-تیوباربیتریک اسید انجام شد (اوکواوا ۱۹۷۹). به‌منظور مطالعه هیستومورفومتری بیضه، پس از تهیه مقاطع هیستولوژیک و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ نوری (LABOMED CxL, Labo America, Inc.) با درشتنمایی‌های مختلف مطالعه شدند. تصاویر به‌دست آمده توسط دوربین دیجیتال (Dino-Lite) به کمک نرم افزار آنالیز تصاویر (DinoCapture 2.0, Version 1.5.28.A) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در مطالعه مورفومتریک بافت بیضه، فاکتورهایی نظیر ضخامت کپسول همبندی، قطر خارجی لوله‌های اسپرم‌ساز، ارتفاع بافت پوششی زایا لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شده و باهم مقایسه گردید. جهت مطالعات مورفومتری تعداد ۲۰ لوله اسپرم‌ساز در هر نمونه بافتی (مجموعاً ۲۰۰ لوله به ازای هر گروه) مطالعه شد.

به‌منظور ارزیابی میکروسکوپی اسپرماتوژنز در لوله‌های اسپرم‌ساز، از سه شاخص تمایز لوله‌ای (TDI)، ضریب اسپرمیوژنز^۲ (SPI) و شاخص تجدید جمعیت^۳ (RI) استفاده شد. برای محاسبه شاخص تمایز لوله‌ای، درصد لوله‌های اسپرم‌ساز که شامل سه یا بیش از سه ردیف از سلول‌های رده اسپرماتوژنز تمایز یافته از اسپرماتوگونی باشد، محاسبه گردید. این شاخص بیانگر حیات و تمایز سلول‌های بنیادی لوله اسپرم‌ساز است. برای محاسبه شاخص تجدید جمعیت، نسبت سلول‌های اسپرماتوگونی فعال به سلول‌های اسپرماتوگونی غیرفعال در لوله‌های اسپرم‌ساز، محاسبه گردید. به‌منظور محاسبه ضریب

1-Tubular Differentiation index

2- Spermiogenesis Index

3-Repopulation Index

بدن در تمام گروه‌های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. بیشترین میزان کاهش در شاخص مذکور در گروه دریافت کننده نیکوتین و گروه دریافت کننده همزمان متیل‌فنیدات و نیکوتین مشاهده گردید.

جدول ۱- میانگین وزن بدن و وزن بیضه در گروه‌های تحت مطالعه

Table 1- Mean of body and testicular weight in experimental groups

Traits	Control	Methylphenidate	Nicotine	Methylphenidate+Nicotine	P-value	SEM
Initial body weight(g)	138±19.54	137.8±3.93	131.4±13.94	134.4±4.77	0.11	5.38
Final body weight(g)	163.6±18.19	150.8±11.03	143.8±6.39	152±12.00	0.20	5.93
Testicular weight (g)	2.34±0.24 ^a	2.14±0.16 ^{ab}	1.81±0.34 ^b	1.90±0.25 ^{ab}	0.03	0.12
Testicular/body weight ratio (%)	1.43	1.41	1.25	1.25		

Data are presented as mean±SD. Means with different superscripts have significant difference ($P<0.05$). SEM: Standard error of means

افزایش در گروه دریافت‌کننده نیکوتین و نیز در گروه دریافت‌کننده متیل‌فنیدات و نیکوتین در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود ($P<0.05$). همچنین، استفاده از نیکوتین به‌تنهایی موجب افزایش معنی‌دار سطح سرمی تستوسترون در مقایسه با مصرف همزمان این ترکیب با متیل‌فنیدات گردید. شاخص استرس اکسیداتیو در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. در این میان، بیشترین میزان افزایش شاخص مذکور در گروه دریافت‌کننده نیکوتین مشاهده گردید ($P<0.05$). با این وجود، تغییرات مشاهده شده در شاخص استرس اکسیداتیو در سایر گروه‌ها به سطح معنی‌دار آماری نرسید.

