

ارزیابی اثرات ضد باروری ترکیبات ۲ و ۴-دی آمینو ۵-(۳ و ۴-دی کلروفنیل) ۶-الکیل اکسی متیل پیریمیدین، در موشهای صحرایی نر

دکتر صادق پور رودسری - دانشیار گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تهران

Evaluation of contraceptive effects of 2, 4 diamino - 5 (3,4 dichloro phenyl) 6- alcheloxy methyl pyrimidine on male rats ABSTRACT

The discovery of antifertility activity of gossypol led the scientists and researchers to the development of compounds with antifertility activity that can be used as male contraceptive. It is obvious that without the contribution and sense of responsibility in men, the population control programs and family planning will have no considerable success.

In the present study, I have tried to evaluate two newly synthesized analog of diaminopyrimidines compounds with the chemical name of 2,4 - diamino -5 (3, 4-dichlorophenyl) 6-alcheloxy methyl pyrimidine (ethoxy and isobothoxy) on male rats.

This study indicates that this compounds without any toxic effects, significantly decrease the serum testosterone, sperm motility (SM), percent of viable sperms, daily sperm production (DSP), Epididimal sperm reserve (ESR) and fertility rats.

Key Words : Antifertility, 2,4-diamino -5 (3,4-dichlorophenyl) 6-alcheloxy methyl pyrimidine.

خلاصه

کشف فعالیت ضدباروری گوسیپول سبب شد که محققین و دانشمندان درصدد تهیه موادی شوند که خاصیت ضدباروری داشته و بعنوان ضدباروری مردانه مصرف شود. زیرا واضح است که بدون مشارکت عملی مردان، برنامه‌های کاهش جمعیت نمی‌تواند موفقیت چندانی داشته باشد.

در این بررسی به ارزیابی اثرات ضدباروری دو داروی جدید از ترکیبات پیریمیدین به اسامی ۲ و ۴-دی آمینو ۵-(۳ و ۴-دی کلروفنیل) ۶-الکیل اکسی متیل پیریمیدین (اتیل اکسی و ایزوبوتیل اکسی) روی موش نر پرداختیم.

این بررسی نشان داد که این ترکیبات بدون هیچگونه اثر سمی، بطور معنی دار میزان تستوسترون سرم، حرکت اسپرمها، درصد اسپرمهای زنده، تولید روزانه اسپرمها، میزان ذخیره اسپرم در اپیدیدیم و درصد باروری را کاهش داد.

واژه‌های کلیدی: ضدباروری - ۲ و ۴-دی آمینو ۵-(۳ و ۴-دی کلروفنیل) ۶-الکیل اکسی متیل پیریمیدین

مقدمه

اگرچه پیشرفتهای عظیم علوم پزشکی، به همراه توسعه خدمات بهداشتی و تکنیکهای درمانی موجب محدودیت و مهار بسیاری از بیماریها، افزایش طول عمر، امید به زندگی و در نهایت کاهش میزان مرگ و میر شده است، اما رشد انفجارگونه جمعیت، مشکلاتی را در راه توسعه و پیشرفت برای مردم جهان، بخصوص مردم کشورهای در حال توسعه بوجود آورده است.

این امر موجب برانگیختن افکار عمومی جمعیت شناسان، اقتصاددانان، برنامه‌ریزان و نهایتاً دولتمردان و سیاستگذاران گردیده است.

