Protective effects of vitamin E against sertraline-induced oxidative stress on the reproductive system and expression of Bcl-2, Caspase-3 and Hsp70-2 genes in testicular tissue of mice

Hassan Morovvati[1], Hojat Anbara[2], Fereshteh Morshedi[3]

1. Professor, Department of Comparative Histology & Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran., (Corresponding Author), Tel: +98-21-61117117, Email: hmorovvati@ut.ac.ir, ORCID ID: 0000-0003-0275-1636
2. Ph.D. Candidate, Department of Comparative Histology & Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3472-9460
3. Ph.D. Candidate, Department of Comparative Histology & Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-0846-366X

ABSTRACT

Background and Aim: Sertraline is an antidepressant drug and many controversial reports have been presented on the complications of sertraline on the reproductive system. In this study we evaluated the protective effects of vitamin E against sertraline-induced damage to the reproductive system of male mice.

Materials and Methods: In this experimental study, 40 adult male mice were divided into 8 groups of 5. Four groups received 100 IU/kg.bw vitamin E by gavage for 42 days. One group was considered as control and three groups received just sertraline with doses of 5, 10 and 20 mg/kg.bw orally. 24 hours after the last treatment, testes tissue and blood samples were collected and sent for histochemical and biochemical studies, spermatogenic indices as well as measurement of the expressions of Bcl-2, Caspase-3 and Hsp70-2 genes.

Results: The results showed a significant increase in the level of malondialdehyde, nitric oxide and expression of Caspase-3 and Hsp70-2 genes. We also found a significant decrease in spermatogenesis indices, total antioxidant capacity, testosterone and Bcl-2 gene expression in the group receiving 20 mg/kg.bw sertraline ($P<0.05$). The above mentioned parameters were improved in the groups that received vitamin E along with sertraline.

Conclusion: Vitamin E can decrease the adverse effects of sertraline on biochemical and histochemical parameters, spermatogenic indices and can increase the expression of Bcl-2, Caspase-3 and Hsp70-2 genes in the testicular tissue of mice.

Keywords: Sertraline, Vitamin E, Apoptosis, Bcl-2, Caspase-3, Hsp70-2.

Received: July 12, 2021 **Accepted:** Nov 17, 2021

How to cite the article: Hassan Morovvati, Hojat Anbara, Fereshteh Morshedi. Protective effects of vitamin E against sertraline-induced oxidative stress on the reproductive system and expression of Bcl-2, Caspase-3 and Hsp70-2 genes in testicular tissue of mice. SJKU 2023;27(5):24-40.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و هفت / آذر و دی 1401/40-24

اثرات محافظتی ویتامین E در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از سرترالین بر دستگاه تولید-مثلی و بیان ژن‌های Bcl-2، Caspase-3 و Hsp70-2 در بافت بیضه موش سوری

حسن مروتی[1]، حجت عنبرا[2]، فرشته مرشدی[3]

1- استاد، بخش بافت شناسی و جنین‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، پست الکترونیک: hmorovvati@ut.ac.ir، تلفن ثابت: 61117117-021، کد ارکید: 0000-0003-0275-1636

2- دانشجوی دکترای تخصصی بافت شناسی مقایسه‌ای، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. کد ارکید: 0000-0002-3472-9460

3- دانشجوی دکترای تخصصی بافت‌شناسی مقایسه‌ای، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. کد ارکید: 0846-0003-0000- 366x

چکیده

زمینه و هدف: سرترالین ازجمله داروهای ضدافسردگی است که گزارش‌های بحث‌برانگیزی در رابطه با عوارض این دارو بر روی دستگاه تولیدمثل وجود دارد. مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی اثرات محافظتی ویتامین E در برابر آسیب‌های ناشی از سرترالین بر دستگاه تناسلی موش نر انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، 40 سر موش نر بالغ به هشت گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. چهار گروه از موش‌ها ویتامین E را به میزان 100 واحد بین‌المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی به مدت 42 روز دریافت نمودند. به سه گروه از گروه‌های فوق بعد از دریافت ویتامین E، سرترالین به میزان 5، 10 و 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی تجویز گردید. یک گروه به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شده و سه گروه دیگر تنها سرترالین را به میزان 5، 10 و 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی دریافت نمودند. 24 ساعت پس از آخرین تیمار، نمونه‌های خونی و بافتی بیضه جمع‌آوری و جهت بررسی‌های بیوشیمیایی، هیستوشیمیایی، شاخص‌های اسپرماتوژنز و همچنین بیان ژن‌های Bcl-2، Caspase-3 و Hsp70-2 مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار سطح مالون دی‌آلدئید، نیتریک اکساید، بیان ژن‌های Caspase-3 و Hsp70-2 و کاهش معنی‌داری در شاخص‌های اسپرماتوژنز، سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام، تستوسترون و بیان ژن Bcl-2 در گروه دریافت-کننده سرترالین به میزان 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بود ($P<0/05$). پارامترهای ذکر شده در گروه‌هایی که همراه سرترالین ویتامین E را نیز دریافت کرده بودند، بهبود یافته بود.

نتیجه‌گیری: ویتامین E می‌تواند اثرات منفی بر پارامترهای بیوشیمیایی، هیستوشیمیایی، شاخص‌های اسپرماتوژنز و همچنین بیان ژن‌های Bcl-2، Caspase-3 و Hsp70-2 در بافت بیضه موش‌های دریافت‌کننده سرترالین را بهبود بخشد.

کلمات کلیدی: سرترالین، ویتامین E، آپوپتوز، Bcl-2، Caspase-3، Hsp70-2.

وصول مقاله : 1400/4/21 اصلاحیه نهایی:1400/8/19 پذیرش:1400/8/26

مقدمه

افسردگی یک اختلال روان‌پزشکی شایع است که بنا به گزارش سازمان جهانی بهداشت، یکی از دلایل مهم ناتوانی در جهان بوده و میزان ابتلا به این بیماری در افراد و به دنبال آن کاهش کیفیت زندگی رو به افزایش است (1). در میان داروهای پرکاربرد در روان‌پزشکی، مهارکننده‌های مونوآمین اکسیداز، داروهای ضدافسردگی سه حلقه‌ای، مهارکننده‌های انتخابی بازجذب سروتونین، مهارکننده‌های بازجذب سروتونین و نورآدرنالین، داروهای ضدافسردگی سروتونرژیک خاص و بنزودیازپین بیشترین تجویز را در بین داروهای ضدافسردگی دارند (2). سرترالین (Sertraline) با نام‌های تجاری آسنترا و زلفت جزو نسل سوم داروهای ضدافسردگی بوده و از گروه مهارکننده‌های انتخابی بازجذب سروتونین (SSRIs) است که برای درمان افسردگی، اختلالات خلقی و اضطرابی بزرگسالان، اختلالات استرسی پس از سانحه و غیره استفاده می‌شود (3). مکانیسم اثر سرترالین از طریق جلوگیری از جذب مجدد سروتونین توسط گیرنده‌های عصبی پس‌سیناپسی و افزایش غلظت سروتونین در دستگاه عصبی مرکزی است (3). عوارض جانبی سرترالین شامل ناتوانی جنسی، کاهش تمایلات جنسی و تأخیر در انزال بوده و همچنین با ایجاد فرآیند استرس اکسیداتیو تأثیرات منفی بر سیستم تولیدمثل دارد (3 و4). استرس اکسیداتیو اختلال در تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و دفاع آنتی اکسیدانی است که می‌تواند به DNA، پروتئین‌ها و چربی‌ها آسیب برساند و در نهایت منجر به نکروز یا آپوپتوز در سلول‌های زنده شود (6 و5). ویتامین E یکی از ویتامین‌های محلول در چربی است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و اثر شیمیایی مواد مخربی که به بافت‌های بدن آسیب می‌زند را از بین می‌برد. این ویتامین توانایی زیادی در خنثی کردن رادیکال‌های آزاد ساخته شده درون سلول‌های بدن دارد. ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌تواند نقش کلیدی در به تأخیر انداختن پاتوژنز انواع بیماری‌های دژنراتیو داشته و در دستگاه تولیدمثلی نر نیز موجب مهار نمودن اثرات مخرب رادیکال های آزاد در بیضه و اسپرم گردد (7 و3). آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، فرآیند فیزیولوژیکی است که نقشی کلیدی در حفظ هومئوستاز بافت‌های بالغ و نیز تنظیم تکامل سیستم ایمنی در جریان رشد و تومورزایی را ایفا می‌کند. آپوپتوز نوعی مرگ سلولی است که در آن سلول‌های میزبان، به دنبال فعالیت برنامه‌ریزی شده و به‌صورت آبشاری از وقایع، از بین می‌روند. این فعالیت توسط مجموعه‌ای از ژن‌ها کنترل می‌شود (8). این پدیده در شرایط طبیعی باعث می‌شود که سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر حذف شوند و برای تکامل و ترمیم بافت ضروری است (9 و8). مسیرهای درگیر در تحریک فرآیند آپوپتوز را به دو دسته مسیر درونی (میتوکندریایی) و مسیر بیرونی (رسپتورهای مرگ) تقسیم می‌کنند. در شرایط آسیب DNA و اختلالات فاکتورهای رشد، مسیر داخلی (مسیر تحت کنترل پروتئین Bcl2) فعال می‌گردد. در صورت کاهش بیان پروتئین Bcl2 در غشای میتوکندری‌ها، تولید و سنتز سیتوکروم‌ها افزایش می‌یابد که به ایجاد تغییر در نفوذپذیری و فعالیت غشای میتوکندری‌ها انجامیده و سیتوکروم های c درون سیتوپلاسم آزاد می‌شوند (6). Caspase-3 به‌عنوان آخرین فاکتور در فرآیند آپوپتوز به‌شمار می‌رود. این ژن در حقیقت مسئول تخریب پروتئین‌ها در سلول‌های درحال آپوپتوز، شکست DNA سلولی و حتی فشردگی کروماتین در سلول‌ها است که در ادامه منجر به مرگ سلول خواهد شد (6). Hsp70-2 جزوی از پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) می‌باشد که در سیتوپلاسم و ساختارهای سلولی و نیز درجهت حفاظت از آن ها نقش داشته و به‌صورت پروتئین‌های چاپرون عمل می‌کند. پروتئین Hsp70-2 در بیضه و اسپرم انسان به‌ویژه در سطح غشای پلاسمایی بیان می‌شود. بیان آن‌ها در پاسخ به بالا رفتن دما، تاخوردگی پروتئین و استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد. Hsp70-2 یک نشانگر معتبر برای عملکرد اسپرم و ناباروری مردان است (10). با توجه به گزارش‌های

