

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.

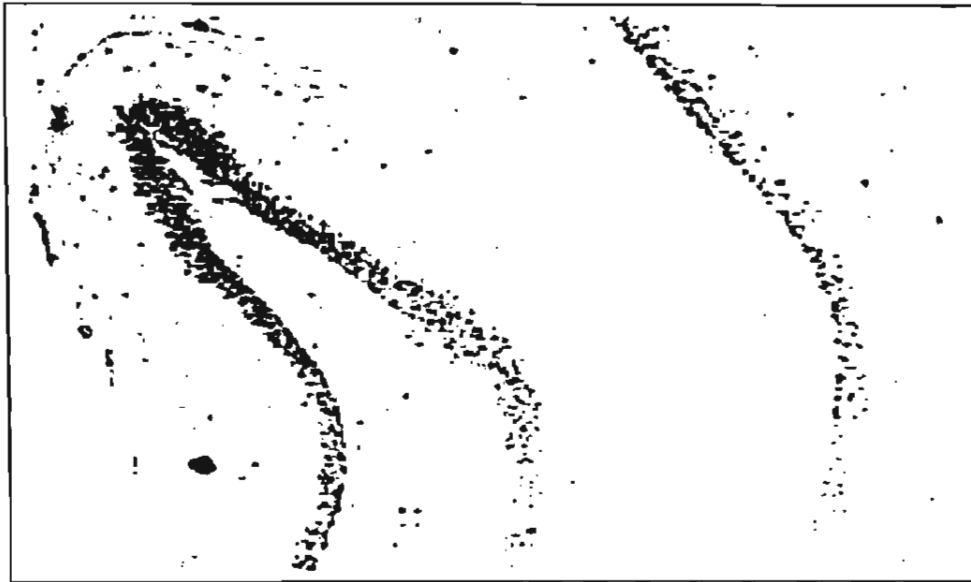


Figure 1 Immunohistochemistry analysis of NMDAR1 in rat dentate gyrus

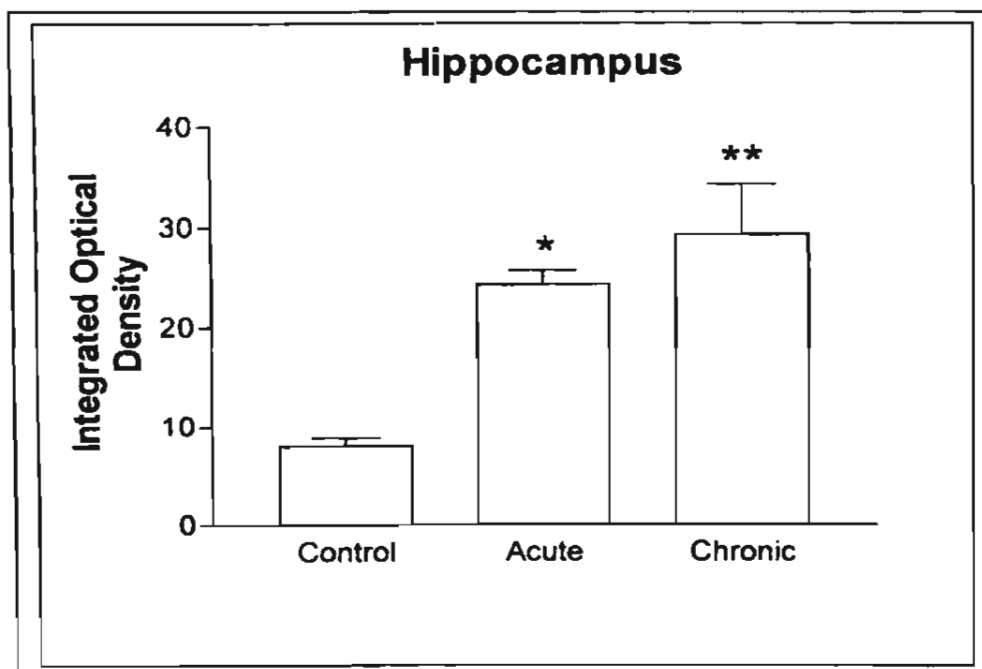


Figure 2 NMDAR1 immunodensity in granule layer of dentate gyrus in rat hippocampal formation after acute and chronic administrations.

