



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine แบบเฉียบพลันและเรื้อรัง
ต่อระบบประสาท และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหนู

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิสฯ ถาน้อย และคณะ

30 มิถุนายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

**การศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine แบบเฉียบพลันและ
เรื้อรังต่อระบบประสาท และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหนู**



~~ส. ก. ๖๖~~ ๖๖ กัด

คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิสฯ ถาน้อย ภาควิชากายวิภาคศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสมอ ถาน้อย ภาควิชากายวิภาคศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. ศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ โศภน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ดิฉัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิสฯ ถาญ้อย หัวหน้าโครงการวิจัย “การศึกษาผลของการได้รับ pseudocophedrine แบบเฉียบพลันและเรื้อรังต่อระบบประสาท และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหนู” ขอแสดงความขอบคุณต่อ ศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ โสภณ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินโครงการวิจัย และการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยในระดับสากล ซึ่งทำให้ดิฉันได้รับประสบการณ์ในการทำงานวิจัยเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ดิฉันขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสมอ ถาญ้อย คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้คำปรึกษาด้านเทคนิควิธีวิจัยเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างยา pseudocophedrine ตลอดโครงการวิจัยนี้ นอกจากนี้ยังขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือวิจัยสำหรับการดำเนินโครงการวิจัยให้สำเร็จด้วยดี

ท้ายที่สุดขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่มอบโอกาส และทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้จนสามารถดำเนินการได้สำเร็จ และเป็นแนวทางที่จะค้นคว้า วิจัยในระดับสูงต่อไป

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิสฯ ถาญ้อย
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG4680063

ชื่อโครงการ : การศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine แบบเฉียบพลันและเรื้อรังต่อระบบประสาท และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหนู

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิสา ฉาน้อย

E-mail Address : sutisat@nu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (1 กรกฎาคม 2546 ถึง 30 มิถุนายน 2548)

pseudoephedrine เป็นสารสังเคราะห์ชนิดหนึ่งที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทคล้ายคลึงกับ amphetamine และ methamphetamine โดยไปมีผลต่อระบบประสาทซิมพาเทติก (sympathomimetic drugs) โดยผ่านทางระบบประสาทโดพามีน (dopaminergic system) การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบถึงผลของการได้รับ pseudoephedrine ทั้งแบบเฉียบพลัน และเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของ NMDA receptor (NR1) ในสมองส่วนต่างๆ ซึ่งเป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกทางพฤติกรรม อารมณ์ การเรียนรู้ และความจำ นอกจากนี้ยังศึกษาถึงผลของการได้รับ pseudoephedrine ต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย เพื่อเข้าใจในกลไกการทำงานของยา pseudoephedrine ต่อร่างกาย

หนูทดลอง (sprague-Dawley rats) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ขนาด 200-250 มิลลิกรัม ถูกแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน และกลุ่มที่ได้รับยา pseudoephedrine อย่างเรื้อรัง ในการศึกษาผลของยา pseudoephedrine ต่อระบบประสาทนั้น ค่าความหนาแน่นของ NMDAR1 receptor ถูกศึกษาในหลายบริเวณของสมอง จากการศึกษาพบว่า ปริมาณความหนาแน่นของ glutamate/NMDA receptor ชนิด NR1 ในสมองส่วน hippocampus ของสัตว์ทดลองที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเรื้อรังสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.005$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และสัตว์ทดลองที่ได้รับ pseudoephedrine แบบเฉียบพลันมีค่าความหนาแน่นของ glutamate/NMDA receptor ชนิด NR1 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ($p < 0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่า ความหนาแน่นของ NR1 ในสมองส่วน nucleus accumbens ของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเรื้อรัง มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการปรับตัวเพิ่มขึ้นของ NMDA receptor ในการตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของ pseudoephedrine ซึ่งอาจมาจากการเสื่อมหรือสูญเสียเซลล์ประสาทที่หลังกลูตาเมต หรือ การกระตุ้นผ่านระบบประสาทโดพามีน ทำให้การหลังของกลูตาเมตลดลง อย่างไรก็ตามผลของ pseudoephedrine ต่อการแสดงออกของ NMDA receptor นั้นยังต้องมีการศึกษาวิจัยต่อไป

ในส่วนของการศึกษาเกี่ยวกับผลของ pseudoephedrine ต่อระบบสืบพันธุ์ apoptotic activities ภายใน seminiferous tubules ถูกศึกษาด้วยวิธี TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay จากการศึกษาพบว่า การได้รับ pseudoephedrine ในปริมาณสูงอย่างเฉียบพลันสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ในท่อสร้างอสุจิ (seminiferous tubules) อย่างไรก็ดีตามพบปริมาณของ apoptotic cells ที่น้อยกว่าใน

กลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine ในปริมาณต่ำอย่างเรื้อรัง ในการศึกษาเชิงคุณภาพพบว่า apoptotic activities นั้นเกี่ยวข้องกับทุก stage ของ sperm development ภายใน seminiferous tubules โดยเฉพาะ spermatogonia. ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการได้รับ pseudoephedrine ในปริมาณสูงนั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ใน seminiferous tubules กระบวนการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นผลมาจากการเพิ่ม adrenergic vasoconstriction อย่างทันทีภายหลังจากได้รับยา pseudoephedrine ในปริมาณสูง

คำสำคัญ: ซูโดเอเฟดรีน, กระบวนการตายของเซลล์, กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์, ตัวรับกลูตาเมต, ระบบประสาท

Abstract

Project Code : MRG4680063
Project Title : Effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on the nervous systems and gametogenesis in rats.
Investigator : Assistant Professor Sutisa Thanoi
E-mail Address : sutisat@nu.ac.th
Project Period : 2 years 3 months (1 July 2003 - 30 June 2005)

Pseudoephedrine is a diastereoisomer of ephedrine and both are classified as sympathomimetic drugs (Will, 1997). Pseudoephedrine is commonly found in over-the-counter decongestants, anorectic agents and as an amphetamine substitute (Blosser et al., 1987). Although pseudoephedrine is not as potent as amphetamine, it has been reported that its actions on the central nervous system via dopamine release resemble to amphetamine (Kumarnsit et al., 1999). Moreover, it has been reported that methamphetamine has the effects in reproductive organs. Therefore, the present study is aimed to investigate the effects of acute and chronic pseudoephedrine administration on the alteration of glutamate/NMDA receptor density in several brain areas. The effects of pseudoephedrine on the reproductive system have also been observed for understanding the mechanisms and increasing the knowledge of using the drug.

Sprague Dawley male rats (250-280 g) were divided into 3 groups as acute, chronic, and control groups by the administration of pseudoephedrine. For the study in the effects of pseudoephedrine on the nervous system, NMDAR1 immunodensity in three experimental groups were compared by analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post hoc tests. NMDAR1 immunodensity was significantly increased above control in dentate gyrus in acute ($p < 0.01$) and chronic ($p < 0.005$) groups. NMDAR1 immunodensity was also significantly increased above control in nucleus accumbens in chronic group ($p < 0.01$), but not in acute group. These results indicate that pseudoephedrine could induce an increase of NMDA receptors in hippocampus and nucleus accumbens. This might be a compensatory effect of NMDA receptor in response to the degeneration or loss of glutamatergic neurons. For the study in the effects of pseudoephedrine on the reproductive system, apoptotic activities within the seminiferous tubules were studied using the TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay. The present study showed that acute administration of high dose pseudoephedrine can induce apoptotic activities within seminiferous tubules. In contrast, animals treated with lower dose of pseudoephedrine chronically showed a small amount of apoptotic cells inside the seminiferous tubules. Qualitatively, the apoptotic activities were involved in every stage of sperm development inside the seminiferous tubules especially

the spermatogonia. These results indicate that acute administration of high dose pseudoephedrine could induce apoptosis within the seminiferous tubules of male rats. Apoptosis that caused by pseudoephedrine may be due to a sudden increased adrenergic vasoconstriction after a single high dose administration.

Keywords: pseudoephedrine, apoptosis, spermatogenesis, glutamate/NMDA receptors, hippocampus, nucleus accumbens

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine แบบเฉียบพลันและเรื้อรังต่อระบบประสาท และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในหนู

(ภาษาอังกฤษ) Effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on the nervous systems and gametogenesis in rats.

2. รหัสโครงการ MRG4680063

3. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิศา ถาน้อย

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัด พิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ 65000

โทรศัพท์ (055) 261000-4 ต่อ 4516 โทรสาร (055) 261000-4 ต่อ 4758

e-mail snthanoi@yahoo.com, sutisat@nu.ac.th

4. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย Neurobiology and Reproductive biology

5. งบประมาณทั้งโครงการ 480,000 บาท

6. ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี

7. ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

Amphetamine and its derivatives such as methamphetamine and ecstasy are the most critical problem of drug abuse in the world including Thailand. The sympathomimetic agents (e.g. ephedrine, pseudoephedrine) can produce psychoactive effects (e.g. pleasant perceptual changes, euphoria and mental stimulation) as same as amphetamine if taken in large doses. The action of pseudoephedrine shows a similar way to amphetamine because of its related structure (Wills, 1997). Moreover, pseudoephedrine was shown partial substitution (20 mg/kg) and full substitution (40 mg/kg) for amphetamine (1mg/kg) (Tongjaroenbuangam et al., 1998). The ephedrine has also been reported that it

can be used to synthesise methamphetamine (Onlooker, 1995). With a number of effects similar to both amphetamine and methamphetamine, the sympathomimetic drugs can be used to be drugs of abuse in an alternative way. Therefore, the effects of sympathomimetic agents on the nervous system and other systems such as reproductive system should be studied for understanding their mechanisms and increasing the knowledge of using those drugs. In the present study pseudoephedrine will be used as amphetamine substitution to study its effects on the alteration of glutamate/NMDA receptors in the brain as well as to study the effects on gametogenesis in rats.

8. วัตถุประสงค์

- 8.1 To determine the effects of pseudoephedrine both acute and chronic administrations on the alteration of glutamate/NMDA receptor density in rat frontal cortex, temporal cortex, striatum and nucleus accumbens
- 8.2 To compare between the effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on the alteration of glutamate/NMDA receptor density in rat frontal cortex, temporal cortex, striatum and nucleus accumbens
- 8.3 To determine the effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on oocytosis
- 8.4 To determine the effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on spermatogenesis
- 8.5 To determine the effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on apoptosis of seminiferous tubule in testis

เนื้อหางานวิจัย

1. ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine แบบเฉียบพลันและเรื้อรังต่อระบบประสาทและ
การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในหนู

(ภาษาอังกฤษ) Effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on the nervous
system and gametogenesis in rats.

2. รหัสโครงการ : MRG4680063

3. คณะผู้ดำเนินการวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อไทย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทิสฯ ถาน้อย
ชื่ออังกฤษ	Assistant Professor Sutisa Nudmamud-Thanoi
คุณวุฒิ	Ph. D. (Neuroscience)
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ 6
สถานที่ทำงาน	สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์	055-261000 ต่อ 4517
โทรสาร	055-261197
e-mail	sutisat@nu.ac.th

นักวิจัยพี่เลี้ยง

ชื่อไทย	ศาสตราจารย์ประเสริฐ โสภณ
ชื่ออังกฤษ	Professor Prasert Sobhon
คุณวุฒิ	Ph.D.
ตำแหน่ง	ศาสตราจารย์ 11
สถานที่ทำงาน	ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

โทรศัพท์ 02-2461358-60 ต่อ 4114, 02-2455198
โทรสาร 02-2479880
e-mail scpsso@mahidol.ac.th

นักวิจัยที่ปรึกษา

ชื่อไทย ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอ ถาน้อย
ชื่ออังกฤษ Assistant Professor Samur Thanoi
คุณวุฒิ Ph. D. (Anatomy & Cell Biology)
ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ 8
สถานที่ทำงาน สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัย นเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055-261000-4 ต่อ 4648
โทรสาร 055-261197
e-mail samurt@nu.ac.th

4. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย

Neurobiology เน้น ศึกษาสารสื่อประสาทในสมอง (neurotransmitters) และ Reproductive biology เน้นศึกษาการสร้างเซลล์ไข่ (oogenesis) และ การสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis)

5. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Amphetamine and its derivatives such as methamphetamine and ecstasy are the most critical problem of drug abuse in the world including Thailand. The sympathomimetic agents (e.g. ephedrine, pseudoephedrine) can produce psychoactive effects (e.g. pleasant perceptual changes, euphoria and mental stimulation) as same as amphetamine if taken in large doses. The action of pseudoephedrine shows a similar way to amphetamine because of its related structure (Wills, 1997). Moreover, pseudoephedrine was shown partial substitution (20 mg/kg) and full substitution (40 mg/kg) for amphetamine (1mg/kg) (Tongjaroenbuangam et al., 1998). The ephedrine has also been reported that it can be used to synthesise methamphetamine (Onlooker, 1995). With a number of effects similar to both amphetamine and methamphetamine, the sympathomimetic drugs can be used to be drugs of abuse in an alternative way. Therefore, the effects of sympathomimetic agents on the

nervous system and other systems such as reproductive system should be studied for understanding their mechanisms and increasing the knowledge of using those drugs. In the present study pseudoephedrine will be used as amphetamine substitution to study its effects on the alteration of glutamate/NMDA receptors in the brain as well as to study the effects on gametogenesis in rats.

6. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 6.1 To determine the effects of pseudoephedrine both acute and chronic administrations on the alteration of glutamate/NMDA receptor density in rat frontal cortex, temporal cortex, striatum and nucleus accumbens
- 6.2 To compare between the effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on the alteration of glutamate/NMDA receptor density in rat frontal cortex, temporal cortex, striatum and nucleus accumbens
- 6.3 To determine the effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on oocytosis
- 6.4 To determine the effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on spermatogenesis
- 6.5 To determine the effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on apoptosis of seminiferous tubule in testis

7. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review) และ เอกสารอ้างอิง

It has been well known that ephedrine and its alkaloid, which are subtypes of sympathomimetic drugs, are used for the treatment of asthma, nasal congestion, and obesity. The sympathomimetic agents (e.g. ephedrine, pseudoephedrine) can produce psychoactive effects such as pleasant perceptual changes, euphoria and mental stimulation as same as amphetamine, a psychostimulant drug, if taken in large doses. The action of sympathomimetic shows a similar way to amphetamine because of its related structure (Wills, 1997). The ephedrine has also been reported that it can be used to synthesise methamphetamine (Onlooker, 1995). The effect of pseudoephedrine has been studied in the nervous system. Kumarnsit et al. (1999) found that pseudoephedrine induced an immediate early gene Fos immunoreactivity in the nucleus accumbens and striatum. Furthermore, the action of pseudoephedrine was also found to mediate via dopaminergic mechanism (Zarrindast, 1981; Kumarnsit et al., 1999). Bowyer et al 2001 have reported that L-ephedrine induced neurodegeneration in the parietal cortex and thalamus in rats with severe hyperthermia. In the study of drug discrimination, pseudoephedrine was shown both partial substitution (20 mg/kg) and full

substitution (40 mg/kg) for amphetamine (1mg/kg) (Tongjaroenbuangam et al., 1998). Moreover, chronic ephedrine administration can lead to behavioural sensitization in rats (Miller et al., 1998, 1999). The effects of either ephedrine or pseudoephedrine mentioned above are the effects, which have been seen in amphetamine and methamphetamine administrations. It has been reported that amphetamine, dopamine agonist, can produce long-term behavioural changes including sensitisation, tolerance, and dependence (Klawans et al., 1978; Segal et al., 1980; Robinson and Becker, 1986). Moreover, the administration of methamphetamine, the derivatives of amphetamine, can damage neurotoxicity to dopaminergic and serotonergic nerve terminals in several brain areas (Morgan and Gibb, 1980; Ricaurte et al., 1980; O'Callaghan 1991; O'Dell et al., 1991). It has also been reported that acute methamphetamine administration decreases dopamine transporter function (Fleckenstein et al., 1997) and loss of dopamine transporter sites demonstrates following chronic methamphetamine administration (Wagner et al., 1980; Nakayama et al., 1993). The dopamine transporters play an important role in removing dopamine to neurons. The deficit of function of dopamine transporter increases accumulation of extracellular dopamine. Consistently with this idea, Nash and Yamamoto (1992) and Melega et al., (1995) have reported that methamphetamine administration increases the level of extracellular dopamine. Increasing extracellular dopamine level produces dopamine hyperactivity. Changes of dopamine function can induce malfunction of glutamatergic system because there are well-documented interactions between glutamate/NMDA receptors and dopaminergic systems. Studies of effects of NMDA antagonists have also focused on the complex interactions between glutamatergic and dopaminergic systems. Murase et al. (1993) have demonstrated that glutamatergic activity in the frontal cortex stimulates discharge of ventral tegmental dopamine neurons, thereby modulating dopaminergic activity in the cortex. Several studies have reported that NMDA receptor antagonists increase levels of dopamine in the prefrontal cortex in association with deficits of prefrontal cortical function (Deutch et al., 1987; Verma and Moghaddam 1996). Moreover, excitatory amino acids also play a crucial role in modulating dopamine release in the prefrontal cortex (Hata et al., 1990; Jedema and Moghaddam 1994), in the striatum (Krebs et al., 1991; Wang 1991; Sacaan et al., 1992), and in the nucleus accumbens (Imperato et al., 1990; Youngren et al., 1993; Taber and Fibiger, 1995). The interaction between dopaminergic and glutamatergic systems has also been demonstrated in the behavioural effects of animal models. Ouagazzal et al. (1993) reported that NMDA antagonists produce locomotor activity and stereotypy in rats similar to that produced by dopamine agonists. Methamphetamine, a dopamine agonist, may also produce alterations of striatal and cortical glutamate/NMDA receptors

(Eisch et al., 1996). The glutamate/NMDA receptors seem to be critically involved in synaptic formation and plasticity both during early development of the CNS (Cline et al. 1987; Udin and Scherer, 1990) and in the adult animals. The glutamate/NMDA receptors may be important in aspects of long-term potentiation (e.g. Coan et al., 1987; Davies et al., 1989), which may in turn underlie some forms of learning. The activation of the glutamate/NMDA receptors seems to account for a significant proportion of the neuronal damage and degeneration, which results from hypoxia, ischaemia and hypoglycaemia in the CNS (Choi 1988).

It has been established that the development and expression of behavioural sensitisation (mentioned above) is coincident with functional changes in limbic-motor circuitry (Robinson and Berridge, 1993; Pierce and Kalivas, 1997). It has been hypothesized that mediate the response to addictive drugs, sexual behaviour, and feeding behaviour may be functionally related in the same neural mechanisms (Robinson and Berridge, 1993; Pierce and Kalivas, 1997). In addition, it has been reported that methamphetamine has the effects in reproductive organs. Yamamoto et al. (2002) reported that methamphetamine induces apoptosis in seminiferous tubules in male mice testis. Apoptotic cells were detected in the seminiferous tubules of male mice 24 hours after a single treatment with 5, 10, and 15 mg/kg methamphetamine. Moreover, it has been reported that gonadal steroid hormones play an important role in modulating methamphetamine neurotoxicity (Dluzen et al., 2002; Dluzen and McDermott 2002). Treatment of gonadectomized females with a physiological regimen of estrogen significantly diminished the amount of striatal dopamine (DA) depletion to methamphetamine (METH) compared with non-estrogen treated mice suggesting that estrogen serves as a neuroprotectant (Dluzen and McDermott 2002). In contrast, testosterone tends to increase METH-evoked dopamine responses (Dluzen and McDermott 2002). Therefore, there may be an interaction between changes of neural mechanism and reproductive system after taken drug abuse.

From review literatures, there are areas of interest on the effects of amphetamine and methamphetamine in the changes in nervous tissues and reproductive organs. The present study will be designed to investigate their effects on the alteration of glutamate/NMDA receptor density in frontal cortex, temporal cortex, striatum and nucleus accumbens of rat brains in order to understand the mechanism of this receptor which play an important role in memory and learning. In addition, the changes in reproductive organs in both sexes will also be studied. The present study will

determine their effects on the changes of gametogenesis in both sexes as well as to study apoptosis in the seminiferous tubules in the testis of male rats in order to better understanding the mechanisms of those drugs on reproductive system and providing useful information of using those drugs. Because of legally restriction in taking amphetamine and methamphetamine to study in Thailand, and with a number of effects similar to both amphetamine and methamphetamine, the sympathomimetic drug, pseudoephedrine will be used in the present study as a substitution. However, the biological mechanisms by which pseudoephedrine produces the psychoactive effects remain unknown. Therefore, the effects of sympathomimetic agent, pseudoephedrine, on the nervous system and other systems such as reproductive system should be studied for better understanding their mechanisms and increasing the knowledge of using those drugs.

เอกสารอ้างอิง

- Choi DW, Koh JY, Peters S (1988) Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* 8:185-96.
- Cline HT, Debski EA, Constantine-Paton M (1987) N-methyl-D-aspartate receptor antagonist desegregates eye-specific stripes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4342-5.
- Coan EJ, Saywood W, Collingridge GL (1987) MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 80:111-4.
- Davies SN, Lester RA, Reymann KG, Collingridge GL (1989) Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature* 338:500-3.
- Deutch AY, Tam SY, Freeman AS, Bowers MB, Roth RH (1987) Mesolimbic and mesocortical dopamine activation induced by phencyclidine: contrasting pattern to striatal response. *Eur J Pharmacol* 134:257-64.
- Dluzen DE, Anderson LI, Pilati CF (2002) Methamphetamine-gonadal steroid hormonal interactions: effects upon acute toxicity and striatal dopamine concentrations. *Neurotoxicol Teratol* 24:267-73.
- Dluzen DE, McDermott JL (2002) Estrogen, anti-estrogen, and gender: differences in methamphetamine neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 965:136-56.
- Hata N, Nishikawa T, Umino A, Takahashi K (1990) Evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptor in tonic inhibitory control of dopaminergic transmission in rat medial frontal cortex. *Neurosci Lett* 120:101-4.
- Imperato A, Serrocco MG, Bacchi S, Angelucci L (1990) NMDA receptors and in vivo dopamine release in the nucleus accumbens and caudatus. *Eur J Pharmacol* 187:555-6.

