

بررسی تأثیر تاموکسیفون بر توان تولید مثلی رت‌های نر نژاد ویستار

شهربانو عربانی^۱، کاظم پریور^۲، موصومه اصل روستا^۳

^۱ استاد، فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

^۲ استاد، سلوی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

^۳ کارشناس ارشد زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

چکیده

سابقه و هدف: تاموکسیفون یک آنتی استروئن غیراستروئیدی است که برای درمان سرطان سینه تجویز می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر تاموکسیفون بر میزان تستوسترون و ساختار بیضه در رت‌های نر نژاد ویستار می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، یک گروه از رت‌ها به سن ۴۵ روز و وزن ۹۰ گرم، به مدت ۱۰ روز متوالی دوز ۱۰۰ میکروگرم تاموکسیفون بر کیلوگرم وزن بدن را در حلالی شامل اتانول ۶۰ درصد و سرم فیزیولوژی دریافت کردند. گروه شم در این مدت، فقط حلال دریافت نموده و گروه شاهد هیچ ماده‌ای دریافت ننمود. پس از پایان تیمار، میزان تستوسترون حیوانات با روش ELISA اندازه-گیری شد و برش‌های بافتی ۵ میکرومتری از بیضه تهیه شد و توسط هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی گردید.

یافته‌ها: میزان تستوسترون در گروه دریافت کننده تاموکسیفون در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت ($P < 0.01$). همچنین کاهش چشمگیری در قطر بیضه، قطر و ضخامت لوله‌های سینی فر، تعداد اسپرماتید و اسپرم این حیوانات مشاهده گردید ($P < 0.001$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری نمود که توان تولید مثلی رت‌های نر نژاد ویستاری که در زمان قبل از بلوغ تاموکسیفون دریافت می‌کنند، کاهش می‌یابد.

واژگان کلیدی: تاموکسیفون، تولید مثل، تستوسترون، بیضه، رت.

مقدمه

استرادیول آنها مشاهده می‌گردد. تیمار طولانی مدت (۶ هفته) تاموکسیفون، پاسخ LH به طرز چشمگیری افزایش می‌دهد. همچنین مصرف تاموکسیفون در پسرانی که بلوغ آنها به تأخیر افتاده است، محور هیبوفیز-گناد را فعال نموده و بلوغ را تسريع می‌نماید (۱). در صورتی که مردان مبتلا به ضعف جنسی، روزانه ۲۰ میلی‌گرم تاموکسیفون را به مدت ۶ ماه متوالی دریافت نمایند، تغییرات وسیعی در تعداد اسپرم آنها مشاهده می‌گردد (۲). امروزه اثرات آنتاگونیستی تاموکسیفون در سطح هیپوتالاموس و غده هیبوفیز تأیید گردیده است و نشان می‌دهد که تاموکسیفون می‌تواند از سد خونی-مغزی عبور نماید (۳). با توجه به اثرات متناظری که از تأثیرات تاموکسیفون بر دستگاه تولید مثلی جنس نر مشاهده گردیده است، تحقیق حاضر به

تاموکسیفون، اولین آنتی استروژنی است که از سال‌های حدود ۱۹۷۰ برای درمان سرطان پیشرفت‌های پستان مورد استفاده قرار گرفته است (۴). اخیرا نتایج امیدوار کننده‌ای راجع به درمان ژینکوماستی مردان توسعه تاموکسیفون ارائه گردیده است و به نظر می‌رسد که استفاده از تاموکسیفون در معالجه این بیماران اثرات جانبی نیز ندارد (۵). اگر مردان سالم، تحت تیمار روزانه ۲۰ میلی‌گرم تاموکسیفون به مدت ۱۰ روز متوالی قرار گیرند، افزایش اندکی در غلظت هورمون‌های LH، FSH، تستوسترون و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