سالمها پیش در کشور چین ادعا شد که پخت و پز مواد غذایی با روغن بدست آمده از دانه‌های خام کتان به مدتهای طولانی، باعث ایجاد ناباروری میشود که پس از بررسیهای متعدد گوسپیول را مسئول این امر دانستند، و مشخص شد که این ماده بطور مستقیم و غیرمستقیم بر DNA پلی‌مراز و همچنین سنتز DNA در طول فرآیند اسپرماتوژنز اثر می‌گذارد (۱) ولی هیپوکالمی ایجاد شده و اثرات توکسیک آن بر کبد، کلیه و قلب مشکلاتی را بوجود آورده است. تاکنون بیشترین مطالعه روی یک فرآورده طولانی اثر تستوسترون بنام تستوسترون انانتات (T-enantate) انجام گرفته است و نشان داده شده است که این هورمون توانائی کافی جهت ایجاد آروسپرمی قابل قبول را ندارد (۲). خوشبختانه با اطلاعات روزافزونی که درباره فیزیولوژی دستگاه تولیدمثل مردان و جنبه‌های بیوشیمیائی این فرآیند حاصل شده است، زمینه لازم را جهت تحقیقات وسیع و فشرده برای کشف و مطالعه عوامل ضدباروری مردانه ایجاد شده است و امید آن میرود که در آینده‌ای نه چندان دور شاهد معرفی روش مؤثر، ایمن، برگشت پذیر، با ضریب اطمینان بالا و قابل قبول توسط مردان، باشیم.

در این پژوهش اثرات ضد باروری دو مشتق اتیل‌اکسی و ایزوبوتیل‌اکسی ترکیب ۲ و ۴-دی‌آمینو ۵ (۳ و ۴-دی‌کلروفنیل) ۶-الکیل‌اکسی - متیل پیریمیدین (سنتز شده در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران) بر روی موشهای صحرائی نر بررسی گردیده است.

مواد و روشها

داروهای مورد استفاده دو مشتق، اتیل‌اکسی و ایزوبوتیل‌اکسی ترکیب ۲ و ۴ دی‌آمینو - ۵ (۳ و ۴-دی‌کلروفنیل) ۶-الکیل‌اکسی متیل پیریمیدین، سنتز شده در دانشکده داروسازی تهران بوده و از پروپیلن گلیکول (ساخت کارخانه Merck با شماره Art:822334) نیز بعنوان حلال انتخابی استفاده گردید. ضمناً از سرم فیزیولوژی ۳۷ درجه برای رقیق کردن اسپرماها و رنگ اتوزین - نیگروزین برای رنگ‌آمیزی و تهیه گسترش استفاده شد. حیوانات مورد آزمایش، موشهای صحرائی نر از نوع Sprague-dawley در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم (۳) با سن ۱۵۰ روز (۴) و موشهای صحرائی ماده بالغ از همان نوع در محدوده وزنی مشابه (۵) بودند که از انستیتو رازی (حصارک کرج) خریداری شده و پس از دو هفته نگهداری در حیوانخانه گروه فیزیولوژی و در شرایط استاندارد از نظر روشنائی، درجه حرارت، آب و غذا، مورد آزمایش قرار گرفتند.

موشهای نر به سه گروه جداگانه (هر گروه ۱۸ عدد) تقسیم شده، و بشرح زیر تحت اثر دارو قرار گرفتند:

گروه اول: یک روز در میان بمدت ۶۰ روز ترکیب اتیل‌اکسی را با مقدار ۵۰ mg/kgbw بصورت داخل صفاقی (IP) دریافت نمودند. گروه دوم: با همان مقدار قبلی ترکیب ایزوبوتیل‌اکسی دریافت نمودند.

گروه سوم: بعنوان شاهد که یکروز در میان بمدت ۶۰ روز، پروپیلن گلیکول را به مقدار ۱ ml/kgbw بصورت داخل صفاقی دریافت نمودند.

بعد از گذشت پنجاه روز از اولین تجویز دارو، هر موش نر را با سه موش ماده جوان و بالغ هم قفس کردیم تا توانائی باروری موشهای نر را عملاً بررسی نماییم. (Mating-Test) بعد از آخرین تزریق، موشهای نر را وزن کرده و پس از کشتن آنها بوسیله گیوتین خون هر کدام را در لوله‌های آزمایش تمیز جهت اندازه‌گیری تستوسترون سرم جمع‌آوری کردیم. سپس شکم حیوان را باز نموده و اندامهای زیر را مورد مطالعه قرار دادیم.

۱- وازادفران جهت تعیین درصد اسپرمهای زنده (Viability) و همچنین درصد تحرک اسپرماها (Motility).

