Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(91): 1-11

# Role of sulpiride administration in sperm quality and relationship to male fertility and in vitro fertilization embryonic development

Ahmadi A[1*], Sadrkhanlou RA[1], Ahmadi A[1]

1. Department of Basic Science, Veterinary Faculty of Urmia University, Urmia, Iran.

Received: 2 Aug 2014, Accepted: 10 Sep 2014

**Abstract**

***Background:*** Male fertility depends on the proper function of a complex system of organs which plays an important role in spermatogenesis. In this study the effects of sulpiride-administration were assessed by means of sperm parameters and in vitro fertilization potential

***Materials and Methods:*** In this experimental study thirty adult male mice were divided into 3 groups as test, control-sham and control. The test group were injected with 40mg/kg sulpiride solution daily for 45 days IP. Sham mice were injected by solvent only. After 45 days, all mice were dispatched by cervical dislocation consequence of unconsciousness. Cauda epididymis were used to collect sperm cells and assess their motility, viability and DNA integrity. The rate of in vitro fertilization and embryonic development were also examined.

***Results:*** In comparison with sham and control groups, sperm motility and viability rate showed a significant reduction in the sulpiride-administered animals. Rate of DNA damage increased which gives rise to a remarkable reduction of fertilization rate, zygote division, blastocysts number, and significant increase of arrested embryos in sulpiride treated mice($p<0.05$).

***Conclusion:*** Data suggest that following sulpiride-induced hyperprolactinemia, induction of spermatogenesis dysfunction, causes low sperm quality that accompanies a significant lower fertility potential and embryonic development in comparison with the sham and control groups.

***Keywords:*** DNA Damage, Embryonic Development, IVF, Hyperprolactinemia, Sulpiride

*Corresponding Author:
Address: Department of Basic Science, VeterinaryFaculty of Urmia University, Urmia, Iran
Email: aram.ahmadi82@gmail.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۷، شماره ۱۰ (شماره پیاپی ۹۱)، دی ۱۳۹۳، ۱۱-۱

# نقش سولپراید در کیفیت اسپرم و ارتباط آن با باروری نر و روند رشد جنینی در لقاح داخل آزمایشگاهی

**آرام احمدی[1*]، رجبعلی صدرخانلو[2]، عباس احمدی[3]**

۱- دکترای تخصصی علوم تشریحی ، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲- استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۱۱تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۹

## چکیده

**زمینه و هدف:** باروری جنس نر به عملکرد صحیح سیستم پیچیده‌ای از ارگان‌ها که نقش مهمی در اسپرماتوژنز دارند، بستگی دارد. در این مطالعه، اثرات داروی سولپراید بر پارامترهای اسپرم و توان لقاح آزمایشی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی ۳۰ موش نر بالغ به ۳ گروه تیمار، کنترل شم و کنترل تقسیم شدند. موش‌های گروه تیمار روزانه ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم محلول سولپراید را به مدت ۴۵ روز و به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه شم فقط حلال دارو را دریافت کرد. بعد از ۴۵ روز متعاقب بی‌هوشی همه موش‌ها به روش جابجایی گردن کشته شدند. اسپرم‌ها از اپیدیدیم جمع‌آوری و تحرک، زنده بودن و کیفیت DNA اسپرم بررسی شد. میزان باروری داخل آزمایشگاهی در هر گروه از نظر وضعیت لقاح و روند رشد جنینی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در مقایسه با گروه‌های کنترل شم و کنترل تحرک و زنده ماندن اسپرم در گروه درمان شده با سولپراید، به طور معنی‌داری کاهش یافت. درصد آسیب DNA که کاهش میزان لقاح، تقسیم زیگوت و تعداد بلاستوسیت‌ها و بالا رفتن معنی‌دار تعداد جنین‌های متوقف شده را به همراه دارد، در موش‌های گروه دریافت کننده سولپراید افزایش یافت ($p<۰/۰۵$).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد متعاقب هایپرپرولاکتینمی ایجاد شده توسط سولپراید، القاء اختلال در روند اسپرماتوژنز باعث کاهش کیفیت اسپرم شده و کاهش قدرت باروری و روند رشد جنینی را در مقایسه با گروه‌های کنترل شم و کنترل به دنبال داشته است.