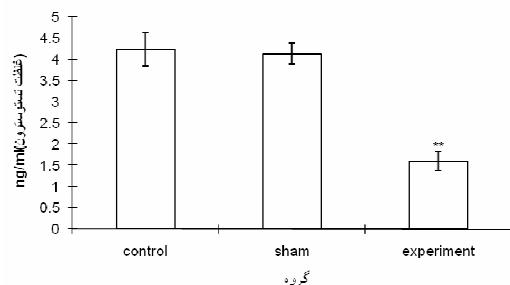
(email: oryan_sh@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۳/۴

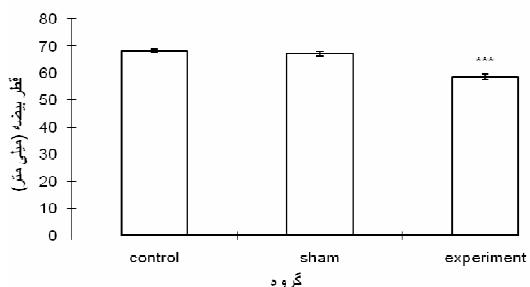
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۵/۲۸

تأثیر تاموکسیفین بر توان تولید مثلی رت‌های نر نژاد ویستار

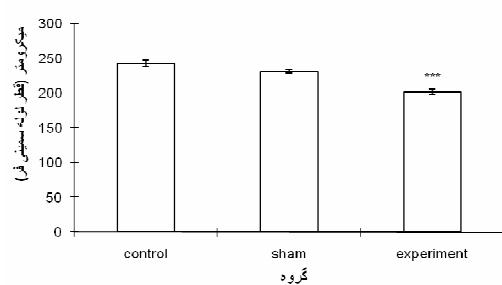
داری در قطر و ضخامت لوله‌های سمینی‌فر حیوانات گروه تجربی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید ($P < 0.001$) (نمودار ۳ و ۴) (شکل ۱).



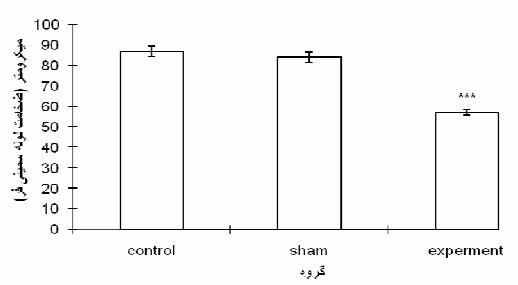
نمودار ۱- نتایج حاصل از سنجش غلظت تستوسترون.
 $P < 0.001$ **



نمودار ۲- نتایج حاصل از اندازه گیری قطر بیضه.
 $P < 0.001$ ***



نمودار ۳- نتایج حاصل از اندازه گیری قطر لوله‌های سمینی‌فر.
 $P < 0.001$ ***



نمودار ۴- نتایج حاصل از اندازه گیری ضخامت لوله‌های سمینی‌فر.
 $P < 0.001$ ***

منظور بررسی تأثیر تاموکسیفین بر غلظت تستوسترون و ساختار بیضه در رت‌های نر نژاد ویستار انجام شد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، رت‌های نر نژاد ویستار به وزن ۹۰-۱۰۰ گرم و سن تقریبی ۵ هفته از انتستیتو پاستور کرج خریداری و در قفس‌های مخصوصی که در آنها به راحتی آب و غذا دریافت می‌کردند، در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات به ۳ گروه تقسیم شدند که ۵ حیوان در هر گروه قرار داشت.

حیوانات گروه تجربی، با دوز ۸۰۰ میکروگرم تاموکسیفین (ساخت شرکت دارویی ایران هورمون) بر کیلوگرم وزن بدن در ۴/۰ میلی‌لیتر حلal (شامل ۰/۰۵ میلی‌لیتر اتانول ۶۰ درصد و ۰/۳۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی) به مدت ۱۰ روز متوالی گواژد شدند. گروه شم در این مدت حلal دریافت نموده و گروه شاهد هیچ نوع دارو یا حلالی دریافت ننمود.

۱۰ روز پس از پایان این دوره، خون‌گیری از قلب حیوانات انجام گرفت. سرم خونی با سانتریفوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جدا شد. تستوسترون سرم با روش الایزا (ELISA) اندازه گیری گردید.