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 ฌ ฎ ฏ ฐ ฑ ฒ

นิทรรศการรู้ใหม่ พ. ๒๕๔๘

วันที่ 14-16 มกราคม 2548

ณ โรงแรมฟลิคซ์ รีสอร์ท

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



NORTH-EASTERN NEUROSCIENCE ASSOCIATION
สมาคมประสาทวิทยาเหนือ-ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

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



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

สุทิสดา กาบุญ^{1,2} ; เสมอ กาบุญ^{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 กลุ่มทดลอง ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติแบบ 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 กาบุญ

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 ไสกณ³

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 10400

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 จากการศึกษาพบว่า 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 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 (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 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 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

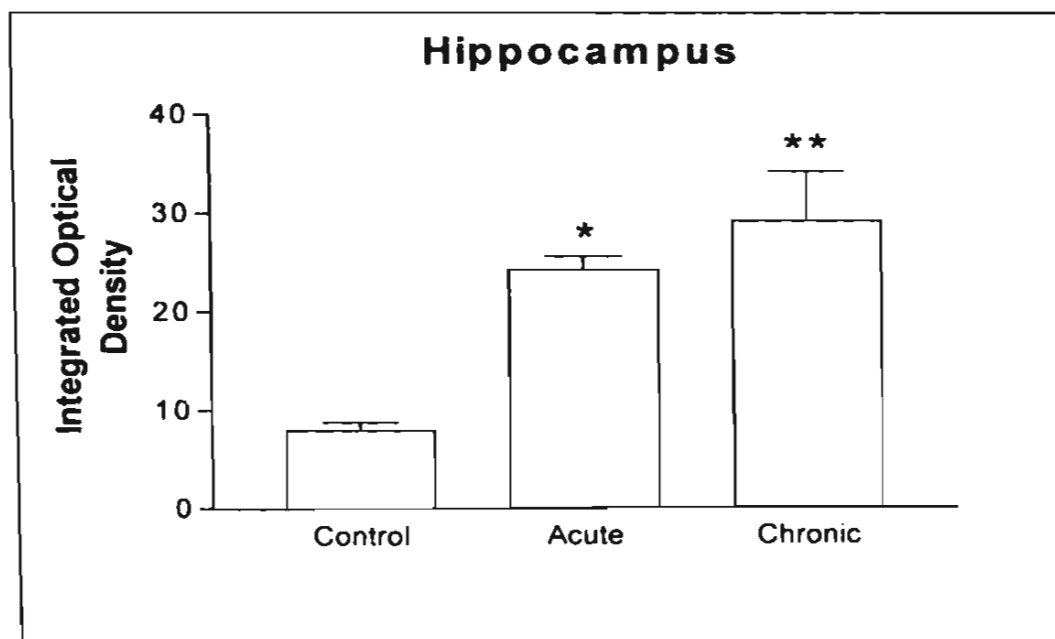


Figure 2. NMDAR1 immunodensity in granule layer of dentate gyrus in rat hippocampus after acute and chronic administration.

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. สุทิสดา 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).

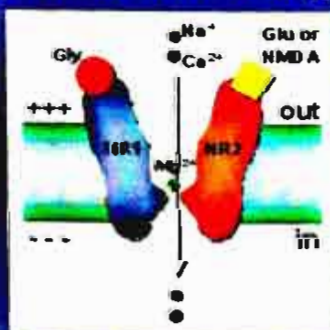
Previous reports

- 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



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

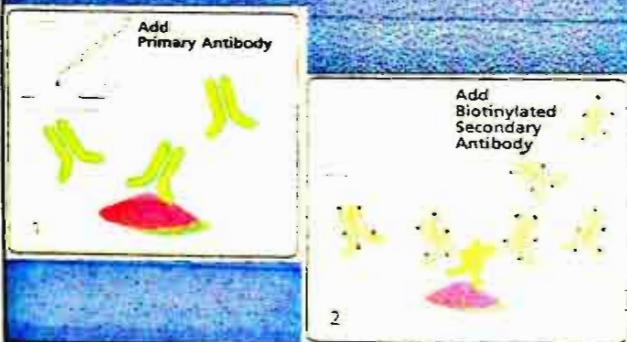
(Linggo et al., 1998; Green et al., 2003)