مختلف در مدل‌های انسانی و حیوانی مبنی بر اثرات نامطلوب داروهای گروه SSRIs از جمله سرترالین بر روی دستگاه‌ها و بافت‌های مختلف بدن مانند دستگاه تناسلی و ارتباط تنگاتنگی که این داروها با سیستم استرس اکسیداتیو دارند(2-4)، بررسی‌های محدودی درباره عوارض و آسیب‌های داروهای SSRIs بر روی دستگاه تناسلی صورت گرفته است (4) و همچنین بررسی‌های اندکی بر اثرات داروی سرترالین بر روی ساختار آناتومیکی بیضه و عملکرد کلی دستگاه تناسلی پرداخته است. از سوی دیگر، با توجه به تأثیرات سوء معدودی از داروهای SSRIs بر روی بافت‌ها و دستگاه‌های مختلف بدن به ویژه دستگاه تناسلی، مطالعه بررسی اثرات محافظتی استفاده از یک داروی آنتی‌اکسیدان مانند ویتامین E می‌تواند کمک شایانی در این زمینه به روان‌پزشکان و بیماران متقاضی این داروها به‌ویژه افراد دارای اختلالات افسردگی نماید. بدین منظور بررسی اثرات سوء داروی سرترالین بر دستگاه تولیدمثلی نر و همچنین نقش کلیدی ویتامین E در کاهش اثرات سوء آن ضروری به نظر می‌رسد. از آنجایی که سایر داروهای ضد افسردگی همانند داروهای فلوکسیتین و پاروکستین توانسته‌اند با افزایش رادیکال‌های آزاد موجب تغییراتی در دستگاه تولیدمثلی شوند، سرترالین نیز ممکن است بتواند موجب تغییراتی در عملکرد دستگاه تولیدمثلی نر شود و شاید ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی بتواند از طریق مسیر گلوتاتیون پراکسیداز، آسیب‌های احتمالی ناشی از سرترالین را کاهش دهد؛ لذا هدف از این مطالعه، بررسی اثرات محافظتی ویتامین E بر روی پارامترهای بیوشیمیایی، هیستوشیمی، شاخص‌های اسپرماتوژنز و همچنین بیان ژن‌های Bcl-2، Caspase-3 و Hsp70-2 در بافت بیضه موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی تیمار شده در یک دوره 42 روزه با سرترالین که تا به حال مورد بررسی قرار نگرفته است، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی:

برای انجام این پژوهش که به‌صورت یک کارآزمایی تجربی تصادفی شده شاهد دار طرح‌ریزی شده بود، 40 سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ از نژاد NMRI با وزن 25-20 گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. حیوانات در شرایط استاندارد 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی با دمای 2±25 سانتی گراد و رطوبت نسبی 10±50 درصد در قفس‌های پلی‌اتیلنی مخصوص نگهداری موش با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی نگهداری شدند. تمامی حیوانات به صورت برابر از پیلت‌های مخصوص موش تغذیه می‌کردند. کلیه ضوابط و شرایط نگهداری و انجام آزمایش‌ها روی حیوانات در این مطالعه طبق دستورالعمل‌های مصوب کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران با کد اخلاق 30029/6/11 صورت پذیرفت. قبل از شروع دوره تیمار، به‌منظور سازگاری با شرایط جدید محیط، حیوانات به مدت دو هفته نگهداری شدند و بعد از نشان‌دار کردن، موش‌های نر به طور تصادفی به 8 گروه 5 تایی به ترتیب زیر تقسیم شدند و به مدت 42 روز متوالی داروهای سرترالین (اکتوورکو، ایران) و ویتامین E (بهسا، ایران) را به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ دریافت کردند.

گروه‌بندی حیوانات:

40 سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر به‌صورت تصادفی به هشت گروه 5 تایی به ترتیب زیر تقسیم شدند. در ادامه موش‌های نر پس از تعیین وزن اولیه، با محلول ثبوتی بوئن نشان‌دار شده و گروه‌بندی انجام شد.

1- گروه کنترل (Con): حیوانات این گروه به مقدار 0/3 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند.

2- گروه دوم (S5): این گروه داروی سرترالین را به تنهایی و به میزان 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند (4).

3- گروه سوم (S10): این گروه داروی سرترالین را به تنهایی و به میزان 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن

بدن به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت نمودند (4).

4- گروه چهارم (S20): حیوانات این گروه داروی سرترالین را به تنهایی و به میزان 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند (4).

5- گروه پنجم (E): این گروه فقط ویتامین E را به میزان 100 واحد بین‌المللی به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت نمودند (3).

6- گروه ششم (S5+E): در این گروه، حیوانات 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داروی سرترالین را به همراه 100 واحد بین‌المللی ویتامین E به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند.

7- گروه هفتم (S10+E): این گروه از حیوانات، 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داروی سرترالین را به همراه 100 واحد بین‌المللی ویتامین E به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند.

8- گروه هشتم (S20+E): حیوانات این گروه، 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داروی سرترالین را به همراه 100 واحد بین‌المللی ویتامین E به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند.

نمونه‌برداری:

یک روز پس از پایان دوره تیمار 42 روزه، موش‌ها دوباره توسط ترازوی دقیق آزمایشگاهی در حد میلی‌گرم توزین شده و کلیه حیوانات موجود در هشت گروه ذکر شده با مخلوط کتامین و زایلازین (0/1 میلی‌لیتر زایلازین، 1 میلی‌لیتر کتامین و 8/9 میلی‌لیتر آب مقطر) با دوز 0/1 میلی‌لیتر به ازای هر 10 گرم وزن بدن بیهوش شدند. سپس نمونه‌های خون با وارد کردن سرنگ‌های استریل از خلف زایده مانوبریوم جناغ و از قسمت بطن راست قلب موش‌ها جمع‌آوری و آسان‌کشی شدند. نمونه‌های خونی در یخ نگهداری شده با میانگین 0/5 میلی‌لیتری از هر موش، در لوله‌های اپندورف 2 میلی‌لیتری ریخته شده و پس از لخته شدن خون، جهت استحصال سرم، نمونه‌ها با سانتریفیوژ یخچال‌دار در 3000 دور به‌مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شدند. نمونه‌های سرم جدا شده به لوله‌های اپندورف 1 میلی‌لیتری منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی و هورمونی در دمای 70- نگهداری شد (10). در مورد بیضه‌ها نیز پس از سنجش وزن آن‌ها، مجموع وزن بیضه‌های چپ و راست مشخص شده و سپس مقدار حاصل بر وزن ثانویه بدن در پایان دوره تیمار تقسیم و در عدد 100 ضرب گردید و عدد حاصل به عنوان شاخص گونادوسوماتیک یا شاخص GSI (Gonadosomatic Index) ثبت گردید (6).