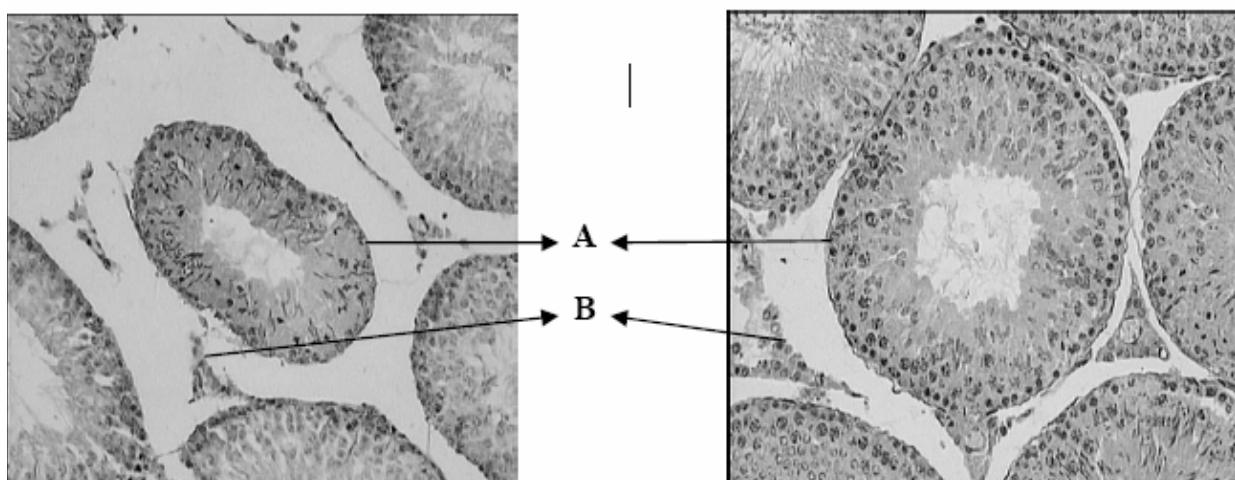
رت‌ها جراحی شده و بیضه آنها برداشته و در مایع بوئن به مدت ۲۴ ساعت تشییت گردید. سپس به ترتیب آب‌گیری با درجات صعودی الکل، شفاف نمودن نمونه‌ها توسط تولوئن، نفوذ پارافین، قالب‌گیری با پارافین و تهیه برش‌های ۵ میکرومتری انجام گرفت. در نهایت نمونه‌ها با هماتوکسیلین و اوزین رنگ‌آمیزی شده و توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. قطر بیضه، ضخامت تونیکا آلبوزینه، قطر و ضخامت لوله‌های سمینی‌فر اندازه گیری شد و همچنین تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک با استفاده از گراتیکول مشبك ($\times 100$) شمارش گردید.

یافته‌ها

غلظت تستوسترون در گروه دریافت کننده تاموکسیفین در مقایسه با گروه شاهد، کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.01$) (نمودار ۱).

همچنین کاهش معنی‌داری در قطر بیضه گروه تجربی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده گردید ($P < 0.001$) (نمودار ۲) (شکل ۱).

ضخامت تونیکا آلبوزینه در بیضه حیوانات گروه تجربی، تغییر معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد نشان نداد. کاهش معنی-

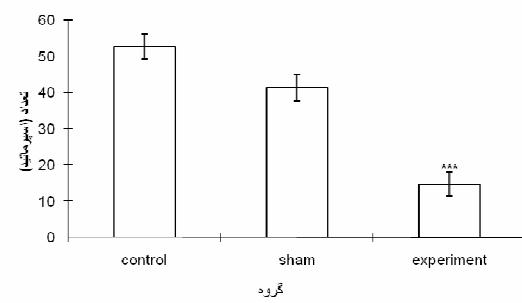


شکل ۱- برش عرضی لوله های سینی فر در گروه شاهد (راست) و گروه تجربی ۳ (چپ). A: لوله سینی فر؛ B: بافت بینایینی.
(بزرگنمایی ۲۰۰۰ برابر)