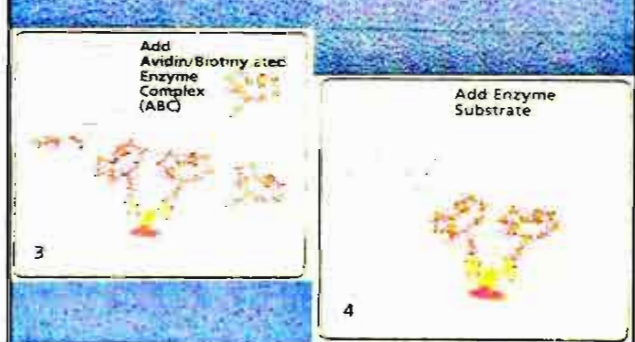
HIPPOCAMPAL FORMATION



Immunohistochemical technique using polyclonal antibody against NMDAR1



Immunohistochemical technique using polyclonal antibody against NMDAR1

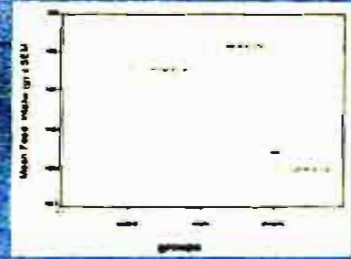


Data analysis

- 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

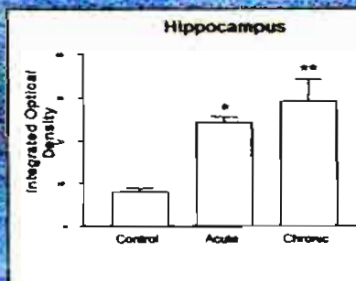


Qualitative Analysis

- 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 (Tongjaroenbuangarn 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 Sathien, 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 โศภณ¹

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.,

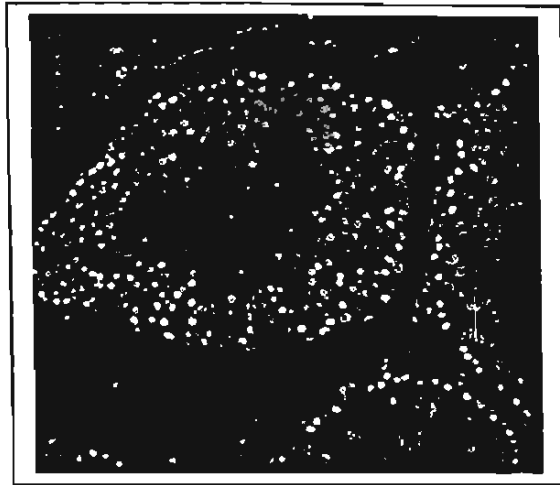
2002). Treatment of gonadectomized females with a physiological regimen of estrogen significantly diminished the amount of striatal dopamine (DA) depletion to methamphetamine (METH) compared with non-estrogen treated mice suggesting that estrogen serves as a neuroprotectant (Dluzen and McDermott 2002). 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

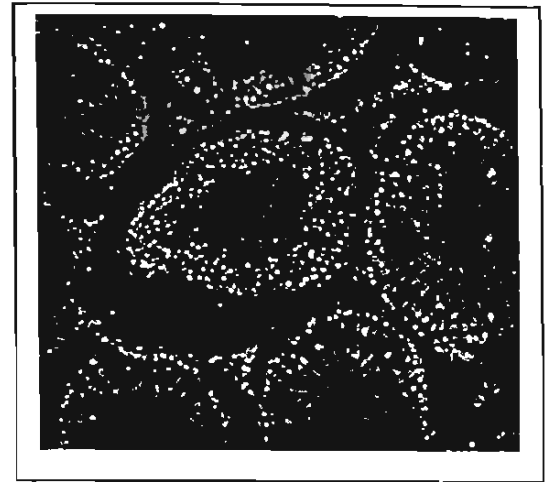
Sprague Dawley male rats (250-280 g) were divided into 3 groups as acute, chronic, and control groups with 10 animals each. To examine an acute effect of pseudoephedrine, animals were administered intragastrically at the dose of 120 mg/kg. The chronic effect was examined by treated pseudoephedrine intragastrically 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)