جدول ۲ میانگین سطوح سرمی هورمون‌های محور هیپوفیز-گناد و شاخص استرس اکسیداتیو را نشان می‌دهد. بر این اساس، مصرف جداگانه متیل‌فنیدات و نیکوتین موجب افزایش میانگین سطح سرمی هورمون FSH در مقایسه با گروه کنترل گردید. این افزایش در گروه دریافت‌کننده متیل‌فنیدات معنی‌دار بود ($P<0.05$). استفاده از متیل‌فنیدات و نیکوتین به‌صورت جداگانه موجب کاهش غلظت خونی هورمون LH گردید. در این بین، مصرف همزمان ترکیبات فوق موجب افزایش معنی‌دار هورمون LH در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده این ترکیبات به‌صورت مجزا شد (جدول ۲). میانگین سطوح سرمی تستوسترون در تمامی گروه‌های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. این

جدول ۲- سطح خونی گنادوتروپین‌های هیپوفیزی، تستوسترون و شاخص استرس اکسیداتیو در گروه‌های تحت مطالعه

Table 2- Serum level of pituitary gonadotropins, testosterone and oxidative stress index in experimental groups

Traits	Control	Methylphenidate	Nicotine	Methylphenidate+Nicotine	P-value	SEM
FSH (IU/ml)	0.37±0.12 ^a	0.78±0.02 ^b	0.50±0.01 ^{ab}	0.30±0.01 ^a	0.002	0.02
LH (μIU/L)	20±0.95 ^{ab}	18.2±0.83 ^a	17.9±0.86 ^a	21.2±1.82 ^b	0.008	0.59
Testosterone (ng/ml)	0.25±0.17 ^a	1.20±0.14 ^a	2.95±0.77 ^b	0.70±0.43 ^a	0.0006	0.24
MDA (mmol/mg Prt.)	0.63±0.23 ^a	0.94±0.32 ^{ab}	1.51±0.39 ^b	1.03±0.32 ^{ab}	0.031	0.17

Data are presented as mean±SD. Means with different superscripts have significant difference ($P<0.05$). SEM: Standard error of means

نشان می‌دهد. بر این اساس، میانگین ضخامت کپسول همبندی بیضه در گروه‌های تحت درمان در مقایسه با

جدول ۳ نتایج حاصل از بررسی هیستومورفومتری بافت بیضه و شاخص‌های میکروسکوپی اسپرماتوژنز را

گروه کنترل افزایش یافت. میانگین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ارتفاع اپی‌تلیوم زایا در تمام گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت ($P < 0.05$). تغییرات مشاهده شده در میانگین شاخص‌های میکروسکوپی اسپرماتوژنز مانند نتایج هیستومورفومتری بافت بیضه بود. در این میان، کمترین میزان شاخص‌های مذکور در گروه دریافت کننده نیکوتین مشاهده گردید. تغییرات بافت‌شناسی (شکل ۱) در راستای نتایج حاصل از بررسی مورفومتری بیانگر بروز تغییرات ساختاری در دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز می‌باشد.

جدول ۳- هیستومورفومتری و شاخص‌های میکروسکوپی اسپرماتوژنز بافت بیضه در گروه‌های تحت مطالعه
Table 3-Histomorphometry and microscopic indices of spermatogenesis in experimental groups

Traits	Control	Methylphenidate	Nicotine	Methylphenidate+Nicotine	P-value	SEM
Capsular thickness (μm)	21.64±1.41	22.02±2.37	22.58±1.78	22.34±1.89	0.563	0.70
Seminiferous tubules diameter (μm)	292.5±14.37 ^a	224.3±47.39 ^b	209.2±44.57 ^b	203.6±45.23 ^b	<0.0001	11.98
Germinal epithelium height (μm)	81.20±5.73 ^a	71.27±9.03 ^b	63.05±8.79 ^b	64.37±7.73 ^b	<0.0001	2.47
Tubular differentiation index (%)	81.2±4.43 ^a	65.2±7.49 ^b	59.1±10.1 ^b	61.5±9.21 ^b	<0.0001	2.46
Spermiogenesis index (%)	82.8±6.48 ^a	68±8.73 ^b	63.6±9.21 ^b	65±10.5 ^b	<0.0001	2.76
Repopulation index (%)	81.1±5.51 ^a	70.7±8.48 ^b	61.2±8.37 ^c	66.1±7.48 ^{bc}	<0.0001	2.35

