مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۳، ۳۰۷-۳۰۱
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,3: 301-307, 2015

مطالعه هیستومتری فولیکول‌های تخمدان موش‌های ماده تحت درمان با متیل فنیدیت

سیمین فاضلی پور[1*] فرهاد ادهمی‌مقدم[2] پریوش داودی[1] زهرا طوطیان[3] فردین اسدی[4]

۱) گروه آناتومی، واحد علوم پزشکی تهران دانشگاه آزاد اسلامی، تهران- ایران
۲) گروه چشم پزشکی دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد علوم پزشکی تهران ،ایران
۳) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران
۴) گروه اطفال، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، تهران- ایران

(دریافت مقاله: ۱۹ بهمن ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۹ اردیبهشت ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: بیشـترین بخش تخمدان را فولیکول‌ها تشکیل می‌دهند که بعضی از داروها می‌توانند موجب تغییراتی در آن شوند. **هدف:** مطالعه تخمدان موش‌های بالغی اسـت که در دوران رشـد از متیل فنیدیت (Methylphenidate) استفاده کرده‌اند. **روش کار:** ۴۰ سر موش سوری ماده نابالغ، در سن سه هفتگی به یک گروه کنترل و سه گروه تجربی تقسیم شدند. حیوانات در گروه‌های تجربی، به روش خوراکی به مدت ۶۰ روز، متیل فنیدیت را به میزان ۲، ۵ و ۱۰ mg/kg دریافت کردند. پس از اتمام مدت تیمار و تعیین وزن مجدد، حیوانات را بیهوش و سطح سرمی FSH و LH تعیین گردید و تغییرات ساختاری فولیکول‌های تخمدانی و اجسام زرد آنها مورد مطالعه قرار گرفت. **نتایج:** میانگین اختلاف وزن بدن در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<0/05$). همچنین در مقایسه انواع فولیکول‌های تخمدانی در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری در فولیکول‌های پیش آنترال، آنترال وجسم زرد، افزایش معنی‌داری در فولیکول‌های آترزی مشاهده گردید($p<0/05$). **نتیجه‌گیری نهایی:** استفاده طولانی مدت متیل فنیدیت در موش موجب افزایش فولیکول‌های آترزی، کاهش جسم زرد، در نتیجه کاهش رشد تعدادی از فولیکول‌ها و اووسیت و تغییر در بعضی از سلول‌های لوتئینی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: متیل فنیدیت، فولیکول‌های تخمدانی، موش

مقدمه

متیل فنیدیت (MPH) یا ریتالین داروئی اسـت که از سـال‌ها قبل جهت درمـان اختـلالات بیـش فعالـی و نقص توجـه و در بزرگسـالان جهت تمرکـزو درمان افسـردگی اسـتفاده می‌شـود. Hoak و Schwartz در سـال ۱۹۸۰ نشـان دادند که برخی از داروها می‌توانند با تأثیر بر عملکرد تخمدان‌ها موجب تغییر در رشـد فولیکول‌ها و مهار تخمک گذاری شـود (۹). Ludolph و همکاران در سال ۲۰۰۶، بر خلاف نظریه بقیه محققین اعـلام نمودند که اطلاعات کمی‌در مورد عملکرد متیل فنیدیت وجود دارد (۱۳). همچنیـن مطالعـه روی حیوانات توسـط Schenk و همکاران در سـال ۲۰۰۲ و Volkow و همکاران در سـال ۲۰۰۲ ، بیانگر این است که MPH رابطـه بالائی با انتقال دهنده‌های دوپامین دارد (۱۸،۲۱). به علاوه Moll و همکاران در سال ۲۰۰۱ مشخص کرده‌اند که میزان تراکم ناقلین دوپامین در درمان طولانی مدت توسـط MPH در مغز کاهش معنی‌داری را نسـبت به گروه کنترل نشـان می‌دهد (۱۶). همچنین Manjanatha و همکاران در سـال ۲۰۰۸ نشـان دادند این ماده موجب کاهش معنی‌دار وزن بدن، بیضه و وزیکول سـمینال موش‌های نر نسـبت به گروه کنترل شـده اسـت(۱۴). Kurahashi و همکاران در سـال۲۰۰۵ گزارش کردند که با توجه به حساسـیت افراد نابالغ نسـبت به تحریک غـدد درون ریز و تأثیر آن بر تکامل دسـتگاه تولید مثلـی، می‌توان گفت که تغییرات اندک در سـطح هورمون‌ها در دوران رشـد، می‌تواند منجر به تغییرات ساختاری و عملکردی اساسی این دستگاه شـود(۱۱). در این رابطه Chatterjee-Chakrabarty و همکاران در سـال ۲۰۰۵ نشان دادند که این ماده قادر به ایجاد تغییرات سطح سرمیFSH و LH خون محیطی نیست ولی باعث افزایـش معنی‌دار میزان LH در هیپوفیز می‌گردد(۴). همچنین Thomas در سال ۱۹۹۰ مطالعاتی در زمینه تأثیر سموم بر دستگاه تناسلی پستانداران را مورد آزمایش قرار دادند و مشخص نمودند که مواد شیمیائی می‌تواند بر هورمون‌های استروئیدی گردش خون وهمچنین رشد تخمدان‌ها اثر بگذارد (۱۹). Bolon و همـکاران در سـال ۱۹۹۷ این نتایـج را دلالت بر این که مواد مختلـف می‌توانند روی محور گناد–هیپوفیز–هیپوتالاموس اثر کرده و موجب تغییر در هورمون‌های دستگاه تناسلی شوند دانستند(۲) بنابراین با توجه به مصرف گسترده متیل فنیدیت در کودکان و تشکیل فولیکول‌های تخمدانی که رشد خود را از دوران جنینی آغاز کرده و ادامه آن را از بلوغ به بعد به پایان می‌رسانند و همچنین عدم مطالعه دقیق در مورد تأثیر این دارو برتخمدان که نقش اصلی در ترشح هورمون‌های جنسی زنانه و گامتها دارد، ما را بر آن داشت که اثرات این داروررا در دوران رشد فولیکول‌های تخمدانی در موش‌های ماده نا بالغ مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی ۴۰ سـر موش ماده نابالغ را در سن سه هفتگی از انستیتو پاستور تهران تهیه و در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنائی،۱۲