- Jedema HP, Moghaddam B (1994) Glutamatergic control of dopamine release during stress in the rat prefrontal cortex. *J Neurochem* 63:785-8.
- Klawans HL, Margolin DI, Dava N, Crosset P (1978) Supersensitivity to D-amphetamine and apomorphine-induced stereotyped behavior induced by chronic D-amphetamine administration. *J Neurol Sci* 25:283-289.
- Krebs MO, Desce JM, Kemel ML, Gauchy C, Godeheu G, Cheramy A, Glowinski J (1991) Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum: evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals. *J Neurochem* 56:81-5.
- Kumarnsit E, Harnyuttanakorn P, Meksuriyen D, Govitrapong P, Baldwin BA, Kotchabhakdi N, Casalotti SO (1999) Pseudoephedrine, a sympathomimetic agent, induces Fos-like immunoreactivity in rat nucleus accumbens and striatum. *Neuropharmacology* 38:1381-7.
- Miller DK, McMahon LR, Green TA, Nation JR, Wellman PJ (1998) Repeated administration of ephedrine induces behavioral sensitization in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 140:52-6.
- Miller DK, Nation JR, Wellman PJ (1999) Sensitization of anorexia and locomotion induced by chronic administration of ephedrine in rats. *Life Sci* 65:501-11.
- Morgan ME, Gibb JW (1980) Short-term and long term effects of methamphetamine on biogenic amine metabolism in extrastriatal dopaminergic nuclei. *Neuropharmacology* 19:989-995.
- Murase S, Grenhoff J, Chouvet G, Gonon FG, Svensson TH (1993) Prefrontal cortex regulates burst firing and transmitter release in rat mesolimbic dopamine neurons studied in vivo. *Neurosci Lett* 157:53-6.
- O'Callaghan (1991) Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 270:197-206.
- O'Dell SJ, Weihmuller FB, Marshall JF (1991) Multiple methamphetamine injections induce marked increases in extracellular striatal dopamine which correlates with subsequent neurotoxicity. *Brain Res* 564:256-260.
- Onlooker (1995) Sorry situation. *Pharm J* 255:480.
- Ouagazzal A, Nicoullon A, Amalric M (1993) Effects of dopamine D1 and D2 receptor blockade on MK-801-induced hyperlocomotion in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 111:427-34.
- Pierce RC, Kalivas PW (1997) A circuitry model of the expression of behavioural sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Rev* 25:192-216.
- Ricaurte GA, Schuster CR, Seiden LS (1980) Long-term effects of repeated methylamphetamine administration on dopamine and serotonin neurons in the rat brain: a regional study. *Brain Res* 193:153-163.

- Robinson TE, Becker JB (1986) Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 396:157-198.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving; an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 18:247-291.
- Sacaan AI, Bymaster FP, Schoepp DD (1992) Metabotropic glutamate receptor activation produces extrapyramidal motor system activation that is mediated by striatal dopamine. *J Neurochem* 59:245-51.
- Segal DS, Weinberger SB, Cahill T, McCunney SJ (1980) Multiple daily amphetamine administration: behavioral and neurochemical alterations. *Science* 207:904-906.
- Taber MT, Fibiger HC (1995) Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: modulation by metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci* 15:3896-904.
- Tongjaroenbuangam W, Meksuriyen D, Govitrapong P, Kotchabhakdi N, Baldwin BA (1998) Drug discrimination analysis of pseudoephedrine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 59:505-10.
- Udin SB, Scherer WJ (1990) Restoration of the plasticity of binocular maps by NMDA after the critical period in *Xenopus*. *Science* 249:669-72.
- Verma A, Moghaddam B (1996) NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *J Neurosci* 16:373-9.
- Wang JK (1991) Presynaptic glutamate receptors modulate dopamine release from striatal synaptosomes. *J Neurochem* 57:819-22.
- Will S (1997) *Drugs of abuse*, Pharmaceutical Press, London, pp.131-34.
- Yamamoto Y, Yamamoto K, Hayase T, Abiru H, Shiota K, Mori C (2002) Methamphetamine induces apoptosis in seminiferous tubules in male mice testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 178:155-60.
- Youngren KD, Daly DA, Moghaddam B (1993) Distinct actions of endogenous excitatory amino acids on the outflow of dopamine in the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 264:289-93.
- Zarrindast MR (1981) Dopamine-like properties of ephedrine in rat brain. *Br J Pharmacol* 74:119-22.

8. ระเบียบวิธีวิจัย

8.1 Animal: Sprague Dawley rats (200-250 g) were used for all experiments. They were divided into a male group and a female group. Each group were subdivided into 3 subgroups as control, acute and

chronic groups. Animals were obtained from the National Animal Centre, Mahidol University, Thailand. The animals were housed 3-6 per cage and maintained at room temperature under a 12 h light/dark cycle with free access to water and food. All animals were handled for at least 1 week before experiment. All animal procedures were carried out in compliance with Mahidol University Code of Practice and the National Institutes of Health (USA) Guidelines for treatment of laboratory animals.

8.2 Drug administration: Pseudoephedrine was received from the Health Sciences Research Institute, Naresuan University, Thailand. To examine the effects of acute pseudoephedrine, animals were administered intragastrically at a dose of 120 mg/kg. The chronic effects of pseudoephedrine were examined by treated intragastrically at the dose of 80 mg/kg, once daily for 15 days. Rats were sacrificed 2 h later and brains were removed for the immunohistochemical and western blot analyses of NMDAR1. Drug doses for these studies were chosen based on the dose that pseudoephedrine can produce a discriminative stimulus resembling that of amphetamine (Tongjaroenbuangam, et al., 1998; Glennon and Yong, 2000).

8.3 Tissue preparation and immunohistochemistry: Brains were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin wax and subsequently sectioned at a thickness of 5 μ M, then mounted onto 3-aminopropyltriethoxysilane (APES) coated glass slides. The sections were deparaffinise in xylene, rehydrated in grade alcohol, then heated in microwave oven on full power (650 W) for 3 periods of 5 min in phosphate buffer saline (PBS; 0.01 M phosphate buffer, 0.9% NaCl,) pH 7.4, to aid antigen retrieval. Sections were incubated for 30 min in a solution of 0.6% H_2O_2 in 10% methanol and 0.1% Triton X in PBS pH 7.4 to inhibit endogenous peroxidase activity and then washed for 3x5 min in PBS. Non-specific binding was minimised by incubation for 1 h in 5% normal rabbit serum in PBS and incubated overnight at 4°C with a polyclonal antibody against the glutamate/NMDA receptor (NMDAR1) (Sigma) at a dilution of 1:1000 in protein blocking solution. The sections were washed for 3x5 min in PBS before incubation for 2 h at room temperature with biotinylated secondary antibody (anti-rabbit IgG) diluted 1:200 in protein blocking solution. This was followed by incubation for 2 h at room temperature with avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (purchased with secondary antibody as a Vectorstain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) after which the sections were washed for 3x5 min in PBS. The sections were washed for a further 3x5 min. Then the protein immunoreactivity was visualised using the chromogen diaminobenzidine (DAB), intensified with nickel chloride. The sections were dehydrated and mounted. Immunoreactivity was not present in control sections in which the primary antibody was omitted from the staining protocol.

Data analysis: Immunoreactivity was quantified by optical density (OD) of NMDAR1 immunoreactivity in the subregions of hippocampus. The optical measurements were made blind to the animal groups. OD analysis was performed on high resolution and analysed with Scion Image Software based on NIH image (v. beta 3b; www.scioncorp.com; 1998). The software was used to obtain the integrated optical density (IOD) of the region. The value is the sum of the optical densities of all pixels in the region divided by number of pixels. Background values were obtained from the neighboring white matter. The average of values from three sections for each subject was used for statistical analysis. Statistical analysis was performed using ANOVA with Dunnett post hoc tests.

8.4 Western blot analysis

After each treatment, animals were sacrificed and brains were immediately removed. Brains were dissected under stereomicroscope for separating the interest areas; frontal cortex, temporal cortex, striatum, and nucleus accumbens. Tissues were stored at -70°C until used.

Tissue was homogenised in 12.5 volumes of ice-cold buffer. The homogenate was centrifuged at 48,000 x g for 10 minutes at 4°C. The pellet obtained was homogenised once more in lysis buffer (1:15 w/v) and then the homogenate was kept on ice for an hour for complete tissue lysis. Tissue lysate was boiled at 100°C for 5 min with SDS-PAGE loading buffer and centrifuged for 3 min and the supernatant was collected. The supernatants containing 20mg protein was analysed on 4% stacking gel and 8% separating gel and the proteins were electrotransferred on to PVDF membranes. The membranes were treated with protein blocking solution (10% non-fat dried milk in PBS) and incubated with NMDA/NR1 antibody in protein blocking solution. The membranes were then washed 3 times with 0.05% of detergent (Tween 20) in PBS for 5 min each and subsequently incubated with biotinylated secondary antibody. This was followed by incubation with avidin biotinylated horseradish peroxidase complex. The protein immunoreactivity was visualised by incubating membranes with a working solution of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB). The membranes was scanned into a computer and NR1 immunodensities will be measured.

Data analysis : Scanned immunoblots was analysed using the Scion Image programme (based on NIH image). The densitometry measurements were used to quantify the density of NMDA/NR1 bands. The software was used to obtain the integrated optical density of the region interest. The value is the sum of the optical densities of all pixels in the region divided by number of pixels. All NMDA/NR1 immunoreactivity bands were measured with the same dimension to obtain their integrated optical

density. The value of integrated optical density (IOD) was used for statistical analysis comparing between treatment and control groups.

8.5 The study of gametogenesis

- Spermatogenesis

After each treatment with pseudoephedrine, animals were sacrificed. Testes were removed from each male rat and fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). All samples were processed under routine H&E procedures for light microscopic study. Slides of testis were examined under light microscope to investigate the process of spermatogenesis in each group of treated animals compared with non-treated animals (control).

- Quality of sperm analysis

In addition to the study of spermatogenesis, semen was collected from each animal by microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA) technique. Semen was monitored on total number of spermatozoa, percentage of sperm viability, percentage of sperm motility and percentage of normal morphology.

- Oogenesis

After each treatment with pseudoephedrine, female rats in each group were sacrificed. Ovaries were removed from each animal and fixed in 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). All samples were processed under routine H&E procedures for light microscopic study. Slides of ovary were examined under light microscope to investigate the process of oogenesis. Number of follicles in each stage of development were monitored and the quality of oocyte were examined qualitatively to compare the changes among each group of treated animals and non-treated animals.

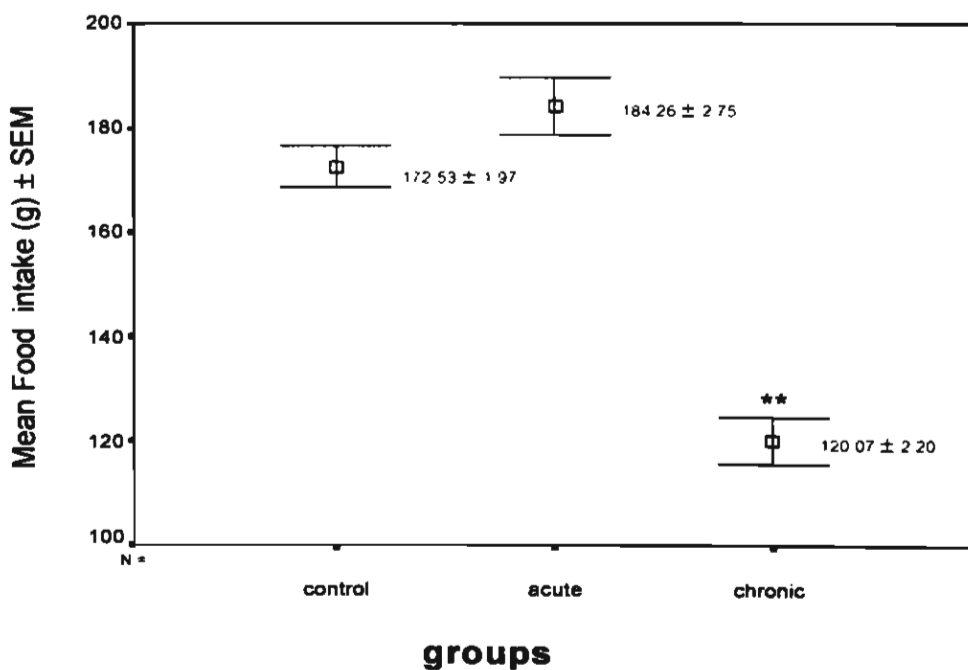
8.6 Apoptosis study in seminiferous tubules

The testes were removed from male rats treated with pseudoephedrine. The apoptotic cells within the seminiferous tubules were studied using apoptosis detection kits.

9. ผลงานวิจัยที่ได้รับ

9.1 ผลของการได้รับ pseudoephedrine ต่อการกินอาหารของสัตว์ทดลอง

การกินอาหารของสัตว์ทดลองจะถูกคำนวณจากอาหารที่ให้ และอาหารที่เหลือในแต่ละวัน จากการทดลองพบว่า สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 3 ที่ได้รับยา pseudoephedrine ต่อเนื่องตลอดการทดลอง จะกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ได้รับยาอย่างเฉียบพลัน 1 ครั้งก่อนฆ่า อย่างมีนัยสำคัญ (กราฟที่ 1) สอดคล้องกับ รายงานการใช้ยา pseudoephedrine ในคน ผลของการใช้ pseudoephedrine ซึ่งเป็นยากระตุ้นระบบประสาท อัดโนเมติ (sympathomimetic agents) นั้นเป็นสาเหตุทำให้น้ำหนักลด เนื่องจากไปมีผลต่อระบบประสาทที่ควบคุม ความหิว ความอิ่ม ทำให้ไม่ยอมกินอาหาร (Wills, 1997) ดังนั้น pseudoephedrine อาจจะถูกนำไปใช้ในทางที่ผิดในการใช้ลดน้ำหนัก และเมื่อถูกใช้อย่างต่อเนื่องจะทำให้เกิดการติดยา และมีผลต่อระบบประสาท



กราฟที่1 แสดงปริมาณอาหารที่กินของหนูกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน และกลุ่มที่ได้รับยา pseudoephedrine อย่างเรื้อรัง

** = $P < 0.005$

9.2 ผลการศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine ต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของ glutamate/NMDA receptor ในสมองหนูส่วน frontal cortex และ hippocampus โดยวิธี immunohistochemical technique

9.2.1 ผลของการได้รับ pseudoephedrine ต่อความหนาแน่นของ glutamate/NMDA receptor ในสมองส่วน hippocampus

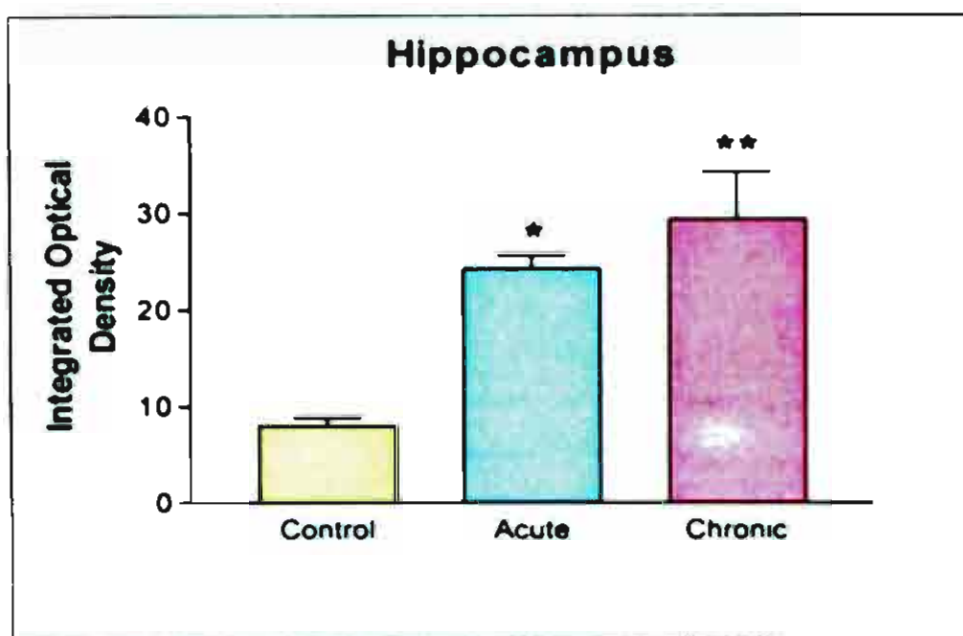
จากการทดลองพบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความหนาแน่นของ glutamate/NMDA receptor ในสมองส่วน hippocampus (กราฟที่ 2) ซึ่งเป็นสมองที่เกี่ยวข้องกับความจำและการเรียนรู้ การเพิ่มขึ้นของ glutamate/NMDA receptor ของกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine ทั้งอย่างเฉียบพลัน และเรื้อรัง อาจเป็นผลมาจากการปรับตัวเพิ่มขึ้นของ glutamate/NMDA receptor เนื่องจากอาจมีการสูญเสียของ glutamatergic neurons ใน hippocampus ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ L-ephedrine ว่าทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน parietal cortex และสมองส่วน thalamus (Miller et al., 1998, 1999) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า กลไกการออกฤทธิ์ของ pseudoephedrine นั้นผ่านทางระบบประสาทโดพามีน (dopaminergic system) (Zarrindast, 1981; Kumarnsit et al., 1999) เช่นเดียวกับ amphetamine และ methamphetamine ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Eisch และคณะ (1996) ที่ได้รายงานว่า มีการเพิ่มขึ้นของ NMDA receptor ในสมองส่วน parietal cortex ภายหลังจากการได้รับ methamphetamine นอกจากนี้ การกระตุ้นตัวรับ dopamine (Dopamine D2 receptor) นั้นทำให้การหลั่งของ glutamate ใน striatum ลดลง (Mitchell and Dogget 1980 และ Crowder and Bradford 1987) ดังนั้นการลดลงของ glutamate ภายหลังจากการถูกกระตุ้นจาก pseudoephedrine จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งของการปรับตัวเพิ่มขึ้นของ glutamate/NMDA receptor



ภาพที่ 1 แสดงเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ข้อมพิเศษต่อเซลล์ประสาทที่มี glutamate/NMDA receptor (เซลล์ที่ติดสีเข้ม) (กำลังขยาย 4X)



ภาพที่ 2 แสดงเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ข้อมพิเศษต่อเซลล์ประสาทที่มี glutamate/NMDA receptor (เซลล์ที่ติดสีเข้ม) (กำลังขยาย 10X)

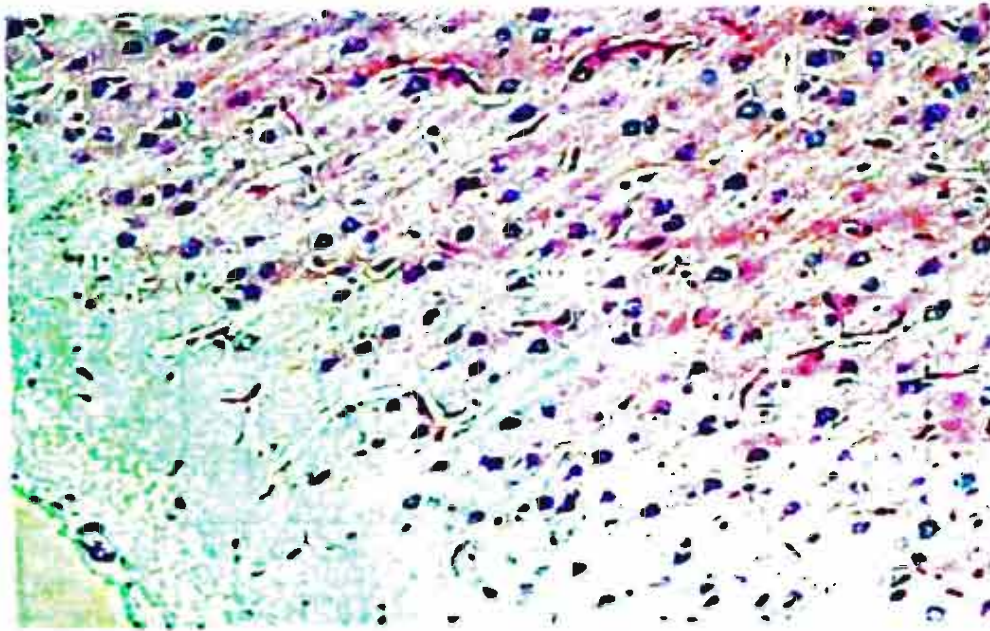


กราฟที่ 2 แสดงค่าความหนาแน่นของ glutamate NMDA receptor (Integrated optical density) ในสมองส่วน hippocampus ของสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา *pseudoephedrine* อย่างเฉียบพลัน และกลุ่มที่ได้รับยา *pseudoephedrine* อย่างเรื้อรัง

* = $P < 0.01$ ** = $P < 0.005$

9.2.2 ผลของการได้รับ *pseudoephedrine* ต่อความหนาแน่นของ glutamate/NMDA receptor ในสมองส่วน frontal cortex