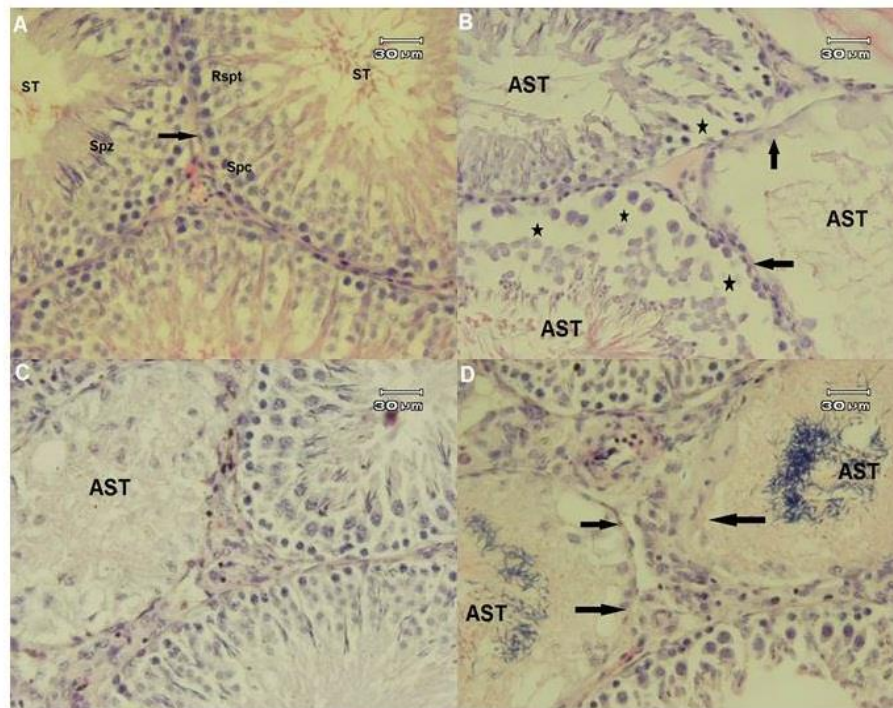
Data are presented as mean±SD. Means with different superscripts have significant difference ($P < 0.05$). SEM: Standard error of means

نتایج حاصل از آنالیز اسپرم نشان داد که میانگین جمعیت اسپرم در گروه‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت (جدول ۴). میانگین درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم در گروه‌های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$).

جدول ۴- شاخص‌های آنالیز اسپرم در گروه‌های تحت مطالعه
Table 4- Sperm analysis indices in experimental groups

Traits	Control	Methylphenidate	Nicotine	Methylphenidate+Nicotine	P-value	SEM
Sperm count ($10^6/\text{ml}$)	76.6±11.2 ^a	64.2±12.8 ^{ab}	50.4±8.37 ^c	54.6±9.57 ^{bc}	<0.0001	3.39
Sperm motility (%)	81.7±9.62 ^a	63.6±6.88 ^b	55.2±9.07 ^b	48.8±8.41 ^b	<0.0001	3.63
Sperm viability (%)	80.1±7.52 ^a	63.5±6.66 ^b	53±8.37 ^b	51.7±14.2 ^b	<0.0001	3.69

Data are presented as mean±SD. Means with different superscripts have significant difference ($P < 0.05$). SEM: Standard error of means



شکل ۱- میکروگراف نوری بافت بیضه در گروه‌های تحت مطالعه

(A) بافت بیضه گروه کنترل. لوله‌های اسپرم ساز (ST) دارای آرایش سلولی منظم مشاهده می‌شوند. (B) مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه متیل‌فنیدات. لوله‌های تغییر شکل یافته (AST) و فاقد سلول (پیکان مشکی) به همراه کاهش جمعیت و اختلال در اتصالات سلولی (علامت ستاره) قابل مشاهده است. (C) بافت بیضه موش صحرایی گروه تیمار با نیکوتین. کاهش شدید جمعیت سلولی در لوله اسپرم‌ساز (AST) مشاهده می‌گردد. (D) مقطع عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در بافت بیضه موش صحرایی تیمار شده با مصرف همزمان متیل‌فنیدات و نیکوتین. کاهش شدید جمعیت سلولی (پیکان مشکی) قابل مشاهده است. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین. بزرگنمایی ۴۰۰ برابر.

Figure 1- Light micrograph of testicular tissue in experimental groups

(A) Control group. Seminiferous tubules (ST) are observed with normal architecture. (B) Transverse section of seminiferous tubules in methylphenidate treated group. Atrophied tubules (AST) with lacking cell (black arrows) observed with decrease of cell population and cell junction impairment (asterisks). (C) Testicular tissue of nicotine treated group. Prominent cell population decrement has been observed in seminiferous tubules (AST). (D) Cross section of seminiferous tubules following simultaneous administration of methylphenidate and nicotine. Intensive decrease of cellular population (black arrows) observed. Hematoxylin-Eosin staining. ×400 Magnification.