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۲۲۰۰۶۶۶۱، نمابر: ۰۲۱-۲۲۶۰۰۷۱۴ Email: simin_fazelipour@yahoo.com

ساعت تاریکی، حرارت ۲۳° و دسترسی به مقادیر دلخواه آب و غذا نگهداری شدند. موش‌ها طبق اصول مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی، پس از یک هفته سازگاری با شرایط محیط و تعیین وزن هر حیوان در گروه‌های مختلف (وزن اولیه قبل از تیمار) به طور تصادفی به ۴ گروه (یک گروه کنترل و سه گروه تجربی) تقسیم شدند. گروه‌های تجربی متیل فنیدیت را به مدت ۶۰ روز به صورت خوراکی و به طریقه گاواژ به میزان mg/kg ۲،۵،۱۰ وزن بدن دریافت کردند و در مقابل به گروه کنترل در طی این مدت هیچ داروئی داده نشد. در پایان دوره تیمار و پس از وزن گیری مجدد حیوانات (وزن ثانویه بعد از دوره تیمار) در همه گروه‌ها، موش‌ها را بیهوش کرده، و از قلب آنها جهت تعیین سطح سرمی گنادوتروپین‌ها، خون گیری بعمل آمد وپس از تهیه سرم خون، در آزمایشگاه پاتوبیولوژی، با استفاده از روش، Chemiluminescence Immunassay سطح سرمی هورمون‌ها تعیین گردید. آنگاه حفره شکمی حیوانات باز شده و تخمدان سمت راست آنها خارج و در فرمالین ۱۰٪ قرار گرفتند. پس از طی مراحل آماده سازی بافتی، از تخمدان‌ها مقاطع سریالی به ضخامت ۵µm تهیه و با هماتوکسیلین–ائوزین رنگ آمیزی و بافت آنها با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه هیستومتریک تخمدان‌ها، انواع فولیکول‌ها واجسام زرد آنها پس از عکسبرداری توسط فتومیکروسکوپ به صورت مارپیچی از قشر به مرکز و در جهت عقربه‌های ساعت مطابق نتایج Bolon و همکاران در سال ۱۹۹۱ و Myers و همکاران در سال ۲۰۰۴ شمارش گردیدند (۲،۱۷) همچنین فولیکول‌ها از نظر رشد اووسیت، سلول‌های گرانولوزا، سلول‌های لوتئینی جسم زردو سلول‌های تک داخلی نیز مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت بررسی اثرات متیل فنیدیت بر تخمدان از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر از آزمون توکی استفاده گردید. تعیین و معیار استنتاج آماری $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در مطالعه اثر متیل فنیدیت بر میانگین اختلاف وزن بدن حیوانات (تفاضل وزن اولیه و ثانویه)، مشخص شد که بین گروه کنترل با گروهی که از ریتالین به میزان mg/kg ۲،۱۰ استفاده کردند کاهش معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$) (جدول۱). در مقایسه میزان هورمون LH بین گروههائی که از ریتالین به میزان mg/kg ۲،۱۰ استفاده کردند با گروه کنترل کاهش معنی‌داری دیده شد ($p<0/05$)(جدول۱). همچنین میزان هورمون FSH در گروههائی که از ریتالین به میزان mg/kg ۲،۱۰ استفاده کردند به شکل معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($p<0/05$) (جدول۱). در مقایسه میانگین فولیکول‌های آغازی بین گروه تجربی با کنترل تفاوت معنی‌داری دیده نشد (جدول۲) ولی این مقایسه برای فولیکول‌های اولیه و ثانویه بشدت کاهش معنی‌داری را نشان داد (جدول ۲). در مقایسه میانگین تعداد

جدول۱. میانگین و خطای استاندارد گنادوتروپین‌های هیپوفیز و اختلاف وزن اولیه و ثانویه بدن در گروه‌های کنترل و تجربی دریافت کننده متیل فنیدیت(MPH). n=۶ (هر یک از مقادیر نشان دهنده میانگین ± خطای معیار است) ($p<0/05$). حروف متفاوت در هر ستون عمودی بیانگر اختلاف معنی‌دار است.