۲- بیضه‌ها بمنظور توزین و تعیین میزان تولید روزانه اسپرم (Daily Sperm Production-DSP)(۶).

۳- اسپیدیدم جهت توزین و تعیین میزان ذخیره اسپرم (Epididymal Sperm Reserves-ESR)(۷).

ضمناً اندامهای غیرآندوکرینی نظیر کلیه و کبد را نیز خارج کرده، و پس از توزین از نظر تغییرات کلی مورد مطالعه قرار دادیم.

محاسبات آماری

محاسبات آماری و تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروههای آزمایشی با گروه کنترل (SEM و mean) از طریق آزمون student's T-test انجام گرفت، و خطای $P < 0.05$ قابل قبول در نظر گرفته شد.

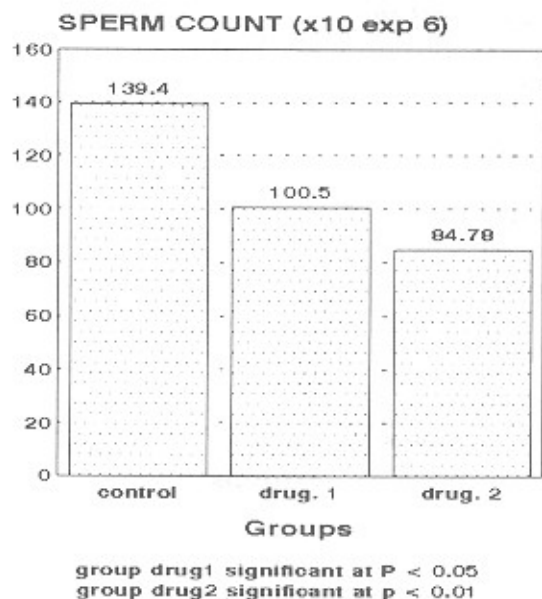
نتایج

جهت اجتناب از طولانی شدن مطلب، گروه تحت درمان با ترکیب اتیل‌اکسی را «گروه اول» و گروه تحت درمان با ترکیب ایزوبوتیل‌اکسی را «گروه دوم» می‌نامیم.

اثر بر میزان ذخیره اسپرم اپی دیدیم ها (ESR)

نتایج حاصل از بررسی میزان ذخیره اسپرم اپی دیدیم نشان داد که میزان ذخیره اسپرم اپی دیدیم در هر دو گروه نسبت به گروه شاهد، کاهش یافته است، لیکن این کاهش در گروه دوم ($P < 0.01$) نسبت به گروه اول ($P < 0.05$) بیشتر بوده است (نمودار شماره ۳).

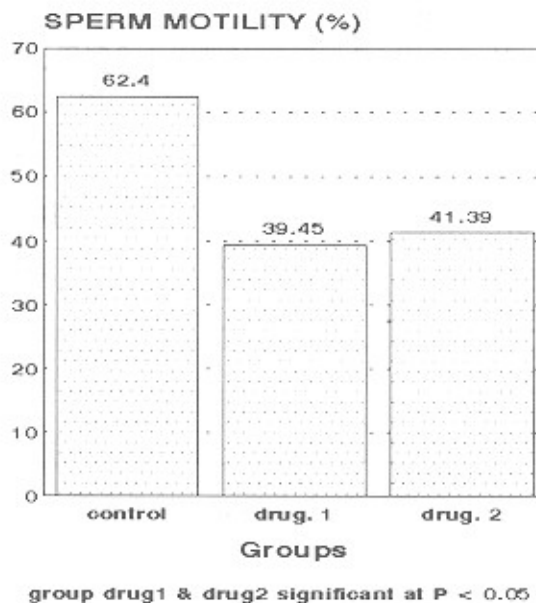
نمودار ۳- اثر اتیل اکسی و ایزوبوتیل اکسی بر میزان ذخیره اسپرم اپی دیدیم



اثر بر میزان درصد تحرک اسپرمها (Motility)

نتایج حاصل از بررسی میزان درصد تحرک اسپرمها نشان داد که تحرک اسپرمها در هر دو گروه نسبت به گروه شاهد، بطور معنی داری کاهش یافته است ($P < 0.05$)، لیکن این کاهش در گروه اول نسبت به گروه دوم، کمی بیشتر می باشد (نمودار شماره ۱).

