مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۳، شماره ۲، تابستان ۹۲، صفحات ۸۱ تا ۸۵

Original Article

تاثیرآزیدسدیم بر تحرک اسپرم زنده وتعیین میزان تستوسترون،LH و FSH خون درموش کوچک آزمایشگاهی نربالغ

مریم خسروی [۱]، فاطمه آلپلو [۲]، مهسا هادی پور جهرمی [۳]، شهرزاد خاکپور [۴]

[۱] استادیار، فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
[۲] کارشناسی ارشد زیست شناسی- علوم جانوری،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال
[۳] دانشیار، گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۴] استادیار، گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *آزید سدیم نوعی ماده شیمیایی و سمی است. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر آزید سدیم بر تحرک اسپرم زنده، تعیین میزان تستوسترون، LH وFSH خون در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ بود.*

روش بررسی: *دراین مطالعه تجربی، ۵۰ سرموش نر نژادBalb/c در۵گروه ۱۰ تایی با وزن حدود ۳۰-۲۵ گرم مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات ۶۰ روز تحت تجویز محلول آزید سدیم به صورت خوراکی (گاواژ) قرار گرفتند. به ترتیب به گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ به میزان ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوانات، محلول آزید سدیم خورانده شد. پس از پایان تیمار، میزان هورمون‌های تستوسترون، LH و FSH سرم خون اندازه‌گیری شده و تعداد اسپرم‌ها، میزان تحرک و درصد زنده بودن اسپرم‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *تعداد اسپرم‌ها در ۳ گروه تجربی نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P<0/001$).درصد زنده بودن اسپرم‌ها در ۳ گروه تجربی نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. میزان تحرک اسپرم‌ها با افزایش میزان دوز دارو کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد را نشان داد ($P<0/001$). میزان هورمون تستوسترون نیز با افزایش میزان دوز دارو، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد را نشان داد ($P<0/001$). میزان FSH در ۳ گروه تجربی نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد به جزء دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم اختلاف معنی‌داری نداشت، اما میزان LH در گروه های تجربی دریافت کننده دوز روزانه ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<0/01$).*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد با کاهش هورمون تستوسترون و تعداد اسپرم‌ها، فرآیند اسپرماتوژنز در حیوانات کاهش می‌یابد.*

واژگان کلیدی: *آزید سدیم، موش کوچک آزمایشگاهی، اسپرماتوژنز، تستوسترون، LH، FSH.*

مقدمه

آزید سدیم یک مادهٔ شیمیایی جامد کریستالی، سفید رنگ و سمی است که در ساخت کیسه‌های هوایی در اتومبیل‌ها استفاده می‌شود. این ماده شیمیایی به دلیل آزادسازی گاز سمی باعث بروز بیماری‌های مختلف از جمله سرطان می‌شود. استنشاق بیش از حد گاز آزید سدیم باعث مرگ می‌شود. آزید سدیم به دلیل داشتن رادیکال آزاد قادر به تخریب سلول‌ها است (۱). در تحقیقاتی که توسط Straube.M در سال۱۹۹۵ صورت گرفت، نشان داده شده است که آزیدسدیم فرآیند اسپرماتوژنز را کاهش می‌دهد (۲).

تحقیقات Carmen.W در سال ۲۰۰۴ نشان داد که آزید سدیم از طریق فعالیت گوانیلات سیکلاز و به دنبال آن افزایش سطح

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، فاطمه آلپلو
(**email**: falpaloo@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۶/۲۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۱/۱۱/۲۹

CGMP درون سلولی شده که موجب مهار انقباض عضلات صاف دیواره شریانچه‌ها، اتساع عروق و همچنین کاهش فشار می‌شود (۳). در تحقیقاتی که توسط Stefan. B در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت، نشان داده شدکه مقدار زیاد آزید سدیم موجب مهار آنزیم‌های سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی و اختلال در تنفس سلولی می‌شود (۴).