گروه‌ها	FSH [ng/dl]	LH [ng/dl]	اختلاف وزن اولیه و ثانویه بدن [g]
کنترل	۱۱/۹۰±۰/ ۹۲ [a]	۱/۸۵±۰/۵ [a]	۲۰/۰۳± ۰/۸۵ [a]
۲ mg/kg	۹/ ۴۲ ±۰/۳۴ [b]	۰/۵۲ ±۰/۳ [b]	۱۴/۹۳± ۱/۴۶ [b]
۵ mg/kg	۱۱/۳۰ ±۰/۵۷ [a]	۱/۷۳ ±۰/۷ [a]	۱۹/۹۳± ۱/۳۴ [a]
۱۰ mg/kg	۹/۹۵ ±۰/۱۵ [b]	۱/۳۵ ±۰/۴ [b]	۱۴/۵۴± ۱/۸۰ [b]

فولیکول‌های آنترال بین گروه تجربی و کنترل کاهش معنی‌داری دیده شد (جدول۲). همچنین مطالعه این نوع فولیکول‌ها، نشان داد که در برخی از فولیکول‌های آنترال در بین سلول‌های گرانولوزای گروه‌های تجربی خصوصاً گروه‌هایی که از ریتالین به میزان ۲mg/kg استفاده کرده اند، تغییر درسلول‌های گرانولوزا مشاهده گردید. در این نوع فولیکول‌ها کاهش رشد اووسیت، نسبت به گروه کنترل دیده شد(تصاویر۲،۱). پراکندگی سلول‌های گرانولوزا و اندازه کوچک آنها نشان دهنده کاهش فعالیت این سلول‌ها می‌باشد. از مشخصات فولیکول‌های آنترال در گروه تجربی بود (تصاویر ۳،۴). در بررسی میانگین تعداد فولیکول‌های آترزی، بین گروه تجربی mg/kg ۲،۱۰ با کنترل افزایش معنی‌داری دیده شد ($p<0/05$) (جدول ۲). این بررسی نشان دهنده این است که در گروه تجربی، بیشتر فولیکول‌ها در حال خرابی بوده و سلول‌ها روند تخریب را طی می‌کنند و بالاخره در مقایسه میانگین تعدادجسم زرد تخمدان، بین گروه‌های تجربی با کنترل کاهش معنی‌داری وجود داشت ($p<0/05$) (جدول ۲). همچنین در مقایسه سلول‌های موجود در جسم زرد، سلول‌های گرانولوزای لوتئینی در گروه کنترل، بزرگ، چند وجهی، هسته بزرگ و یوکروماتین، هستک مشخص و ساختار سلول‌های سنتز کننده هورمون استروژن و پروژسترون را نشان دادند در صورتی که همین سلول‌ها در گروه تجربی دارای هسته نامنظم که نشان دهنده تغییر درفعالیت این سلول است، می‌باشند. به علاوه در بین این سلول‌ها تخریب سلول‌های تک داخلی در گروهای تجربی نسبت به کنترل دیده شد (تصویر ۵).

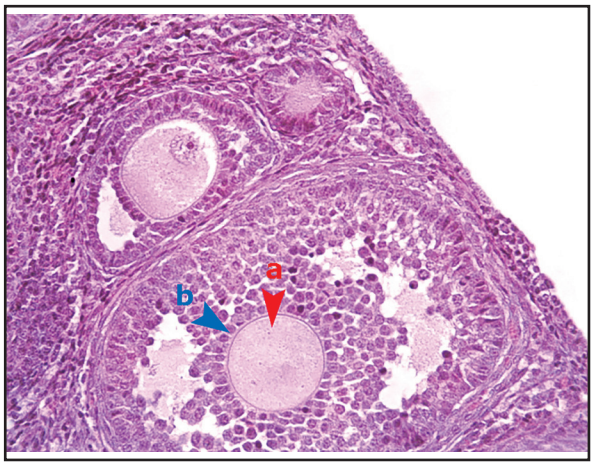
بحث

Volkow و همکاران در سال ۲۰۰۲ و Volkow و همکاران در سال ۱۹۹۵ گزارش نمودند که اثرات رفتاری، متابولیکی و شیمیائی عصبی که در اثر مصرف حاد متیل فنیدیت (MPH) حاصل شده، نشان دهنده این است که MPH، نسبت به میزان مصرف و نوع تجویز حساس است. چنان که پاسخ به تجویز داخل وریدی MPH سریع ولی نتایج حاصل از عملکرد این ماده به صورت خوراکی با ماده مؤثره کمتر که انتظار از تأثیر کمتر آن است نشان از افزایش متابولیسم اسید ریتالینیک که یک ترکیب با محتویات

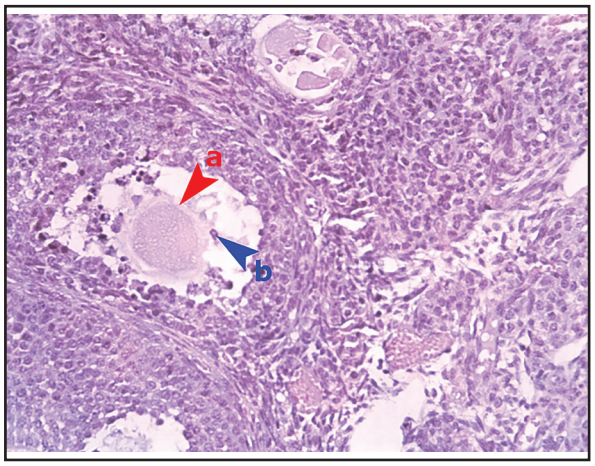
جدول۲. میانگین و خطای استاندارد تعداد انواع فولیکول‌های تخمدان در گروه‌های کنترل و تجربی دریافت کننده متیل فنیدیت (MPH). n=۶ (هر یک از مقادیر نشان دهنده میانگین ± خطای معیار است) ($p<۰/۰۵$). حروف متفاوت در هر ستون عمودی بیانگر اختلاف معنی‌دار است.