ارزیابی‌های بیوشیمیایی- هورمونی:

اندازه‌گیری سطح هورمون تستوسترون با استفاده از کیت اندازه‌گیری تستوسترون به‌روش الایزا و ایمونواسی، بر اساس اتصال رقابتی تستوسترون نمونه با تستوسترون کونژوگه طراحی و اجرا شد. سپس نمونه‌های سرمی جهت تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانت تام سرم (TAC)، با استفاده از روش FRAP (Ferric reducing ability of plasma) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در این روش در pH اسیدی ایجاد شده توسط بافر استات، رنگ آبی تولیدشده به واسطه احیای یون‌های فریک (Fe^{+3}) کمپلکس Fe^{+3}-TPTZ و تبدیل آن‌ها به یون‌های فرو (Fe^{+2})، در طول موج 593 نانومتر و به صورت اسپکتروفتومتریک مورد سنجش قرار می‌گیرد (11و10). به منظور تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی، سطح تولید مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان شاخص ارزیابی این فرآیند در نمونه‌های سرمی بر اساس واکنش با اسید تیوباربیتوریک و تولید محصولی رنگی با حداکثر جذب نوری در 532 نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس منحنی کالیبراسیون استاندارد MDA محاسبه و به صورت نانومول در هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (11و10). جهت تعیین میزان نیتریک اکساید سرم (NO) نیز از روش غیرمستقیم رنگ‌سنجی گریس در طول موج 540 نانومتر استفاده شد که در آن با اندازه‌گیری غلظت نیتریک اکساید که با عامل رنگزا واکنش داده و

ترکیب آزو صورتی رنگ تولید می‌نماید که در نهایت این شاخص توسط منحنی استاندارد محاسبه گردید (11و10).

بررسی‌های هیستوشیمیایی و شاخص‌های اسپرماتوژنز:

پس از پایان دوره تیمار اقدام به نمونه‌برداری از موش‌ها شد که بدین منظور بعد از آسان‌کشی موش‌ها و بازکردن محوطه شکمی، بیضه سمت راست به‌منظور تهیه برش‌های پارافینی جهت ارزیابی شاخص‌های اسپرماتوژنز به‌مدت 48-72 ساعت در داخل محلول ثبوتی بوئن قرار داده شد و بیضه سمت چپ نیز به‌منظور بررسی‌های هیستوشیمیایی و بیان ژن‌های Bcl-2، Caspase-3 و Hsp70-2 در داخل ازت مایع قرار گرفت. به‌منظور تهیه برش‌های پارافینی، بیضه‌ها پس از تثبیت، به ترتیب وارد مراحل آبگیری، شفاف‌سازی، آغشتگی با پارافین، قالب‌گیری، برش بافت با ضخامت 5-7 میکرومتر شده و در ادامه وارد مراحل رنگ-آمیزی گردید. برای ارزیابی شاخص‌های اسپرماتوژنز از رنگ‌آمیزی معمولی هماتوکسیلین- ائوزین استفاده شد. شاخص‌های اسپرماتوژنیک شامل ضریب تمایز لوله‌ای (TDI)، ضریب اسپرمیوژنز (SPI) و ضریب تجمعی (RI) است. بدین منظور، تعداد 100 لوله منی‌ساز در هر بیضه جهت ارزیابی مورد بررسی قرار گرفتند. جهت ارزیابی ضریب تمایز لوله‌ای، درصد لوله‌های منی‌ساز که شامل سه یا بیش از سه رده از سلول‌های اسپرماتوژنز تمایزیافته از اسپرماتوگونی نوع A بودند، محاسبه گردید (12). ضریب اسپرمیوژنز بیانگر درصد لوله‌های منی‌ساز دارای اسپرمیوژنز طبیعی (حاوی اسپرم) است (12). جهت مشخص کردن ضریب تجمعی نیز، درصد سلول‌های اسپرماتوگونی فعال به غیرفعال در لوله‌های منی‌ساز محاسبه گردید (12). در مورد برش‌های انجمادی نیز نمونه‌ها پس از خارج‌شدن از ازت مایع با استفاده از دستگاه برش انجمادی (Cryostat, SLEE, Germany) در دمای 40- درجه سانتی‌گراد و با ضخامت‌های 15-20 میکرومتری برش خورده و پس از انجام رنگ‌آمیزی‌های سودان بلک-ب و آلکالین فسفاتاز نتایج مورد بررسی قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی سودان بلک-ب برای مشاهده چربی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. رنگ-آمیزی آلکالین فسفاتاز نیز برای شناسایی مقادیر آنزیم آلکالین فسفاتاز که آنزیمی بسیار مهم جهت ارزیابی میزان واکنش‌های التهابی در بافت‌ها می‌باشد، انجام می‌گیرد (10).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بی‌درنگ یا کمی (Real-Time PCR):

برای بررسی بیان ژن‌های Bcl-2، Caspase-3 و Hsp70-2، ابتدا تعداد یکسانی از نمونه‌های بیضه را برداشته و مقداری از بافت بیضه به‌وسیله تیغ جراحی جدا و خرد شد. در ابتدای کار به‌منظور استخراج RNA از کیت استخراج RNA (BioFACT™ Total RNA Prep Kit) استفاده گردید. پس از استخراج RNA، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biophotometr) غلظت و تراکم نوری نمونه های مورد مطالعه در طول موج 260-280 نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد، به‌منظور استخراج cDNA از RNA استخراج شده از کیت سنتز cDNA (WizScript RT Master) استفاده گردید. در ادامه cDNA ساخته شده با استفاده از روش Real-Time PCR تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. هر واکنش PCR با استفاده از کیت Real Q Plus 2X Master Mix Green (Ampliqon, Denmark) در دستگاه Real-Time PCR (QIAGEN,Germany) بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام پذیرفت. توالی پرایمرهای مستقیم و معکوس اختصاصی برای ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از پایگاه اطلاعاتی NCBI و نرم افزار Primer Blast مشخص شده و از شرکت سینا ژن تهیه گردید که توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول 1 ارائه شده است (14و13و6). در ادامه40 سیکل تکثیری برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد، دماهای هر سیکل در جدول شماره 2 مشخص شده است. صحت هر منحنی Amplification توسط منحنی Melting و با استفاده از دمای اختصاصی Melt که برای محصول هر ژن اختصاصی

است، تائید گردید. میزان بیان هر ژن هدف نسبت به ژن رفرنس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری:

با توجه به کمی و پیوسته بودن داده‌ها، تعداد گروه‌های مستقل مورد ارزیابی و نیز متعاقب اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها توسط آزمون کولموگروف- اسمیرنوف، ارزیابی آماری داده‌های این مطالعه با استفاده از بسته نرم-افزاری SPSS نسخه 19 (SPSS Inc, version 19.00, California, USA) انجام پذیرفت و تمامی نتایج بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان گردید. جهت مقایسه بین گروه‌ها آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن تست‌های مقایسه‌ای چندگانه توکی مورد استفاده قرار خواهد گرفت. مقدار $P<0/05$ برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد (10).

یافته‌ها

نتایج وزن بیضه و وزن بدن:

بررسی تغییرات مربوط به وزن بیضه، وزن بدن و همچنین شاخص گونادوسوماتیک در گروه‌های مختلف نشان داد که مصرف سرترالین و ویتامین E موجب تغییرات معنی‌داری ($P<0/05$) در میانگین پارامترهای ذکر شده مابین گروه‌ها نگردید (جدول شماره 3).