تحقیق حاضر به منظور بررسی تأثیرآزید سدیم برتحرک اسپرم زنده، تعیین میزان تستوسترون، LH وFSH خون در موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ صورت گرفت.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، موش‌های نر نژادBalb/c با محدوده وزنی ۳۰-۲۵گرم از انستیتو پاستور کرج خریداری و در قفس‌های مخصوص در شرایط۱۲ساعت روشنایی و۱۲ساعت تاریکی در دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات به ۵ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند.گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ محلول آزید سدیم را به ترتیب به میزان ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن حیوانات دریافت کردند. گروه کنترل هیچ نوع ماده یا حلالی دریافت نکرد و گروه شاهد حلال ماده شیمیایی دریافت کرد. LD50 آزید سدیم در موش‌های سوری نر برابر۲۷ میلی گرم بر کیلوگرم می‌باشد.

در پایان دوره تجویز دارو، خونگیری از قلب حیوانات انجام گرفت، سرم خونی جدا گردید و با روش الایزا (Elisa)، میزان تستوسترون، LH وFSH اندازه گیری گردید. پس از جراحی موش‌ها، بیضه‌ها و وازودفران‌ها بیرون آورده و اسپرم‌های موجود در وازودفران‌ها توسط کراتیکول مشبک درزیرمیکرسکوپ شمرده شد.

جهت تعیین تعداد اسپرم‌ها (Sperm count) وازودفران‌ها بعد از توزین در ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ۳۷ درجه سانتی گراد و پس از قطعه قطعه شدن، و به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ شمارش اسپرم ها صورت گرفت.

برای محاسبه تعداد اسپرم‌ها بر حسب گرم دفران‌ها، بعد از شمارش اسپرم‌ها در دو خانه لام نئوبار، آنها را بر تعداد مربع × حجم هر مربع تقسیم کرده و تعداد اسپرم بر حسبmm^3 به دست آمد، سپس این عدد را در ۲۰۰۰ ضرب کرده و تعداد اسپرم‌ها در ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به دست آمد. عدد به دست آمده بر جمع کل وزن دو دفران ها تقسیم شده که نتیجه حاصل تعداد اسپرم‌ها بر حسب گرم دفران‌ها به دست آمد.

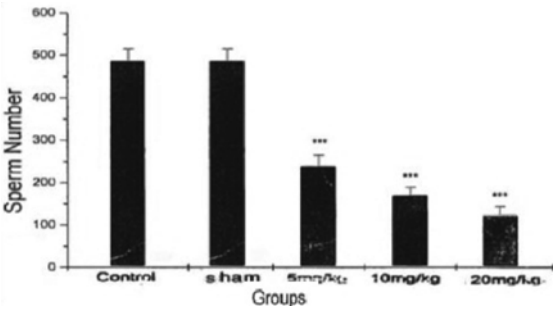
جهت تعیین درصد اسپرم‌های زنده (Sperm viability) روی نمونه یک قطره از رنگ ائوزین B یا نیگروزین ریخته و توسط لام دیگر، قطره مخلوط شده را در طول لام اولیه گسترده شده و به سرعت روی شعله چراغ الکلی خشک و فیکس گردید. در اسپرم‌های زنده قسمت سر و تنه به رنگ روشن (سبز و روشن) درآمده، در حالی که اسپرم‌های مرده به خود رنگ گرفته و تمام قسمت‌های آنها به خصوص سر، به طوری که تیره‌تر از زمینه بودند، به رنگ بنفش تیره در آمدند.

با محاسبه تعداد اسپرم‌های رنگ گرفته به کل اسپرم‌های موجود در زیر میدان دید میکروسکوپ (بزرگنمایی۴۰×) اسپرم‌های زنده به دست آمد. جهت تعیین درصد تحرک اسپرم‌ها(Sperm motility) به وسیله پیپت پاستور یک قطره از سرم فیزیولوژی حاوی اسپرم روی یک لام تمیز قرار داده و روی آن با لامل پوشیده شد.

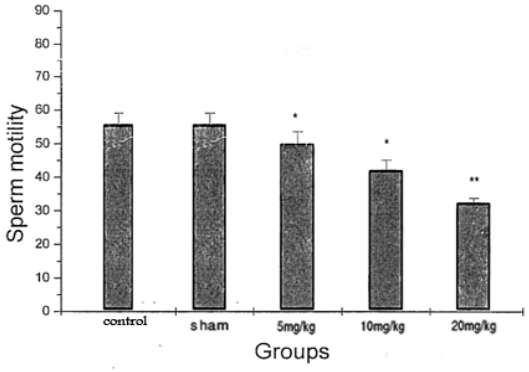
سپس لام به وسیله میکوسکوپ نوری با بزرگنمایی۱۰× و ۴۰× مورد بررسی قرار گرفت و تعداد اسپرم‌های متحرک نسبت به کل اسپرم‌های موجود در زیر میدان دید محاسبه شد.