گروه‌ها	کنترل	۲ mg/kg	۵ mg/kg	۱۰ mg/kg
تعدادفولیکول آغازی	۱۳/۲۵±۳/۵۰ ^{a}	۱۲/۴۰۰±۲/۹۳ ^{a}	۱۱/۲۹±۱/۵۰ ^{a}	۹/۴۲ ±۲/۳۵ ^{a}
تعداد فولیکول اولیه و ثانویه	۶۰/۲۸±۰/۴۰ ^{a}	۱۸/۶۷± ۷/۴۰ ^{b}	۱۵/۵۰±۱/۱۲ ^{b}	۱۳/۸۳ ±۲/۷۹ ^{b}
تعدادفولیکول ثالثیه [آنترال]	۱۳±۲/۵۲ ^{a}	۸/۸۰±۱/۶۵ ^{b}	۸/۳۳±۱/۳۳ ^{b}	۹/۸۳ ±۱/۸۵ ^{b}
تعدادفولیکول آترزی	۸/۳۳±۰/۷۰ ^{a}	۹/۱۷±۱/۲۲ ^{b}	۶/۱۷±۰/۴۰ ^{ab}	۹/۶۷ ±۱/۵۷ ^{b}
تعدادجسم زرد	۵±۰/۶۹ ^{a}	۰/۸۳±۰/۶۶ ^{b}	۲/۱۷±۰/۶۶ ^{b}	۱/۰۸ ±۰/۵۵ ^{b}

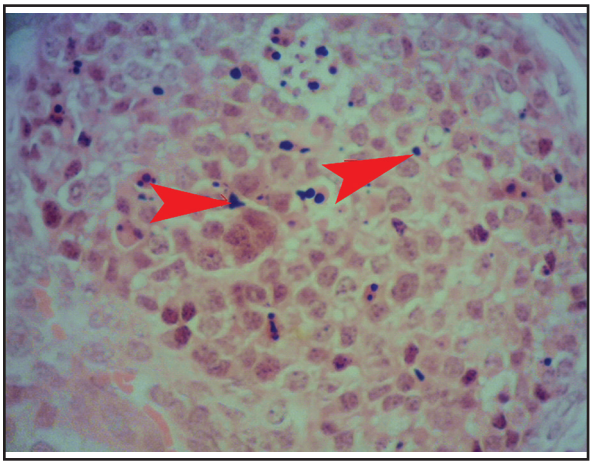
تحریکی کم است را نشان می‌دهد. قابل ذکر است که علی رغم کمتر بودن ماده مؤثر MPH در روش خوراکی به دلیل گذر از کبد، تغییراتی در ساختار آن حاصل می‌شود (۲۰،۲۱). همچنین Moll و همکاران در سال ۲۰۰۱ و Holtkamp و همکاران در سال ۲۰۰۱ در یک بررسی بر روی مدل‌های حیوانی نشان دادند که داروهائی مانند MPH که اعتیاد آورند برای مدت طولانی در مغز ذخیره می‌شوند، بنابراین اثرات حاد و مزمن داروهای اعتیاد آور می‌توانند موجب سرخوشی در معتادین شوند (۱۰،۱۶). در این مطالعه اثر مزمن MPH، که به دلیل جلوگیری از استرس حیوان به صورت خوراکی تجویز شد، بر دستگاه تولید مثلی ماده و عملکرد آن که در نهایت تحت کنترل مغز است، مشخص گردید. Holtkamp و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارشاتی مبنی بر کاهش معنی‌داری وزن بدن در اثر مصرف مزمن این دارو ارائه دادند (۱۰). در مطالعه دیگری که توسط Chatterjee-Chakrabarty و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Lisska و Rivkees در سال ۲۰۰۳ انجام گرفته، مشخص شده در صورتی که MPH به صورت زیر جلدی و تدریجی وارد محیط داخلی بدن شود پس از مدت ۴ هفته کاهش معنی‌دار وزن بدن در گروه‌های تیمار را به دنبال خواهد داشت. بررسی‌های مختلف، دلایل متعددی را برای توجیه کاهش وزن بدن در اثر این ماده ارائه داده اند که مهمترین و مؤثرترین آن فاکتورهائی مانند کاهش جذب به دلیل اختلال و مشکلات معدی روده‌ای، کاهش اشتها، و یا اساساً تأخیر در جذب مواد غذائی است (۴،۱۲). در این مطالعه نیز کاهش معنی‌دار وزن موش‌های تیمار با ریتالین در مقایسه با گروه کنترل نیز مشاهده گردید. کاهش وزن حیوانات تیمار شده با MPH، که موجب کاهش رشد بدن نیز می‌شود، می‌تواند یک عامل نگران کننده در تأخیر آغاز بلوغ جنسی شود. عامل اصلی در شروع بلوغ جنسی به دلیل تأثیر MPH بر محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد، می‌باشد. به همین دلیل مطالعاتی که Clark و همکاران در سال ۲۰۰۳ بر روی اثر طولانی مدت متیل فنیدیت در دوران بلوغ بر دستگاه تناسلی موش‌های صحرائی ماده انجام داده اند، مشخص نمودند که این دارو موجب تغییر بر ترشحات محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–تخمدان شده که نتیجه آن تغییر در کنترل چرخه جنسی است. به علاوه این تأثیر نیز بر اپی تلیوم واژن و متعاقب آن کاهش سلول‌های دهانه واژن و همچنین خشکی غشاء موکوسی آن گزارش شده است. با توجه به اینکه یکی از راه‌های تشخیص آغاز بلوغ، بررسی دهانه واژن از نظر سلولی است لذا مشاهده تغییرات واژن در حیوانات تیمارشده با MPH نشان دهنده تاخیر در بلوغ جنسی موش‌های صحرائی می‌باشد (۵). بر اساس نتایج Meller و همکاران در سال ۲۰۰۱ استفاده طولانی مدت این دارو در دوران بلوغ موجب نگرانی در شروع بلوغ جنسی به دلیل تأثیر بر عملکرد و ساختار دستگاه تناسلی ماده (تخمدان) است و بیشترین اهمیت این تأثیر در آزاد سازی GnRH از هیپوتالاموس است که محرک هیپوفیز برای ترشح گنادوتروپین‌ها و در نتیجه محرک بلوغ گنادها است (۱۵). مشاهده تاخیر در رشد حیوانات تیمار شده، همچنین بررسی میزان گنادوتروپین‌ها نشان داده که میزان LH در هیپوفیز در آغاز مصرف این ماده طبیعی است ولی بعد از جذب نهائی و تشکیل فولیکول‌های اولیه که رشد آنها می‌بایستی تحت تأثیر FSH قرار گیرد، نیاز به LH جهت تأثیر بر فولیکول‌های بالغ و تخمک گذاری احساس می‌شود و یا بعبارتی کمبود گنادوتروپین‌ها در دوران بلوغ از رسیدن فولیکول‌ها به مرحله فولیکول‌های بالغ جلوگیری کرده و موجب مهار رشد فولیکول‌ها و تخمک گذاری می‌شود. بنابراین می‌بایستی یک ارتباط منطقی بین ازدیاد LH هیپوفیز و نقص در فولیکولوژنز تخمدان‌های حیوانات تحت تیمار وجود داشته باشد، زیرا بررسی ساختار بافتی تخمدان‌ها حاکی از نبود فولیکول‌های بالغ و کاهش تخمک‌گذاری است. این گونه نقص در فولیکولوژنز شاید به دلیل ناتوانی حیوانات تیمار شده در افزایش ناگهانی LH باشد که موجب باقی ماندن فولیکول‌ها در مراحل اولیه رشد در تخمدان‌ها می‌شود. تحقیقاتی که توسط Thomas در سال ۱۹۹۰ بر موش‌های صحرائی ماده انجام گرفته، نشان داده در گروهی که روزانه از ریتالین به صورت طولانی با دوز ۴۵۰µg/kg وزن بدن استفاده کرده اند، تخمدان‌ها به دلیل مهار آزاد سازی LH از هیپوفیز، عملکرد کمتری داشته و فولیکول‌های کمتری تولید می‌کنند (۱۹). بنابر این می‌توان نتیجه گیری کرد در صورتی که از متیل فنیدیت در دوران رشد و نمو فولیکول‌ها استفاده شود، رشد تخمدان‌ها را به تاخیر می‌اندازد. در این مطالعه نیز سطح سرمی LH و FSH در گروه‌هائی که از این ماده به میزان ۲،۱۰ mg/kg وزن بدن استفاده کردند، نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد. در بررسی ساختار بافتی تخمدان‌ها و شمارش فولیکول‌های مختلف، مشخص گردید که تعداد فولیکول‌های آغازی در گروه کنترل و تجربی تفاوت معنی‌دار را نشان نداد ولی در تعداد فولیکول‌های پیش آنترال، بین گروه کنترل با تجربی تفاوت معنی‌دار بود. بررسی‌های آماری نشان داد که