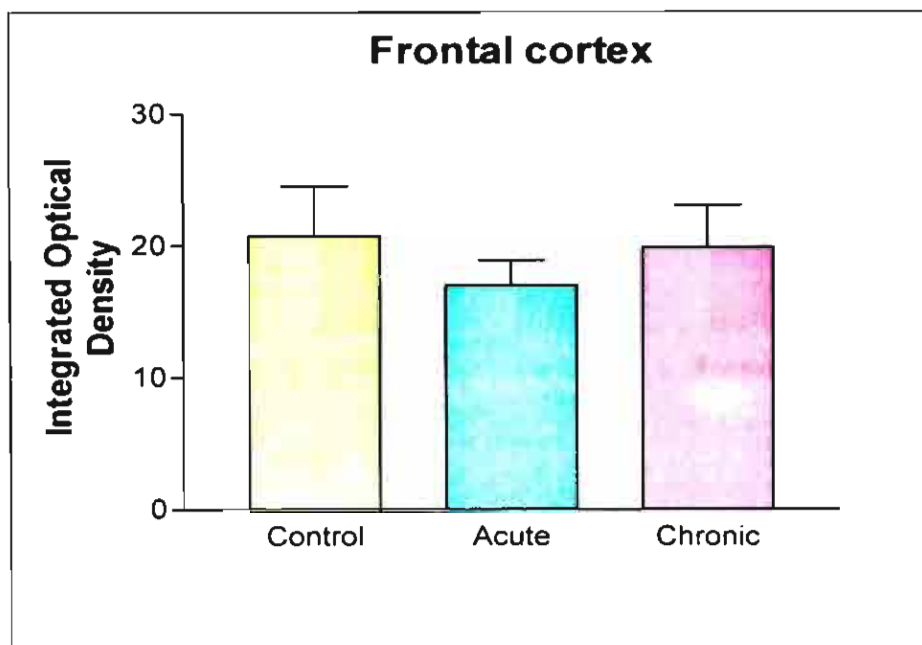
จากการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา *pseudoephedrine* อย่างเฉียบพลัน และกลุ่มที่ได้รับ *pseudoephedrine* อย่างเรื้อรัง ในสมองส่วน frontal cortex ซึ่งสอดคล้องกับ Eisch และคณะ (1996) ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ NMDA receptor ในสมองส่วน prefrontal cortex ภายหลังจากได้รับ methamphetamine อย่างไรก็ตาม Eisch และคณะ (1996) กลับพบว่า NMDA receptor เพิ่มขึ้นในสมองส่วน parietal cortex จากรายงานดังกล่าวจึงเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของ NMDA receptor ในสมองนั้นเกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ซึ่งในการทดลองนี้เนื่องจากข้อจำกัดในเทคนิคที่ใช้วัดนั้น ไม่สามารถที่จะวัดจำเพาะได้ จึงต้องเป็นการวัดค่าความหนาแน่นโดยรวมของสมอง



ภาพที่ 3 แสดงเซลล์ประสาทชนิดต่างๆ ที่ปรากฏอยู่ในสมองส่วน frontal cortex ย้อมด้วย H&E (กำลังขยาย 4X)



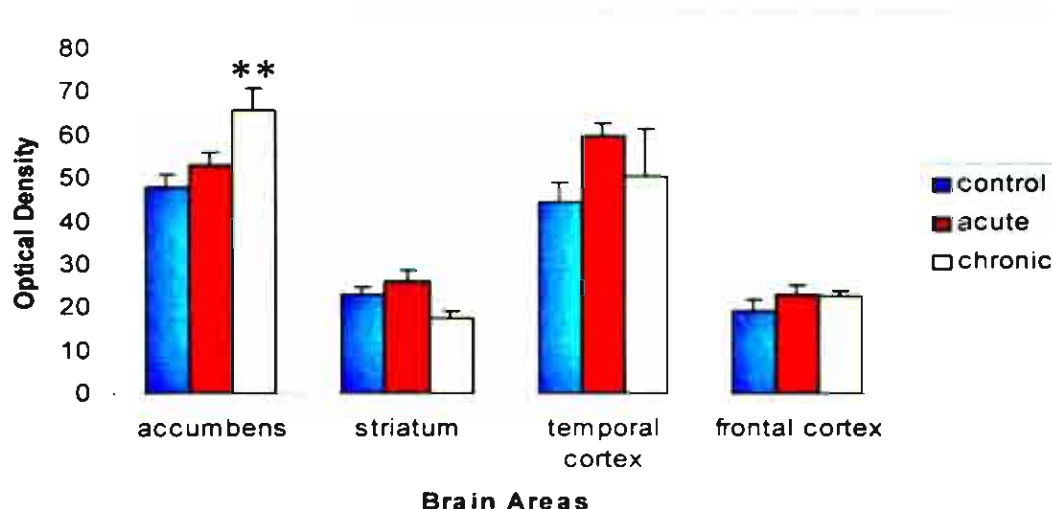
ภาพที่ 4 แสดงเซลล์ประสาทในสมองส่วน frontal cortex ย้อมพิเศษต่อเซลล์ประสาทที่มี glutamate/NMDA receptor (กลูโคสรี) (กำลังขยาย 4X)



กราฟที่ 3 แสดงค่าความหนาแน่นของ glutamate/NMDA receptor (Integrated optical density) ในสมองส่วน frontal cortex ของสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน และกลุ่มที่ได้รับยา pseudoephedrine อย่างเรื้อรัง

9.3 ผลการศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine ต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของ glutamate/NMDA receptor ในสมองส่วน frontal cortex, temporal cortex, striatum and nucleus accumbens โดยวิธี westernblotting technique

จากการทดลองพบว่ามี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในสมองส่วน accumbens ระหว่างกลุ่มควบคุม กับกลุ่มที่ได้รับยา pseudoephedrine อย่างเรื้อรัง (ANOVA post-hoc test, $p < 0.01$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน นอกจากนั้นไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุม กับกลุ่มที่ได้รับยา pseudoephedrine อย่างเฉียบพลันและกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเรื้อรัง ในสมองส่วน frontal cortex, temporal cortex และส่วน striatum ซึ่งสอดคล้องกับ Eisch และคณะ (1996) ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ NMDA receptor ในสมองส่วน prefrontal cortex ภายหลังการได้รับ methamphetamine อย่างไรก็ตาม Eisch และคณะ (1996) กลับพบว่า NMDA receptor เพิ่มขึ้นในสมองส่วน parietal cortex จากรายงานดังกล่าวจึงเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของ NMDA receptor ในสมองนั้นเกิดขึ้นอย่างจำเพาะ

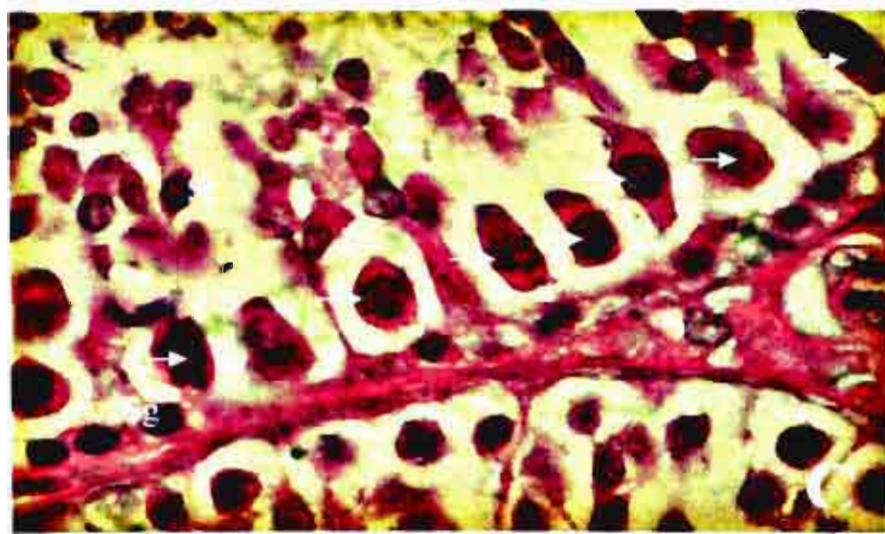
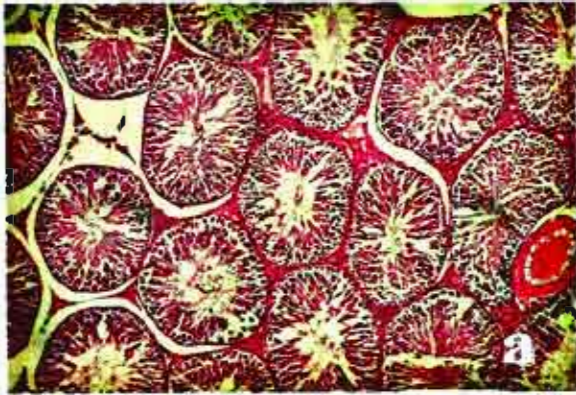


กราฟที่ 4 แสดงค่าความหนาแน่นของ glutamate/NMDA receptor (Integrated optical density) ในสมองส่วน frontal cortex ของสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับยา pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน และกลุ่มที่ได้รับยา pseudoephedrine อย่างเรื้อรัง

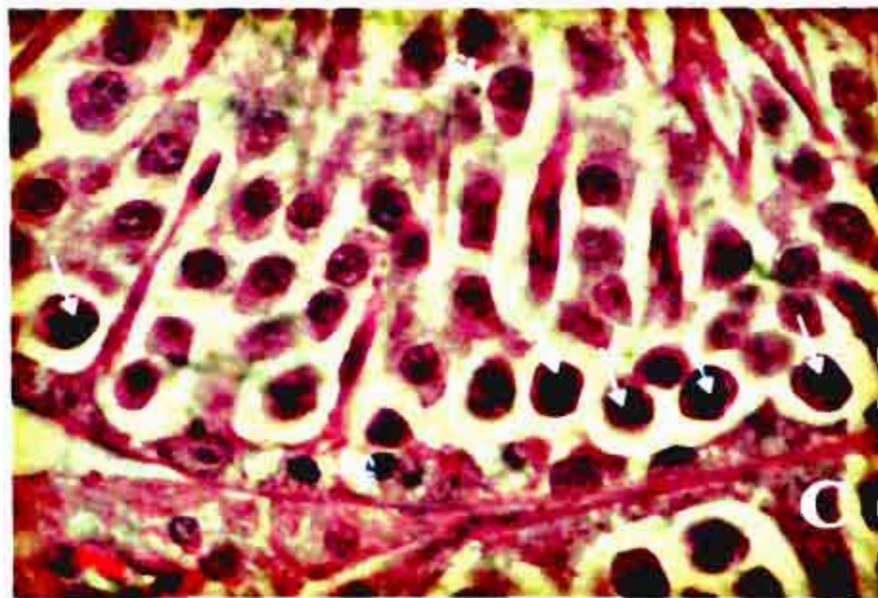
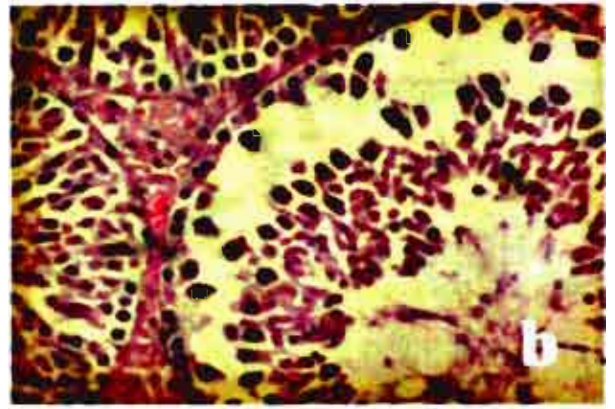
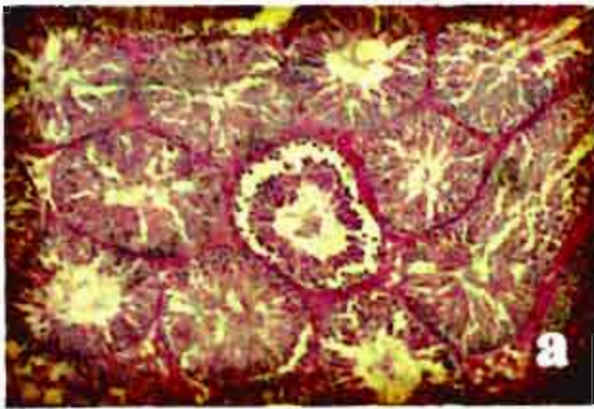
** $p < 0.01$

9.4 ผลของการได้รับ pseudoephedrine ต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

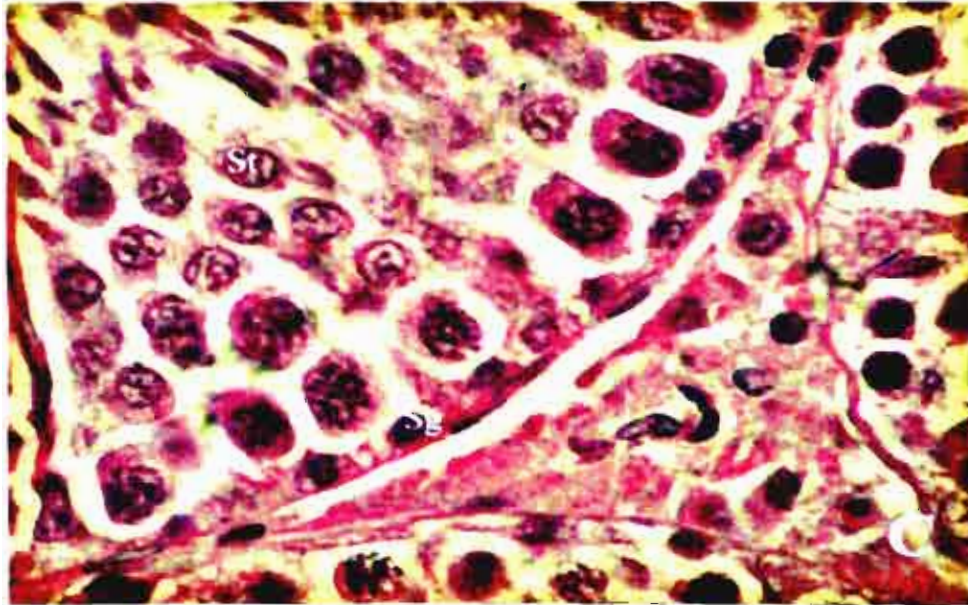
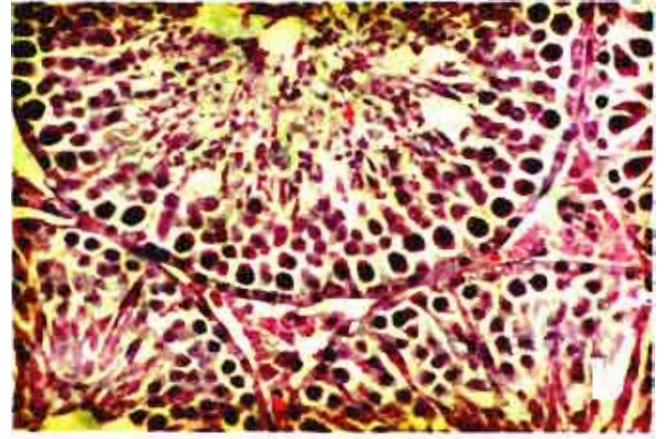
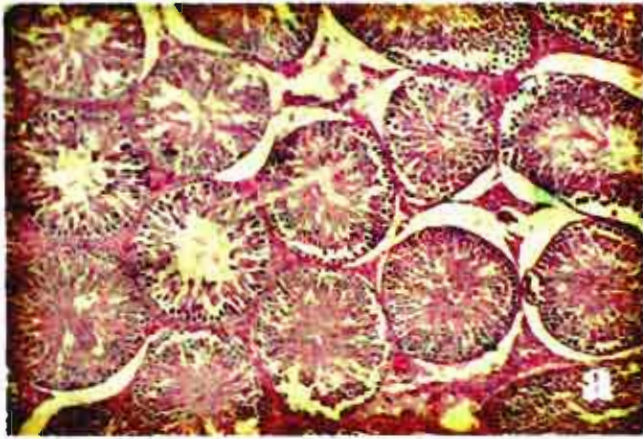
จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของอัณฑะ (testis) และรังไข่ (ovary) ของสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม ภายหลังจากได้รับ pseudoephedrine พบว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของท่อสร้างเซลล์อสุจิ (seminiferous tubule) ในอัณฑะ (testis) ของหนูเพศผู้กลุ่มควบคุม มีโครงสร้างโดยทั่วไป (qualitative study) อยู่ในสภาพปกติ (ภาพที่ 5) โดยพบว่ามีขบวนการสร้างเซลล์อสุจิ (spermatogenesis) ในระยะต่างๆ ปรากฏให้เห็น (ภาพที่ 5c) ในสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine แบบเฉียบพลัน พบว่ามีบางส่วนของเซลล์ในท่อ seminiferous tubule มีการสูญหาย และเสื่อมสลายไป (ภาพที่ 6 a, b) อย่างไรก็ตาม ยังปรากฏระยะต่างๆ ของการสร้างเซลล์อสุจิให้เห็น (ภาพที่ 6c) ในสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine แบบเรื้อรัง พบว่ามีบางส่วนของเซลล์ในท่อ seminiferous tubule สูญหาย และเสื่อมสลายไปเช่นกัน (ภาพที่ 7c) ความแตกต่างที่พบนี้อาจเป็นผลมาจากการได้รับ pseudoephedrine ของสัตว์ทดลอง ทั้งนี้การสูญหายและเสื่อมสลายที่เกิดขึ้นภายใน seminiferous tubule ต้องได้รับการตรวจสอบยืนยันการตายของเซลล์ด้วยวิธี apoptotic cell staining ต่อไป



ภาพที่ 5 แสดง seminiferous tubule ใน testis ของหนูกลุ่มควบคุม (a) ท่อ seminiferous tubule ใน testis ของหนูกลุ่มควบคุม กำลังขยาย 10 x (b) seminiferous tubule กำลังขยาย 40 x (c) แสดงระยะต่างๆ ของการสร้างเซลล์อสุจิ (spermatogenesis) ในท่อ seminiferous tubule เริ่มต้นจาก spermatogonia (Sg) ที่บริเวณ basal lamina ของ seminiferous tubule; primary spermatocyte (ลูกศร) แสดงถึงการแบ่งเซลล์แบบ mitosis ใน nucleus ของเซลล์; spermatid (St) กำลังขยาย 100 x



ภาพที่ 6 แสดง seminiferous tubule ใน testis ของหนูที่ได้รับ pseudoephedrine แบบเฉียบพลัน (acute group) (a) แสดง seminiferous tubule ที่มีบางส่วนของเซลล์สร้างเซลล์อสุจิสูญหาย หรือเสื่อมสลายไป (ลูกศร) กำลังขยาย 10 x (b) seminiferous tubule กำลังขยาย 40 x (c) แสดงระยะต่างๆ ของขบวนการ spermatogenesis; spermtogonia (Sg); primary spermatocyte (ลูกศร); spermatid (St) กำลังขยาย 100 x



ภาพที่ 7 แสดง seminiferous tubule ใน testis ของหนูที่ได้รับ pseudoephedrine แบบเรื้อรัง (chronic group) (a) แสดง seminiferous tubule ที่มีบางส่วนของเซลล์สร้างเซลล์อสุจิสูญหาย หรือเสื่อมสภาพไป (ลูกสร) กำลังขยาย 10 x (b) แสดงเซลล์สร้างอสุจิในระยะต่างๆ ของขบวนการ spermatogenesis ภายใน seminiferous tubule กำลังขยาย 40 x (c) แสดงเซลล์สร้างอสุจิในระยะต่างๆ : spermatogonia (Sg); primary spermatocyte (ลูกสร); spermatid (St) กำลังขยาย 100x

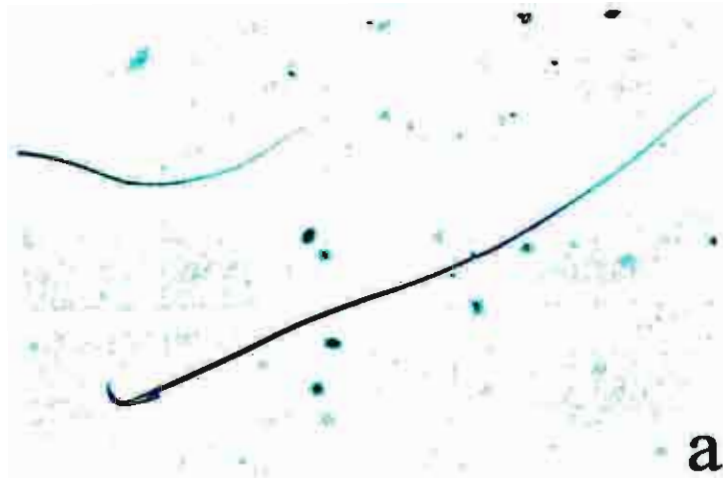
9.5 ผลของการได้รับ pseudoephedrine และ methamphetamine ต่อคุณภาพของสเปิร์ม

ในการศึกษาคุณภาพของสเปิร์มเป็นการศึกษาจำนวนของสเปิร์มจากบริเวณ cauda epididymis และลักษณะรูปร่างของสเปิร์ม ซึ่งลักษณะรูปร่างของสเปิร์ม (sperm morphology) ที่ปกติ (normal morphology) (ภาพที่ 8a) หัวของ สเปิร์มหนูมีลักษณะเป็นตะขอ และมีความยาวประมาณ 2.5 μm และลักษณะรูปร่างของสเปิร์มที่ผิดปกติมีหลายรูปแบบได้แก่ ลักษณะสเปิร์มที่หัวขาด (ภาพที่ 8b) สเปิร์มที่หัวงอ (ภาพที่ 8c) สเปิร์มที่หางงอ (ภาพที่ 8d) สเปิร์มที่หางขาด (ภาพที่ 8e)