یافته‌ها

تعداد اسپرم‌های موجود در وازودفران‌های موش نر، تعداد اسپرم در گروه‌های تجربی دریافت کننده آزیدسدیم با دوزmg/kg ۵، ۱۰ و ۲۰ کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد پیدا کرد. در گروه تجربی دریافت کننده آزید سدیم با دوز mg/kg ۲۰ بیشترین کاهش اسپرم مشاهده شد. طبق نمودار ۱، با افزایش میزان دوز آزید سدیم تعداد اسپرم‌ها به صورت وابسته به دوز کاهش یافت.

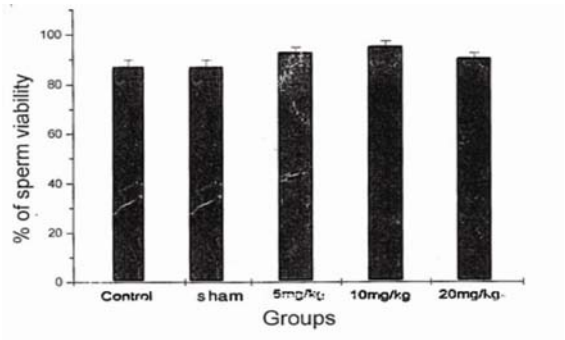


نمودار ۱- تعداد اسپرم‌های موجود در وازودفران درگروه‌های شاهد، کنترل و گروه‌های دریافت کننده دوزهای mg/kg۵، ۱۰ و ۲۰ آزید سدیم



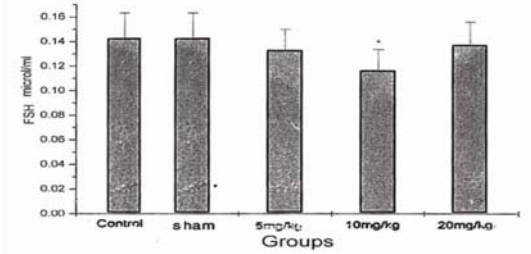
نمودار ۲- قابلیت زیستی سلول‌های اسپرم در گروه‌های کنترل، شاهد و گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۵ mg/kg، ۱۰ و ۲۰ آزید سدیم (n=۱۰، $^{*}p<۰/۰۵$، $^{**}p<۰/۰۱$)

میزان تحرک اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف توسط تحلیل آماری صورت گرفت. میزان تحرک اسپرم‌ها در گروه‌های دریافت کننده آزیدسدیم با دوز ۵ mg/kg، ۱۰ و۲۰ نسبت به گروه کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری داشت. طبق نمودار ۲، با افزایش دوز آزید سدیم، قابلیت زیستی سلول های اسپرم به صورت وابسته به دوز کاهش یافت.



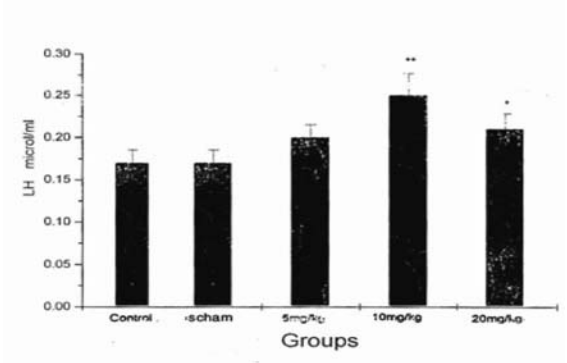
نمودار ۳- درصد زنده ماندن اسپرم‌ها درگروه‌های کنترل، شاهد و گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۵ mg/kg، ۱۰ و ۲۰ آزید سدیم (n=۱۰)

میزان درصد زنده ماندن اسپرم‌ها در گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ نسبت به گروه کنترل و شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت.