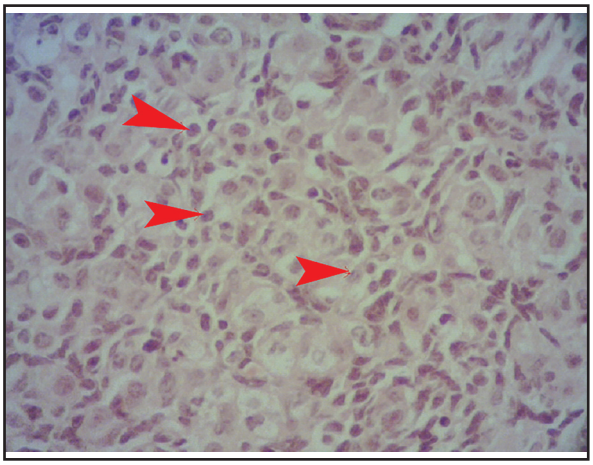
تصویر۱. فولیکول آنترال در گروه کنترل، در این تصویر رشد اووسیت (a) و سلول‌های گرانولوزا (b) دیده می‌شود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، X۴۰۰.



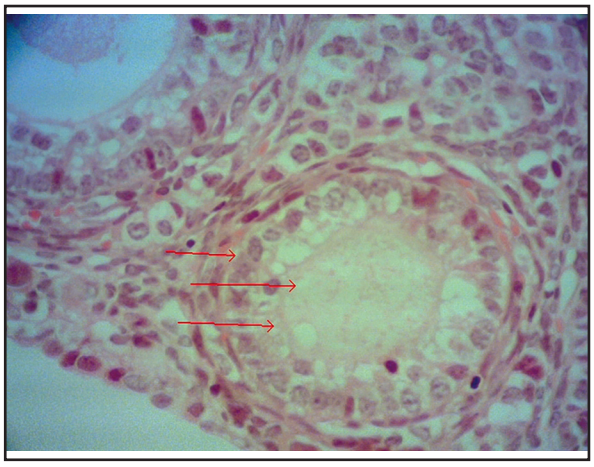
تصویر۲. فولیکول آنترال در گروه‌های تجربی، در این تصویرعدم رشد کامل اووسیت (a) و پراکندگی سلول‌های گرانولوزا و از بین رفتن آنها (b) دیده می‌شود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، X۴۰۰.