میان، گنادوتروپین‌های هیپوفیزی از اهمیت بالایی برخوردار هستند. مسیره‌های دوپامینرژیک در آزادسازی هورمون آزادکننده گنادوتروپین‌ها نقش دارند (سیچانوسکا و همکاران ۲۰۱۰). متیل‌فنیدات از طریق گیرنده‌های دوپامینی (D2) و انتقال دهنده‌های دوپامینی فعالیت می‌نماید (آداویا اوزیگاوا و همکاران ۲۰۰۶ و اوت

بافت بیضه از بافت‌های حساس در برابر عوامل خطر محیطی محسوب می‌گردد. انواع مختلفی از اختلالات ساختاری و عملکردی در سلول‌های رده اسپرماتوژنز رخ می‌دهد که در ارتباط با مشکلات باروری می‌باشد (آیتکن و رومن ۲۰۰۸). عملکرد اپی‌تلیوم زایگر بافت بیضه توسط عوامل گوناگونی کنترل می‌گردد. در این

متیل‌فنیدات، اختلاف قابل توجهی در وزن موش‌های صحرایی نر در مقایسه با گروه کنترل وجود ندارد (مونتگینی و همکاران ۲۰۱۴). در یک تحقیق متعاقب مصرف دوز پایین متیل‌فنیدات (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اختلاف قابل توجهی بین وزن بیضه در مقایسه با گروه کنترل وجود نداشت در حالی‌که دوز بالای متیل‌فنیدات باعث کاهش وزن بیضه‌ها در مقایسه با سایر گروه‌ها شد (جانسو و همکاران ۲۰۱۰).

در این مطالعه، سطح سرمی هورمون FSH در گروه‌های دریافت‌کننده متیل‌فنیدات و نیکوتین به‌طور مجزا نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده همزمان این ترکیبات افزایش یافت. در این میان، کاهش سطح سرمی هورمون LH در موش‌های صحرایی دریافت‌کننده متیل‌فنیدات و نیکوتین مشاهده گردید. نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که مصرف مجزای متیل‌فنیدات و نیکوتین موجب افزایش سطح خونی هورمون تستوسترون می‌گردد. متعاقب مصرف متیل‌فنیدات تغییراتی در هورمون‌های محور هیپوفیز بیضه مشاهده شده است (آدریانی و لئو ۲۰۰۶). همچنین، در موش‌های صحرایی دریافت‌کننده نیکوتین به کاهش معنی‌دار سطوح سرمی هورمون‌های مذکور اشاره شده است (مصدق و همکاران ۲۰۱۷).

بافت بیضه یکی از بافت‌های حساس در برابر استرس اکسیداتیو است. ترکیبات فعال اکسیژن با پراکسیداسیون چربی‌های غشای سلول منجر به مرگ سلولی می‌گردد (آلوالیا و همکاران ۱۹۹۶). استفاده از نیکوتین موجب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌گردد. این امر موجب ایجاد استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون چربی و آسیب سلولی می‌گردد (آزاد و همکاران ۲۰۱۸). رادیکال‌های آزاد اکسیژن و استرس اکسیداتیو یکی از عوامل مهم در بروز اختلالات باروری است (آزاد و همکاران ۲۰۱۸). در این مطالعه میزان سطوح شاخص استرس اکسیداتیو (MDA) در خون و بافت بیضه موش‌های صحرایی دریافت‌کننده متیل‌فنیدات و نیکوتین در مقایسه با گروه

و همکاران ۲۰۰۷). بافت بیضه و سلول‌های اسپرماتوزوئید در موش صحرایی حاوی گیرنده‌های دوپامینی و انواع مختلفی از گیرنده‌های آدرینرژیک هستند. علی‌رغم اینکه مکانیسم‌های اصلی در عملکرد دوپامین هنوز بطور دقیق شناسایی نشده‌اند با این وجود، حضور گیرنده‌های دوپامینی در بافت بیضه و سلول‌های زیگر نشان می‌دهد که مصرف متیل‌فنیدات دارای اثرات مستقیمی بر دستگاه تناسلی باشد. در این رابطه، با وجود گزارشات متعددی مبنی بر مشاهده اختلالات اسپرماتوژنز در مطالعات گوناگون ولی همچنان مکانیسم یا مکانیسم‌های اصلی اثرات منفی متیل‌فنیدات بر دستگاه تناسلی نر به‌خوبی شناسایی نشده است (آدریانی و همکاران ۲۰۰۶، جانسو همکاران ۲۰۱۰ و کیانی فرد و همکاران ۲۰۱۳).