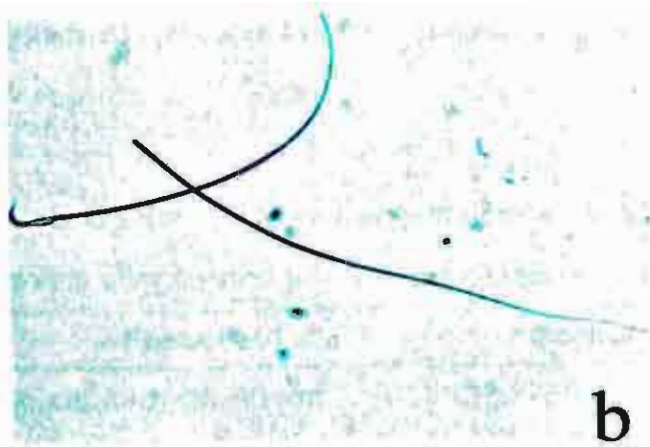
จากตารางที่ 1 พบว่าจำนวนสเปิร์มที่เจาะจากบริเวณ cauda epididymis ของหนูเพศผู้ที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเจียบพลัน จะมีจำนวนลดลง ($111.00 \pm 10.26 \times 10^6$) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($163.33 \pm 5.89 \times 10^6$) แต่จำนวนสเปิร์มในกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine ชนิดเรื้อรัง ($153.33 \pm 14.84 \times 10^6$) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

เมื่อศึกษาถึง morphology ของสเปิร์มของหนูที่ได้รับ pseudoephedrine ในรูปแบบต่างๆ พบว่า ร้อยละของสเปิร์มปกติ (normal sperm morphology) มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($94.83 \pm 1.83 \times 10^6$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $85.83 \pm 3.06 \times 10^6$ ในกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine ชนิดเจียบพลัน ($P < 0.001$) และ $87.67 \pm 4.41 \times 10^6$ ในกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine แบบเรื้อรัง ($P < 0.005$)

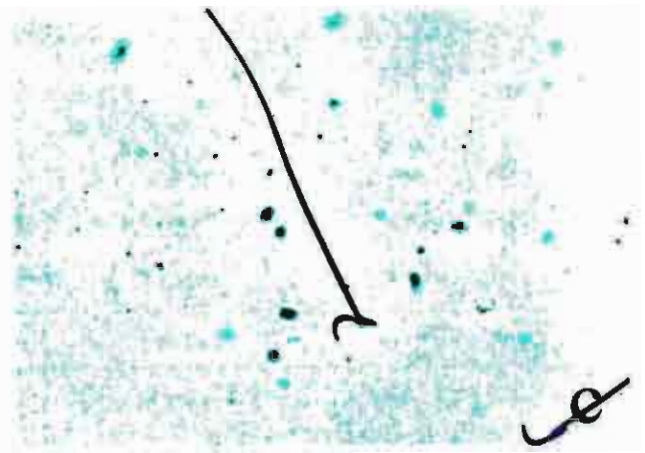
จากการศึกษาผลของ methamphetamine (ตารางที่ 2) ต่อจำนวนสเปิร์มที่เจาะจากบริเวณ cauda epididymis ของหนูเพศผู้ พบว่าจำนวนสเปิร์มในกลุ่มที่ได้รับ methamphetamine อย่างเจียบพลัน ($106.67 \pm 41.41 \times 10^6$) และชนิดเรื้อรัง ($122.33 \pm 13.71 \times 10^6$) จะมีจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($138.67 \pm 8.91 \times 10^6$) อย่างไรก็ตามความแตกต่างดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อศึกษาถึง morphology ของสเปิร์มของหนูที่ได้รับ methamphetamine ในรูปแบบต่างๆ พบว่า ร้อยละของสเปิร์มปกติ (normal sperm morphology) ที่ตรวจพบในสัตว์ทดลองทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าจำนวน normal sperm morphology มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับ methamphetamine อย่างเจียบพลัน ($71.33 \pm 7.86 \times 10^6$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($94.50 \pm 2.17 \times 10^6$) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ methamphetamine แบบเรื้อรัง มีสัดส่วนลดลงเพียงเล็กน้อย ($89.83 \pm 2.93 \times 10^6$) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



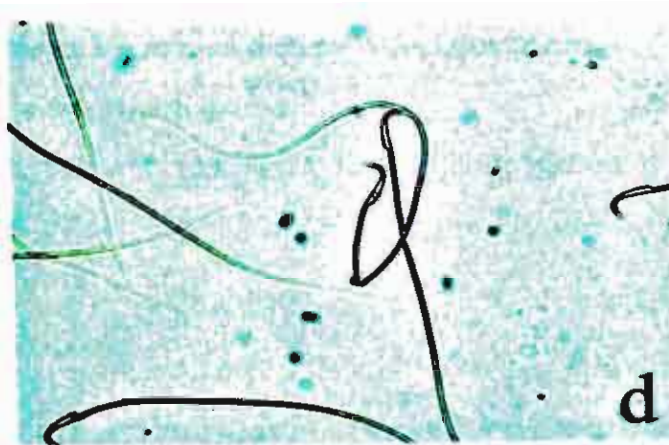
a



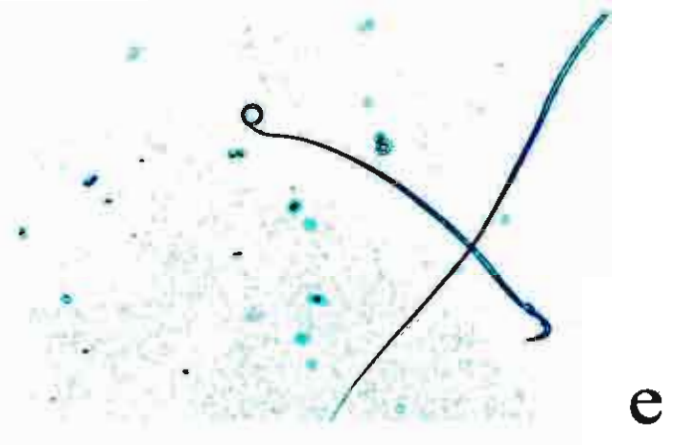
b



c



d



e

ภาพที่ 8 แสดงลักษณะรูปร่างของสเปิร์มที่ปกติ (normal morphology)(a), ลักษณะรูปร่างของสเปิร์มที่ผิดปกติ สเปิร์มหัวขาด (headless sperm) (b), สเปิร์มค้งคอ (bent neck)(c), สเปิร์มหางงอ (bent tail) (d), สเปิร์มที่หางคด (coiled tail) (e)

Table 1. Cauda epididymal sperm number ($\times 10^6/\text{organ}$) and normal sperm morphology (%) of male rats after treated with various doses of pseudoephedrine compared with the control group

Features	Control	Acute	Chronic
Cauda epididymal sperm number ($\times 10^6/\text{organ}$)	163.33 $\pm$ 5.89	111.00 $\pm$ 10.26 ^a	153.33 $\pm$ 14.84
Normal sperm morphology (%)	94.83 $\pm$ 1.83	85.83 $\pm$ 3.06 ^b	87.67 $\pm$ 4.41 ^c

Values are means and standard deviations

N = 6 for each group

^aSignificantly different from the control group at $p < 0.001$

^bSignificantly different from the control group at $p < 0.001$

^cSignificantly different from the control group at $p < 0.005$

Table 2. Cauda epididymal sperm number ($\times 10^6/\text{organ}$) and normal sperm morphology (%) of male rats after treated with various doses of methamphetamine compared with the control group

Features	Control	Acute	Chronic
Cauda epididymal sperm number ($\times 10^6/\text{organ}$)	138.67 $\pm$ 8.91	106.67 $\pm$ 41.41	122.33 $\pm$ 13.71
Normal sperm morphology (%)	94.50 $\pm$ 2.17	71.33 $\pm$ 7.86 ^a	89.83 $\pm$ 2.93

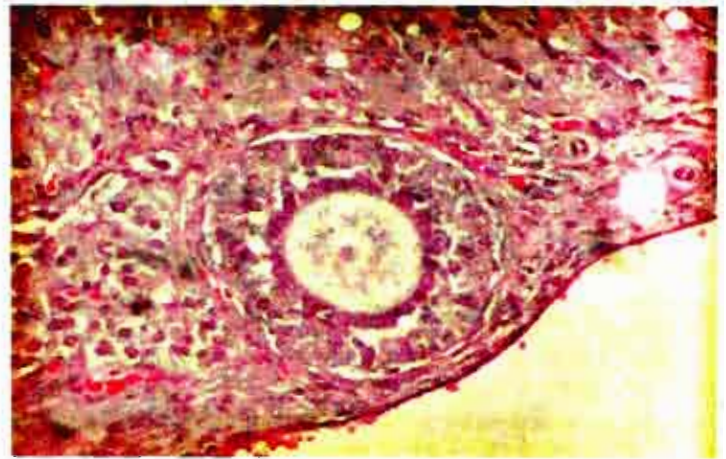
Values are means and standard deviations

N = 6 for each group

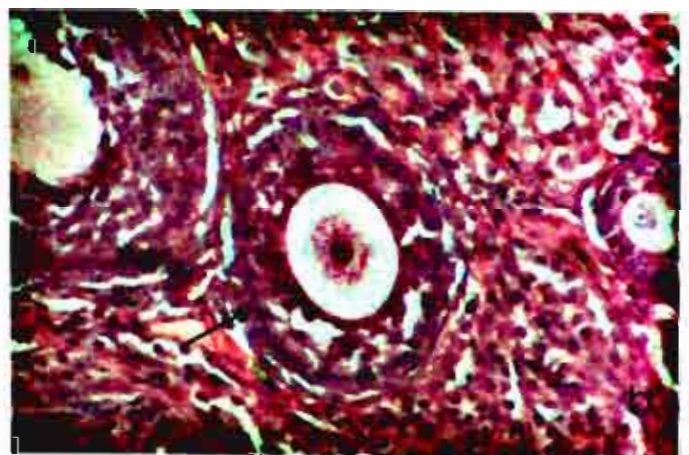
^aSignificantly different from the control group at $p < 0.001$

9.6 ผลของการได้รับ pseudoephedrine ต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

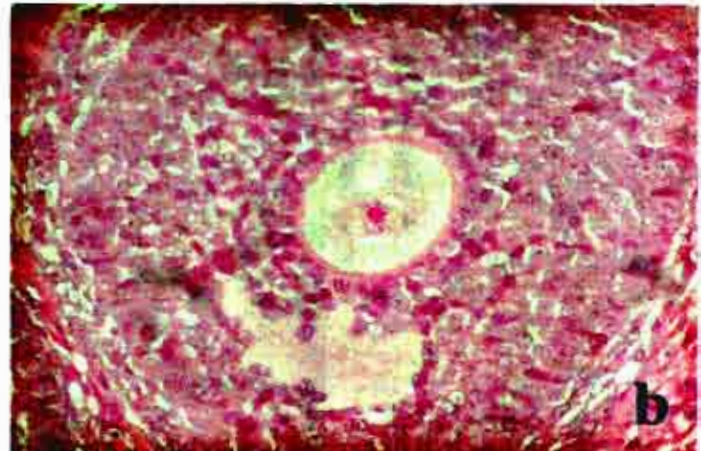
การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของเซลล์ไข่ (ovarian follicle) ในรังไข่ของหนูเพศเมีย ของกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน และกลุ่มที่ได้รับอย่างเรื้อรัง แสดงในภาพที่ 9, 10 และ 11 ตามลำดับ จากการศึกษาลักษณะทั่วไป (qualitative study) พบว่าไม่มีความแตกต่างของการสร้างเซลล์ไข่ ในรังไข่ของสัตว์ทดลองทั้งสามกลุ่ม อย่างไรก็ตาม apoptotic cell staining ยังมีความจำเป็นเพื่อตรวจสอบ การเกิด apoptosis ที่เกิดขึ้นในรังไข่ของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มต่อไป



ภาพที่ 9 แสดงเซลล์ไข่ (ovarian follicle) ในรังไข่ (ovary) ของหนูเพศเมีย ของกลุ่มควบคุม (a) แสดงเซลล์ไข่ในระยะ mature follicle (ลูกศร) ที่พบในรังไข่ กำลังขยาย 10X (b) แสดงเซลล์ไข่ในระยะ secondary follicle ใน ovary กำลังขยาย 40 X



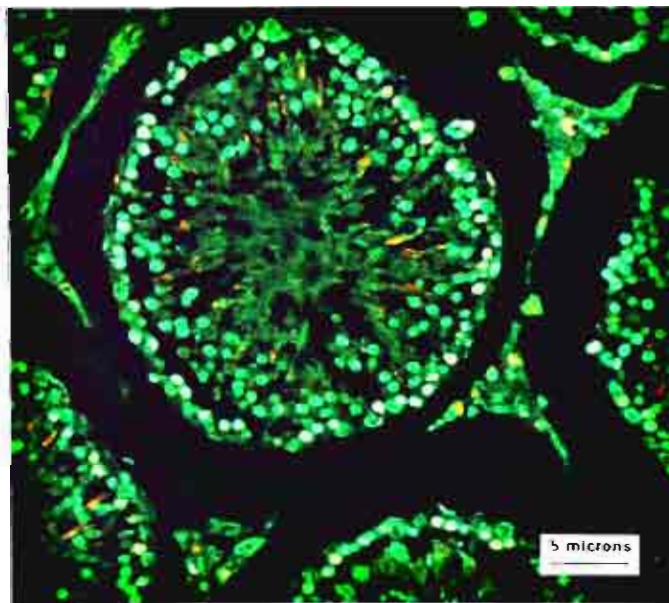
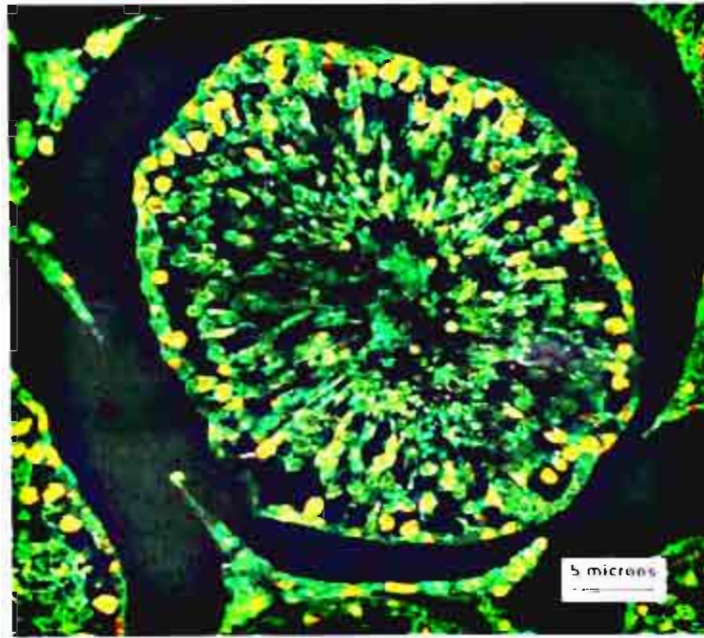
ภาพที่ 10 แสดงเซลล์ไข่ (ovarian follicle) ในระยะต่างๆ ที่พบในรังไข่ (ovary) ของหนูเพศเมีย ที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน (acute group) (a) แสดงเซลล์ไข่ในระยะ primary follicle (ลูกศร) ที่พบในรังไข่ กำลังขยาย 10X (b) แสดงเซลล์ไข่ในระยะ primary follicle (ลูกศร) พบว่ามี follicular cell เรียงตัวหลายชั้นล้อมรอบ primary oocyte กำลังขยาย 40 X



ภาพที่ 11 แสดงเซลล์ไข่ (ovarian follicle) ในรังไข่ (ovary) ของหนูเพศเมีย ที่ได้รับ pseudoephedrine แบบเรื้อรัง (a) แสดงเซลล์ไข่ในระยะ secondary follicle (ลูกศร) ที่พบบนรังไข่ กำลังขยาย 10X (b) แสดงเซลล์ไข่ในระยะ secondary follicle พบ antrum แทรกอยู่ใน follicular cell กำลังขยาย 40 X

9.7 ผลการศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine ต่อกระบวนการตายของเซลล์ในท่อสร้างอสุจิ

จากผลการศึกษาพบว่า การได้รับ pseudoephedrine อย่างเฉียบพลันในปริมาณที่สูง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ใน seminiferous tubules (ภาพที่ 12a, b). ในทางตรงข้ามพบว่าหนูที่ได้รับ pseudoephedrine ในปริมาณต่ำอย่างเรื้อรัง มีปริมาณของ apoptotic cells ใน seminiferous tubules น้อยกว่า (ภาพที่ 13) นอกจากนี้ยังพบว่าการตายของเซลล์ (TUNEL-positive-cells) ใน seminiferous tubules ในสัตว์ที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเรื้อรัง ซึ่งสามารถพบได้ในทุกระดับของ sperm development โดยเฉพาะ spermatogonia ที่อยู่ที่ basement membrane ของ seminiferous tubules (ภาพที่ 12a) ผลการศึกษาได้รับการยืนยันด้วยการศึกษาด้วย 2 เทคนิคการย้อมเซลล์ ได้แก่ fluorescent staining (ภาพที่ 12, 13) และ colorimetric staining (ภาพที่ 14) จากผลการศึกษานั้นสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณร้อยละของเซลล์ที่ตายใน seminiferous tubule ขึ้นอยู่กับขนาดของการได้รับสาร methamphetamine (Yamamoto et al., 2002) ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของ เซปิร์มภายหลังการได้รับ methamphetamine (ตารางที่ 2) ซึ่งพบว่ามีผลสอดคล้องกันกับ pseudoephedrine (ตารางที่ 1) การเกิด apoptosis จากการได้รับ pseudoephedrine ในปริมาณสูงอาจเป็นผลมาจากการเพิ่ม adrenergic vasoconstriction อย่างเฉียบพลัน (Traino et al., 2004) นอกจากนั้นอาจเป็นผลจากการลดระดับฮอร์โมน testosterone ซึ่งพบว่าการลดลงเมื่อได้รับ methamphetamine (Yamamoto et al., 2002) การเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนอาจจะเป็นที่เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ใน spermatogenic cells อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อยืนยัน



ภาพที่ 12 Apoptotic cells in seminiferous tubule of rats treated with high dose pseudoephedrine. TUNEL-positive staining indicative of DNA fragmentation was detected as yellow-green fluorescent on the nuclei (a,b) and normal cells were detected as red fluorescent signals (b)

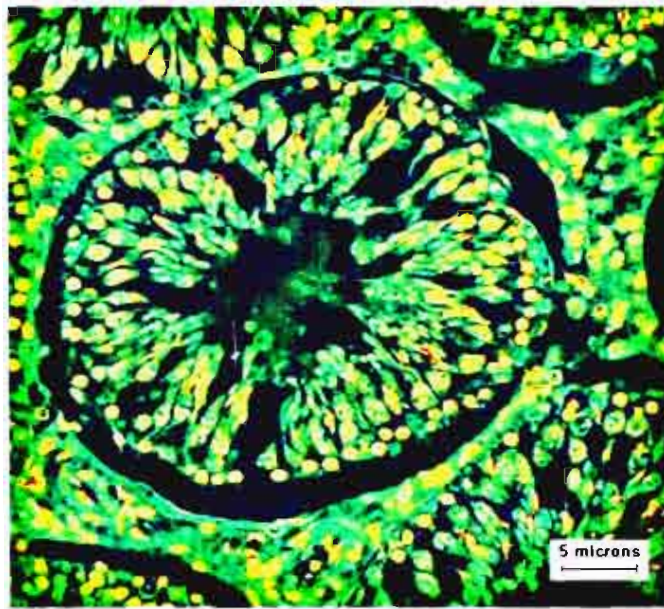
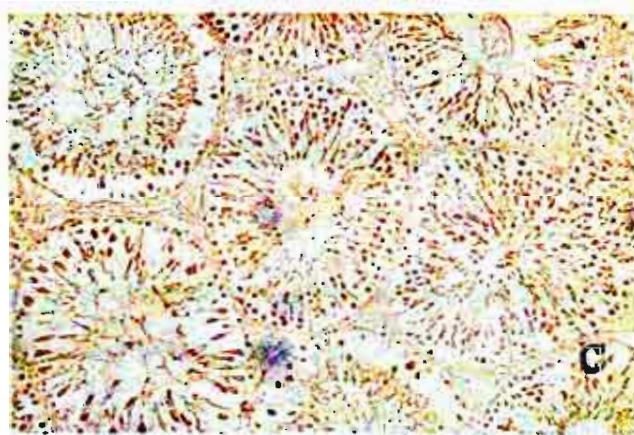
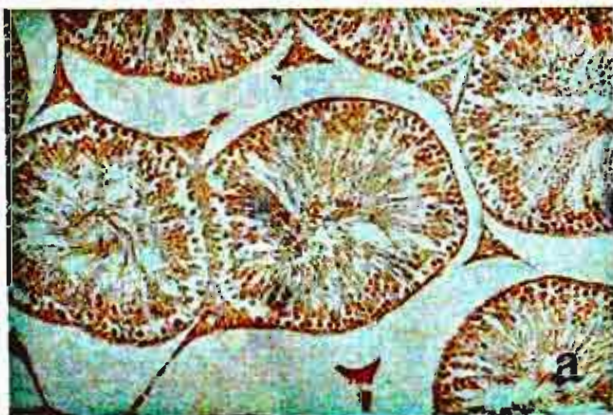


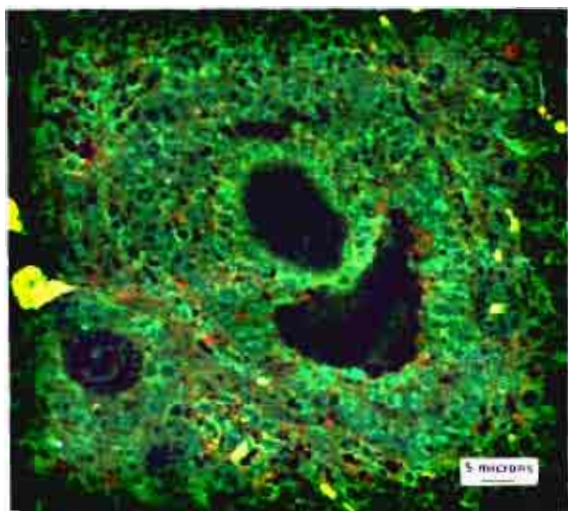
Figure 13. Apoptotic cells in seminiferous tubule of rats treated with lower dose pseudoephedrine chronically indicated by yellow-green fluorescent signals



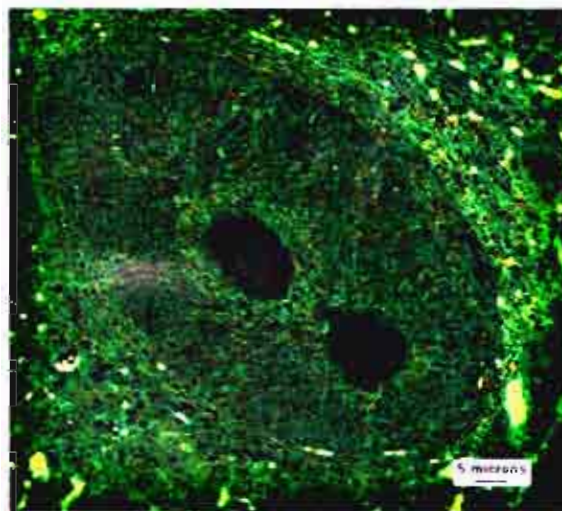
ภาพที่ 14 Apoptotic cells in seminiferous tubule of rats treated with high dose (b) low dose (c) of pseudoephedrine indicated by dark brown cells comparing with control (a).