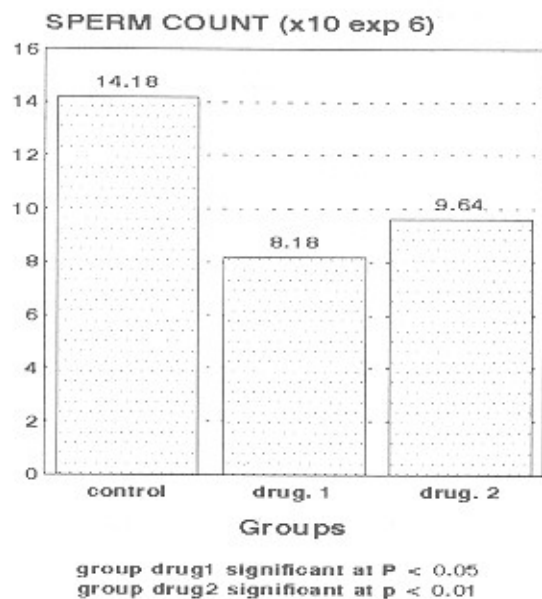
نمودار ۱- اثر اتیل اکسی و ایزوبوتیل اکسی بر تحرک اسپرم



اثر بر میزان تولید روزانه اسپرم توسط بیضه ها (DSP)

نتایج حاصل از بررسی میزان تولید روزانه اسپرم توسط بیضه ها نشان داد که میزان تولید روزانه اسپرم توسط بیضه ها در هر دو گروه نسبت به گروه شاهد، کاهش یافته است، لیکن این کاهش در گروه اول ($P < 0.01$) نسبت به گروه دوم ($P < 0.05$) بیشتر می باشد (نمودار شماره ۴).

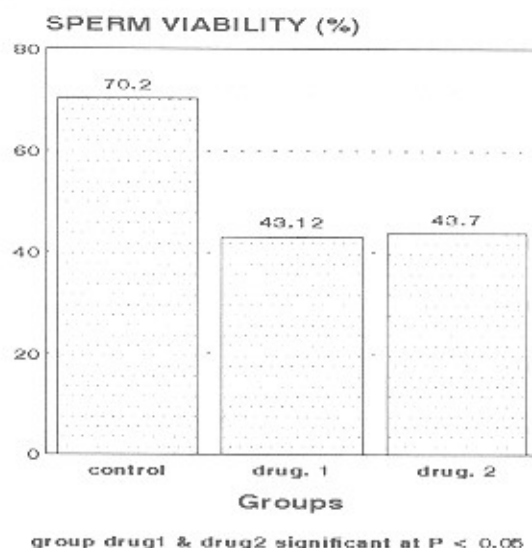
نمودار ۴- اثر اتیل اکسی و ایزوبوتیل اکسی بر میزان تولید روزانه اسپرم



اثر بر میزان درصد اسپرمهای زنده (Viability)

نتایج حاصل از بررسی میزان درصد اسپرمهای زنده نشان داد که درصد اسپرمهای زنده در هر دو گروه نسبت به گروه شاهد، کاهش یافته است ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۲).

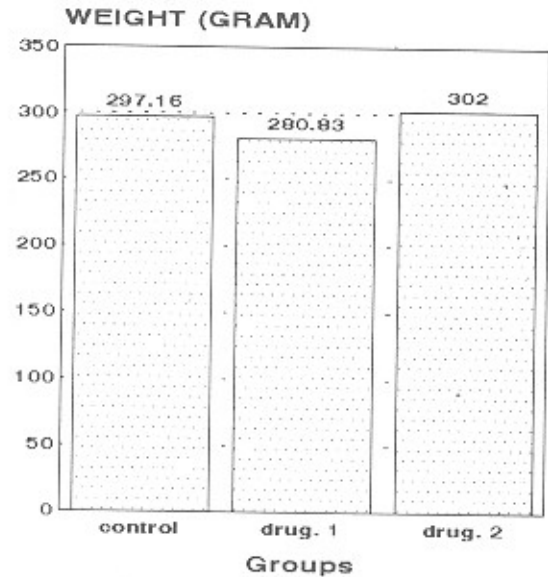
نمودار ۲- اثر اتیل اکسی و ایزوبوتیل اکسی بر نسبت اسپرمهای زنده