گزارش شده است که استفاده از ترکیبات محرک نظیر متیل‌فنیدات موجب افزایش تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از سیگار می‌گردد (ووترز و همکاران ۲۰۰۸). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از متیل‌فنیدات یا نیکوتین بصورت مجزا یا ترکیبی اثر قابل توجهی بر وزن نهایی بدن در موش‌های صحرایی ندارد. در این بین، میانگین وزن بیضه‌ها و نیز نسبت وزن بیضه به وزن بدن در گروه‌های دریافت‌کننده ترکیبات فوق کاهش یافت. اندازه‌گیری وزن تام و وزن نسبی اندام‌ها در مطالعات سم‌شناسی از اهمیت بالایی برخوردار است (کریسمن و همکاران ۲۰۰۴). وزن بیضه‌ها به حجم و توده سلول‌های تمایز یافته رده اسپرماتوژنز وابسته است (کاتو و همکاران ۲۰۰۱). نتایج یک مطالعه نشان داده که استفاده از هیدروکلرید کوکائین (ترکیبی شبیه به متیل‌فنیدات از نظر ساختاری) سبب کاهش وزن بیضه‌ها شده است (جورج و همکاران ۱۹۹۶). در تحقیق حاضر، نتایج حاصل از بررسی وزن بیضه‌ها نشان داد که کاهش وزن نسبی بیضه‌ها می‌تواند به‌دلیل آتروفی لوله‌های اسپرم ساز در پاراننشیم بیضه ایجاد گردد. گزارش شده است که به‌دنبال استفاده از

جمعیت و نیز کاهش درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها می‌گردد (آزاد و همکاران ۲۰۱۸). نتایج یک مطالعه نشان داده است که مصرف طولانی مدت متیل‌فنیدات در موش‌های صحرایی بالغ موجب افزایش جمعیت اسپرماتوزوئیدهای موجود در اپیدیدیم در مقایسه با موش‌های گروه کنترل می‌گردد با این وجود، درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها کاهش می‌یابد (آزاد و همکاران ۲۰۱۸).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این تحقیق، چنین به نظر می‌رسد که میزان تغییرات ساختاری و عملکردی بافت بیضه به‌دنبال استفاده مجزا از متیل‌فنیدات و نیکوتین در مقایسه با استفاده همزمان این ترکیبات با یکدیگر متفاوت است. در این میان، بسیاری از شاخص‌های مورد ارزیابی در این مطالعه در موش‌های صحرایی دریافت‌کننده نیکوتین در مقایسه با گروه‌های تیمار دیگر از کاهش بیشتری برخوردار بود. همچنین، مقایسه میانگین نتایج بدست آمده بین گروه‌های سه گانه تیمار به‌خصوص در مطالعات مورفومتری و آنالیز اسپرم نشان داد که میزان تغییرات مشاهده شده بین گروه دریافت‌کننده نیکوتین و گروه دریافت‌کننده همزمان متیل‌فنیدات و نیکوتین از تشابه بیشتری برخوردار است که می‌تواند نشان‌دهنده اثرگذاری بیشتر نیکوتین بر بروز تغییرات یاد شده در موارد مصرف همزمان ترکیبات مذکور باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز کمال سپاسگزاری را دارند.

کنترل افزایش یافت. سلول‌های اسپرماتوزوئید به واسطه وجود مقادیر فراوانی از چربی در ساختمان خود نسبت به آسیب سلولی ایجاد شده در شرایط استرس اکسیداتیو بسیار حساس هستند (شن و اونگ ۲۰۰۰). در تحقیق حاضر نتایج حاصل از مطالعات مورفومتری بافت بیضه نشان داد که مصرف متیل‌فنیدات و نیکوتین سبب ایجاد تغییرات متعدد ساختاری در لوله‌های اسپرم‌ساز شده و میزان این تغییرات متعاقب مصرف همزمان ترکیبات مذکور بیشتر می‌گردد. یکی از دلایل اصلی آسیب بافت بیضه افزایش میزان پراکسیداسیون چربی است که موجب آسیب اکسیداتیو ماده ژنتیکی اسپرم، اختلال عملکرد غشای سلول و تکامل سلول‌های اسپرماتوزوئید می‌گردد (آیتکن و رومن ۲۰۰۸ و حمزه و الحربی ۲۰۱۴). مطالعه شاخص‌های میکروسکوپی اسپرماتوزنر روشی مطمئن جهت ارزیابی فعالیت بافت بیضه می‌باشد (شتی و همکاران ۲۰۰۰). در مطالعه حاضر بیشترین میزان کاهش در شاخص‌های میکروسکوپی اسپرماتوزنر در گروه دریافت‌کننده نیکوتین مشاهده شد. کاهش شاخص‌های میکروسکوپی اسپرماتوزنر می‌تواند نشان‌دهنده تغییر در روند تقسیم و تمایز سلولی در سلول‌های رده اسپرماتوزنر باشد (موسوی پورگوهر و همکاران ۲۰۱۶). بر اساس نتایج این مطالعه، مصرف طولانی مدت متیل‌فنیدات و نیکوتین موجب کاهش شاخص‌های آنالیز اسپرم در تمام گروه‌های دریافت‌کننده در مقایسه با گروه کنترل گردید. همچنین، استفاده همزمان از متیل‌فنیدات و نیکوتین موجب کاهش بیشتر درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها در مقایسه با مصرف مجزای این ترکیبات می‌گردد. مشخص شده است که مصرف نیکوتین موجب کاهش