**واژگان کلیدی:** آسیب DNA، روند رشد جنینی، لقاح داخل آزمایشگاهی، هیپرپرولاکتینمی، سولپراید

*__نویسنده مسئول:__ ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

Email: aram.ahmadi82@gmail.com

**مقدمه**

اختلالات جنسی و تولید مثلی جزء عوارض جانبی استرس آور و روتین استفاده از داروهای آنتی سایکوتیک است که بر کیفیت زندگی بیماران مصرف کننده دارو اثر سوئی می‌گذارد(۱). هایپرپرولاکتینمی مهم‌ترین عامل نگران کننده در درمان بیماران مبتلا به اسکیزوفرنی است. اثرات جانبی سوء میزان بالای پرولاکتین سرمی می‌تواند تاثیرات منفی بر روند درمان این بیماران داشته باشد(۲). پرولاکتین نقش کلیدی در تنظیم رفتار و فعالیت جنسی و تولیدمثلی ایفا می‌کند(۳) و افزایش پرولاکتین سرمی باعث ایجاد ناباروری و گالاکتوره در هر دو جنس و مشکلات ارکسیون، ارگاسم، انزال و ژنیکوماستی در جنس نر و اختلال و عدم وجود سیکل جنسی در جنس ماده می‌گردد(۴). هایپرپرولاکتینمی به عنوان عامل ایجادکننده ۱۱ درصد از ناباروری‌ها در جنس نر شناخته می‌شود(۵).

فاکتورهای پاتولوژیک، فارماکولوژیک و فیزیولوژیک همه روی مقادیر پرولاکتین اثر دارند. اغلب اثرات منفی بالینی هایپرپرولاکتینمی به دخالت پرولاکتین در سیستم هیپوتالاموس - هیپوفیزی - گنادی نسبت داده می‌شود. پرولاکتین ترشح ضربانی هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (Gonadotropin releasing hormone-GnRH) را از هیپوتالاموس مهار کرده و مستقیماً از عمل هیپوفیزی هورمون‌های محرک فولیکول (Follicle stimulating Hormone-FSH) وهورمون زرده ای (Luteinizing Hormone-LH) روی گنادها جلوگیری می‌کند. و باعث ایجاد هایپوگنادیسم ثانویه با کاهش میزان LH ، FSH و تستوسترون می‌شود که این عوامل باعث کاهش تحرک و کیفیت اسپرم می‌گردد. اختلال در کیفیت اسپرم با ایجاد اختلالات باروری رابطه مستقیمی دارد(۶).

بعضی از داروهای آنتی سایکوتیک غیر کلاسیک نظیر مشتقات بنزامیدها (سولپراید، آمی سولپراید و متاکلوپرامایدد) گیرنده‌های دوپامین را مهار کرده که باعث از بین رفتن سیستم کنترلی بر روی سلول‌های لاکتوتروف در زمینه ترشح پرولاکتین گشته و در نتیجه هیپر پرولاکتینمی ایجاد می‌شود(۷).

سولپراید داروی ضد روان پریشی است که به طور عمده برای درمان بیماری روانی اسکیزوفرنی و افسردگی مورد استفاده قرار می‌گیرد و نسبت به بیشتر داروهای قدیمی ضد روان پریشی دارای اثرات جانبی اکستراپیرامیدال (Extrapyramidal) کمتری است(۸).

این دارو دارای اثر ضعیفی بر روی گیرنده‌های نوراپی نفرین، استیل کولین، سروتونین و گاما آمینو بوتیریک اسید است. در محیط درون تنی نیز باعث فعال شدن گیرنده‌های گاما-هیدروکسی بوتیرات می‌شود که در ایجاد حالت آرام‌بخشی آن نقش دارد(۹).

از این دارو در درمان بیماری هانتینگتون، زخم دوازدهه، شیرواری ضعیف (Poor lactation)، افسردگی و درمان حرکت پریشی تاخیری و نیز در مواردی برای جلوگیری از آبستنی استفاده می‌شود(۱۰).