اثر بر وزن بدن

نتایج بدست آمده از بررسی میزان وزن بدن موشها نشان داد که هیچگونه تفاوتی بین گروههای اول و دوم در مقایسه با گروه شاهد وجود ندارد.

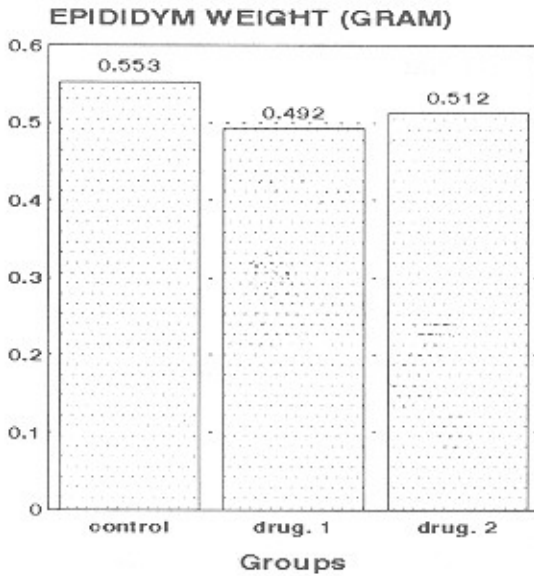
نمودار 5- اثر اتیل اکسی و ایزوبوتیل اکسی بر وزن بدن موش



اثر بر وزن اپیدیدیمها

نتایج بدست آمده از بررسی میزان اپی دیدیمها، نشان داد که هیچگونه تفاوت معنی داری بین گروههای اول و دوم در مقایسه با گروه شاهد وجود ندارد.

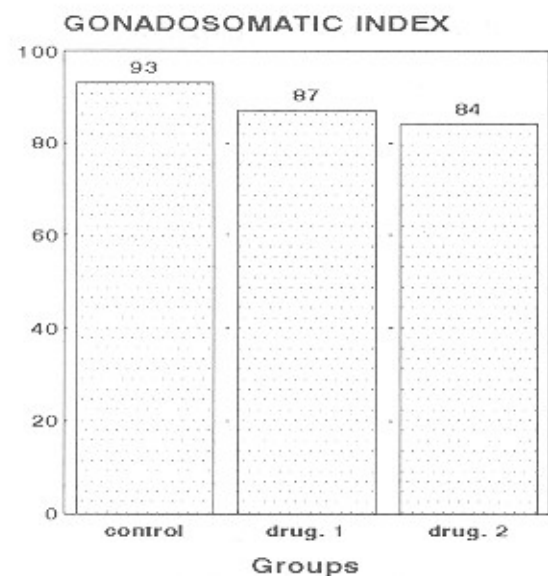
نمودار 7- اثر اتیل اکسی و ایزوبوتیل اکسی بر وزن اپی دیدیم



اثر بر نسبت وزن بیضه ها به وزن بدن (GSI)

این شاخص نشان دهنده هماهنگی بین وزن بیضه ها و وزن بدن است (Gonadosomatic index) نتایج بدست آمده از بررسی میزان نسبت وزن بیضه ها به وزن بدن موشها نشان داد که تفاوت معنی داری بین گروههای اول و دوم در مقایسه با گروه شاهد وجود ندارد.