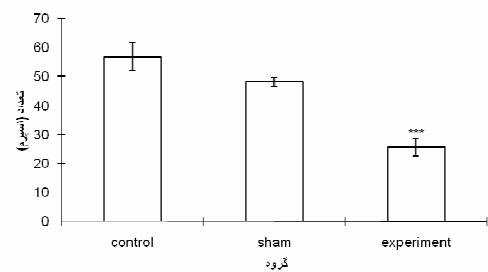
هیچ گونه تغییر معنی داری در تعداد سلول های اسپرماتوگونی نوع A، اسپرماتوگونی نوع B، اسپرماتوسیت اولیه، سرتولی و لیدیگ مشاهده نگردید. تعداد اسپرماتیدها و اسپرم ها در گروه تجربی کاهش معنی داری را نشان داد ($P < 0.001$) (نمودار ۵ و ۶).

بحث

تیمار تاموکسیفن به همراه استرادیول بنزووات در رتهای ۵ روزه، پاسخ اپی دیدیمی القا شده توسط استرادیول بنزووات را کاهش می دهد (۶). مصرف خوراکی روزانه 400 میلی گرم بر کیلو گرم تاموکسیفن توسط رتهای نر بالغ به مدت 120 روز متوالی منجر به کاهش چشم گیر وزن بیضه، اپی دیدیم، پروستات و سینهای وزیکول می گردد. غلظت LH و تستوسترون سرم خونی کاهش می یابد، در حالی که تغییری در غلظت FSH و استرادیول مشاهده نمی گردد (۷). تیمار رتهای نر بالغ با دوزهای 200 و 400 میکرو گرم بر کیلو گرم در روز تاموکسیفن طی مدت 90 روز منجر به کاهش چشم گیر ناحیه اشغال شده بیضه توسط سلول های لیدیگ و همچنین سطوح LH سرم می گردد (۸). کاهش مقادیر LH خون به دنبال مصرف دوز 400 میلی گرم بر کیلو گرم در روز تاموکسیفن توسط رتهای نر به علت کاهش غلظت LHRH و به دنبال آن LH می باشد (۹). طی مطالعه دیگری، جوجه های نر White Leghorn که در دو هفته اول زندگی به سر می برندند تا سن 12 هفتگی به طور متناوب تحت تزریق دوزهای مختلف تاموکسیفن قرار گرفتند. دوزهای پایین تاموکسیفن، منجر به افزایش رشد تاج و آغاز زودهنگام فعالیت جنسی حیوانات و تولید زودتر از موعد منی گردید. بیضه این حیوانات نسبت به گروه شاهد بزرگ تر بود. جوجه های تحت تیمار دوزهای بالاتر تاموکسیفن، اسپرم کمتری نسبت به گروه شاهد تولید نمودند.



نمودار ۵. نتایج حاصل از شمارش تعداد اسپرماتید.
 $P < 0.001$ ***



نمودار ۶. نتایج حاصل از شمارش تعداد اسپرم.
 $P < 0.001$ ***

به علاوه فاصله زیادی بین لوله های سینی فر در بیضه گروه دریافت کننده تاموکسیفن مشاهده گردید (شکل ۱).

در *in vivo* سمیت ژنتیکی دارد (۱۳). مطالعات *in vitro* ثابت نموده‌اند که تاموکسی芬 موجب القای مرگ سلولی آپوپوتیک و نکروتیک به شیوه وابسته به دوز می‌گردد (۱۴). بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعات پیشین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که دریافت دوز ۸۰۰ میکروگرم تاموکسی芬 بر کیلوگرم وزن بدن توسط رت‌های نابالغ، با تأثیر نهادن بر محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- بیضه، منجر به کاهش غلظت تستوسترون در زمان پس از بلوغ می‌گردد و از طرفی با القای اثرات منفی بر ساختار هیستولوژیکی بیضه، تعداد اسپرم را در این حیوانات کاهش می‌دهد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تیمار رت‌های نر نابالغ نژاد ویستار توسط تاموکسی芬، منجر به کاهش توان تولید مثلی این حیوانات در زمان پس از بلوغ می‌گردد.