منابع مورد استفاده

Abdollahzadeh A, Kianifard D and Vafaei Saiah G, 2017. Study of the long-term and dose dependent effects of methylphenidate and monosodium glutamate on the hormonal alterations of the pituitary-testicular axis and sperm analysis in adolescence rats. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine 74: 75-81.

- Adeoya osiguwa SA, Gibbons R and Fraser LR, 2006. Identification of functional alpha2- and betaadrenergic receptors in mammalian spermatozoa. *Human Reproduction* 21: 1555-1563.
- Adriani W, Leo D, Guarino M, Natoli A, Diconsiglio E and Deangelis G, 2006. Short term effects of adolescent Methylphenidate exposure on brain strial gene expression and sexual endocrine parameters in male Rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1074: 52-73.
- Agarwal A, Makker K and Sharma R, 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *American Journal of Reproductive Immunology* 59: 2-11.
- Ahluwalia P, Tewari K and Choudhary P, 1996. Studies on the effects of monosodium glutamate on oxidative stress in erythrocytes of adult male mice. *Toxicology Letters* 84: 161-165.
- Aitken RJ and Roman SD, 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1: 15-24.
- Azad F, Nejati V, Shalizar-Jalali A, Najafi G and Rahmani F, 2018. Royal jelly protects male mice against nicotine-induced reproductive failure. *Veterinary Research Forum* 9: 231 – 238.
- Cansu A, Ekinci O, Ekinci O, Serdaroglu A, Erdogan D and Kutay ZC, 2010. Methylphenidate has dose dependent negative effects on rat spermatogenesis decreased round spermatids and testicular weight and increased P53 expression and apoptosis. *Human and Experimental Toxicology* 30: 1592-1600.
- Ciechanowska M, Lapot M, Mateusiak K and Przekop F, 2010. Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. *Reproductive Biology* 10: 85-124.
- Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK, Maronpot RR, Prater DA, Riley JH, Seaman WJ and Thake DC, 2004. Best practice guideline: toxicologic histopathology. *Toxicologic Pathology* 32(1): 126-131.
- Doskoc P, 2002. Why is not Methylphenidate more addictive? *Neuropsychiatry Review* 3: 19.
- Geha RS, Beiser A, Ren C, Patterson R, Greenberger PA, Grammer LC and Saxon A, 2000. Multicenter, double-blind, placebo-controlled, multiple-challenge evaluation of reported reactions to monosodium glutamate. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106(5): 973-980.
- George VK, Li H, Teloken C, Grignon DJ, Lawrence WD and Dhabuwala CB, 1996. Effects of long-term cocaine exposure on spermatogenesis and fertility in peripubertal male rats. *Journal of Urology* 155:327-331.
- Hamzaa RZ and AL-Harbi MS, 2014. Monosodium glutamate induced testicular toxicity and the possible ameliorative role of vitamin E or selenium in male rats. *Toxicology Reports* 1:1037-1045.
- Katoh C, Kitajima S, Saga Y, Kanno J, Horii I and Inoue T, 2002. Assessment of quantitative dual-parameter flow cytometric analysis for the evaluation of testicular toxicity using cyclophosphamide and ethinylestradiol treated rats. *Journal of Toxicological Sciences* 27:87-96.
- Kianifard D, Hasanzadeh S and Kianifard L, 2013. The study of time dependent administration of Methylphenidate on the microscopic indices of spermatogenesis and sperm analysis in adult Rats. *Journal of Experimental and Integrative Medicine* 3:121-126.
- Kraus MF and Burch EA, 1992. Methylphenidate hydrochloride as an antidepressant controversy case studies and review. *South Medical Journal* 85:985-991.
- Levin FR and Kleber HD, 1995. Attention deficit hyperactivity disorder and substance abuse: relationships and implications for treatment. *Harvard Review of Psychiatry* 2: 246-258.
- Miranda-Spooner M, Paccola CC, Neves FMO, de Oliva SU and Miraglia SM, 2016. Late reproductive analysis in rat male offspring exposed to nicotine during pregnancy and lactation. *Andrology* 4: 218-231.
- Miskowiak B, Kesa B, Limanowski A, Partyka M, and Filipiak, B, 1998. Long-term effect of neonatal monosodium glutamate (MSG) treatment on reproductive system of the female rat. *Folia Morphologica* 58: 105-113.
- Montagnini BG, Silva LS, Santos AH, Anselmo-Franci JA, Fernandes GS, Mesquita SFP and Gerardin DCC, 2014. Effects of repeated administration of methylphenidate on reproductive parameters in male rats. *Physiology and Behavior* 133: 122-129.
- Mosadegh M, Hasanzadeh S and Razi M, 2017. Nicotine-induced damages in testicular tissue of rats; evidences for bcl-2, p53 and caspase-3 expression. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 20:199-208.
- Mousavi Pourgozar Z, Kianifard D and Khalilzadeh E, 2016. The microscopic and ultra-structural study of testicular tissue following time dependent administration of methylphenidate in adult rats. *Scientific Journal of Ilam Medical University* 24: 83-94.