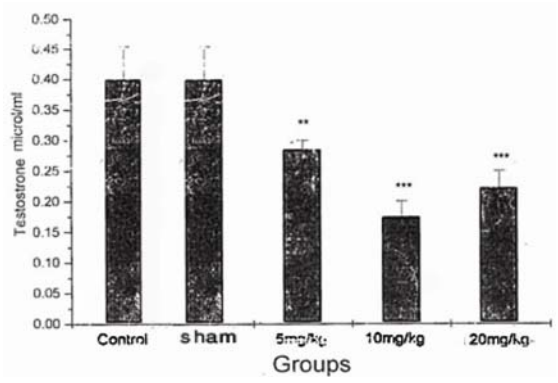
نمودار۴- میزان FSH درگروه‌های کنترل، شاهد وگروه‌های دریافت کننده دوزهای ۵ mg/kg، ۱۰ و ۲۰ آزید سدیم (n=۱۰، $^{**}p<۰/۰۵$)

میزان FSH تغییر معنی‌داری در گروه‌های تجربی دریافتکننده آزید سدیم با دوزهای ۵ mg/kg و۲۰ نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد نشان داده نشد. میزان FSH در گروه تجربی دریافت کننده آزید سدیم با دوز ۱۰ mg/kg نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری رانشان داد. طبق نمودار۴، میزان FSH وابسته به دوز نبوده و موثرترین دوز را در گروه تجربی دریافت کننده آزید سدیم با دوز ۱۰mg/kg نشان داد که منجر به کاهش میزان FSH شد.



نمودار ۵- میزان LH درگروه‌های کنترل، شاهد و گروه‌های دریافت کننده دوزهای ۵ mg/kg، ۱۰ و ۲۰ آزید سدیم (n=۱۰، $^{*}p<۰/۰۵$، $^{**}p<۰/۰۱$)

LH در گروه‌های تجربی دریافت کننده آزید سدیم با دوز۱۰mg/kg و ۲۰ نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد افزایش معنی‌داری پیدا کرد. طبق نمودار۵، میزان LH وابسته به دوز نبود و موثرترین دوز را در گروه تجربی دریافت کننده آزید سدیم با دوز ۱۰mg/kg نشان داد که میزان LH افزایش یافته است.



نمودار ۶- میزان هورمون تستوسترون درگروه‌های کنترل، شاهد و گروه‌های دریافت کننده دوزهای 5mg/kg ، ۱۰ و ۲۰ آزید سدیم (n=۱۰، $^{**}p<۰/۰۰۱$، $^{***}p<۰/۰۰۱$)

هورمون تستوسترون در تمام گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری داشت. بیشترین کاهش درگروه تجربی دریافت کننده آزید سدیم با دوز ۱۰mg/kg نسبت به گروه کنترل و شاهد مشاهده شد. طبق نمودار ۶، میزان تستوسترون وابسته به دوز نبود و موثرترین دوز را در گروه تجربی دریافت کننده آزیدسدیم با دوز mg/kg ۱۰ نشان داد که میزان تستوسترون کاهش یافته است.

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد که آزید سدیم در دوز مصرفی روزانه ۱۰میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن حیوانات در طی ۶۰ روز کاهش بیشتری بر فرآیند اسپرماتوژنز داشته است و در تحقیقاتی که توسط Joseph Ostdy در سال۱۹۹۹ بر روی علف کش‌ها و آفت کش‌ها صورت گرفت، نشان داد که آفت کش‌ها باعث ناباروری می‌شوند (۵). در سال۱۹۹۰، Olsen و در سال ۱۹۹۶، CinCinati بر روی آفت‌کش‌های ۱،۲- دی برمو ۳کلروپروپان تحقیقاتی انجام دادند و کاهش تعداد اسپرم‌ها را گزارش نمودند. نتایج این محققین با نتایج تحقیقات این مطالعه مطابقت می‌کند (۶، ۷).