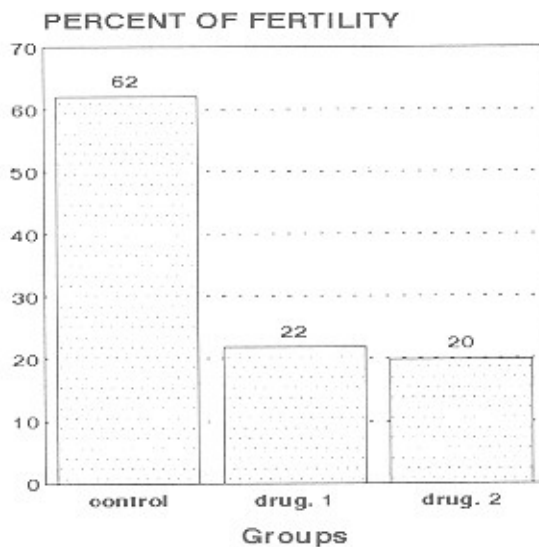
نمودار 6- اثر اتیل اکسی و ایزوبوتیل اکسی بر نسبت وزن بیضه به وزن بدن



اثر بر توانایی باروری موشهای صحرائی نر

نتایج بدست آمده از بررسی میزان باروری موشهای صحرائی نر نشان داد که میزان باروری موشها در هر دو گروه در مقایسه با گروه شاهد، شدیداً کاهش یافته است ($P < 0.01$) ضمناً این کاهش، در گروه دوم اندکی بیشتر از گروه اول رخ داده است (نمودار شماره 8).

نمودار 8- اثر اتیل اکسی و ایزوبوتیل اکسی بر باروری موشهای صحرائی نر



group drug1 significant at $p < 0.05$
group drug2 significant at $p < 0.01$

آن شود. بدین لحاظ کاهش در میزان درصد حیات اسپرمها را نیز می توان به تأثیرات احتمالی این ترکیبات بر روی بافت اپیدیدیم نسبت داد (۹).

بررسی نمودار مربوط به میزان ذخیره اسپرم اپیدیدیم (ESR) نیز کاهش مشخص و معنی داری را در هر دو گروه خصوصاً در گروه ۲ نشان می دهد. این پارامتر نشاندهنده میزان فعالیت بافت بیضه در تولید اسپرم در روزهای گذشته می باشد. با توجه به طول مدت مصرف دارو (۶۰ روز) و نیز طول چرخه اسپرماتوژنیک در موش صحرایی (حدود ۴۸ روز) به نظر می رسد، ترکیبات مورد استفاده به محض ورود به بدن، توانسته اند خیلی سریع بر بافت بیضه اثر کرده و اسپرماتوژن را کاهش دهند.

در بررسی نمودار مربوط به میزان تولید روزانه اسپرم توسط بیضه ها (DSP) کاهش کاملاً مشخصی در هر دو گروه خصوصاً در گروه ۱ دیده می شود. این امر نشان دهنده تأثیر انکارناپذیر ترکیبات مورد استفاده در روند اسپرماتوژن می باشد.

بررسی نمودار مربوط به میزان وزن موشها، هیچگونه اختلافی را بین گروههای ۱ و ۲ نسبت به گروه شاهد نشان نمی دهد. با توجه به اینکه از تغییرات وزن به عنوان یکی از پارامترهای بررسی سلامتی در موشهای صحرایی استفاده می شود به نظر می رسد که ترکیبات مورد استفاده در طول مدت درمان ظاهراً هیچگونه اثرات زیان آوری بر روی موشها نداشته اند. بررسی احشاء و اندامهای داخلی موشها نیز نشانگر سلامتی کامل این اندامها از لحاظ ظاهری و ماکروسکوپی بود.

در بررسی نمودار مربوط به میزان نسبت وزن بیضه ها به وزن بدن (GSI)، ما شاهد کاهش اندکی در هر دو گروه نسبت به گروه شاهد هستیم، ولی این کاهش معنی دار نیست. این مسئله نشانگر تأثیر اندک ترکیبات مورد استفاده بر بافت بیضه است، یعنی این ترکیبات اسپرماتوژن را کاهش داده اند بدون اینکه اثرات تخریبی و سمی شدیدی بر سلولهای بیضه داشته باشند.