9.7 ผลการศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine ต่อกระบวนการตายของเซลล์ไข่

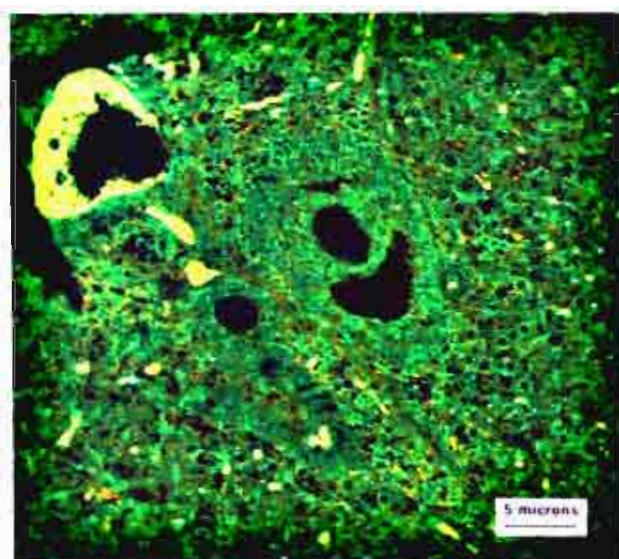
ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกระบวนการตายของเซลล์ไข่จากกลุ่มควบคุม กับกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเจือปน และกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเจือปน



(a)



(b)



(c)

ภาพที่ 15 Apoptotic cells in ovary of rats treated with high dose (b) low dose (c) of pseudoephedrine indicated by dark brown cells comparing with control (a).

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ชื่อผู้แต่ง: S. Nudmamud-Thanoi, S. Thanoi, P. Sobhon

ชื่อเรื่อง: Increase of Glutamate/N-Methyl-D-Aspartate Receptor Immunodensity in the Dentate Gyrus of Rats Following Pseudoephedrine Administration

ชื่อวารสาร: Neurotoxicology

วัน เดือน ปี ที่เสนอตีพิมพ์: 2nd August 2005

2. ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

2.1 ชื่อผู้แต่ง: S. Nudmamud-Thanoi, S. Thanoi, P. Sobhon

ชื่อเรื่อง: Increase of Glutamate/N-Methyl-D-Aspartate Receptor Immunodensity in the Nucleus Accumbens of Rats Following Pseudoephedrine Administration

ชื่อวารสาร: Neurotoxicology

วัน เดือน ปี ที่จะเสนอตีพิมพ์: December 2005

2.2 ชื่อผู้แต่ง: S. Nudmamud-Thanoi, S. Thanoi, P. Sobhon

ชื่อเรื่อง: Acute high dose administration of pseudoephedrine induced apoptotic activity inside the seminiferous tubules of male rats

ชื่อวารสาร: Neurotoxicology

วัน เดือน ปี ที่จะเสนอตีพิมพ์: December 2005

3. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

3.1 เจริญพาณิชย์

ผลจากการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปศึกษาวิจัยเพิ่มเติมถึงผลกระทบของการใช้ยา pseudoephedrine ต่าระบบต่างๆ ของร่างกาย และนำมาซึ่งการค้นคว้าหาผลิตภัณฑ์เพื่อนำมารักษาผู้ที่มีอาการคิดยา หรืออาการข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยา

3.2 เจริญสาธารณะ

เพื่อให้สาธารณชนทราบถึงผลของการใช้ยา pseudoephedrine ซึ่งเป็นยาที่มีแนวโน้มที่จะเป็นยาเสพติดได้

3.3 เจริญวิชาการ

ผลงานวิจัย และเทคนิควิจัยสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาการเรียนการสอนทั้งในระดับปริญญาตรี และระดับบัณฑิตศึกษา

4. ผลงานวิจัยอื่นๆ

4.1 ชื่อผู้แต่ง: S. Nudmamud-Thanoi, S. Thanoi, P. Sobhon

ชื่อเรื่อง: Increased glutamate/N-methyl-D-aspartate receptor immunoreactivity in rat hippocampus following

รูปแบบการเสนอผลงาน: Poster presentation

สถานที่: การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 14-16 มกราคม 2548 ณ โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี

4.2 ชื่อผู้แต่ง: Sutisa Nudmamud-Thanoi , Samur Thanoi, Prasert Sobhon

ชื่อเรื่อง: Effects of pseudoephedrine administration on glutamate/N-methyl-D-aspartate receptor immunoreactivity in rat hippocampus

รูปแบบการเสนอผลงาน: Poster presentation

สถานที่: การประชุมวิชาการกายวิภาคศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28 27-29 เมษายน 2548 ณ โรงแรมเนวาด้าแกรนด์ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี

4.3 ชื่อผู้แต่ง: Sutisa Nudmamud-Thanoi , Samur Thanoi, Prasert Sobhon

ชื่อเรื่อง: High dose pseudoephedrine administration can induce apoptosis in seminiferous tubules of male rats

รูปแบบการเสนอผลงาน: Poster presentation

สถานที่: การประชุมวิชาการกายวิภาคศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28 27-29 เมษายน 2548 ณ โรงแรมเนวาด้าแกรนด์ อ.เมือง จ.อุบลราชธานี

4.4 ชื่อผู้แต่ง: สุทิสสา ถาน้อย , เสมอ ถาน้อย, ประเสริฐ โศภณ

ชื่อเรื่อง: การได้รับ pseudoephedrine เพิ่มปริมาณของ glutamate/N-methyl-D-aspartate receptor ในบริเวณ hippocampus ของสมองหนู

รูปแบบการเสนอผลงาน: Oral presentation

สถานที่: การประชุมทางวิชาการนเรศวรวิจัย ครั้งที่ 1 28-29 กรกฎาคม 2548 ณ สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

4.5 ชื่อผู้แต่ง: เสมอ ถาน้อย, สุทิสสา ถาน้อย, ประเสริฐ โศภณ

ชื่อเรื่อง: การได้รับ pseudoephedrine ในปริมาณสูงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ในท่อนำสุจิของหนูขาวเพศผู้

รูปแบบการเสนอผลงาน: Oral presentation

สถานที่: การประชุมทางวิชาการนเรศวรวิจัย ครั้งที่ 1 28-29 กรกฎาคม 2548 ณ สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

ภาคผนวก

Dr.Sutisa Thanoi

From: NeuroToxicology [authorsupport@elsevier.com]
To: Dr.Sutisa Thanoi
Cc:
Subject: Submission Confirmation
Attachments:

Sent: a. 8/2/2548 6:25 PM

Dear Dr. Sutisa Nudmamud-Thanoi,

Your submission entitled "Increase of Glutamate/N-Methyl-D-Aspartate Receptor Immunodensity in the Dentate Gyrus of Rats Following Pseudoephedrine Administration" has been received by journal Neurotoxicology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/neutox/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Neurotoxicology

Ref.: Ms. No. NEUTOX-D-05-00103

Increase of Glutamate/N-Methyl-D-Aspartate Receptor Immunodensity in the Dentate Gyrus of Rats Following Mephedrine Administration
Neurotoxicology

Dear Dr. Nudmamud-Thanoi,

Reviewers have now commented on your paper. You will see that they are advising that you revise your manuscript particularly with regard to clarifying the control group exposure in this work. If you are prepared to undertake the work required, I would be pleased to reconsider my decision.

For your guidance, reviewers' comments are appended below.

If you decide to revise the work, please submit a list of changes or a rebuttal against each point which is being raised when you submit the revised manuscript.

To submit a revision, go to <http://ees.elsevier.com/neutox> and log in as an Author. You will see a menu item called Submission Needing Revision. You will find your submission record there.

Yours sincerely

John L. O'Donoghue, VMD, PhD
Associate Editor
Neurotoxicology

Increase of Glutamate/N-Methyl-D-Aspartate Receptor Immunodensity in the Dentate Gyrus of Rats Following Pseudoephedrine Administration

S. Nudmamud-Thanoi ^{1*}, S. Thanoi, ¹ P. Sobhon ²

¹ Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand

² Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand

*Corresponding author:

Tel. : +66 5526-1000 ext. 4517

Fax : +66 5526-1197

E-mail address: sutisat@nu.ac.th

Abstract

Pseudoephedrine is a sympathomimetic drug in which its structure is similar to amphetamine. Although pseudoephedrine is not as potent as amphetamine, it has been reported that the actions of pseudoephedrine on the central nervous system via dopamine release resemble to amphetamine. Changes of dopamine function can induce malfunction of glutamatergic system because there are well-documented interactions between glutamate/N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and dopaminergic system. Therefore, this study is aimed to investigate the effects of acute and chronic pseudoephedrine administration on NMDA receptors in hippocampal formation which is the area involved in learning and memory. We employed immunohistochemistry to determine the alteration of NMDA receptors density in rat hippocampus and dentate gyrus following acute and chronic pseudoephedrine administration. The density of NMDA receptors in the dentate gyrus of animals treated with pseudoephedrine chronically was significantly highest ($p<0.005$) when compared with the acute and control groups. Similarly, the density of NMDA receptors in an acute group was also higher than the control group ($p<0.01$). These results indicate that pseudoephedrine could induce an increase of NMDA receptors in the dentate gyrus. This might be a compensatory effect of NMDA receptor in response to the degeneration or loss of glutamatergic neurons.

Keywords: Pseudoephedrine, NMDA receptor, Hippocampus, Dentate Gyrus, Immunohistochemistry

INTRODUCTION

Pseudoephedrine is a diastereoisomer of ephedrine and both are classified as sympathomimetic drugs (Will, 1997). Pseudoephedrine is commonly found in over-the-counter decongestants, anorectic agents and as an amphetamine substitute (Blosser et al., 1987; Blum, 1981). The sympathomimetic agents can produce psychoactive effects such as pleasant perceptual changes, euphoria and mental stimulation as same as amphetamine, a psychostimulant drug, if taken in large doses. The action of sympathomimetic agents shows a similar way to amphetamine because of its related structure (Wills, 1997). The effect of pseudoephedrine has been studied in the nervous system. Kumarnsit et al. (1999) found that pseudoephedrine induced an immediate early gene Fos immunoreactivity in the nucleus accumbens and striatum. Furthermore, the action of pseudocphedrine was also found to mediate via dopaminergic mechanism (Zarrindast, 1981; Kumarnsit et al., 1999). In the study of drug discrimination, pseudoephedrine was shown both partial substitution (20 mg/kg) and full substitution (40 mg/kg) for amphetamine (1mg/kg) (Tongjaroenbuangam et al., 1998). Amphetamine, dopamine agonist, can produce long-term behavioral changes including sensitization, tolerance, and dependence (reviewed by Robinson and Becker, 1986). Moreover, the administration of methamphetamine, the derivatives of amphetamine, can damage neurotoxicity to dopaminergic and serotonergic nerve terminals in several brain areas (O'Callaghan and Miller, 1991; O'Dell et al., 1991). It has also been reported that acute methamphetamine administration decreases dopamine transporter function (Fleckenstein et al., 1997) and loss of dopamine transporter sites demonstrates following chronic methamphetamine administration (Nakayama et al., 1993). Changes of dopamine function can induce malfunction of glutamatergic system because there are well-documented interactions between glutamate/NMDA receptors and dopaminergic systems (e.g Murase et al., 1993; Verma and Moghaddam, 1996). There is an evidence indicated the role of

glutamate in the development of methamphetamine toxicity. Methamphetamine enhances glutamate release (Abekawa et al., 1994), and NMDA-receptor antagonist has been report to protect against methamphetamine neurotoxicity (Sonsalla et al., 1998). Moreover, methamphetamine also produced alterations of striatal and cortical glutamate/NMDA receptors (Eisch et al., 1996). Itzhak (1994) found the upregulation of cortical NMDA receptor following repeated exposure of mice to cocaine, a psychostimulant. Although glutamate abnormalities have not to date been elucidated after exposure to sympatomimetic agents, a study found that ephedrine play a critical role of glutamate release in subcortical region indicated dysfunction of CNS glutamatergic pathways (Bowyer et al., 2000). It is very interesting to study mechanisms of glutamatergic system after pseudoephedrine, an over-the-counter product, exposure as the glutamate/NMDA receptors seem to be critically involved in synaptic formation and plasticity of the CNS (Cline et al., 1987; Udin and Scherer, 1990) as well as in aspects of long-term potentiation (e.g. Coan et al., 1987; Davies et al., 1989). Therefore, in the present study, we aimed to investigate the effects of acute and chronic pseudoephedrine administration on the alteration of glutamate/NMDA receptor density in rat hippocampus and dentate gyrus.

MATERIALS AND METHODS

Male Sprague-Dawley rats (250-280g) were obtained from the National Animal Center, Mahidol University, Thailand. The animals were housed 3-6 per cage and maintained at room temperature under a 12 h light/dark cycle with free access to water and food. All animals were handled for at least 1 week before experiment. All animal procedures were carried out in compliance with Mahidol University Code of Practice and the National Institutes of Health (USA) Guidelines for treatment of laboratory animals.

Pseudoephedrine was received from the Health Sciences Research Institute, Naresuan University, Thailand. To examine the effects of acute pseudoephedrine, animals were administered intragastrically at a dose of 320 mg/kg. The chronic effects of pseudoephedrine were examined by treated intragastrically at the dose of 160 mg/kg, once daily for 15 days. Rats were sacrificed 2 h later the last dose and brains were removed for the immunohistochemical analysis of glutamate/NMDA receptor subunit1 (NMDAR1). Drug doses for these studies were chosen based on the dose that pseudoephedrine can produce a discriminative stimulus resembling that of amphetamine (Tongjaroenbuangam, et al., 1998; Glennon and Young, 2000).

Brains were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin wax and subsequently sectioned at a thickness of 5 μ M, then mounted onto 3-aminopropyltriethoxysilane (APES) coated glass slides. The sections were deparaffinize in xylene, rehydrated in grade alcohol, then heated in microwave oven on full power (650 W) for 3 periods of 5 min in phosphate buffer saline (PBS; 0.01 M phosphate buffer, 0.9% NaCl,) pH 7.4, to aid antigen retrieval. Sections were incubated for 30 min in a solution of 0.6% H₂O₂ in 10% methanol and 0.1% Triton X in PBS pH 7.4 to inhibit endogenous peroxidase activity and then washed for 3x5 min in PBS. Non-specific binding was minimized by incubation for 1 h in 5% normal rabbit serum in PBS and incubated overnight at 4°C with a polyclonal antibody against the NMDAR1 (Sigma) at a dilution of 1:1000 in protein blocking solution. The sections were washed for 3x5 min in PBS before incubation for 2 h at room temperature with biotinylated secondary antibody (anti-rabbit IgG) diluted 1:200 in protein blocking solution. This was followed by incubation for 2 h at room temperature with avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (purchased with secondary antibody as a Vectorstain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) after which the sections were washed for 3x5 min in PBS. The sections were washed for a further 3x5 min. Then the

protein immunoreactivity was visualized using the chromogen diaminobenzidine (DAB), intensified with nickel chloride. The sections were dehydrated and mounted. Immunoreactivity was not present in control sections in which the primary antibody was omitted from the staining protocol.

Immunoreactivity was quantified by optical density (OD) of NMDAR1 immunoreactivity in the subregions of hippocampus and the dentate gyrus. The optical measurements were made blind to the animal groups. OD analysis was performed on high resolution and analyzed with Scion Image Software based on NIH image (v. beta 3b; www.scioncorp.com; 1998). The software was used to obtain the integrated optical density (IOD) of the region. The value is the sum of the optical densities of all pixels in the region divided by number of pixels. Background values were obtained from the neighboring white matter. The average of values from three sections for each subject was used for statistical analysis. Statistical analysis was performed using ANOVA with Dunnett post hoc tests.

RESULTS

Immunohistochemistry demonstrated NMDAR1 immunoreactive cells in all principal neuronal populations of the hippocampus, namely pyramidal neurons in cornu ammonis fields 1-3 (CA1-3), granule cells in the dense cell layer of the dentate gyrus (DG). Immunoreactivity was accordingly limited to neurons, was strong in pyramidal cells of CA1-3, and was especially strong in granule cells of DG. Neurons in other hippocampal subareas (e.g. molecular layer) and surrounding areas (white matter) were less immunoreactive. Therefore, the data was analyzed by selected the area of interest in pyramidal cell layer in CA1-3 and granule cell layer in dentate gyrus. Within each region, NMDAR1 immunodensity in the three experimental groups were compared by ANOVA. NMDAR1

immunodensity was significantly increased above control in dentate gyrus in acute ($p<0.01$) and chronic ($p<0.005$) pseudoephedrine administration.

DISCUSSION

The main finding of the present study is an increase of NMDAR1 immunodensity in the dentate gyrus of rats following acute and chronic pseudoephedrine administration. The result showed an up-regulation of NMDAR1 density in granule layer of dentate gyrus. As pseudoephedrine has been considered to be a psychostimulant and has the potential to be abused (Tongjaroenbuangam et al., 1998; Glennon and Young, 2000), our findings provide a support of psychostimulant effect on glutamatergic system. Abnormalities of glutamatergic system may derive from the change of dopamine function as the action of pseudoephedrine has been suggested to mediate via dopaminergic mechanism (Zarrindast, 1981; Kumarnsit et al., 1999). The present results are in agreement with the previous reports which found increase in cortical NMDA receptor binding after treatment with psychostimulant agents either methamphetamine (Eisch et al., 1996) or cocaine (Itzhak, 1994), suggesting the mechanisms of NMDA receptor implicated in the development of sensitization of the drugs. Moreover, the phosphorylation of NMDAR1, at least on serine 896 and 890 sites, was demonstrated sensitive to amphetamine exposure (Liu et al., 2004).

Supporting a hypothesis of glutamatergic dysfunction in subcortical regions following psychostimulant drug exposure, an increase of metabotropic glutamate receptor (mGluR5) immunoreactivity and mRNA levels have been reported in the cortical and hippocampal neurons after amphetamine treatment (Yu et al., 2001). Furthermore, the observations that found decrease of glutamate release after stimulation of dopamine receptor (Mitchell and Dogget, 1980; Crowder and Bradford, 1987) provide a further support of glutamate abnormalities following the administration of psychostimulants including pseudoephedrine.

A possible interpretation of the present observation that is certainly testable in further studies is that the NMDA receptor elevation may be a response to a neurodegenerative process involving either glutamatergic neuronal loss or a reduction of glutamate release.

Acknowledgements

This research was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission of Higher Education (CHE), and the Faculty of Medical Science, Naresuan University, Thailand. The authors also gratefully acknowledge the Health Sciences Research Institute, Naresuan University, Thailand.

References

- Abekawa T, Ohmori T, Koyama T. Effects of repeated administration of a high dose of methamphetamine on dopamine and glutamate release in rat striatum and nucleus accumbens. *Brain Res* 1994;643:276-81.
- Blosser JC, Barrantes M, Parker RB. Correlation between anorectic potency and affinity for hypothalamic (+)-amphetamine binding sites of phenylethylamines. *Eur J Pharmacol* 1987;134:97-103.
- Blum A. Phenylpropanolamine: an over-the-counter amphetamine? *JAMA* 1981;245:1346-7.
- Bowyer JF, Newport GD, Slikker W Jr, Gough B, Ferguson SA, Tor-Agbidye J. An evaluation of l-ephedrine neurotoxicity with respect to hyperthermia and caudate/putamen microdialysate levels of ephedrine, dopamine, serotonin, and glutamate. *Toxicol Sci* 2000;55:133-42.
- Cline HT, Debski EA, Constantine-Paton M. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist desegregates eye-specific stripes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4342-5.

- Coan EJ, Saywood W, Collingridge GL. MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 1987;80:111-4.
- Crowder JM, Bradford HF. Inhibitory effects of noradrenaline and dopamine on calcium influx and neurotransmitter glutamate release in mammalian brain slices. *Eur J Pharmacol* 1987;143:343-52.
- Davies SN, Lester RA, Reymann KG, Collingridge GL. Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature* 1989;338:500-3.
- Eisch AJ, O'Dell SJ, Marshall JF. Striatal and cortical NMDA receptors are altered by a neurotoxic regimen of methamphetamine. *Synapse* 1996;22:217-25.
- Fleckenstein AE, Metzger RR, Wilkins DG, Gibb JW, Hanson GR. Rapid and reversible effects of methamphetamine on dopamine transporters. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:834-8.
- Glennon RA, Young R. (+)Amphetamine-stimulus generalization to an herbal ephedrine product. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:655-8.
- Itzhak Y. Modulation of the PCP/NMDA receptor complex and sigma binding sites by psychostimulants. *Neurotoxicol Teratol* 1994;16:363-8.
- Kumarnsit E, Harnyuttanakorn P, Meksurien D, Govitrapong P, Baldwin BA, Kotchabhakdi N, Casalotti SO. Pseudoephedrine, a sympathomimetic agent, induces Fos-like immunoreactivity in rat nucleus accumbens and striatum. *Neuropharmacology* 1999;38:1381-7.
- Liu Z, Mao L, Parelkar NK, Tang Q, Samdani S, Wang JQ. Distinct expression of phosphorylated N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunits by projection neurons and interneurons in the striatum of normal and amphetamine-treated rats. *J Comp Neurol* 2004;474:393-406.