نتایج حاصل از سنجش هورمون‌تستوسترون:

بررسی میزان هورمون تستوسترون در گروه‌های مختلف نشان داد که میزان این هورمون در گروه‌های S5، S10 و S20 با گروه‌های کنترل و ویتامین E دارای کاهش معنی‌دار ($P<0/05$) بود. مقایسه گروه‌های متناظر نشان داد که سطح هورمون تستوسترون تنها در گروه S5+E دارای اختلاف معنی‌دار با گروه متناظر خود یعنی گروه S5 بود (جدول 4).

سنجش میزان نیتریک اکساید:

سطح سرمی نیتریک اکساید در گروه‌های S10،S20 نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E افزایش معنی‌داری نشان داد ($P<0/05$). همچنین مقایسه گروه‌های متناظر نشان داد که سطح نیتریک اکساید سرم در گروه‌های S10+E و S20+E نسبت به گروه‌های S10 و S20 کاهش معنی‌داری ($P<0/05$) داشته است (جدول 4).

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم:

سنجش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم در گروه‌های مختلف نشان داد که سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم در گروه‌های S10 و S20 با گروه‌های کنترل و ویتامین E دارای کاهش معنی‌دار ($P<0/05$) بودند. همچنین سطح آنتی‌اکسیدانی تام سرم در گروه S20+E افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) در مقایسه با گروه S20 داشت (جدول 4).

سنجش میزان مالون دی‌آلدئید:

بررسی میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در حیوانات نشان داد که تجویز سرترالین در گروه‌های S10 و S20 باعث افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) در میزان مالون دی‌آلدئید با گروه‌های کنترل و ویتامین E ($P<0/05$) شده بود. همچنین سطح مالون دی‌آلدئید در گروه‌های S10+E و S20+E در مقایسه با گروه‌های کنترل و ویتامین E اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) داشت. گروه‌های S10+E و S20+E دارای کاهش معنی‌داری ($P<0/05$) در سطح مالون دی‌آلدئید در مقایسه با گروه متناظر خود یعنی گروه‌های S10 و S20 بودند (جدول 4).

ارزیابی ضریب تمایز لوله‌ای:

در بررسی شاخص تمایز لوله‌ای یا شاخص TDI لوله‌های منی‌ساز مشخص شد که هر یک از گروه‌های S5 وS10 نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E تغییر معنی‌داری ($P<0/05$) نداشتند. در مقابل گروه S20 کاهش معنی-داری ($P<0/05$) نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامینE نشان داد. در مقایسه گروه‌های متناظر مشخص شد که ویتامین E در گروه S20+E سبب افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) نسبت به گروه S20 شده بود (جدول 5).

ارزیابی ضریب تجمعی یا جایگزینی مجدد اسپرماتوگونی-های فعال:

بررسی‌های ضریب تجمعی لوله‌های منی‌ساز نشان داد که تنها گروه S20 دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) نسبت

به سایر گروه‌های مورد مطالعه بوده و این گروه نسبت به سایر گروه‌ها دارای کاهش معنی‌داری (P<0/05) است (جدول 5).

ارزیابی ضریب اسپرمیوژنز:

مقایسه میانگین ضریب اسپرمیوژنز در لوله‌های منی‌ساز مابین گروه‌های مختلف آزمایشی مشخص کرد که گروه S20 نسبت به سایر گروه‌های مورد آزمایش کاهش معنی‌دار (P<0/05) داشت. به‌علاوه، بررسی گروه‌های متناظر نشان داد که شاخص اسپرمیوژنز در گروه S20+E با گروه S20 و سایر گروه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری (P<0/05) نشان داد که نشان دهنده اثر مثبت ویتامین E در کاهش اثرات منفی سرترالین بر ضریب اسپرمیوژنز بود (جدول 5).

ارزیابی بیان ژن‌های Bcl-2، Caspase-3 و Hsp70-2

مقایسه میزان بیان ژن Bcl-2 در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد که سرترالین در گروه‌های S5، S10 و S20 سبب کاهش میزان بیان این ژن نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E شده بود. (P<0/05). مقایسه گروه‌های تجربی متناظر نشان داد که مصرف هم‌زمان ویتامین E همراه با سرترالین در گروه‌های S5+E، S10+E و S20+E نسبت به گروه‌های S5، S10 وS20 میزان بیان ژن Bcl-2 را افزایش داده بود؛ اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار (P<0/05) نبود (نمودار شماره 1).

نتایج به دست آمده از میزان بیان ژن Caspase-3 نیز در گروه‌های مختلف نشان داد که در گروه S20 میزان بیان ژن Caspase-3 نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E افزایش معنی‌داری (P<0/05) پیدا کرده بود. مصرف هم‌زمان ویتامین E همراه با سرترالین سبب کاهش میزان بیان ژن Caspase-3در گروه‌های S5+E، S10+E و S20+E نسبت به گروه‌های متناظر خود یعنی گروه‌های S5، S10 و S20 شده بود؛ ولی این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار (P<0/05) نبود (نمودار شماره 1).

در بررسی میزان بیان ژن Hsp70-2 مشخص گردید که مصرف سرترالین موجب افزایش معنی‌داری در سطح بیان ژن Hsp70-2 در گروه S20 نسبت به گروه کنترل و ویتامین E شده بود (P<0/05). مقایسه گروه‌های متناظر نشان داد که مصرف سرترالین سطح بیان ژن Hsp70-2 در گروه‌هایS5+E، S10+E و S20+E نسبت به گروه‌های S5، S10 و S20 کاهش داده بود؛ اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار (P<0/05) نبود (نمودار 1).

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز:

نتایج حاصل از مقایسه میزان رنگ‌پذیری مقاطع بافتی بیضه به رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز در گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد که میزان رنگ‌پذیری و ایجاد ذرات کوچک قهوه‌ای‌رنگ در سیتوپلاسم سلول‌های لیدیگ و رده اسپرماتوژنز در گروه‌های دریافت‌کننده سرترالین S5، S10 و S20 نسبت به سایر گروه‌ها شاخص‌تر بود. دریافت داروی سرترالین سبب افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در بافت بیضه شده بود؛ اما دریافت ویتامین E به همراه دوزهای پایین داروی سرترالین سبب کاهش فعالیت این آنزیم شده بود و در دوز بالای سرترالین (20 میلی‌گرم) کاهش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قابل مشاهده نبود. شدت رنگ‌پذیری به ترتیب در گروه‌های S20+E، S10+E، S5+E، کنترل و ویتامین E کاهش پیدا کرد. نتایج حاصل از این بررسی به صورت اعداد بین 0 تا 5 بیان شد (جدول 6، شکل 1).

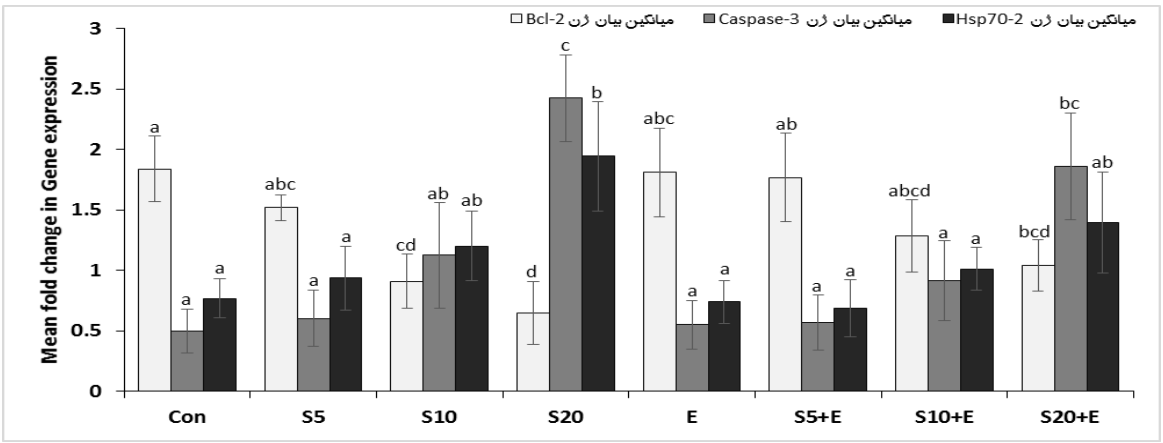
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی سودان بلک-ب:

اثبات وجود چربی در داخل سیتوپلاسم سلول‌های بافت بیضه که با روش Sudan black B انجام گرفت نشان داد که ذرات سیاه‌رنگ حاوی چربی در سیتوپلاسم سلول‌های لیدیگ در بافت بینابینی در گروه کنترل قابل مشاهده است. این ذرات همچنین در رده‌های سلولی مجاور حفره داخلی لوله‌های منی‌ساز به میزان کم و پراکنده در داخل سیتوپلاسم سلول‌ها مشاهده گردیدند. شدت رنگ پذیری به این رنگ‌آمیزی به‌ترتیب در گروه‌های S20، S10، S5، S2O+E، S10+E، S5+E، کنترل و ویتامین E کاهش

پیدا کرده بود. نتایج حاصل از این بررسی به‌صورت اعداد بین 0 تا 5 بیان گردید (جدول 6، تصویر 2).