- Nesseim WH, Haroun HS, Mostafa E, Youakim MF and Mostafa T, 2010. Effect of nicotine on spermatogenesis in adult albino rats. *Andrologia* 43: 398-404.
- Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K, 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry* 95: 351-358.
- Otth C, Torres M, Ramirez A, Fernandez JC, Castro M, Rauch MC, Brito M, Yañez AJ, Rodríguez-Gil JE, Slebe JC and Concha II, 2007. Novel identification of peripheral dopaminergic D2 receptor in male germ cells. *Journal of Cell Biochemistry* 100: 141-150.
- Shen HM and Ong CN, 2000. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radical Biology & Medicine* 28(4): 529-536.
- Shetty G, Wilson G, Huhtaniemi I, Shuttlesworth GA, Reissmann T and Meistrich ML, 2000. Gonadotropin releasing hormone analogs and testosterone inhibits the recovery of spermatogenesis in irradiated Rats. *Endocrinology* 141:1735-1745.
- Torkzaban M, Moghaddam Gh, Tajik P and Barin A, 2017. Isolation and maintenance of calves type A spermatogonia in vitro: in influence of epidermal growth factor on number of cells, colony size and spermetogioa viability. *Journal of Animal Sciences Researches (Agricultural Science)* 27: 27-39 (in Persian).
- Wooters TE, Neugebaue NM, Rush CR and Bardo MT, 2008. Methylphenidate enhances the abuse-related behavioral effects of nicotine in rats: Intravenous self-administration, drug discrimination, and locomotor cross-sensitization. *Neuropsychopharmacology* 33: 1137-1148.
- Wyrobek AJ, Gordon LA, Burkhardt JG, Francis MW, Jr Kapp RW, Letz G, Malling HV, Topham JC and Whorton MD, 1983. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* 115: 1-72.

The effects of the simultaneous administration of Methylphenidate and Nicotine on the structure and function of testicular tissue in adult rats

D Kianifard^{1*}, SM Mousavi Shoar² and M Basaki³

Received: February 5, 2019 Accepted: June 2, 2019

¹Assistant Professor, Division of Histology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²MSc, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Assistant Professor, Division of Biochemistry, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author: kianifard@tabrizu.ac.ir

Introduction: Exposure to different xenobiotics can affect the male reproductive system by making structural and functional changes in testicular tissue (Aitken and Roman 2008). The changes in the cellular structure of testicular tissue are associated with varying degrees of infertility (Aitken and Roman 2008). Methylphenidate is an amphetamine derivative which used for treatment of ADHD syndrome (Kraus and Burch 1992 and Levin and Kleber 1995 and Doskoch 2002 and Cansu et al 2010). Long-term administration of methylphenidate has been associated with changes in testicular tissue and sperm population. Nicotine is a toxic alkaloid that available in a wide range of population through different forms (Miranda-Spooner et al 2016). The negative effects of nicotine on spermatogenesis and decreased sperm quality have been reported (Mosadegh et al 2017). Experimental studies in humans and laboratory animals have shown that the use of stimulant compounds such as methylphenidate and amphetamine derivatives increases the tendency to consume nicotine-containing products (Wooters et al 2008). Given the importance of above mentioned subject and the negative effects of nicotine (as a gonadotoxic composition) and methylphenidate on the reproductive system, in this study the effects and the complications of the long-term exposure to methylphenidate and nicotine in the form of simultaneous administration were evaluated on the structure and the function of testicular tissue in animal model of adult rats.