Mitchell PR, Doggett NS. Modulation of striatal [3H]-glutamic acid release by dopaminergic drugs. *Life Sci* 1980;26:2073-81.

Murase S, Grenhoff J, Chouvet G, Gonon FG, Svensson TH. Prefrontal cortex regulates burst firing and transmitter release in rat mesolimbic dopamine neurons studied in vivo. *Neurosci Lett* 1993;157:53-6.

Nakayama M, Koyama T, Yamashita I. Long-lasting decrease in dopamine uptake sites following repeated administration of methamphetamine in the rat striatum. *Brain Res* 1993;601:209-12.

O'Dell SJ, Weihmuller FB, Marshall JF. Multiple methamphetamine injections induce marked increases in extracellular striatal dopamine which correlates with subsequent neurotoxicity. *Brain Res* 1991;564:256-60.

O'Callaghan JP, Miller DB. Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;270:197-206.

Robinson TE, Becker JB. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 1986;396:157-98.

Sonsalla PK, Albers DS, Zeevalk GD. Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino Acids* 1998;14:69-74.

Tongjaroenbuangam W, Meksuriyen D, Govitrapong P, Kotchabhakdi N, Baldwin BA. Drug discrimination analysis of pseudoephedrine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1998;59:505-10.

Udin SB, Scherer WJ. Restoration of the plasticity of binocular maps by NMDA after the critical period in *Xenopus*. *Science* 1990;249:669-72.

Verma A, Moghaddam B. NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *J Neurosci* 1996;16:373-9.

Will S. *Drugs of abuse*. London: Pharmaceutical Press;1997. p.131-4.

Yu MF, Lin TY, Ho WH, Yin HS. Amphetamine induces differential changes in the gene expression of metabotropic glutamate receptor 5 in cultured cortical and hippocampal neurons. *J Mol Neurosci* 2001;17:13-24.

Zarrindast MR (1981) Dopamine-like properties of ephedrine in rat brain. *Br J Pharmacol* 1981;74:119-22.

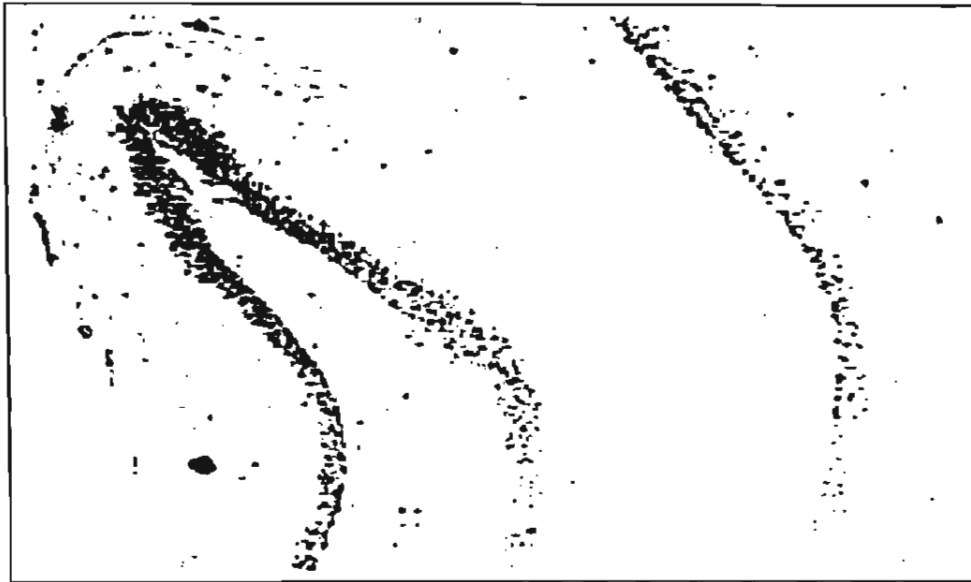


Figure 1 Immunohistochemistry analysis of NMDAR1 in rat dentate gyrus

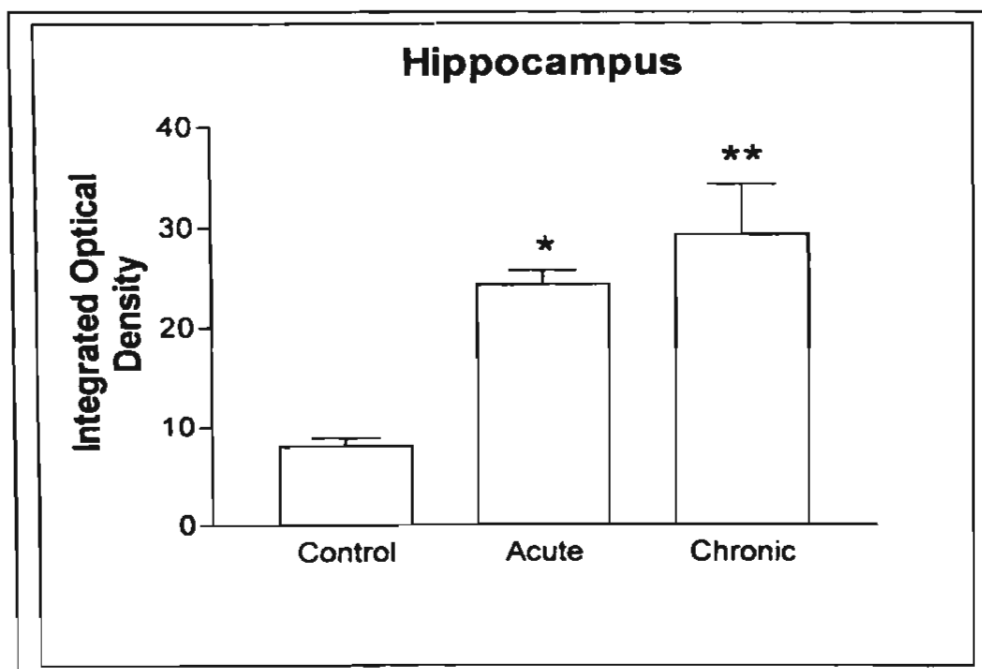


Figure 2 NMDAR1 immunodensity in granule layer of dentate gyrus in rat hippocampal formation after acute and chronic administrations.

Data are integrated optical density. Values are mean $\pm$ S.E.M.

** $p < 0.005$ * $p < 0.01$ vs control by Dunnett Post Hoc Tests

บ ก ค ฅ ฆ อ ก ฌ ฎ ฏ ฐ ฑ ฒ

นิทรรศการรู้ใหม่ พ. ๒๕๔๘

วันที่ 14-16 มกราคม 2548

ณ โรงแรมฟลิคซ์ รีสอร์ทแคว

จังหวัดกาญจนบุรี



Increased density of glutamate/N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampus following acute and chronic pseudoephedrine administrations

Sutisa Nudmamud-Thanoi^{a,b*}, Samur Thanoi^{a,b}, Prasert Sobhon^c

^a Department of Anatomy, ^b Center for Central Facility and Research Development, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000

^c Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400

Abstract—Background: Pseudoephedrine is a sympathomimetic drug in which its structure is similar to amphetamine. Although pseudoephedrine is not as potent as amphetamine, it has been reported that the actions of pseudoephedrine on the central nervous system via dopamine release resemble to amphetamine. Changes of dopamine function can induce malfunction of glutamatergic system because there are well-documented interactions between glutamate/N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and dopaminergic system. Therefore, this study is aimed to investigate the effects of acute and chronic pseudoephedrine administrations on NMDA receptors in hippocampus which is the area involved in learning and memory.

Methods: We employed immunohistochemistry to determine the alteration of NMDA receptors density in rat hippocampus following acute and chronic pseudoephedrine administrations.

Results: The density of NMDA receptors in hippocampus of animals treated with pseudoephedrine chronically was significantly highest ($p < 0.005$) when compared with the acute and control groups. Similarly, the density of NMDA receptors in an acute group was also higher than the control group ($p < 0.01$).

Conclusion: These results indicate that pseudoephedrine could induce an increase of NMDA receptors in hippocampus. This might be a compensatory effect of NMDA receptor in response to the degeneration or loss of glutamatergic neurons.

Keywords—Pseudoephedrine, Glutamate/N-methyl-D-aspartate receptor, Amphetamine, Hippocampus

Output

1. Nudmamud-Thanoi S, Thanoi S, Sobhon P, Increased density of glutamate/N-methyl-D-aspartate receptor in rat hippocampus following acute and chronic pseudoephedrine administrations. (in preparation).

* Corresponding author. Tel: 055 2611000 ext 4516; fax: 055 261197; e-mail: sutisat@nu.ac.th

การประชุมวิชาการ กายวิภาคศาสตร์ (ประเทศไทย) ครั้งที่ 28

ระหว่างวันที่ 27-29 เมษายน 2548

ณ โรงแรมเนวาทา แกรนด์ จังหวัดอุบลราชธานี



**28th Annual Meeting of
the Society of Anatomy
of Thailand
April 27-29, 2005**

NORTH-EASTERN NEUROSCIENCE ASSOCIATION
สมาคมประสาทวิทยาเหนือ-ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ



ผลของการได้รับ pseudoephedrine ต่อการแสดงออกของ glutamate/N-methyl-D-aspartate receptor ในบริเวณ hippocampus ของสมองหนู

สุทิสดา กาญจน์^{1,2} ; เสมอ กาญจน์^{1,2}, ประเสริฐ โสภณ³

¹ภาควิชากายวิภาคศาสตร์,

²ศูนย์ปฏิบัติการกลางและ

ส่งเสริมงานวิจัย, คณะ

วิทยาศาสตร์การแพทย์,

มหาวิทยาลัยนเรศวร

³ภาควิชากายวิภาคศาสตร์,

คณะวิทยาศาสตร์,

มหาวิทยาลัยมหิดล

วัตถุประสงค์ : ศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine แบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรังต่อการแสดงออกของ glutamate/N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptors ในสมองหนูส่วน hippocampus ซึ่งเป็นบริเวณที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้ และความจำ

วิธีการศึกษา : หนูขาวเพศผู้ (250-280 กรัม) แบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว คือกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน กลุ่มที่ได้รับอย่างเรื้อรัง และกลุ่มควบคุม กลุ่มเฉียบพลันได้รับ pseudoephedrine ขนาด 120 มิลลิกรัม/กิโลกรัม 1 ครั้งโดยป้อนเข้าสู่หลอดอาหาร กลุ่มเรื้อรังได้รับ pseudoephedrine ขนาด 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 15 วัน และกลุ่มควบคุมได้รับน้ำ ภายหลังการได้รับ pseudoephedrine แล้ว สัตว์ทดลองถูกทำให้ตายอย่างสงบ การแสดงออกของ NMDA receptors subunit 1 (NMDAR1) ถูกศึกษาโดยวิธี immunohistochemistry ในสมองหนูส่วน hippocampus ภายหลังการได้รับยา pseudoephedrine แบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรัง

ผลการศึกษา : เทคนิค Immunohistochemistry แสดงให้เห็นว่ามี NMDAR1 immunoreactive cells ในสมองส่วน hippocampus โดยเฉพาะ pyramidal cells ของ cornu ammonis fields และ granule cells ของ dentate gyrus ความหนาแน่นของ NMDAR1 เปรียบเทียบใน 3 กลุ่มทดลองถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติแบบ analysis of variance พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ NMDA receptors ในกลุ่มเฉียบพลัน ($p<0.01$) และกลุ่มเรื้อรัง ($p<0.005$) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่าการได้รับ pseudoephedrine ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ NMDA receptors ในสมองส่วน hippocampus ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการปรับตัวเพิ่มขึ้นของตัวรับที่ตอบสนองต่อการเสื่อม หรือสูญเสียของเซลล์ประสาทกลูตาเมต

Keywords : glutamate/NMDA receptors, pseudoephedrine, hippocampus, immunohistochemistry

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ให้กับ สุทิสดา กาญจน์

EFFECTS OF PSEUDOEPHEDRINE ADMINISTRATION ON GLUTAMATE/N-METHYL-D-ASPARTATE RECEPTOR IMMUNOREACTIVITY IN RAT HIPPOCAMPUS

Sutisa Nudmamud-Thanoi^{1,2}, Samur Thanoi^{1,2}, Prasert Sobhion³

¹ Department of Anatomy,

² Center for Central

Facility and Research

Development, Faculty of

Medical Science,

Naresuan University

³ Department of Anatomy,

Faculty of Science,

Mahidol University

Objectives : This study is aimed to investigate the effects of acute and chronic pseudoephedrine administration on glutamate/N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in hippocampus which is the area involved in learning and memory.

Materials and Methods : Sprague Dawley male rats (250-280 g) were divided into 3 groups as acute, chronic, and control groups with 10 animals each. To examine an acute effect of pseudoephedrine, animals were administered intragastrically at the dose of 120 mg/kg. The chronic effect was examined by treated pseudoephedrine intragastrically at the dose of 80 mg/kg, once daily for 15 days. The animals in control group were administered intragastrically with vehicle. We employed immunohistochemistry to determine the alteration of glutamate/N-methyl-D-aspartate receptors subunit 1 (NMDAR1) immunoreactivity in rat hippocampus following acute and chronic pseudoephedrine administration.

Results : Immunohistochemistry demonstrated NMDAR1 immunoreactive cells in all principal neuronal populations of the hippocampus. Immunoreactivity was accordingly limited to neurons, was strong in pyramidal cells of cornu ammonis fields 1-3 (CA1-3), and was especially strong in granule cells of dentate gyrus. NMDAR1 immunodensity in three experimental groups were compared by analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post hoc tests. NMDAR1 immunodensity was significantly increased above control in dentate gyrus in acute ($p < 0.01$) and chronic ($p < 0.005$) groups. These results indicate that pseudoephedrine could induce an increase of NMDA receptors in hippocampus. This might be a compensatory effect of NMDA receptor in response to the degeneration or loss of glutamatergic neurons.

Keywords : glutamate/NMDA receptors, schizophrenia, superior temporal cortex

This research project was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission of Higher Education (CHE) to S Nudmamud-Thanoi

การได้รับ pseudoephedrine ในปริมาณสูงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ในท่อนำอสุจิของหนูขาวเพศผู้

สุกิสรา กาบ้อย^{1,2} ; เสวอ กาบ้อย^{1,2}, ประเสริฐ ไสยกุล³

¹ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์,

² ศูนย์ปฏิบัติการกลางและส่งเสริมงานวิจัย, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์, มหาวิทยาลัยนเรศวร

³ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาผลกระทบของการได้รับยา pseudoephedrine ต่อระบบสืบพันธุ์โดยทำการศึกษการตายของเซลล์ในท่อนำอสุจิ ซึ่งจะทำให้เกิดความเข้าใจในกลไกการทำงานและการใช้ยาอย่างถูกวิธี

วิธีการศึกษา : หนูขาวเพศผู้ (250-280 กรัม) แบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว คือกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเจือปนพลัน กลุ่มที่ได้รับอย่างเรื้อรัง และกลุ่มควบคุม กลุ่มเจือปนพลันได้รับ pseudoephedrine ขนาด 120 มิลลิกรัม/กิโลกรัม 1 ครั้งโดยป้อนเข้าสู่หลอดอาหาร กลุ่มเรื้อรังได้รับ pseudoephedrine ขนาด 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 15 วัน และกลุ่มควบคุมได้รับน้ำ ภายหลังการได้รับ pseudoephedrine แล้ว สัตว์ทดลองถูกทำให้ตายอย่างสงบ ท่อนำอสุจิถูกนำมาศึกษาการตายของเซลล์โดยวิธี TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay

ผลการศึกษา : จากการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเจือปนพลันด้วยปริมาณสูง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการตายของเซลล์ในท่อนำอสุจิ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ pseudo-ephedrine อย่างเรื้อรังในขนาดความเข้มข้นที่ต่ำกว่าพบการตายของเซลล์ในท่อนำอสุจิในจำนวนน้อยกว่า การศึกษาเชิงคุณภาพพบว่า กลไกการเกิดการตายของเซลล์เกี่ยวข้องในทุกระยะของการพัฒนาของเซลล์อสุจิภายในท่อนำอสุจิ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการได้รับยา pseudo-ephedrine ในปริมาณสูงนั้นสามารถทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ในท่อนำอสุจิ ซึ่งการตายของเซลล์นั้น อาจเป็นผลมาจากการหดตัวของหลอดเลือดที่เพิ่มขึ้นอย่างเจือปนพลันด้วยฤทธิ์ของยาภายหลังการได้รับ

คำสำคัญ : pseudoephedrine การตายของเซลล์ spermatogenesis

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ให้กับ สุกิสรา กาบ้อย

HIGH DOSE PSEUDOEPHEDRINE ADMINISTRATION CAN INDUCE APOPTOSIS IN SEMINIFEROUS TUBULES ON MALE RATS

Sutisa Nudmamud-Thanoi^{1,2}, Samur Thanoi^{1,2}, Prasert Sobhon³

¹ Department of Anatomy,

² Center for Central

Facility and Research

Development, Faculty of

Medical Science,

Naresuan University

³ Department of Anatomy,

Faculty of Science,

Mahidol University

Objectives : The present study is aimed to investigate the effects of pseudoephedrine, a sympathomimetic drug, on the reproductive system for understanding the mechanisms and increasing the knowledge of using the drug.

Materials and Methods : Sprague Dawley male rats (250-280 g) were divided into 3 groups as acute, chronic, and control groups with 10 animals each. To examine an acute effect of pseudoephedrine, animals were administered intragastrically at the dose of 120 mg/kg. The chronic effect was examined by treated pseudoephedrine intragastrically at the dose of 80 mg/kg, once daily for 15 days. The animals in control group were administered intragastrically with vehicle. After treatment, animals were sacrificed and apoptotic activities within the seminiferous tubules were studied using the TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay.

Results : The present study showed that acute administration of high dose pseudoephedrine can induce apoptotic activities within seminiferous tubules. In contrast, animals treated with lower dose of pseudoephedrine chronically showed a small amount of apoptotic cells inside the seminiferous tubules. Qualitatively, the apoptotic activities were involved in every stage of sperm development inside the seminiferous tubules especially the spermatogonia. These results indicate that acute administration of high dose pseudoephedrine could induce apoptosis within the seminiferous tubules of male rats. Apoptosis that caused by pseudoephedrine may be due to a sudden increased adrenergic vasoconstriction after a single high dose administration.

Keywords : pseudoephedrine, apoptosis, spermatogenesis

This research project was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission of Higher Education (CHE) to S Nudmamud-Thanoi.

บทคัดย่อ

การประชุมทางวิชาการ

 “นเรศวรวิจัย”

ครั้งที่ 1



กระบวนการค้นคว้าใหม่ในการบริหารงานวิจัยในมหาวิทยาลัยนเรศวร

วันที่ 28-29 กรกฎาคม 2548

ณ ชั้น 3 สถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

การได้รับ pseudoephedrine ในปริมาณสูงอย่างเฉียบพลันสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ภายในท่อสร้างอสุจิของหนูขาว
Acute high dose administration of pseudoephedrine induced apoptotic activity in the seminiferous tubules of male rats

สมศก ถาน้อย^{1,2}, สุติสา ถาน้อย^{1,2}, ประเสริฐ โสมน¹
Samur Thanoi^{1,2}, Sutisa Nudmamud-Thanoi^{1,2}, Prasert Sobhon¹

บทคัดย่อ

Pseudoephedrine เป็นยาในกลุ่มเดียวกับ ephedrine โดยออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทซิมพาเทติก (Will, 1997) Pseudoephedrine นั้นเป็นยาที่มีฤทธิ์ decongestant และใช้สำหรับลดความอ้วน โดยออกฤทธิ์คล้ายกับ amphetamine (Blosser et al, 1987) ดังนั้นการได้รับ pseudoephedrine ในปริมาณมากอาจสามารถทำให้เกิดอาการผิดปกติได้คล้ายกับการได้รับ amphetamine จากการศึกษที่ผ่านมาพบว่าการได้รับ methamphetamine นั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ในท่อสร้างอสุจิของหนู (Yamamoto et al., 2002) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ ผลกระทบของการได้รับยา pseudoephedrine ต่อระบบสืบพันธุ์โดยทำการศึกษาการตายของเซลล์ในท่อสร้างอสุจิ ซึ่งจะ ทำให้เกิดความเข้าใจในกลไกการทำงาน และการใช้ยาอย่างถูกวิธี หนูขาวเพศผู้ (250-280 กรัม) แบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว คือกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน กลุ่มที่ได้รับอย่างเรื้อรัง และกลุ่มควบคุม กลุ่มเฉียบพลันได้รับ pseudoephedrine ขนาด 120 มิลลิกรัม/กิโลกรัม 1 ครั้งโดยป้อนเข้าสู่หลอดอาหาร กลุ่มเรื้อรังได้รับ pseudoephedrine ขนาด 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 15 วัน และกลุ่มควบคุมได้รับน้ำ ภายหลังการได้รับ pseudoephedrine แล้ว สัตว์ทดลองถูกทำให้ตายอย่างสงบ ท่อสร้างอสุจิถูกนำมาศึกษาการตายของเซลล์โดยวิธี TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay จากการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเฉียบพลันด้วยปริมาณสูง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดขบวนการตายของเซลล์ในท่อสร้างอสุจิ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเรื้อรังในขนาดความเข้มข้นที่ต่ำกว่าพบการตายของเซลล์ในท่อสร้างอสุจิในจำนวนน้อยกว่า การศึกษาเชิงคุณภาพพบว่า กลไกการเกิดการตายของเซลล์เกี่ยวข้องในทุกระยะของการพัฒนาของเซลล์อสุจิภายในท่อสร้างอสุจิ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการได้รับยา pseudoephedrine ในปริมาณสูงนั้นสามารถทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ในท่อนำอสุจิ ซึ่งการตายของเซลล์นั้น อาจเป็นผลมาจากการหดตัวของหลอดเลือดที่เพิ่มขึ้นอย่างเฉียบพลัน ด้วยฤทธิ์ของยาภายหลังการได้รับ

Abstract

Pseudoephedrine is a diastereoisomer of ephedrine and both are classified as sympathomimetic drugs (Will, 1997). Pseudoephedrine is commonly found in over-the-counter decongestants, anorectic agents and as an amphetamine substitute (Blosser et al., 1987). It has been reported that methamphetamine has the effects in reproductive organs. Yamamoto et al. (2002) reported that methamphetamine induces apoptosis in seminiferous tubules in male mice testis. Therefore, The present study is aimed to investigate the effects of pseudoephedrine, a sympathomimetic drug, on the reproductive system for understanding the mechanisms and increasing the knowledge of using the drug.