جدول 1. توالی و تعداد پرایمر ژن‌های Bcl-2، Caspase-3 و Hsp70-2 و ژن کنترل داخلی GAPDH.

اسامی ژن‌ها	توالی	دمای ذوب	درصد CG
Hsp70-2	FWD: CAGCGAGGCTGACAAGAAGAA REV: GGAGATGACCTCCTGGCACT	59/82 61/40	52/4 60
Caspase-3	FWD: TGACTGGAAAGCCGAAACTC REV: AGCCTCCACCGGTATCTTCT	57/30 59/35	50 55
Bcl-2	FWD: CTCGTCGCTACCGTCGTGACTTCG REV: CAGATGCCGGTTCAGGTACTCAGTC	67/84 66/26	62/5 56
GAPDH	FWD: TGAAGCAGGCATCTGAGGG REV: CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG	58/83 61/40	57/9 60



نمودار 1: مقایسه میزان بیان ژن‌های Bcl-2، Caspase-3 و Hsp70-2 در مقایسه با GAPDH در گروه‌های مختلف آزمایشی.

Con: کنترل،

S5: سرترالین 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

S10: سرترالین 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

S20: سرترالین 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

E: ویتامین E،

S5+E: سرترالین 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E،

S10+E: سرترالین 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E،

S20+E: سرترالین 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E.

داده‌ها بر اساس میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند. حرف لاتین مشابه مابین گروه‌ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار آن گروه‌ها با یکدیگر می‌باشند ($P<0/05$).

جدول 2. برنامه زمانی و دمایی Real-Time PCR.

مرحله	دما	زمان
Denaturation (1 Cycle)	95 °C	10 دقیقه
Annealing & Extension (40 Cycle)	95 °C 58 °C 72 °C	20 ثانیه 30 ثانیه 20 ثانیه

جدول 3. نتایج میانگین شاخص‌های وزن بیضه‌ها و وزن بدن در گروه‌های مختلف آزمایشی.

گروه‌ها	میانگین وزن بیضه	تغییرات وزن بدن	شاخص گنادوسوماتیک
Con	0/12±0/009[a]	7/44±2/08[a]	0/68±0/10[a]
S5	0/12±0/009[a]	6/57±2/91[a]	0/66±0/07[a]
S10	0/12±0/008[a]	7/06±2/61[a]	0/64±0/05[a]
S20	0/12±0/009[a]	7/03±2/86[a]	0/63±0/07[a]
E	0/12±0/007[a]	6/29±2/50[a]	0/67±0/06[a]
S5+E	0/12±0/008[a]	6/84±1/83[a]	0/65±0/05[a]
S10+E	0/12±0/009[a]	6/52±1/94[a]	0/66±0/04[a]
S20+E	0/12±0/010[a]	7/62±2/10[a]	0/63±0/09[a]

Con: کنترل،

S5: سرترالین 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

S10: سرترالین 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

S20: سرترالین 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

E: ویتامین E،

S5+E: سرترالین 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E،

S10+E: سرترالین 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E،

S20+E: سرترالین 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E.

داده‌ها بر اساس میانگین±انحراف معیار بیان شده اند. حرف لاتین مشابه مابین گروه‌ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار آن گروه‌ها با یکدیگر می‌باشند ($P<0/05$).

جدول 4. نتایج میانگین آزمایش های بیوشیمیایی تستوسترون، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم، نیتریک اکساید و مالون دی‌آلدئید در گروه‌های مختلف آزمایشی.

گروه‌ها	تستوسترون (ng/ml)	TAC (mmol/ml)	NO (mmol/ml)	MDA (mmol/ml)
Con	3/0±16/30^{a}	0/903±0/037^{a}	25/82±2/32^{a}	1/0±85/34^{a}
S5	2/0±16/20^{b}	0/843±0/081^{abc}	25/72±2/39^{a}	2/10±0/39^{ad}
S10	1/0±86/20^{cd}	^{0}/626±0/045^{bde}	32/64±2/32^{b}	3/95±0/46^{c}
S20	1/0±26/15^{c}	0/533±0/040^{d}	40/16±2/52^{c}	6/02±0/51^{d}
E	3/0±30/45^{a}	0/900±0/050^{a}	24/31±2/76^{a}	1/73±0/29^{a}
S5+E	2/0±96/15^{ad}	0/863±0/040^{ac}	23/63±2/69^{a}	1/96±0/36^{a}
S10+E	2/0±33/20^{bd}	0/710±0/036^{d}	26/87±2/59^{a}	2/98±0/33^{b}
S20+E	1/0±83/20^{bc}	0/736±0/050^{bcd}	32/3±2/40^{b}	4/16±0/37^{d}

ng/ml: نانوگرم بر میلی‌لیتر.

mmol/ml: میلی‌مول بر میلی‌لیتر.

Con: کنترل،

S5: سرترالین 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

S10: سرترالین 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

S20: سرترالین 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

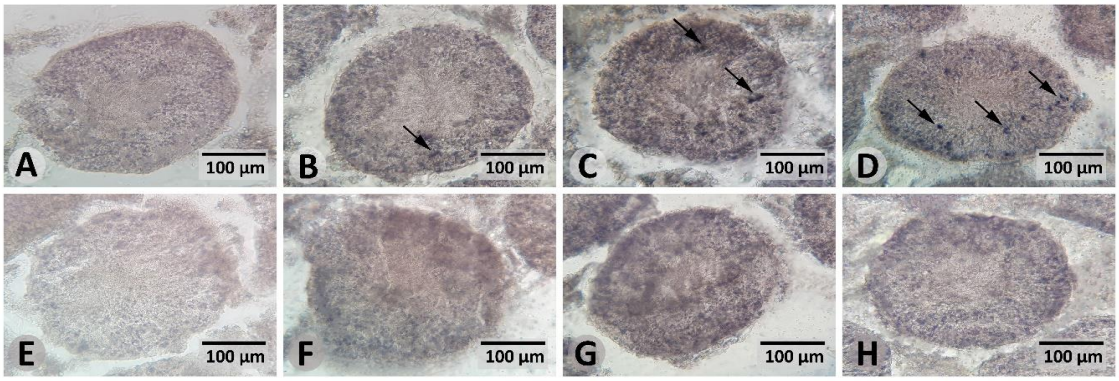
E: ویتامین E،

S5+E: سرترالین 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E،

S10+E: سرترالین 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E،

S20+E: سرترالین 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E.

داده‌ها بر اساس میانگین±انحراف معیار بیان شده اند. حرف لاتین مشابه مابین گروه‌ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار آن گروه‌ها با یکدیگر می‌باشند ($P<0/05$).



تصویر 1: برش عرضی از بافت بیضه در گروه‌های مختلف آزمایشی مربوط به رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز.دانه‌های قهوه‌ای و نیز اعمال واکنش آلکالین فسفاتاز (پیکان‌ها) در گروه کنترل (A) و ویتامین E (E) به‌ندرت مشاهده گردید. گروه‌های S5 (B)، S10 (C) و S20 (D) به‌تدریج واکنش شدیدتری نسبت به رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز نشان دادند. از طرف دیگر، واکنش آلکالین فسفاتاز در گروه‌های S5+E (F)، S10+E (G) و S20+E (H) کاهش پیدا کرده بود

جدول 5. نتایج میانگین شاخص‌های اسپرماتوژنز بافت بیضه در گروه‌های مختلف آزمایشی.