تصویر۳. جسم زرد در گروه‌های تجربی، در این تصویر سلول‌های لوتئینی درحال تغییر دیده می‌شوند. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، X۴۰۰.



تصویر۴. سلول‌های لوتئینی در گروه‌های تجربی، در این تصویر سلول‌های لوتئینی دارای هسته نامنظم دیده می‌شود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، X۴۰۰.



تصویر۵. فولیکول تخمدان در گروه تجربی، در این تصویر پراکندگی سلول‌های تک داخلی و سلول‌های گرانولوزا دیده می‌شود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، X۴۰۰.

در گروه‌های تیمار با MPH تبدیل فولیکول‌های آغازی به فولیکول‌های اولیه کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد و جالب تر آن که حدود نیمی‌از فولیکول‌های پیش آنترال نتوانسته‌اند به فولیکول‌های آنترال تبدیل شوند و یک کاهش معنی‌داری بین هر یک از مراحل رشد فولیکول‌ها دیده می‌شود. در این ارتباط مطالعاتی توسط Dong و همکاران در سال ۱۹۹۶ و Elvin و همکاران در سال ۱۹۹۹ در زمینه چگونگی تبدیل فولیکول‌های آغازی به اولیه انجام گرفته و بررسی شده که تبدیل فولیکول‌های آغازی به اولیه نیاز به واکنش متقابل اووسیت، سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های تک داخلی دارد و همچنین مشخص شده که فاکتور رشد اووسیت (GDF-۹) یک رل اصلی در فولیکولوژنز و تخمک گذاری دارد(۶). در برش‌های تخمدانی مورد مطالعه حیوانات تحت تیمار با این ماده به نظر می‌رسد که بیان فاکتور (GDF-۹) به دلیل استفاده از MPH مهار گردیده است بنابراین کاهش در بیان این فاکتور موجب توقف فولیکولوژنز در مراحل اولیه رشد فولیکول‌ها شده است همچنین نبود فولیکول گرااف ثابت می‌کند که ممکن است این دارو مستقیماً روی تخمدان اثر کرده و فولیکولوژنز را درگیر کرده باشد. همچنین هورمون‌های سیستمیک و فاکتورهای رشد که رل اصلی در رشد