Sprague Dawley male rats (250-280 g) were divided into 3 groups as acute, chronic, and control groups by the administration of the pseudoephedrine. After treatment, animals were sacrificed and apoptotic activities within the seminiferous tubules were studied using the TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay.

The present study showed that acute administration of high dose pseudoephedrine can induce apoptotic activities within seminiferous tubules. In contrast, animals treated with lower dose of

pseudoephedrine chronically showed a small amount of apoptotic cells inside the seminiferous tubules. Qualitatively, the apoptotic activities were involved in every stage of sperm development inside the seminiferous tubules especially the spermatogonia. These results indicate that acute administration of high dose pseudoephedrine could induce apoptosis within the seminiferous tubules of male rats. Apoptosis that caused by pseudoephedrine may be due to a sudden increased adrenergic vasoconstriction after a single high dose administration.

Keywords: pseudoephedrine, apoptosis, spermatogenesis

¹ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, ² ศูนย์ปฏิบัติการกลางและส่งเสริมงานวิจัย, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร 65000

³ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ 10300

⁴ Department of Anatomy, ² Center for Central Facility and Research Development, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000

³ Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400

การได้รับ pseudoephedrine เพิ่มปริมาณของ glutamate/N-methyl-D-aspartate receptor ในบริเวณ hippocampus ของสมองหนู
Pseudoephedrine administration can increase glutamate/N-methyl-D-aspartate receptor immunoreactivity in rat hippocampus

สุทิสานันท์¹, เสมอ นันท์¹, ประเสริฐ โสภณ¹
Sutisa Nudmanud-Thanon^{1,2}, Samur Thanon^{1,2}, Prasert Sobhon¹

บทคัดย่อ

Pseudoephedrine เป็นยาในกลุ่มเดียวกับ ephedrine โดยออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทซิมพาเทติก (Will, 1997) Pseudoephedrine นั้นเป็นยาที่มีฤทธิ์ decongestant และใช้สำหรับลดความห้วน โดยออกฤทธิ์คล้ายกับ amphetamine (Blosser et. al, 1987) ถึงแม้ว่าการออกฤทธิ์ของ pseudoephedrine นั้นไม่รุนแรงเท่า amphetamine และ methamphetamine จากการศึกษพบว่า pseudoephedrine นั้นออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางผ่านทางระบบโดพามีนเหมือนกับ amphetamine ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine แบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรังต่อการแสดงออกของ glutamate/N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors ในสมองส่วน hippocampus ซึ่งเป็นบริเวณที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้ และความจำ หนูขาวเพศผู้ (250-280 กรัม) แบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว คือกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน กลุ่มที่ได้รับอย่างเรื้อรัง และกลุ่มควบคุม เทคนิค Immunohistochemistry แสดงให้เห็นว่ามี NMDAR1 immunoreactive cells ในสมองส่วน hippocampus โดยเฉพาะ pyramidal cells ของ cornu ammonis fields และ granule cells ของ dentate gyrus ความหนาแน่นของ NMDAR1 เปรียบเทียบใน 3 กลุ่มทดลอง ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติแบบ analysis of variance พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ NMDA receptors ในกลุ่มเฉียบพลัน ($p < 0.01$) และกลุ่มเรื้อรัง ($p < 0.005$) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษพบว่า การได้รับ pseudoephedrine ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ NMDA receptors ในสมองส่วน hippocampus ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการปรับตัวเพิ่มขึ้นของตัวรับที่ตอบสนองต่อการเสื่อม หรือสูญเสียของเซลล์ประสาทกลูตาเมต

Abstract

Pseudoephedrine is a diastereoisomer of ephedrine and both are classified as sympathomimetic drugs (Will, 1997). Pseudoephedrine is commonly found in over-the-counter decongestants, anorectic agents and as an amphetamine substitute (Blosser et al., 1987). Although pseudoephedrine is not as potent as amphetamine, it has been reported that its actions on the central nervous system via dopamine release resemble to amphetamine (Kumamsit et al., 1999). Therefore, this study aimed to investigate the effects of acute and chronic pseudoephedrine administration on the alteration of glutamate/NMDA receptor density in rat hippocampus. Sprague Dawley male rats (250-280 g) were divided into 3 groups as acute, chronic, and control groups by the administration of pseudoephedrine. Immunohistochemistry demonstrated NMDAR1 immunoreactive cells in all principal neuronal populations of the hippocampus. Immunoreactivity was accordingly limited to neurons, was strong in pyramidal cells of cornu ammonis fields 1-3 (CA1-3), and was especially strong in granule cells of dentate gyrus. NMDAR1 immunodensity in three experimental groups were compared by analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post hoc tests. NMDAR1 immunodensity was significantly increased above control in dentate gyrus in acute ($p < 0.01$) and chronic ($p < 0.005$) groups. These results indicate that pseudoephedrine could induce an

increase of NMDA receptors in hippocampus. This might be a compensatory effect of NMDA receptor in response to the degeneration or loss of glutamatergic neurons.

Keywords: glutamate/NMDA receptors, schizophrenia, superior temporal cortex

ศาสตราจารย์ ดร. ภาณุพงศ์ ภาณุพงศ์, ศูนย์ปฏิบัติการทดลองและส่งเสริมงานวิจัย, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก 65000

¹ Department of Anatomy, ² Center for Central Facility and Research Development, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000

³ Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400

การได้รับ pseudoephedrine เพิ่มปริมาณของ glutamate/N-methyl-D-aspartate receptor ใน
บริเวณ hippocampus ของสมองหนู

Pseudoephedrine administration can increase glutamate/N-methyl-D-aspartate receptor
immunoreactivity in rat hippocampus

โดย

สุทิสดา ถานน้อย^{1,2}, เสมอ ถานน้อย^{1,2}, ประเสริฐ โสภณ³

Sutisa Nudmamud-Thanoi^{1,2}, Samur Thanoi^{1,2}, Prasert Sobhon³

บทคัดย่อ

Pseudoephedrine เป็นยาในกลุ่มเดียวกับ ephedrine โดยออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทซิมพาเทติก (Will, 1997) Pseudoephedrine นั้นเป็นยาที่มีฤทธิ์ decongestant และใช้สำหรับลดความอ้วน โดยออกฤทธิ์คล้ายกับ amphetamine (Blosser et. al, 1987) ถึงแม้ว่าการออกฤทธิ์ของ pseudoephedrine นั้นไม่รุนแรงเท่า amphetamine และ methamphetamine จากการศึกษาพบว่า pseudoephedrine นั้นออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางผ่านทางระบบโดพามีนเหมือนกับ amphetamine ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของการได้รับ pseudoephedrine แบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรังต่อการแสดงออกของ glutamate/N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors ในสมองหนูส่วน hippocampus ซึ่งเป็นบริเวณที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ

หนูขาวเพศผู้ (250-280 กรัม) แบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว คือกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน กลุ่มที่ได้รับอย่างเรื้อรัง และกลุ่มควบคุม เทคนิค Immunohistochemistry แสดงให้เห็นว่ามี NMDAR1 immunoreactive cells ในสมองส่วน hippocampus โดยเฉพาะ pyramidal cells ของ cornu ammonis fields และ granule cells ของ dentate gyrus ความหนาแน่นของ NMDAR1 เปรียบเทียบใน 3 กลุ่มทดลอง ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติแบบ analysis of variance พบว่าการเพิ่มขึ้นของ NMDA receptors ในกลุ่มเฉียบพลัน ($p < 0.01$) และกลุ่มเรื้อรัง ($p < 0.005$) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่าการได้รับ pseudoephedrine ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ NMDA receptors ในสมองส่วน hippocampus ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการปรับตัวเพิ่มขึ้นของตัวรับที่ตอบสนองต่อการเสื่อม หรือสูญเสียของเซลล์ประสาทกลูตาเมต

Abstract

Pseudoephedrine is a diastereoisomer of ephedrine and both are classified as sympathomimetic drugs (Will, 1997). Pseudoephedrine is commonly found in over-the-counter decongestants, anorectic agents and as an amphetamine substitute (Blosser et al., 1987). Although

pseudoephedrine is not as potent as amphetamine, it has been reported that its actions on the central nervous system via dopamine release resemble to amphetamine (Kumarnsit et al., 1999).

Therefore, this study aimed to investigate the effects of acute and chronic pseudoephedrine administration on the alteration of glutamate/NMDA receptor density in rat hippocampus.

Sprague Dawley male rats (250-280 g) were divided into 3 groups as acute, chronic, and control groups by the administration of pseudoephedrine. Immunohistochemistry demonstrated NMDAR1 immunoreactive cells in all principal neuronal populations of the hippocampus. Immunoreactivity was accordingly limited to neurons, was strong in pyramidal cells of cornu ammonis fields 1-3 (CA1-3), and was especially strong in granule cells of dentate gyrus. NMDAR1 immunodensity in three experimental groups were compared by analysis of variance (ANOVA) with Dunnett post hoc tests. NMDAR1 immunodensity was significantly increased above control in dentate gyrus in acute ($p < 0.01$) and chronic ($p < 0.005$) groups. These results indicate that pseudoephedrine could induce an increase of NMDA receptors in hippocampus. This might be a compensatory effect of NMDA receptor in response to the degeneration or loss of glutamatergic neurons.

Keywords: glutamate/NMDA receptors, schizophrenia, superior temporal cortex

Introduction

Pseudoephedrine is a diastereoisomer of ephedrine and both are classified as sympathomimetic drugs (Will, 1997). Pseudoephedrine is commonly found in over-the-counter decongestants, anorectic agents and as an amphetamine substitute (Blosser et al., 1987). Although pseudoephedrine is not as potent as amphetamine, it has been reported that its actions on the central nervous system via dopamine release resemble to amphetamine (Kumarnsit et al., 1999). Changes of dopamine function can induce malfunction of glutamatergic system because there are well-documented interactions between glutamate/N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and dopaminergic system. Although glutamate abnormalities have not to date been elucidated after exposure to sympathomimetic agents, a study found that ephedrine plays a critical role of glutamate release in subcortical region indicated dysfunction of CNS glutamatergic pathways (Bowyer et al., 2000). It is very interesting to study mechanisms of glutamatergic system after pseudoephedrine, an over-the-counter product, exposure as the glutamate/NMDA receptors seem

to be critically involved in synaptic formation and plasticity of the CNS (Udin and Scherer, 1990) as well as in aspects of long-term potentiation (Davies et al., 1989).

Therefore, this study aimed to investigate the effects of acute and chronic pseudoephedrine administration on the alteration of glutamate/NMDA receptor density in rat hippocampus.

Materials and Methods

Sprague Dawley male rats (250-280 g) were divided into 3 groups as acute, chronic, and control groups with 10 animals each. To examine an acute effect of pseudoephedrine, animals were administered intragastrically at the dose of 120 mg/kg. The chronic effect was examined by treated pseudoephedrine intragastrically at the dose of 80 mg/kg, once daily for 15 days. The animals in control group were administered intragastrically with vehicle. We employed immunohistochemistry to determine the alteration of glutamate/N-methyl-D-aspartate receptors subunit1 (NMDAR1) immunoreactivity in rat hippocampus following acute and chronic pseudoephedrine administration. . The immunoreactivity was detected by NMDA receptor subunit1 (NMDAR1) polyclonal antibody and staining density quantified by the Scion Image Software based on NIH image. Statistical analysis was performed using analysis of variance and post-hoc Dunnett's t-test.

Results

Immunohistochemistry demonstrated NMDAR1 immunoreactive cells in all principal neuronal populations of the hippocampus, namely pyramidal neurons in cornu ammonis fields 1-3 (CA1-3), granule cells in the dense cell layer of the dentate gyrus (DG). Immunoreactivity was accordingly limited to neurons, especially strong in pyramidal cells of CA1-3 as well as in granule cells of DG. Neurons in other hippocampal subareas (e.g. molecular layer) and surrounding areas (white matter) were less immunoreactive. Therefore, the data was analysed by selected the areas of interest in pyramidal cell layer in CA1-3 and granule cell layer in dentate gyrus. Within each region, NMDAR1 immunodensity in the three experimental groups were compared by ANOVA. NMDAR1 immunodensity was significantly increased above control in dentate gyrus in acute ($p<0.01$) and chronic ($p<0.005$) pseudoephedrine administration.



Figure 1. NMDAR1 immunoreactivity in rat hippocampus

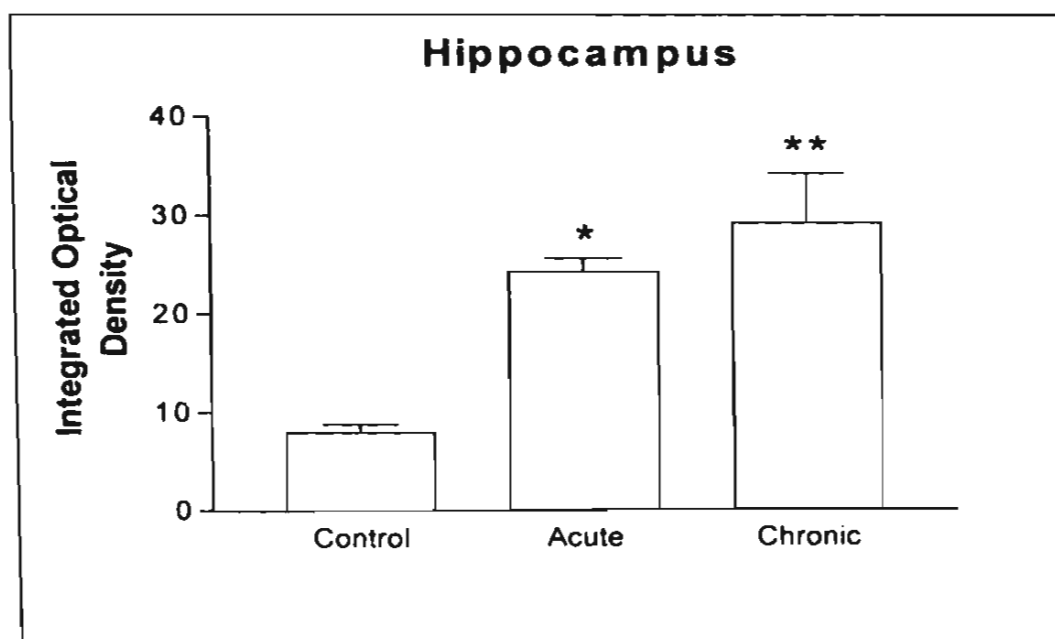


Figure 2. NMDAR1 immunodensity in granule layer of dentate gyrus in rat hippocampus after acute and chronic administration.

Data are integrated optical density. Values are mean ± S.E.M.

** $p < 0.005$ * $p < 0.01$ vs control by Dunnett Post Hoc Tests

Discussions

The main finding of the present study is an increase of NMDAR1 immunoreactivity in rat hippocampus following acute and chronic pseudoephedrine administration. The result showed an up-regulation of NMDAR1 density in granule layer of dentate gyrus. As pseudoephedrine has

been considered to be a psychostimulant and has the potential to be abused (Glennon and Young, 2000), our findings provide a support of psychostimulant effect on glutamatergic system. Abnormalities of glutamatergic system may derive from the change of dopamine function as the action of pseudoephedrine has been suggested to mediate via dopaminergic mechanism. The present results are in agreement with the previous reports which found increase in cortical NMDA receptor binding after treatment with psychostimulant agents either methamphetamine (Eisch et al., 1996) or cocaine (Itzhak, 1994), suggesting the mechanisms of NMDA receptor implicated in the development of sensitization of the drugs. Supporting a hypothesis of glutamatergic dysfunction in subcortical regions following the administration of psychostimulants including pseudoephedrine, an increase of metabotropic glutamate receptor (mGluR5) immunoreactivity and mRNA levels have been reported in the cortical and hippocampal neurons after amphetamine treatment (Yu et al., 2001). A possible interpretation of the present observation is that the NMDA receptor elevation may be a response to a neurodegenerative process involving either glutamatergic neuronal loss or a reduction of glutamate release.

Acknowledgements

This research was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission of Higher Education (CHE). The authors also gratefully acknowledge the Faculty of Medical Science, Naresuan University for facility support and the Health Sciences Research Institute for pseudoephedrine drug.

References

- Blosser, J.C., Barrantes, M. and Parker, R.B.(1987) Correlation between anorectic potency and affinity for hypothalamic (+)-amphetamine binding sites of phenylethylamines. *Eur. J. Pharmacol.* 134,97-103.
- Bowyer, J.F., Newport, G.D., Slikker, W. Jr., Gough, B., Ferguson, S.A. and Tor-Agbidye, J. (2000) An evaluation of l-ephedrine neurotoxicity with respect to hyperthermia and caudate/putamen microdialysate levels of ephedrine, dopamine, serotonin, and glutamate. *Toxicol. Sci.* 55, 133-142.
- Davies, S.N., Lester, R.A., Reymann, K.G. and Collingridge, G.L. (1989) Temporally distinct

pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation. *Nature* 338, 500-503.

Glennon, R.A. and Young, R. (2000) (+)Amphetamine-stimulus generalization to an herbal ephedrine product. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65, 655-658.

Itzhak, Y. (1994) Modulation of the PCP/NMDA receptor complex and sigma binding sites by psychostimulants. *Neurotoxicol. Teratol.* 16, 363-368.

Kumarnsit, E., Harnyuttanakorn, P., Meksuriyen, D., Govitrapong, P., Baldwin, B.A., Kotchabhakdi, N. and Casalotti, S.O. (1999) Pseudoephedrine, a sympathomimetic agent, induces Fos-like immunoreactivity in rat nucleus accumbens and striatum. *Neuropharmacology* 38,1381-1387.

Udin, S.B., Scherer, W.J. (1990) Restoration of the plasticity of binocular maps by NMDA after the critical period in *Xenopus*. *Science* 249, 669-672.

Will, S. (1997) *Drugs of abuse*, Pharmaceutical Press, London, pp.131-34

Yu, M.F., Lin, T.Y., Ho, W.H., and Yin, H.S. (2001) Amphetamine induces differential changes in the gene expression of metabotropic glutamate receptor 5 in cultured cortical and hippocampal neurons. *J. Mol. Neurosci.* 17, 13-24.

¹ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, ² ศูนย์ปฏิบัติการกลางและส่งเสริมงานวิจัย, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก 65000

³ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ 10400

¹ *Department of Anatomy,* ² *Center for Central Facility and Research Development, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000*

³ *Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400*

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ให้กับ ดร. สุทิสา ถาน้อย

Pseudoephedrine can increase glutamate/N-methyl-D-aspartate receptor immunoreactivity in rat hippocampal formation

Sutisa Nudmamud-Thanoi

Department of Anatomy, and Center for Central Facility and Research Development, Faculty of Medical Science, Naresuan University

PSEUDOEPHEDRINE

- a sympathomimetic agent
- commonly found in over-the-counter decongestants, anorectic agents and as an amphetamine substitute (Blosser et al., 1987)
- produce psychoactive effects (e.g. pleasant perceptual changes, euphoria and mental stimulation (Will, 1997).

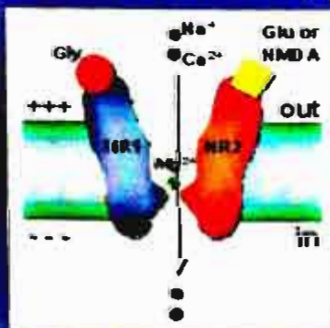
Previous reports

- Pseudoephedrine was shown both partial and full substitution for amphetamine (Tongjaroenbuangam et al., 1998)
- The action of pseudoephedrine was found to mediate via dopaminergic mechanism (Zarrindast, 1981; Kumarnsit et al., 1999)
- Changes of dopamine function can induce malfunction of glutamatergic system (e.g. Verma and Moghaddam, 1996)

Glutamate/NMDA receptors

- NMDA receptors are composed of four or five subunits (NMDAR1 and NMDAR2A-2D)
- NMDA receptors are important in aspects of long-term potentiation, which may in turn underlie some forms of learning.
- NR1 is an obligate subunit and present in many neurones throughout a large number of regions in the CNS (Nakanishi, 1992)

Glutamate/NMDA receptors



www.neuroscience.com/science

OBJECTIVES

- To determine the effects of acute and chronic pseudoephedrine administration on the alteration of glutamate/NMDA receptor density in rat hippocampal formation

METHODS

Animals: Male Sprague-Dawley rats (250-300g)

(3 groups: control, acute, chronic)

Pseudoephedrine

acute 140 mg/kg

chronic 80 mg/kg 15 days

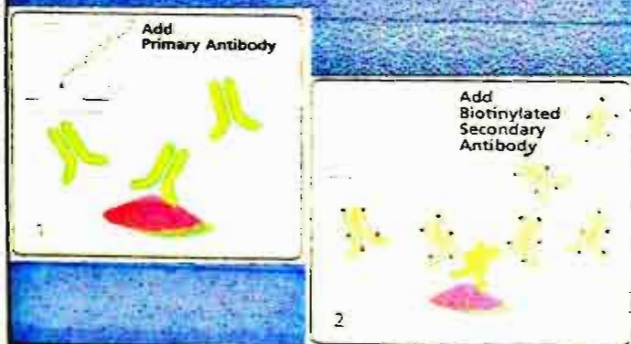
(Linggo et al., 1998; Green et al., 2003)



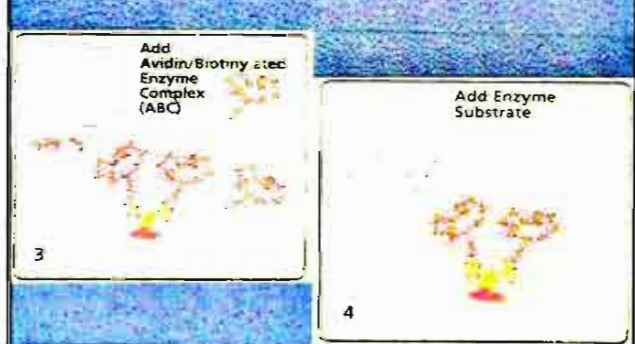
HIPPOCAMPAL FORMATION



Immunohistochemical technique using polyclonal antibody against NMDAR1



Immunohistochemical technique using polyclonal antibody against NMDAR1

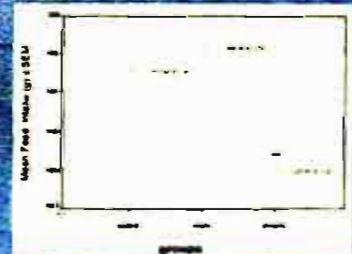


Data analysis

- NMDAR1 immunoreactivity was quantified by optical density (OD) in rat hippocampus and dentate gyrus
- OD was analysed with Scion Image Software based on NIH image to obtain the integrated optical density (IOD)
- Statistical analysis was performed using ANOVA with Dunnett post hoc test

RESULTS

Total concentration of subject treated with pseudoephedrine chronically was significantly decreased when compared with control and acute groups. This is also in the effect of pseudoephedrine on autonomic nervous system.