در بررسی نمودار مربوط به وزن اپیدیدیمها نیز کاهش اندکی در هر دو گروه نسبت به گروه شاهد وجود دارد ولی این کاهش هم معنی دار نیست. این امر نیز نشاندهنده این مطلب است که هرگونه تأثیر ایجاد شده بر روی اسپرمها در بافت اپیدیدیم، بدون ایجاد اثرات سمی بر بافتها و سلولهای اپیدیدیم روی داده است.

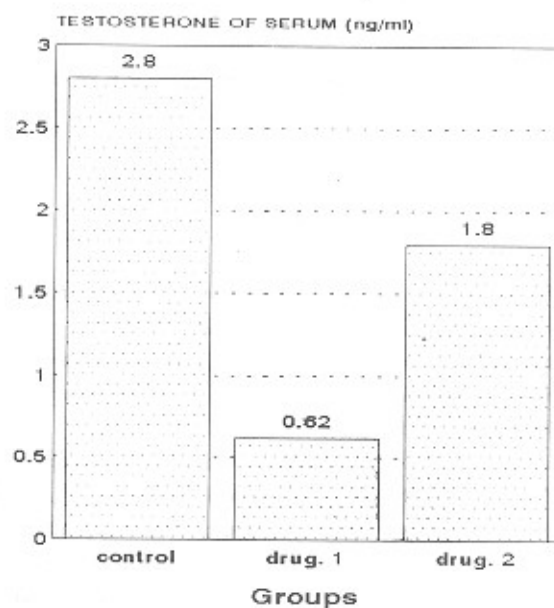
بررسی نمودار مربوط به میزان باروری موشهای صحرایی، نشانگر کاهش شدید در هر دو گروه نسبت به گروه شاهد می باشد، که این امر با توجه به یافته های قبلی دور از انتظار هم نیست. این مطلب نیز تأییدی دیگر بر تأثیر ترکیبات مورد استفاده بر روند اسپرماتوژن و نیز مراحل بلوغ و باروری اسپرمها در اپیدیدیم می باشد.

در بررسی نمودار مربوط به میزان تستوسترون سرم نیز کاهش معنی داری در هر دو گروه نسبت به گروه شاهد دیده می شود. این امر نشاندهنده تأثیر ترکیبات مورد استفاده بر روند استروئیدوژنیک در

اثر بر میزان تستوسترون سرم

نتایج حاصل از بررسی میزان تستوسترون سرم موشهای صحرایی نو نشان داد که میزان تستوسترون در هر دو گروه در مقایسه با گروه شاهد، کاهش یافته است ($P < 0.05$). ضمناً این کاهش، در گروه اول در مقایسه با گروه دوم اندکی بیشتر رخ داده است (نمودار شماره ۹).

نمودار ۹- اثر اتیل اکسی و ایزوبوتیل اکسی بر میزان تستوسترون سرم



group drug1 & drug2 significant at $p < 0.05$

بحث و نتیجه گیری

همانطور که دیده شد هر یک از ترکیبات مورد استفاده، نسبت به گروه شاهد اثرات متفاوتی در پارامترهای مورد بررسی ما ایجاد کردند. حال با نگاهی گذرا به هر یک از آنها، بررسی تأثیرات ایجاد شده می پردازیم.

در بررسی نمودار مربوط به میزان درصد تحرک اسپرمها (Motility)، کاهش معنی داری در تحرک اسپرمها در گروه ۲ و به میزان بیشتری در گروه ۱ نسبت به گروه شاهد دیده می شود. با توجه به اینکه اسپرماتوزوئیدها قابلیت تحرک و فعالیت خود را در اپیدیدیم کسب می کنند، به نظر می رسد که ترکیبات مورد استفاده احتمالاً بعضی اثرات خود را از طریق تأثیر بر بافت اپیدیدیم ایجاد می کنند (۸).