و نمو گنادها و گامت سازی دارند به دلیل تغییر درفاکتورهای رشد نیز مانند فعـال کننده‌ها و بازدارنده‌ها و فاکتورهای دیگر که تنظیم چرخه فیدبک را بیـن گنادها و مغز، برای ترشـح گنادوتروپین‌ها بر عهده دارند و همچنین تنظیم کننده‌های کلیدی رشد و تمایز گنادها، تحت تأثیر این ماده مهار شده باشـند. بعلاوه آزادکننده‌های محرک ترشح FSH، سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌هـای آنترال و سـلول‌های تک کـه در مراحل اولیه رشـد و نمو فولیکول‌ها نقش بسـیار مهمی‌در تکوین فولیکول‌ها دارند، مهار شده اند. بنابراین می‌توان گفت که شاید در حیوانات تحت تیمار با ریتالین این گونه فاکتورها مهار شده‌اند. در مطالعه اخیر از یک طرف کاهش معنی‌دار هورمون LH وبـه دنبال آن تغییر درکاهش معنی‌دار تبدیل فولیکول‌های آغازی به فولیکول‌های پیش آنترال و سـپس کاهش معنی‌دار تبدیل فولیکول‌های پیـش آنترال به فولیکول‌های آنترال، نشـان دهنده تأثیر مصرف طولانی مـدت MPH بر تخمدان اسـت که بتوانـد در اثر کاهـش هورمون‌های هیپوتالاموس مؤثر بر گنادوتروپین‌ها و در نتیجه کاهش رشد فولیکول‌های تخمدان باشد و از طرف دیگر تأثیر مستقیم این ماده بر تخمدان و همچنین مهار بیان فاکتور رشد اووسیت و مهار فاکتور رشد خانواده بتا و فاکتورهای تنظیم کننده چرخه هورمونی تخمدان در اثر این ماده که عملشان مختل شـده اسـت، تغییراتی در رشـد تخمدان‌ها ایجاد نموده اند. در این مطالعه افزایش آترزی در فولیکول‌های تخمدان در گروهای تحت درمان، نشان از تأثیـر MPH بر تخمـدان دارد و از طرفی کاهش معنی‌دار جسـم زرد در گروه‌های مصرف کننده متیل فنیدیت مشخص کننده این واقعیت است که تعداد اندکی فولیکول‌ها توانسـته اند به مرحله بلوغ نهائی رسیده تا بتوانند تبدیل به جسـم زرد شوند. به عبارتی کاهش میزانLH که نسبت به گروه کنترل بشدت معنی‌دار است موجب می‌شود که تعداد بیشتری از فولیکول‌ها در تخمـدان باقـی مانـده و به جسـم زرد تبدیل نشـوند. همچنین وجود سلول‌های در حال تخریب در جسم زرد و تغییر در ساختار این سلول‌ها که می‌تواند به دلیل تأثیر ریتالین بر محور مغز–هیپوفیز–تخمدان باشد، منجر به کاهش هورمون‌ها شده است. در تحقیق دیگری Ayalon و همکاران در سـال ۱۹۷۷ بر روی اثر مواد سـمی‌و داروها بصورت حـاد در موش‌های صحرائی مشـخص نمودند که بعضی از مواد مختلف اثر مهاری بر ترشح گنادوتروپین‌هـا و تحریک کننده آنها یعنـی GnRH دارند به طوریکه در بررسی گنادوتروپین‌های سرم خون حیوانات تیمار شده پس از مصرف دارو، تأثیر این ماده را بر هیپوتالاموس، یعنی ترشح GnRH و عدم تأثیر آن بر هیپوفیز را نشان می‌دهد (۱). مطالعات Himelstein-Braw و همکاران در سـال ۱۹۷۶ بیـان نمودنـد که توکسـین‌ها می‌تواننـد موجب تخریب سـلول‌های گرانولوزا که اهمیت زیادی در رشدو نمو فولیکول‌ها، خصوصا رشـد فولیکول‌های ابتدائی دارند، شود (۸) در این مطالعه نیز در گروه‌های تحـت درمان در تعـدادی از فولیکول‌ها از بین رفتن سـلول‌های گرانولوزا مشاهده گردید. بررسی‌های Gerschenson و Paik در سال ۲۰۰۱ نشان داد که اسـتفاده از بعضی داروهای شیمیائی روی تعداد فولیکول‌های بالغ، بیشـتر از فولیکول‌های ابتدائی تأثیرگذار می‌باشند (۷) همچنین Hoak و Schwartz در سال ۱۹۸۰ نشان دادند که مواد مختلف می‌توانند با تأثیر بر ترشح هورمون‌ها، بر رشد فولیکول‌ها و تخمک گذاری آنها اثر نمایند(۱۰). در این مطالعه نیز علاوه بر کاهش تبدیل فولیکول‌ها به یکدیگر، تخریب در فولیکول‌های بزرگتر به صورت فولیکول آترزی دیده شـد. همچنین آلوده کننده‌های محیط زیست مانند رنگ‌ها، چسب‌ها و موادی مشابه، توانسته‌اند موجب کاهش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌های اولیه، آنترال و تعداد جسم زرد در موش‌های بالغ شـده و موجـب افزودن تعداد فولیکول‌های آترتیک گردند، که این تغییرات به طور مشابه در اثر مصرف طولانی مدت این دارو مشاهده شد. در پایان، نشان داده شد که مصرف متیل فنیدیت در موش‌های نا بالغ می‌تواند موجب تغییر در سـاختار تخمدان شده و بر رشد فولیکول‌ها تأثیر گذاشته و در نتیجه موجب کاهش رشد اووسیت‌ها شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Ayalon, D., Nir, I., Cordova, T., Bauminger, S., Puder, M., Naor, Z., Kashi, R., Zor, U., Harell, A., Lindner, H.R. (1977) Acute effect of delta1-tetrahydrocannabinol on the hypothalamo-pituitary-ovarian axis in the rat. Neuroendocrinology. 42: 23-31.
2. Bolon, B., Bucc, T.J., Warbritton, A.R., Chen, J.J., Mattison, D.R., Heindel, J.J. (1997) Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: results from continuous breeding bioassays. Fundam Appl Toxicol. 39: 1-10.
3. Brit, K.L., Drummond, A.E., Cox, V.A., Dyson, M., Wreford, N.G., Jones, M.E. (2000) An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene Endocrinol. 141: 2614-2623.
4. Chatterjee-Chakrabarty, S., Miller, B.T., Collins, T.J., Nagamani, M. (2005) Adverse effects of methylphenidate on the reproductive axis of adolescent female rats. Fertil Steril. 84: 1131-1138.
5. Clark, A.S., 5Kelton ,M.C., Whitney, A.C. (2003) (Chronic administration of anabolic steroids dis-