NMDAR1 immunoreactivity in hippocampus

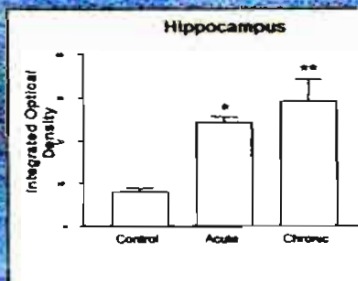


Qualitative Analysis

- Immunohistochemistry demonstrated NMDAR1 immunoreactive cells in pyramidal neurones in cornu ammonis fields (CA1-3), granule cells in the dentate gyrus.
- Neurons in hippocampal subareas (e.g. molecular layer) and surrounding areas (white matter) were less immunoreactive.

Quantitative Analysis

NMDAR1 immunodensity was significantly increased above control in hippocampus and dentate gyrus in acute ($p < 0.01$) and chronic ($p < 0.001$) pseudoephedrine administration.



CONCLUSION

- The main finding is increased NMDAR1 immunodensity in rat hippocampus following acute and chronic pseudoephedrine administration.
- The result showed an up-regulation of NMDAR1 density in granule layer of the dentate gyrus.

CONCLUSION

- As pseudoephedrine has been considered to be a psychostimulant and has the potential to be abused (Tongjroenbuangarn et al., 1998; Anderson et al., 2001; Glennon and Young, 2000), our findings provide a support of psychostimulant effect on glutamatergic system.
- The present results are in agreement with the previous reports which found increase in cortical NMDA receptor binding after treatment with psychostimulant agents either methamphetamine (Elsch et al., 1996) or cocaine (Itzhak, 1994), suggesting the involvement of NMDA receptor implicated in the development of sensitization of the drugs.

CONCLUSION

- To summarise, the present observations provide evidence to support the abnormalities of glutamatergic system following the administration of psychostimulants including pseudoephedrine.
- A possible interpretation of the present observation is that the NMDA receptor elevation may be a response to a neurodegenerative process involving either glutamatergic neuronal loss or a reduction of glutamate release.

ACKNOWLEDGEMENTS

- This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission of Higher Education (CHE).
- Faculty of Medical Science, Naresuan University.
- Health Science Research Institute, Naresuan University.
- Prof. Dr Prasert Sribhuan, Faculty of Science, Mahidol University.
- Prof. Dr Gavin P Reynolds, Queen's University Belfast, UK.

**การได้รับ pseudoephedrine ในปริมาณสูงอย่างเฉียบพลันสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของ
เซลล์ภายในท่อสร้างอสุจิของหนูขาว**

**Acute high dose administration of pseudoephedrine induced apoptotic activity inside the
seminiferous tubules of male rats**

โดย

เสมอ ถาน้อย^{1,2}, สุติศา ถาน้อย^{1,2}, ประเสริฐ โสภณ¹

Samur Thanoi^{1,2}, Sutisa Nudmamud-Thanoi^{1,2}, Prasert Sobhon¹

บทคัดย่อ

Pseudoephedrine เป็นยาในกลุ่มเดียวกับ ephedrine โดยออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทซิมพาเทติก (Will, 1997) Pseudoephedrine นั้นเป็นยาที่มีฤทธิ์ decongestant และใช้สำหรับลดความอ้วน โดยออกฤทธิ์คล้ายกับ amphetamine (Blosser et. al, 1987) ดังนั้นการได้รับ pseudoephedrine ในปริมาณมากอาจสามารถทำให้เกิดอาการติดยาได้คล้ายกับการได้รับ amphetamine จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการได้รับ methamphetamine นั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ในท่อสร้างอสุจิของหนู (Yamamoto et al., 2002) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ และผลกระทบของการได้รับยา pseudoephedrine ต่อระบบสืบพันธุ์โดยทำการศึกษการตายของเซลล์ในท่อสร้างอสุจิ ซึ่งจะก่อให้เกิดความเข้าใจในกลไกการทำงาน และการใช้ยาอย่างถูกวิธี

หนูขาวเพศผู้ (250-280 กรัม) แบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว คือกลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเฉียบพลัน กลุ่มที่ได้รับอย่างเรื้อรัง และกลุ่มควบคุม กลุ่มเฉียบพลันได้รับ pseudoephedrine ขนาด 120 มิลลิกรัม/กิโลกรัม 1 ครั้งโดยป้อนเข้าสู่หลอดอาหาร กลุ่มเรื้อรังได้รับ pseudoephedrine ขนาด 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 15 วัน และกลุ่มควบคุมได้รับน้ำ ภายหลังการได้รับ pseudoephedrine แล้ว สัตว์ทดลองถูกทำให้ตายอย่างสงบ ท่อสร้างอสุจิถูกนำมาศึกษาการตายของเซลล์โดยวิธี TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay

จากการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเฉียบพลันด้วยปริมาณสูง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ในท่อสร้างอสุจิ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ pseudoephedrine อย่างเรื้อรัง ในขนาดความเข้มข้นที่ต่ำกว่าพบการตายของเซลล์ในท่อสร้างอสุจิในจำนวนน้อยกว่า การศึกษาเชิงคุณภาพพบว่า กลไกการเกิดการตายของเซลล์เกี่ยวข้องในทุกระยะของการพัฒนาของเซลล์อสุจิภายในท่อสร้างอสุจิ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นถึงการได้รับยา pseudoephedrine ในปริมาณสูงนั้นสามารถทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ในท่อนำอสุจิ ซึ่งการตายของเซลล์นั้น อาจเป็นผลมาจากการหดตัวของหลอดเลือดที่เพิ่มขึ้นอย่างเฉียบพลันด้วยฤทธิ์ของยาภายหลังการได้รับ

Keywords: pseudoephedrine, apoptosis, spermatogenesis

Abstract

Pseudoephedrine is a diastereoisomer of ephedrine and both are classified as sympathomimetic drugs (Will, 1997). Pseudoephedrine is commonly found in over-the-counter decongestants, anorectic agents and as an amphetamine substitute (Blosser et al., 1987). It has been reported that methamphetamine has the effects in reproductive organs. Yamamoto et al. (2002) reported that methamphetamine induces apoptosis in seminiferous tubules in male mice testis. Therefore, The present study is aimed to investigate the effects of pseudoephedrine, a sympathomimetic drug, on the reproductive system for understanding the mechanisms and increasing the knowledge of using the drug.

Sprague Dawley male rats (250-280 g) were divided into 3 groups as acute, chronic, and control groups by the administration of the pseudoephedrine. After treatment, animals were sacrificed and apoptotic activities within the seminiferous tubules were studied using the TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay.

The present study showed that acute administration of high dose pseudoephedrine can induce apoptotic activities within seminiferous tubules. In contrast, animals treated with lower dose of pseudoephedrine chronically showed a small amount of apoptotic cells inside the seminiferous tubules. Qualitatively, the apoptotic activities were involved in every stage of sperm development inside the seminiferous tubules especially the spermatogonia. These results indicate that acute administration of high dose pseudoephedrine could induce apoptosis within the seminiferous tubules of male rats. Apoptosis that caused by pseudoephedrine may be due to a sudden increased adrenergic vasoconstriction after a single high dose administration.

Keywords: pseudoephedrine, apoptosis, spermatogenesis

Introduction

Pseudoephedrine is a diastereoisomer of ephedrine and both are classified as sympathomimetic drugs (Will, 1997). Pseudoephedrine is commonly found in over-the-counter decongestants, anorectic agents and as an amphetamine substitute (Blosser et al., 1987). It has been reported that methamphetamine has the effects in reproductive organs. Yamamoto et al. (2002) reported that methamphetamine induces apoptosis in seminiferous tubules in male mice testis. Apoptotic cells were detected in the seminiferous tubules of male mice 24 hours after a single treatment with 5, 10, and 15 mg/kg methamphetamine. Moreover, it has been reported that gonadal steroid hormones play an important role in modulating methamphetamine neurotoxicity (Dluzen et al.,

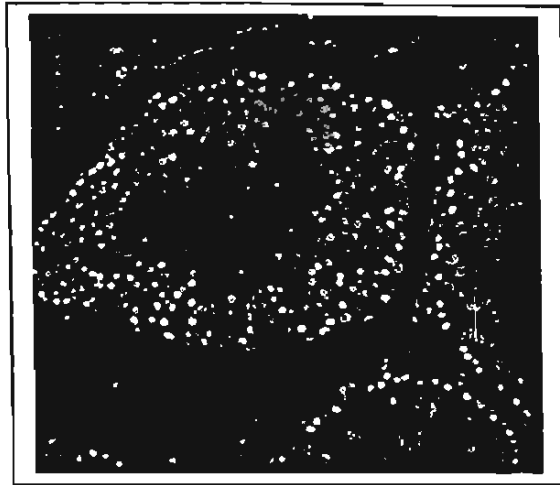
2002). Treatment of gonadectomized females with a physiological regimen of estrogen significantly diminished the amount of striatal dopamine (DA) depletion to methamphetamine (METH) compared with non-estrogen treated mice suggesting that estrogen serves as a neuroprotectant (Dluzen and McDermott 2002). In contrast, testosterone tends to increase METH-evoked dopamine responses (Dluzen and McDermott 2002). Therefore, there may be an interaction between changes of neural mechanism and reproductive system after taken drug abuse. Therefore, The present study is aimed to investigate the effects of pseudoephedrine, a sympathomimetic drug, on the reproductive system for understanding the mechanisms and increasing the knowledge of using the drug.

Materials and Methods

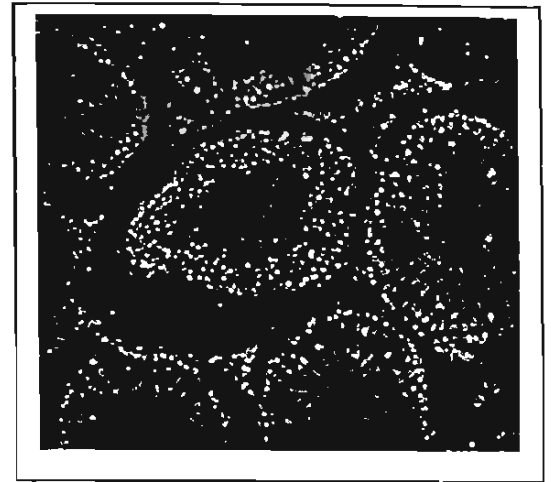
Sprague Dawley male rats (250-280 g) were divided into 3 groups as acute, chronic, and control groups with 10 animals each. To examine an acute effect of pseudoephedrine, animals were administered intragastrically at the dose of 120 mg/kg. The chronic effect was examined by treated pseudoephedrine intragastrically at the dose of 80 mg/kg, once daily for 15 days. The animals in control group were administered intragastrically with vehicle. After treatment, animals were sacrificed and apoptotic activities within the seminiferous tubules were studied using the TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay.

Results

The present study showed that acute administration of high dose pseudoephedrine can induce apoptotic activities within seminiferous tubules (Fig 1a, b). In contrast, animals treated with lower dose of pseudoephedrine chronically showed a small amount of apoptotic cells inside the seminiferous tubules (Fig 2). Qualitatively, the appearance of TUNEL-positive-cells in seminiferous tubules in animals treated with high dose pseudoephedrine were detected in almost every stage of sperm development especially in the spermatogonia lining along the basement membrane of the tubules (Fig. 1a)



(a)



(b)

Figure 1. Apoptotic cells in seminiferous tubule of rats treated with high dose pseudoephedrine. TUNEL-positive staining indicative of DNA fragmentation was detected as yellow-green fluorescent on the nuclei (a,b) and normal cells were detected as red fluorescent signals (b)

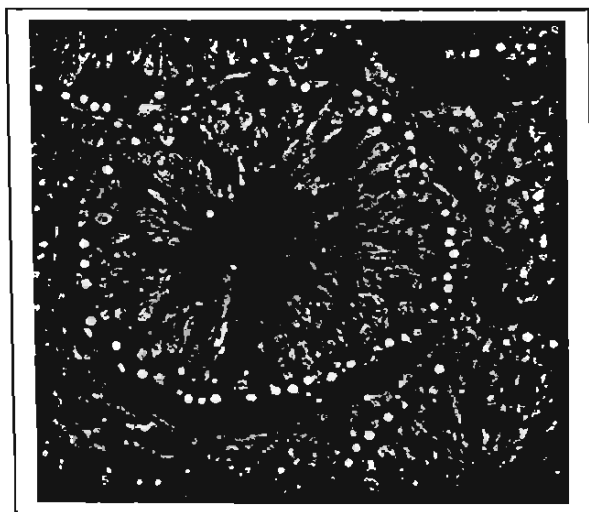


Figure 2. Apoptotic cells in seminiferous tubule of rats treated with lower dose pseudoephedrine chronically indicated by yellow-green fluorescent signals

Discussions

The main finding of the present study indicate that acute administration of high dose pseudoephedrine could induce apoptosis within the seminiferous tubules of male rats. It has been suggested that the percentage of apoptotic activity in semoniferous tubules caused by methamphetamine was dose dependent (Yamamoto et al., 2002). Apoptosis that caused by

pseudoephedrine may be due to a sudden increased adrenergic vasoconstriction after a single high dose administration (Traino et al., 2004). In addition, pseudoephedrine may have an effect in reducing the serum testosterone concentration as well as the effect of methamphetamine (Yamamoto et al., 2002). The changes of testosterone concentration may play some role in triggering the apoptosis in the spermatogenic cells.

Acknowledgements

This research was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission of Higher Education (CHE). The authors also gratefully acknowledge the Faculty of Medical Science, Naresuan University for facility support and the Health Sciences Research Institute for pseudoephedrine drug.

References

- Blosser, J.C., Barrantes, M. and Parker, R.B.(1987) Correlation between anorectic potency and affinity for hypothalamic (+)- amphetamine binding sites of phenylethylamines. Eur. J. Pharmacol. 134, 97-103.
- Dluzen, D.E., Anderson, L.I. and Pilati, C.F. (2002) Methamphetamine-gonadal steroid hormonal interactions: effects upon acute and striatal dopamine concentrations. Neurotoxicol. Teratol. 24, 267-73.
- Dluzen, D.E. and McDermott, J.L. (2002) Estrogen, anti-estrogen, and gender: differences in methamphetamine neurotoxicity. Ann.N Y Acad. Sci. 965, 135-56.
- Traino, A.A., Buckley, N.A. and Bassett M.L. (2004) Probable ischemic colitis caused by pseudoephedrine with tramadol as a possible contributing factor. Ann Pharmacother. 38, 2068-70.
- Will, S. (1997) Drugs of abuse, Pharmaceutical Press, London, pp.131-34
- Yamamoto, Y., Yamamoto, K., Hayase, T., Abiru, H., Shioto, K. and Mori, C. (2002) Methamphetamine induces apoptosis in seminiferous tubules in male mice testis. Toxicol.Appl.Pharmacol. 178, 155-160.

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, ศูนย์ปฏิบัติการกลางและส่งเสริมงานวิจัย, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์,
มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก 65000

¹ภาควิชากายวิภาคศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ 10400

¹ *Department of Anatomy,* ² *Center for Central Facility and Research Development, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000*

³ *Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400*

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ให้กับ สุทธิสา ถ่าน้อย

Acute high dose administration of pseudoephedrine induced apoptotic activity inside the seminiferous tubules of male rats

What is Pseudoephedrine?

Pseudoephedrine is a diastereoisomer of ephedrine and both are classified as sympathomimetic drugs (Will, 1997).

Pseudoephedrine is commonly found in over-the-counter decongestants, anorectic agents and as an amphetamine substitute (Blosser et al., 1987).

SLIMTIME
VICTORIA



Anorectic drugs



Decongestants



Yamamoto et al. (2002) reported that methamphetamine induces apoptosis in seminiferous tubules in male mice testis.

Apoptotic cells were detected in the seminiferous tubules of male mice 24 hours after a single treatment with 5, 10, and 15 mg/kg methamphetamine.

Therefore, The present study is aimed to investigate the effects of pseudoephedrine on the reproductive system for understanding the mechanisms and increasing the knowledge of using the drug.

Animals



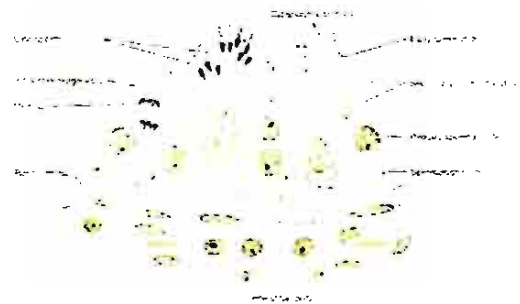
1. Control N = 10
2. Acute N = 10
3. Chronic N = 10

3 Groups of animals

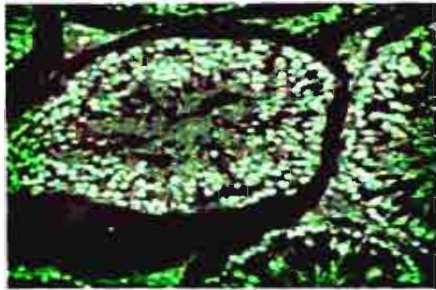
1. **Control** = Water intragastrically
2. **Acute** = 120 mg/kg pseudoephedrine once intragastrically
3. **Chronic** = 80 mg/kg pseudoephedrine intragastrically once daily for 15 days

Seminiferous Tubule

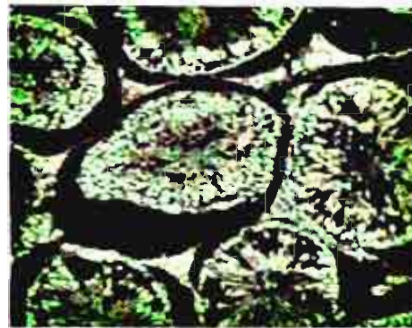
A black and white micrograph showing a cross-section of a seminiferous tubule. The tubule is filled with developing sperm cells. Labels with arrows point to various components: 'Sertoli cell' points to a large, pale cell within the tubule; 'Epithelial covering' points to the outer layer of the tubule; 'Interstitial cells' points to cells outside the tubule; 'Spermatocytes' points to a cluster of cells near the outer edge; and 'Spermatids' points to a cluster of small, dark cells near the inner edge.



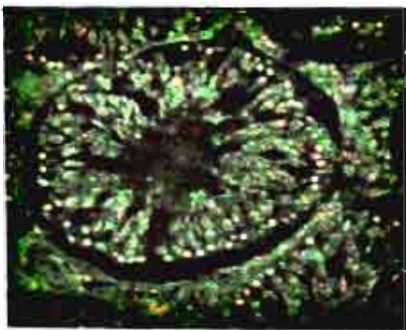
Results



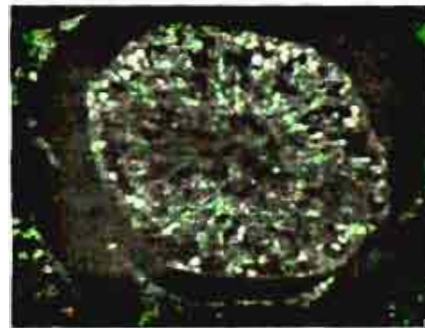
Acute group



Acute group



Chronic group



Control group

Discussions

The main finding of the present study indicate that acute administration of high dose pseudoephedrine could induce apoptosis within the seminiferous tubules of male rats.

It has been suggested that the percentage of apoptotic activity in seminiferous tubules caused by methamphetamine was dose dependent (Yamamoto et al., 2002).

Apoptosis that caused by pseudoephedrine may be due to a sudden increased adrenergic vasoconstriction after a single high dose administration (Traine et al., 2004).

In addition, pseudoephedrine may have an effect in reducing the serum testosterone concentration as well as the effect of methamphetamine (Yamamoto et al., 2002). The changes of testosterone concentration may play some role in triggering the apoptosis in the spermatogenic cells.

Further study on sperm quality examinations need to be done.

Acknowledgements

This research was supported by the Thailand Research Fund (TRF) and Commission of Higher Education (CHE). The authors also gratefully acknowledge the Faculty of Medical Science, Naresuan University for facility support and the Health Sciences Research Institute for pseudoephedrine drug.