گروه‌ها	درصد ضریب تمایز لوله‌ای	درصد ضریب اسپرمیوژنز	درصد ضریب تجمعی
Con	81/66±2/51^{ab}	78/33±1/52^{a}	88/29±7/19^{a}
S5	81/33±2/30^{ab}	77/66±2/51^{a}	87/24±7/57^{a}
S10	77/66±1/15^{b}	75/33±3/51^{a}	77/41±4/78^{a}
S20	64/66±1/52^{c}	58/66±1/52^{b}	64/84±4/29^{b}
E	84/33±1/52^{a}	81/66±2/08^{a}	88/23±6/87^{a}
S5+E	82/33±3/21^{ab}	77/66±2/51^{a}	83/39±6/12^{a}
S10+E	79/66±2/51^{ab}	76/66±1/52^{a}	81/19±2/07^{a}
S20+E	71/33±2/08^{d}	66/66±2/51^{c}	75/24±5/32^{a}

Con: کنترل،

S5: سرترالین 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

S10: سرترالین 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

S20: سرترالین 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

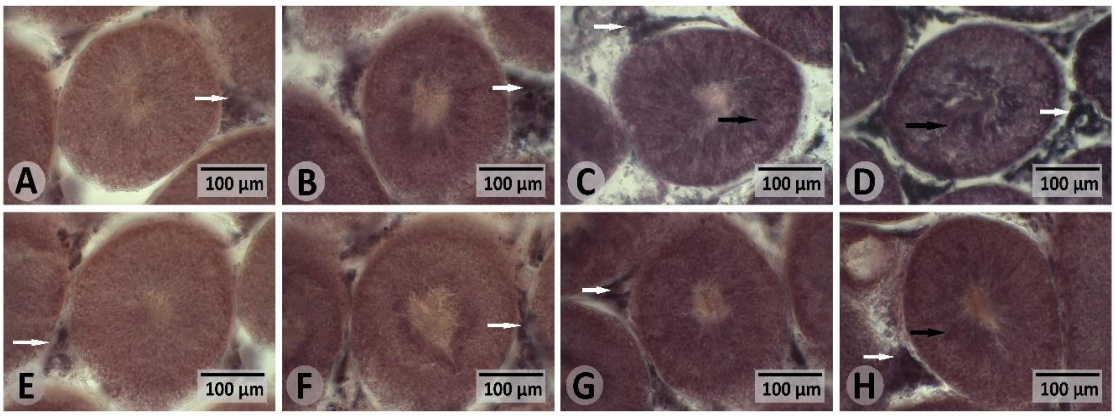
E: ویتامین E،

S5+E: سرترالین 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E،

S10+E: سرترالین 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E،

S20+E: سرترالین 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E.

داده‌ها بر اساس میانگین±انحراف معیار بیان شده اند. حرف لاتین مشابه مابین گروه‌ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار آن گروه‌ها با یکدیگر می‌باشند ($P<0/05$).



تصویر 2: برش عرضی از بافت بیضه در گروه‌های مختلف آزمایشی مربوط به رنگ‌آمیزی سودان بلک-ب. در سلول‌های لیدیگ (فلش‌های سفید) و سلول-های سری اسپرماتوژنز (فلش‌های سیاه) در گروه کنترل (A)، ویتامین E (E) و گروه S5 (B) مقدار کافی ذخیره چربی مشاهده گردید. گروه‌های S10 (C) و S20 (D) افزایش میزان ذخیره چربی‌ها بیشتر در سلول‌های سری اسپرماتوژنز (فلش‌های سیاه) نشان دادند. در مقابل، گروه‌های دریافت‌کننده سرترالین به همراه ویتامین E شامل S5+E (F)، S10+E (G) و S20+E (H) کاهش میزان ذخیره چربی‌ها در سلول‌های سری اسپرماتوژنز (فلش‌های سیاه) نشان دادند.

جدول 6. نتایج کیفی رنگ‌آمیزی‌های آلکالین فسفاتاز و سودان بلک-ب مقاطع بافت بیضه در گروه‌های مختلف آزمایشی.

نوع رنگ‌آمیزی	Con	S5	S10	S20	E	S5+E	S10+E	S20+E
آلکالین فسفاتاز	+1	+3	+4	+5	+1	+2	+2	+3
سودان بلک-ب	+1	+3	+4	+5	+1	+2	+2	+3

Con: کنترل،

S5: سرترالین 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

S10: سرترالین 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

S20: سرترالین 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن،

E: ویتامین E،

S5+E: سرترالین 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E،

S10+E: سرترالین 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E،

S20+E: سرترالین 20 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن همراه با ویتامین E.

اعداد 1 تا 5 به‌ترتیب برای نشان دادن حداقل و حداکثر میزان رنگ‌پذیری نسبت به رنگ‌آمیزی‌های آلکالین فسفاتاز و سودان بلک-ب مابین گروه‌ها استفاده گردیده است.

بحث

مهارکننده‌های انتخابی باز جذب مجدد سروتونین (SSRIs) عوامل درمانی مفیدی برای مدیریت افسردگی و سایر اختلالات روان‌پزشکی هستند، با این‌حال درمان با این داروها با شیوع بالای اختلالات عملکرد جنسی همراه است (15). داروهای گروه SSRIs با مهار پمپ‌های برگشت مجدد سروتونین، میزان سروتونین موجود در شکاف‌های سیناپسی را افزایش می‌دهند. گیرنده‌های سروتونین در عروق دستگاه ادراری-تناسلی گزارش شده‌اند که مسئول انقباض بوده و همچنین گیرنده‌های سروتونین در بیضه‌ها در تنظیم جریان خون نقش دارند (16). مکانیسم شناخته شده در عملکرد این داروها شامل بازگشت مجدد سروتونین توسط سلول‌های عصبی و افزایش سطح این انتقال‌دهنده عصبی در سیناپس است که به‌طورکلی مقادیر بالای سروتونین باعث مهار رفتارهای جنسی، آتروفی بیضه، آسیب به فرآیند اسپرماتوژنز و سرکوب استروئیدوژنز می‌شود (16و17).

بررسی مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از سرترالین بر پارامترهای تغییرات وزن بدن، وزن بیضه و شاخص گونادوسوماتیک تأثیر معنی‌داری نداشت که با مطالعات پیشین مبنی بر اثر سرترالین با دوزهای 5، 10 و 20 میلی-گرم بر کیلوگرم در بیضه موش‌های صحرایی همخوانی دارد (4). علاوه بر این گزارش شده است که درمان با داروهای SSRIs مانند فلوکستین هیچ تأثیری در وزن بدن و وزن بیضه نوزادان پس از قرار گرفتن مادران در معرض فلوکستین در موش‌های صحرایی نداشته است (18). درحالی‌که در برخی از مقالات بیان شده که مصرف داروی فلوکستین سبب کاهش وزن بدن و وزن بیضه شده است که با نتایج مقاله حاضر مطابقت ندارد (20 و19). وزن بیضه تا حدی به جمعیت سلول‌های اسپرماتوژنز تمایز یافته بستگی دارد؛ بنابراین کاهش وزن بیضه ناشی از مصرف داروهای SSRIs می‌تواند به کاهش سلول‌ها و سرکوب اسپرماتوژنز نسبت داده شود (20).

مطالعات پیشین اثبات نموده‌اند که قرارگرفتن در معرض سرترالین باعث کاهش میزان تستوسترون می‌شود (4). مکانیسم عمل سرترالین ممکن است به دلیل اثر آن روی سلول‌های لیدیگ باشد که منجر به کاهش سطح تستوسترون می‌شود(21). همچنین اثبات گردیده است که

تزریق داخل‌صفاقی سرترالین به میزان 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن باعث ایجاد بازخورد منفی در مغز و محور هیپوتاموس-هیپوفیز-گنادی موش صحرایی شده و فعالیت آنزیم‌های تولیدکننده استروئید در بافت بیضه را مهار و این‌گونه منجر به کاهش میزان تستوسترون در خون می‌گردد (21و4) که با یافته‌های حاصل از این مطالعه که کاهش معنی‌دار سطح سرمی تستوسترون در گروه‌های دریافت‌کننده سرترالین را نشان می‌دهد، کاملاً مطابقت دارد. در این بررسی ویتامین E توانست سبب افزایش معنی‌دار سطح تستوسترون سرمی در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سرترالین شود که این بهبود در سطح تستوسترون را می‌توان ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین E دانست (7).