همچنین بیضه و آدنوهیپوفیز آنها کوچک‌تر از گروه شاهد بود (۱۰). تاموکسی芬 در دوزهای بالاتر از ۵ میکرومول در محیط *in vitro* رشد سلول را مهار و در دوز ۷/۵ میکرومول اثرات برگشت‌ناپذیری بر سلول‌ها القا می‌نماید. همچنین موجب کاهش تعداد سلول‌ها می‌شود که علت آن، اثرات سیتوتوکسیک این ماده شیمیایی می‌باشد (۱۱). مصرف خوراکی دوز ۸۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم تاموکسی芬 توسط رت‌های نر بالغ، منجر به افزایش تعداد سلول‌های غول‌بیکر چنددهسته‌ای در بیضه می‌گردد (۱۲). بررسی‌ها نشان داده که تاموکسی芬 به شکل وابسته به دوز، تعداد اسپرم‌های غیرمعمول در موش‌ها را افزایش می‌دهد. تغییر در تعداد اسپرم‌ها و پیدایش اسپرم‌های غیرمعمول، مدرکی از دخالت تاموکسی芬 یا متابولیت‌هایش در تمایز ژنتیکی کنترل شده بر اسپرم‌اتوزوئید است که نشان می‌دهد این دارو در دوزهای بالا

REFERENCES

1. Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor. *Clin Cancer Res* 2003;9:1980-89.
2. Hanavadi S, Banerjee D, Monypenny IJ, Mansel RE. The role of tamoxifen in the management of gynaecomastia. *Breast* 2005;15:276-80.
3. Vermelun A, Comhaire F. Hormonal effects of an antiestrogen, tamoxifen, in normal and oligospermic men. *Fertil Stril* 1978;29:320-27.
4. Traub AI, Thompson W. The effect of tamoxifen on spermatogenesis in subfertile men. *Andrologia* 1981;13:486-90.
5. Patterson J. Clinical aspects and development of antiestrogen therapy: a review of the endocrine effects of tamoxifen in animals and man. *J Endocrinol* 1981;89:67-75.
6. Dhar JD, Gupta S, Bansode FW, Setty BS. Response of the postnatal rat epididymis to estrogen & antiestrogens. *Indian J Med Res* 1997;105:72-76.
7. Gill-Sharma MK, Balasinor N, Parte P. Effect of intermittent treatment with tamoxifen on reproduction in male rats. *Asian J Androl* 2001;3:115-19.
8. Gopalkrishnan K, Gill-Sharma MK, Balasinor N, Padwal V, D'Souza S, Parte P, et al. Tamoxifen-induced light and electron microscopic changes in the rat testicular morphology and serum hormonal profile of reproductive hormones. *Contraception* 1998;57:261-69.
9. Balasinor N, Parte P, Gill-Sharma MK, Kini J, Juneja HS. Mechanism delineating differential effect of an antiestrogen, tamoxifen, on the serum LH and FSH in adult male rats. *J Endocrinol Invest* 2006;29:485-96.
10. Rozenboim I, Dgany O, Robinzon B, Arnon E, Snapir N. The effect of tamoxifen on the reproductive traits in *White Leghorn* cockerels. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;32:377-81.
11. Murphy LC, Satherland RL. Differential effects of tamoxifen and analogs with nonbasic side chains on cell proliferation in vitro. *Endocrinology* 1985;116:1071-78.
12. D'Souza UJ. Tamoxifen induced multinucleated cells (symplasts) and distortion seminiferous tubules in rat testis. *Asian J Androl* 2003;5:217-20.
13. Padmalatha Rai S, Vijayalaxmi KK. Tamoxifen citrate induced sperm shape abnormalities in the mouse. *Mutant Res* 2001;492:1-6.
14. Mandlekar S, Kong AN. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 2001;6:469-77.