در بررسی نمودار مربوط به میزان درصد حیات اسپرمها (Viability) نیز کاهش معنی داری در هر دو گروه نسبت به گروه شاهد دیده می شود. اسپرمها بعد از تولید توسط بیضه، سریعاً توسط لوله منی بر به اپیدیدیم منتقل می شوند. کسب بعضی قابلیتها مانند تحرک، باروری و کلاً تبدیل شدن به یک اسپرم بالغ در اپیدیدیم صورت می گیرد. حال هرگونه تغییری در اپیدیدیم مانند تغییرات اسیدی یا بازی، مقدار مواد غذایی و یا ترشح هورمونهای موضعی، می تواند باعث جلوگیری از تکامل اسپرم، و یا حتی مرگ

COSENTINO و همکاران در سال (1990)، نشان داد که این مکانیسم قادر نیست در میزان تستوسترون سرم کاهش ایجاد نماید. پس به نظر می‌رسد که ترکیبات مورد استفاده علاوه بر مهار DHFR، از طریق مکانیسم‌های دیگری که فعلاً ناشناخته هستند، بر روند استروئیدوژنیک و اسپرماتوژنیک توأم تأثیر کرده، و هر دو را کاهش می‌دهند. به نظر می‌رسد اثرات ضد اسپرماتوژنز و ضدباروری ترکیبات فوق قابل برگشت باشند. البته کاملاً مشخص است که درک و تفهیم کامل مکانیسم عمل این ترکیبات به مطالعات بیشتری نیاز دارد، تا عمل آنها را بر روی سلولهای لیدینگ و سلولهای سرتولی و روابط متقابل آنها را روشن سازد.

بیضه می‌باشد. پس به نظر می‌رسد قسمتی از تأثیرات به وجود آمده در جهت کاهش روند اسپرماتوژنز، مربوط به کاهش سطح تستوسترون سرمی باشد.

با توجه به نتایج این تحقیق و سایر تحقیقات انجام شده قبلی که در مقدمه به آن اشاره رفت (۲ و ۱) به نظر می‌رسد که اثرات ضد باروری این ترکیبات، ماحصل اثرات مستقیم آنها بر سلولهای پوششی (اپیتلیوم) لوله‌های منی‌ساز و منی‌بر و همچنین اپیدیدیم باشد، اگر چه مکانیسم اثر ضد مالاریایی دی‌آمینوپیریمیدینها به مهار دی‌هیدروفولات ردوکتاز (DHFR) و در نتیجه کاهش در بیوسنتز نوکلئوتیدهای پورین، تیمیدیلات و مشتقات متیل مربوط می‌باشد ولی مطالعات انجام شده بر روی پیریمتامین (۹) توسط

منابع

- 1- F.C.W. wu, Review. male contraception: current status and future prospects, *clinical Endocrinology* 1988, 29: 443-65.
- 2- Tonami and Hirokazu, Effect of $t \pm e$ male oral contraceptive gossypol on testicular DNA polymerases in rat, *japanease journal of fertility and sterility*, 1994 39 (3): 283-91.
- 3- Kantak N.M and Gogate M.G Effect of short term administration of Tulsi on reproductive behaviour and adult male rats, *Indian journal of physiology and pharmacology*. 1992; 36 (2): 109-111.
- 4- Taylor G.T, et al, Search for a male contraceptive: The effects of gossypol on sexual motivation and epididymal sperm. *Journal of medicine* 1991;22(1): 24-43.
- 5- oberlander, G yeung C.H and cooper T.G induction of reversible infertility in male rats by oral ornidazole and its effects on sperm motility and epididymal secretion, *journal of reproduction and fertility* 1994;100: 551-59.
- 6- Caleb A.Awoniyi, Varadaraj chandrasheker et al, The effects of chronic administration pyrimelhamine on spermatogenesis and fertility in male rats. *journal of andrology* 1999; 14 (3): 174-9.
- 7- Anand R.J.K et al Calcium channel antajonist, Verapamil modulates human spermatozoal functions. *Research in experimental medicine* 1994; 194: 165-78.
- 8- james M cosentino, Ruth. pakyz E and fried pyrimethamine: an approach to the developement of a male contraceptive; *proc. Natl. Acad. Sci.USA*;1990 87:1431-5.
- 9- james M.and cosentino The effects of sulfasalazine on human male fertility and seminal prostaglandins, *journal of urology*, 1984; 682-686.