در این مطالعه سرترالین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم را کاهش و میزان مالون دی‌آلدئید را در گروه‌های S10 و S20 افزایش داده بود. دریافت سرترالین موجب شکل‌گیری آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن می‌شود که این گونه‌های فعال اکسیژن باعث آسیب به غشای میتوکندریایی شده و با ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی موجبات آسیب غشاءهای سلولی را فراهم می‌آورند (4و3). گزارش های پیشین کاهش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم و افزایش میزان مالون دی آلدئید را در موش‌های دریافت کننده سرترالین را نشان داده است (22) که با نتایج حاصل از این مطالعه هم‌سو می‌باشد. از سوی‌دیگر، ویتامین E سبب کاهش معنی‌دار سطح مالون‌دی‌آلدئید در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده سرترالین گردید. در واقع ویتامین E موجب مهار NADPH اکسیداز که واسطه تولید آنیون سوپراکساید می‌باشد، گردیده و غشا را برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (11و3). در این مطالعه ویتامین E سبب افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در مقایسه با گروه سرترالین شد؛ زیرا دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار زیادی در مقابل انواع گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل آنیون سوپر اکسید و هیدروکسیل می‌باشد (11و3).

در ارتباط با نیتریک اکساید نیز مطالعات پیشین نشان داده‌اند که سطح سرمی نیتریک اکساید در بیماران دارای تأخیر در انزال پس از درمان با داروهای سرترالین، لووکسین و پاروکستین افزایش یافته است که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (23). همچنین گزارش شده است که دریافت مواد اکسیدانی مولد رادیکال‌های آزاد باعث افزایش میزان سطح نیتریک اکساید سرم می‌شوند، درحالی‌که ویتامین E و ویتامین C به سبب خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود باعث کاهش میزان نیتریک اکساید سرم می‌شوند (12و11). بیان گردیده است که نیتریک اکساید می‌تواند با کاهش تولید ATP تحرک اسپرم را کاهش داده و با اختلال در غشای میتوکندریایی و آزادسازی سیتوکروم c به درون سیتوپلاسم فرآیند آپوپتوز را تحریک نماید (6).

در مطالعه حاضر شاخص‌های اسپرماتوژنز شامل RI، TDI و SI در لوله‌های منی‌ساز تحت تأثیر استرس اکسیداتیو ناشی از سرترالین کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. گزارش شده است که ایجاد استرس اکسیداتیو موجب کاهش شدید ضرایب RI، TDI و SI در لوله‌های منی‌ساز بیضه موش‌های سوری می‌گردد (12و6) که با مطالعه حاضر هم‌سو است؛ ولی دریافت مواد آنتی‌اکسیدانی مانند ویتامین E سبب بهبود ضرایب اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز می‌شود (24).

ژن Hsp70-2 در سلول‌های سری اسپرماتوژنیک در طول میوز یک در سلول‌های زایای جنس نر بیان می‌شود (25). مشاهده شده است که اختلال در بیان ژن Hsp70-2 یا جهش در این ژن منجر به آپوپتوز اسپرماتوسیت‌های اواخر پاکی‌تن میوز یک می‌شود که باعث ناباروری می‌گردد (10). هنگامی‌که سلول در معرض استرس به دلیل رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرد، مخازن سلولی Hsp70-2 برای دفاع سلولی ناکافی بوده و به همین دلیل در این شرایط سنتز Hsp70-2 برای افزایش دفاع سلول‌های جنسی القا می‌گردد (10). در مطالعه حاضر استرس اکسیداتیو ناشی از سرترالین در گروه‌های S10 و S20 سبب افزایش سطح بیان

Hsp70-2 گردید که ویتامین E توانسته بود تا حدی این شرایط استرس اکسیداتیوی را تعدیل و سبب بهبود میزان بیان Hsp70-2 گردد. گزارش شده است که سطح بیان Hsp70-2 در موش‌هایی که تحت تأثیر استرس اکسیداتیو هستند افزایش می‌یابد؛ ولی دریافت ویتامین E سبب بهبود سطح بیان Hsp70-2 می‌شود که با مطالعه حاضر مطابقت دارد (26و24و10). بر اساس نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات پیشین می‌توان بیان کرد که افزایش سطح بیان Hsp70-2 نشان دهنده فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدانی در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از سرترالین است.

Caspase-3 یک مولکول مهم در آپوپتوز است که مسیرهای مولکولی را شروع و منجر به قطعه قطعه شدن DNA می‌گردد (6). آپوپتوز سلول‌های زایا در بیضه می‌تواند توسط سیگنال‌های درونی ایجاد شود که به آن مسیر آپوپتوز ذاتی گفته می‌شود که سبب انتشار سیتوکروم c می‌شود، در ادامه سیتوکروم c فعالسازی کاسپاز Caspase-9 را به‌منظور تشکیل یک کمپلکس به نام آپوپتوزوم آغاز می‌کند (27). Caspase-8 و Caspase-9 وظیفه فعال‌کردن Caspase-3 و متعاقب آن آپوپتوز سلول‌های زایا را بر عهده دارند (28). استرس اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن موجب فسفوریلاسیون بخشی از خانواده پروتئین Bcl-2 شده و تعادل پروتئین‌های ضدآپوپتوزی را به نفع عوامل پروآپوپتوزی مانند پروتئین Bax تنظیم می‌کند (6). مطالعات پیشین نشان می‌دهد که داروهای SSRIs مانند فلوکستین سبب افزایش سطح بیان Caspase-3 در بیضه موش‌های صحرایی نر شده است؛ ولی مواد آنتی‌اکسیدانی همانند امگا 3 این افزایش شدید Caspase-3 را توانسته مهار کند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (29). داروهای گروه SSRIs مانند فلوکستین موجب آزاد شدن سیتوکروم c و فعال‌سازی کاسپاز می‌شود که منجر به قطعه‌قطعه شدن DNA و آپوپتوز سلول‌های زایا می‌شود (30).

آنزیم آلکالین فسفاتاز دارای نقش مهمی در فرآیندهای سلولی است. آسیب غشای سلول باعث آزاد شدن این آنزیم به داخل سلول و در نهایت در سرم می‌گردد؛ بنابراین اندازه‌گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز به‌عنوان یک شاخص برای تغییرات بیضه استفاده می‌شود (31 و10). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزایش دوز سرترالین و آسیب سلول‌های بیضه همانند سلول‌های رده اسپرماتوژنز باعث افزایش این آنزیم در برش‌های بافتی بیضه می‌گردد و در اینجا ویتامین E می‌تواند نقش خود را به‌عنوان آنتی اکسیدان نشان دهد و باعث کاهش سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز شود. طی رنگ‌آمیزی سودان بلک در مطالعه حاضر دانه‌های فراوان، متراکم و کاملاً سیاه‌رنگ در رنگ‌آمیزی سودان بلک در سیتوپلاسم سلول‌های بیضه همانند سلول‌های رده اسپرماتوژنز بالأخص در گروه‌های دریافت‌کننده سرترالین مشاهده گردید. این دانه‌های متراکم قهوه‌ای تیره در رنگ‌آمیزی سودان بلک در مجاور غشای پایه لوله‌های تحلیل‌رفته منی‌ساز بیشتر قابل مشاهده بودند که با نتایج حاصل از مطالعات دیگر مطابقت دارد (10).