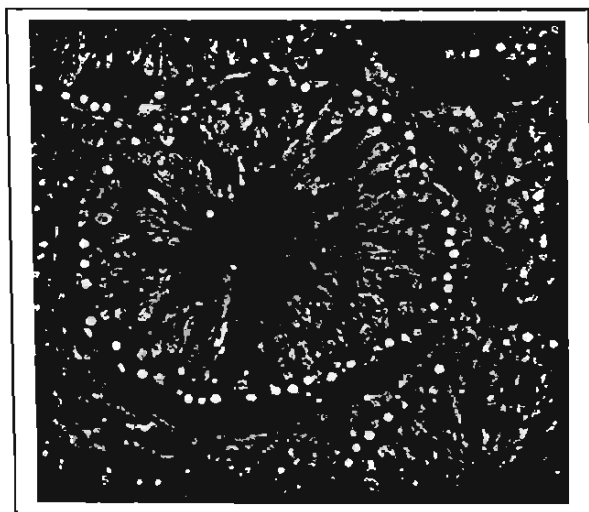


Figure 2. Apoptotic cells in seminiferous tubule of rats treated with lower dose pseudoephedrine chronically indicated by yellow-green fluorescent signals

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.

Materials and Methods

Animals



Sprague Dawley male rats (250-280 g)

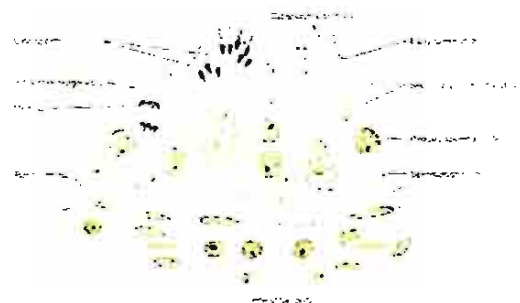
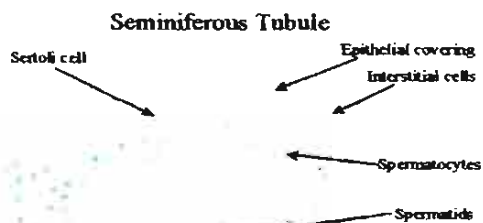
3 Groups of Animals

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

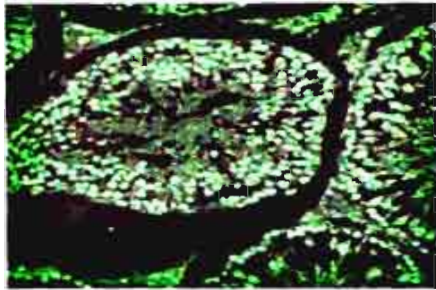
3 Groups of animals

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

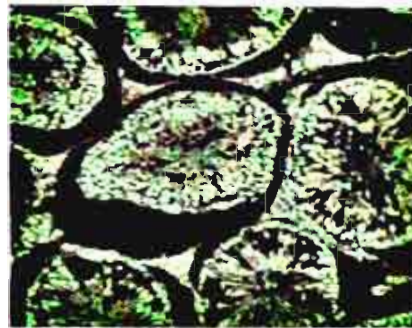
TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay was used to examine apoptotic activities in the seminiferous tubules of rat testis



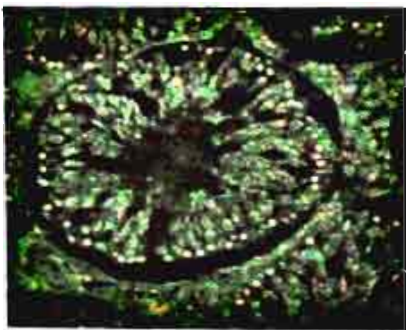
Results



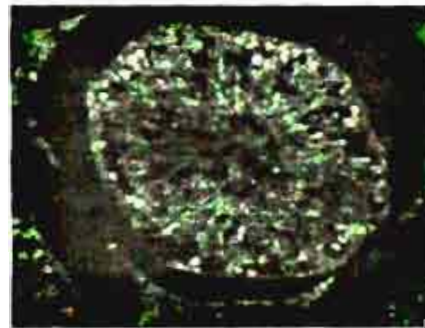
Acute group



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.