Material and methods: Methylphenidate (10 mg/kg b.w.) (Geha et al 2000) and Nicotine (4 mg/kg b.w.) (Nesseim et al 2010) were administrated intraperitoneally once a day for eight weeks in adult rats. The animals were divided into control and three treatment groups: 1) methylphenidate administrated group; 2) nicotine administrated group and 3) methylphenidate+nicotine administrated group. At the end of the eight weeks, the blood sampling was performed for measurement of the blood levels of pituitary gonadotropins (follicle stimulating hormone and luteinizing hormone) and testosterone. Plasma lipid peroxidation (malondialdehyde) assay was performed on the blood samples Briefly, testicular tissues were homogenized in KCl. Measurement of tissue and plasma malondialdehyde (MDA) levels were quantitatively carried out base on the MDA-TBA (thiobarbituric acid) complex formation (Kato et al 2002). The animals were euthanized and the body and testicular weight were recorded. Testicular tissue samples were fixed in 10% formaldehyde solution and paraffin embedded tissue were prepared for histomorphometrical study and evaluation of microscopic indices of spermatogenesis. For morphometric assessment of seminiferous tubules, the slides were studied at 200× magnification. To get extra precise results, only the seminiferous tubules (STs) that sectioned transversely were studied and the shortest diameter of seminiferous tubules was considered for measurement. For every one animal, three microscopic slides from different parts of testicular tissue were prepared and 200 tubules were studied. For estimation of spermatogenesis in testicular tissue, three different indices were used. Tubular differentiation index (TDI), repopulation index (RI) and spermiogenesis index (SPI). To determine the tubular differentiation index, the number of seminiferous tubules with more than three layers of germinal cells derived from type A of spermatogonia was calculated. To find out the

repopulation index, the ratio of active spermatogonia (with euchromatic nucleus) to inactive ones (with dense heterochromatic nucleus) was evaluated. The ratio of the number of seminiferous tubules with spermatozooids to the empty tubules, were calculated for spermiogenesis index (Miskowiak et al 1998 and Shetty et al 2000). The sperm analysis was performed on the epididymal tissue. For analyses of sperm, the cauda epididymis was separated from testis and cut into small pieces into one milliliter of Ham's F10 culture medium. The epididymal sperm count was evaluated by hemocytometer with light microscope at $\times 400$ magnification. Sperm motility was assessed with a phase contrast microscope at $\times 400$ magnification. In average 10 microscopic fields were observed and the mean of counted sperms was considered as sperm motility for each rat (Wyrobek et al 1983). The results were analyzed using the GraphPad PRISM[®] software version 5.04 (GraphPad Software, Inc. USA). All data were reported as mean (SD). The comparison of the means between experimental groups was evaluated by one way-ANOVA method followed by Tukey's multiple comparison tests. Differences were considered to be statistically significant if $P < 0.05$.

Results and discussion: The results showed that, the administration of methylphenidate and nicotine separately or simultaneously induce various structural and functional changes in testicular tissue compared to control group. There was no significant difference in body weight between experimental groups ($P < 0.05$). The mean of testicular weight was reduced in all treated groups in comparison to control group. The ratio of testicular/body weight was decreased in treated groups compared to control group. The separate administration of methylphenidate and nicotine was led to elevation of the blood FSH levels ($P = 0.002$) and decrement of the blood LH levels ($P = 0.008$). Whereas, the coadministration of these compounds led to increase of the blood LH levels. The mean of the blood testosterone levels was increased in all treated groups in comparison to control group ($P = 0.0002$). This elevation of the blood testosterone levels was observed in separately treated groups. The mean of the serum malondialdehyde was increased in treated groups compared to control group ($P = 0.25$). The most elevation of serum malondialdehyde levels was observed in nicotine treated animals. Histomorphometrical studies indicate various structural changes in testicular tissue such as increasing of the capsule thickness, reduction of tubular diameter, decrease of the height of germinal epithelium. All microscopic indices of spermatogenesis were reduced in treated groups in comparison to control group ($P < 0.0001$). Accordingly, the lowest indices of spermatogenesis were observed in nicotine administrated group. All sperm analysis indices were reduced in treated groups in comparison to control group. The lowest mean of epididymal sperm population and sperm motility and viability was observed in nicotine treated group and methylphenidate+nicotine administrated group consequently ($P < 0.0001$).

Conclusion: In conclusion, nicotine and methylphenidate induces testicular tissue damage with different mechanisms. However, the results of this study showed that the simultaneous administration of methylphenidate and nicotine could exacerbate the structural and functional alterations of testicular tissue. Moreover, the comparison of the results between treated groups expresses the greater and stronger portion of nicotine in inducing of alterations in testicular tissue structure and function.

Keywords: Methylphenidate, Nicotine, Rat, Testicular Tissue