نتیجه‌گیری

با جمع‌بندی یافته‌های مطالعه حاضر چنین برمی‌آید که سرترالین، به‌واسطه افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، پی‌ریزی تنش‌های اکسیداتیو و نیز تضعیف دستگاه دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن، موجبات اختلالات مربوط به پارامترهای بیوشیمیایی، هیستوشیمیایی، شاخص‌های اسپرماتوژنز را در موش‌های دریافت‌کننده سرترالین فراهم می‌آورد که به نوبه‌ی خود قادر هستند تا عملکرد فیزیولوژیک سیستم تولیدمثل نر را دچار اختلال نمایند. مضافاً اینکه دریافت سرترالین قادر است به‌واسطه اعمال استرس اکسیداتیو موجب کاهش میزان بیان ژن‌های Bcl-2 و در عین‌حال افزایش میزان بیان ژن‌های Caspase-3 و Hsp70-2 شود که ازجمله ژن‌های دخیل در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول بوده و سبب القای آپوپتوز می‌گردند. در حالی که

ویتامین E به دلیل قابلیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی، عوارض ناشی از تجویز سرترالین را در دستگاه تولید مثل موش نر کاهش می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند که ویتامین E در دوزهای پایین سرترالین تا حد زیادی اثرات مخرب این دارو را کنترل می‌کند؛ اما در دوز بالای سرترالین، ویتامین E به‌طور کامل نتوانسته است که این اثرات نامطلوب ناشی از سرترالین را تعدیل نماید؛ بنابراین می‌توان بیان کرد که ویتامین E می‌تواند نقش محافظتی خود را در برابر اثرات نامطلوب دوزهای پایین سرترالین اعمال نماید. با این وجود، تائید مضرات و توکسیک بودن سرترالین و نقش محافظتی ویتامین E در قبال آن در دستگاه تولیدمثلی نر، نیازمند طرح‌ریزی مطالعات تجربی گسترده‌تر و نیز کارآزمایی‌های بالینی است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به سبب حمایت‌هایشان از این مطالعه اعلام دارند. این مقاله حاصل پایان‌نامه دوره‌ی دکتری تخصصی (Ph.D) دانشگاه تهران است که با شماره 30029/6/11 توسط شورای پژوهشی دانشگاه تهران مورد تأیید قرار گرفته است. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در انتشار این مقاله وجود ندارد.

منابع

1.Trivedi MH, Lin EH, Katon WJ. Consensus recommendations for improving adherence, self-management, and outcomes in patients with depression. CNS Spectr. 2007;12(8):1-27.
2.Rickels K, Zaninelli R, McCafferty J, Bellew K, Iyengar M, Sheehan D. Paroxetine treatment of generalized anxiety disorder: a double-blind, placebo-controlled study. Am J Psychiatry. 2003;160(4):749-56.
3. Morshedi F, Morovvati H, Sadeghinezhad J, Taheri M, Anbara H. Evaluation of Sperm Quality and Serum Parameters in Sertraline-Exposed Mice and Protective Role of Vitamin E. JBUMS. 2020;22(1):1-8. [Article in Persian]
4. Atli O, Baysal M, Aydogan-Kilic G, Kilic V, Ucarcan S, Karaduman B, et al. Sertraline-induced reproductive toxicity in male rats: evaluation of possible underlying mechanisms. Asian J Androl. 2017;19(6):672-9.
5. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2000;29(3-4):323-33.
6. Anbara H, Sheibani MT, Razi M, Kian M. Insight into the mechanism of aspartame-induced toxicity in male reproductive system following long-term consumption in mice model. Environ Toxicol. 2021;36(2):223-37.
7. Chandra AK, Chatterjee A, Ghosh R, Sarkar M. Vitamin E-supplementation protect chromium (VI)-induced spermatogenic and steroidogenic disorders in testicular tissues of rats. Food Chem Toxicol. 2010;48(3):972-9.
8. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis. 2000;21(3):485-95.
9. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. Aging. 2012;4(5):330-49.
10. Anbara H, Sheibani MT, Razi M. Long-Term Effect of Aspartame on Male Reproductive System: Evidence for Testicular Histomorphometrics, Hsp70-2 Protein Expression and Biochemical Status. Int J Fertil Steril. 2020;14(2):91-101.
11. Hassanzadeh A, Shahvaisi K, Hassanzadeh K, Izadpanah E, Amini A, Moloudi M R. Effects of rebamipide and encapsulating rebamipide with chitosan capsule on inflammatory mediators in rat experimental colitis. SJKU. 2015;20(3):94-104. [Article in Persian]
12. Anbara H, Shahrooz R, Razi M, Malekinejad H, Najafi G. The effect of vitamin C on mice hemolytic anemia induced by phenylhydrazine: an animal model study using histological changes in

testis, pre-implantation embryo development, and biochemical changes. Iran J Basic Med Sci. 2018;21(7):668-77.
13. Fattinger SA, Geiser P, Samperio Ventayol P, Di Martino ML, Furter M, Felmy B, et al. Epithelium-autonomous NAIP/NLRC4 prevents TNF-driven inflammatory destruction of the gut epithelial barrier in Salmonella-infected mice. Mucosal Immunol. 2021;14(3):615-29.
14. Desmots F, Russell HR, Michel D, McKinnon PJ. Scythe regulates apoptosis-inducing factor stability during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. J Biol Chem. 2008;283(6):3264-71.
15. Hamdi, H. The preventive role of wheat germ oil against sertraline-induced testicular damage in male albino rats. Andrologia. 2019;51:e13369.
16. Collin O, Damber JE, Bergh A. 5-Hydroxytryptamine--a local regulator of testicular blood flow and vasomotion in rats. J Reprod Fertil. 1996;106(1):17-22.
17. Csoka AB, Shipko S. Persistent sexual side effects after SSRI discontinuation. Psychother Psychosom. 2006;75(3):187-8.
18. Ramos AC, Alice HDS, Silveira KM, Kiss AC, Mesquita SF, Gerardin DC. Maternal treatment with fluoxetine promotes testicular alteration in male rat pups. J Reprod Fertil Dev. 2015;28:1206-13.
19. Silva Junior VAd, Lins Amorim MJAA, Amorim Junior AAd, Pinto CF, Deiró TBJ, Oliveira JRMd, et al. Neonatal Administration of Fluoxetine Decreased Final Sertoli Cell Number in Wistar Rats. Int J Morpho. 2008;26(1):51-62.
20. Hajizadeh Z, Soleimani Mehranjani M, Najafi G, Shariatzadeh S M A, Shalizar Jalali A. Black Grape Seed Extract Modulates Fluoxetine-Induced Oxidative Stress and Cytotoxicity in the Mouse Testis, Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2016;11(2):e27512.
21. Hedger MP, Khatab S, Gonzales G, de Kretser DM. Acute and short-term actions of serotonin administration on the pituitary-testicular axis in the adult rat. Reprod Fertil Dev. 1995;7(5):1101-9.
22. Abdel-Salam OM, Youness ER, Khadrawy YA, Sleem AA. Brain and liver oxidative stress after sertraline and haloperidol treatment in mice. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2013;24(2):115-23.
23. Otunctemur A, Ozbek E, Kirecci SL, Ozcan L, Dursun M, Cekmen M, Ozdogan HK. Relevance of serum nitric oxide levels and the efficacy of selective serotonin reuptake inhibitors treatment on premature ejaculation: decreased nitric oxide is associated with premature ejaculation. Andrologia. 2014;46(9):951-5.
24. Khosravanian H, Razi M, Farokhi F, Khosravanian N. Simultaneous Administration of Dexamethasone and Vitamin E Reversed Experimental Varicocele-induced Impact in testicular tissue in Rats; Correlation with Hsp70-2 Chaperone Expression. Int Braz J Urol. 2015;41(4):773-90.
25. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identifiedas the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. Biol Reprod. 2000;63(3):925-32.
26. Khosravanian N, Razi M, Farokhi F, Khosravanian H. Testosterone and vitamin E administration up-regulated varicocele-reduced Hsp70-2 protein expression and ameliorated biochemical alterations. J Assist Reprod Genet. 2014;31(3):341-54.
27. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407(6805):770-6.
28. Nair R, Shaha C. Diethylstilbestrol induces rat spermatogenic cell apoptosis in vivo through increased expression of spermatogenic cell Fas/FasL system. J Biol Chem. 2003;278(8):6470-81.
29. Soliman ME, Mahmoud BL, Kefafy MA, Yassein RI, El-Raoghy ESA. Effect of antidepressant drug (fluoxetine) on the testes of adult male albino rats and the possible protective role of omega-3. Menoufia Medical Journal. 2017;30(4):1135-42.
30. Khaksar M, Oryan A, Sayyari M, Rezabakhsh A, Rahbarghazi R. Protective effects of melatonin on long-term administration of fluoxetine in rats. Exp Toxicol Pathol. 2017;69(8):564-74.
31. Anbara H, Shahrooz R, Malekinejad H, Saadati S. Protective effects of royal jelly and vitamin c against experimental hemolytic anemia on sex hormones and histochemical testicle tissue histochemistry of adult mice. JSSU. 2016;23(12):1140-54. [Article in Persian]