در سال ۲۰۰۹ ، Fahad Alqurainy بیان کرد استفاده از آزید سدیم به عنوان آفت کش در کشاورزی و استنشاق این ماده به هر طریقی باعث کاهش تعداد اسپرم‌ها می‌شود (۸). طبق مطالعات صورت گرفته توسط Acatt.Ts et al 1983 Tribble.DL , 1999 سلول‌های سرتولی در لوله‌های اسپرم ساز نقش نگهدارنده وپشتیبان را دارند و در رشد و نمو و تمایز سلول‌های اسپرماتوژنیک موثرند و باعث بلوغ اسپرم می‌شوند (۱۰، ۹). طبق نتایج حاصل از این مطالعه احتمالا سمیت آزید سدیم برروی هورمون تستوسترون اثر گذاشته و سلول‌های سرتولی کاهش پیدا کرده و در نتیجه بلوغ و تعداد اسپرم‌ها کاهش پیدا کرده است.

آزیدسدیم به عنوان یک مادهٔ سمی باعث تغییر در ترکیب شیمیایی وعملکرد اپیدیدیم می‌شود و باعث تغییر انتقال و تعداد اسپرم در بلوغ اسپرم می‌شود، لذا باعث کاهش پروتئین‌های مؤثر بر حرکت رو به جلوی اسپرم می‌گردد (۱۱، ۷). همچنین آزید سدیم احتمالا با ایجاد سمیت درون سلولی و آسیب به ساختار آنزیم‌های سازنده در مسیر سنتز استروئیدها موجب اختلال در سنتز هورمون تستوسترون می‌گردد، در نتیجه از طریق فیدبک منفی باعث افزایش ترشح LH می‌شود (۱۲).

نتایج این تحقیق مؤید این مطلب می‌باشند که تیمار موش‌های سوری نر نژادBalb/c با آزید سدیم، باعث کاهش فرآیند اسپرماتوژنز،کاهش هورمون تستوسترون و تعداد اسپرم‌ها می‌شود که در نهایت منجر به ناباروری می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از کلیهٔ اساتیدی که در این تحقیق همکاری کردند، به ویژه سرکار خانم دکتر شهرزاد خاکپور از مرکز تحقیقات علوم پزشکی دانشگاه آزاد واحد پزشکی تهران، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Forget A, Fredette V.Sodium azide selective medium for the primary isolation of anaerobic bacteria. J Bacteriol 1962; 83:1217-23.
2. Straube E, Straube W, Krüger E, Bradatsch M, Jacob-Meisel M, Rose HJ. Disruption of male sex hormones with regard to pesticides: pathophysiological and regulatory aspects. ToxicolLett 1999; 107:225-31.
3. van den Berg CW, Taylor KE, Lang D. C-reactive protein-induced in vitro vasorelaxation is an artefact caused by the presence of sodium azide in commercial preparations. ArteriosclerThrombVascBiol 2004; 24:e168-71.
4. Fauster K, Hartl M, Santner T, Aigner M, Kreutz C, Bister K, et al. 2'-Azido RNA, a versatile tool for chemical biology: synthesis, X-ray structure, siRNA applications, click labeling. ACS ChemBiol 2012; 7:581-89.
5. Gray LE Jr, Ostby J, Cooper RL, Kelce WR. The estrogenic and antiandrogenic pesticide methoxychlor alters the reproductive tract and behavior without affecting pituitary size or LH and prolactin secretion in male rats. ToxicolInd Health 1999; 15:37-47.
6. Frazier LM, Jones TL. Managing patients with concerns about workplace reproductive hazards. J Am Med WomensAssoc 2000; 55:80-105.
7. Olsen GW, Lanham JM, Bodner KM, Hylton DB, Bond GG. Determinants of spermatogenesis recovery among workers exposed to 1,2-dibromo-3-chloropropane. J Occup Med 1990; 32:979-84.
8. Fahad AL .Qurainy and Salim khan. Mutagenic effects of sodium azide and its application in crop improvement. World ApplSci J 2009; 6:1589-1601.

9. Acott TS, Katz DF, Hoskins DD. Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation. BiolReprod 1983; 29:389-99.

10. Tribble DL. AHA Science Advisory. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasison vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Circulation 1999; 99:591-95.

11. Lamb JC, Foster P, Editors. Physiology and toxicology of male reproduction. London: Academic Press Inc; 1988. P.1-100.

12. Usselman MC, Cone RA. Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by "immobilin," a high molecular weight glycoprotein. BiolReprod 1983; 29:1241-53.