rupts pubertal onset and estrous cyclicity in rats. Biol Reprod. 68: 465-471.
6. Elvin, J.A., Yan, C., Wang, P., 5Nishimori, K., Matzuk, M.M. (1999) Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. Mol Endocrinol. 13: 1018-1034.
7. Gerschenson, M., Paik, C.Y., Gaukler, E.L., Diwan, B.A., Poirier, M.C. (2001) Cisplatin exposure induces mitochondrial toxicity in pregnant rats and their fetuses. Reprod Toxicol. 15: 525–531.
8. Himelstein-Braw, R., Byskov, A.G., Peters, H., Faber, M. (1976) Follicular atresia in the infant human ovary. Reprod Fertil. 46: 55-59.
9. Hoak, D.C., Schwartz, N.B. (1980) Blockade of recruitment of ovarian follicles by suppression of the secondary surge of follicle-stimulating hormone with porcine follicular field. PNAS. 77: 4953–4956.
10. Holtkamp, K., Wallraf, B., 5Wüller, S.R., 5Herpertz-Dahlmann, B. (2002) Methylphenidate-related growth impairment. J Child Adolesc Psychopharmacol. 12: 55-61.
11. Kurahashi, N., Kondo, T., Omura, M., Umemura, T., Ma, M., Kishi, R. (2005) The effects of subacute inhalation of di [2-ethylhexyl] phthalate (DEHP) on the testes of prepubertal Wistar rats. J Occup Health. 47: 437-444.
12. Lisska, M.C., Rivkees, S.A. (2003) Daily methylphenidate use slows the growth of children: a community based study. J Pediatr Endocrinol Metab. 16: 711-718.
13. Ludolph, A.G., Schaz, U., Storch, A., Liebau, S., Fegert, J.M., Boeckers, T.M. (2006) Methylphenidate exerts no neurotoxic, but neuroprotective effects in vitro. J Neural Transm. 113: 1927-1934.
14. Manjanatha, M.G., Shelton, S.D., Dobrovolsky, V.N., Shaddock, J.G., McGarrity, L.G., Doerge, D.R., Twaddle NW, Lin CJ, Chen JJ, Mattison DR, Morris SM. (2008) Pharmacokinetic,dose-range,and mutagenecity studies of methylphenidate hydrochloride in B6C3F1 mice. Environ Mol Mutagen. 49: 585-593.
15. Meller, W.H., Grambsch, P.L., Bingham, C., Tagatz, G.E. (2001) Hypothalamic pituitary gonadal axis dysregulation in depressed women. Psychoneuroendocrinology. 26: 253-259.
16. Moll, G.H., Hause, S., Rüther, E., Rothenberger, A., Huether, G. (2001) Early methylphenidate administration to young rats causes a persistent reduction in the density of striatal dopamine transporters. J Child Adolesc Psychopharmacol. 11: 15-24.
17. Myers, M., Britt, K.L., Ebling, F.J.P., %Kerr, J.B. (2004) Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. Reproduction. 127: 569-580.
18. Schenk, J.O. (2002) The functioning neuronal transporter for dopamine: kinetic mechanisms and effects of amphetamines, cocaine and methylphenidate. Prog Drug Res. 59: 111-131.
19. Thomas, P. (1990) Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function. Exp Zool. 256: 126–128.
20. Volkow, N.D., Ding, Y.S., Fowler, J.S., Wang, G.J., Logan, J, , J.S., Dewey, S., Ashby, C., Liebermann, J., 5Hitzemann, R. (1995) Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. Arch Gen Psychiatry. 52: 456-563.
21. Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G., Ding, Y., Gatley, S.J. (2002) Mechanism of action of methylphenidate: insights from PET imaging studies. J Atten Disord. 6: 31-43.

Histometrical study of ovarian follicles of immature mice treated with methylphenidate

Fazelipour, S.[1*], Adhami Moghadam, F.[2], Davudi, P.[1], Tootian, Z.[3], Assadi, F.[4]

[1]*Department of Anatomy, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran-Iran*
[2]*Department of Ophtalmology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran-Iran*
[3]*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterrinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*
[4]*Department of Pediatrics, University of Medical Sciences, Zanjan-Iran*

(Received 8 February 2015, Accepted 29 April 2015)

Abstract:

BACKGROUND: The main part of ovary is consisted of follicles which certain drugs may cause change in them. **OBJECTIVES:** The purpose of this study was to investigate the effects of Methylphenidate on ovarian follicle of mice, treated by Ritalin before puberty. **METHODS:** 40 immature female mice at 3 weeks of age were divided into 4 groups, consisting of one control and 3 experimental groups. The experimental groups were gavaged by 2, 5 and 10 mg/kg methylphenidate respectively and the control group received only distilled water with the same method for 60 days. At the end of the experiment, the mice were weighed and then the serum levels of FSH and LH were assessed and structural changes of ovarian follicles and corpora lutea were studied. **RESULTS:** The mean difference of body weight in experimental groups compared with the control group which showed a significant reduction ($p<0.05$). In experimental groups compared with the control group, a significant reduction in pre enteral, enteral follicles, corpora lutea and a significant increase in atretic follicles were observed ($p<0.05$). **CONCLUSIONS:** Ritalin intake for a long period may increase the number of atretic follicles and decrease corpora lutea, so subsequently results in reduction of the growth of follicles and oocytes as well as inducing the atypical appearance of the cells in the luteinized cells.

Keyword: methylphenidate, mice, ovarian follicles

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Mean and standard deviation of hypophysis gonadotropines and the difference between primary and secondary body weight in control and experimental groups receiving methylphenidate (MPH). n =6 (each value indicates the mean ± standard deviation). ($p<0.05$) Different letters in each vertical column indicate significant difference.

Table 2. Mean and standard deviation of the number of ovarian follicles in control and experimental groups receiving methylphenidate (MPH). n =6 (each value indicates the mean ± standard deviation). ($p<0.05$) Different letters in each vertical column indicate significant difference.

Figure 1. Antral follicle in control group; in this figure oocyte growth (a) and granulosa cells (b) are seen. (H & E X 400).

Figure 2. Antral follicle in experimental groups; in this figure incomplete growth of oocyte (a) and dispersion and destruction of granulosa cells (b) are seen. (H & E X 400).

Figure 3. Corpus luteum in experimental groups; in this figure between the luteal cells some destructing cells are seen. (H & E X 400).

Figure 4. Luteal cells in experimental groups; in this figure some luteal cells with dark and irregular nuclei are seen. (H & E X 400).

Figure 5. Ovarian follicle in experimental groups; in this figure vacuolization of the internal theca cells and granulosa cells and their dispersion are seen. (H & E X 400) .

***Corresponding author's email: simin_fazelipour@yahoo.com, Tel: 021-22006661, Fax: 021-22600714**