از آنجا که مطالعه کاملی در زمینه اثرات داروی سولپراید بر کیفیت اسپرم و روند رشد جنینی در محیط آزمایشگاهی صورت نگرفته است، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر داروی سولپراید بر بعضی از پارامترهای اسپرم و متعاقب آن اثرات آن بر روی پتانسیل باروری با بررسی قدرت زنده‌مانی و رشد جنین در محیط آزمایشگاهی، طراحی و اجرا گردید.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۳۰ سرموش سوری نر بالغ (۱۰-۸ هفته) با میانگین وزن ۲±۲۱ گرم برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. متعاقب یک هفته سازگاری با شرایط محیط در گروه‌های آزمایشی تیمار کنترل- شم و کنترل دسته‌بندی شدند. قابل ذکر است که برای هر گروه ۱۰ سر موش سوری بالغ مورد استفاده قرار گرفت. گروه تیمار روزانه ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی سولپراید را به حجم ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر به ازای هر موش به مدت ۴۵ روز

به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه کنترل-شم نیزحلال دارو (روغن کنجد) را به صورت داخل صفاقی و در طی مدت مشابه دریافت کردند. موش‌های گروه کنترل فقط در شرایط مشابه نگهداری شدند و هیچ دارویی دریافت نکردند.

بررسی پارامترهای مربوط به اسپرم: موش‌های متعلق به گروه‌های تست، کنترل- شم و کنترل پس از طی دوره درمان، به وسیله گاز $CO_2$ بی‌هوش و خون‌گیری از طریق قطع ورید وداجی، برای تهیه سرم جهت آنالیز هورمونی انجام گرفت، سپس موش‌ها کشته شدند. دم اپیدیدیم با رعایت اصول استریل متعاقب تراشیدن موی ناحیه (خط میانی بدن) و ایجاد برشی به طول دو سانتی‌متر خارج شد.

به منظور اندازه‌گیری میزان هورمون پرولاکتین سرمی با استفاده از کیت ویژه پرولاکتین موش سوری (SEA846Mu-China/USCNLIFE) و روش الایزا میزان این هورمون اندازه‌گیری و ارزیابی شد.

نحوه استحصال اسپرم از اپیدیدم: دم اپیدیدیم با رعایت شرایط استریل پس از جدا کردن بافت‌های همبندی اطراف جدا شده و متعاقب آن درون محیط کشت، HTF(Human tubal Fluid – شرکت سیگما آمریکا) حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA که از قبل در شرایط ۵ درصد $CO_2$ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به تعادل رسیده بود، قرار داده شدند. دم اپیدیدم‌ها به قطعات مختلف تقسیم شد و به مدت ۳۰ دقیقه داخل انکوباتور$CO_2$ با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جهت خروج اسپرم‌ها، قرار داده شدند. بعد از ۳۰ دقیقه قطعات بافتی از محیط خارج شدند(۱۱).

ارزیابی تحرک اسپرم‌ها: برای این منظور نمونه اسپرم مطابق با روش بالا استحصال شد و متعاقب رقیق سازی اسپرم‌ها برای هر موش در هر گروه ۱۰ قطره جهت ارزیابی تحرک اسپرم‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین درصد تحرک، ۱۰۰ خانه از ۲۵ میدان میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفتند و سپس میانگین آنها بر اساس درصد تحرک پیشرونده، تحرک غیر پیشرونده و عدم تحرک ثبت شد.

برای ارزیابی درصد اسپرم‌های زنده و هم‌چنین تشخیص اسپرم‌های زنده از اسپرم‌های مرده از روش رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین استفاده شد. اصول این کار بر این نکته استوار است که در اثر آسیب به غشاء پلاسمایی، اسپرم‌ها در برابر رنگ مذکور نفوذ پذیر می‌شوند. لذا آن دسته از اسپرم‌هایی که هر یکی از قطعات سر، گردن و یا دم آنها رنگ گرفته بود به عنوان اسپرم‌های مرده اطلاق شدند. نتایج در قالب درصد بیان شدند(۱۲).

ارزیابی عدم پیوستگی دو رشته DNA: برای ارزیابی هر گونه شکستگی در دو رشته DNA ی اسپرم موش‌ها، رنگ آمیزی آکریدین اورنج در نظر گرفته شد. این رنگ آمیزی برای شناسایی آن دسته از اسپرم‌هایی که DNAی آنها دچار شکست شده است، مورد استفاده قرار می‌گیرد. در صورتی که DNAی اسپرم دچار شکست شده باشد متعاقب رنگ آمیزی، DNA به رنگ زرد تا قرمز فلوروسنت نمایان می‌شود. در نتیجه آن دسته از اسپرم‌هایی که این حالت را نشان دهند به عنوان اسپرم‌هایی که DNA ی آسیب دیده دارند در نظر گرفته می‌شوند و نتایج حاصل از این بررسی در قالب درصد بیان گردید(۱۳، ۱۴).

بررسی قابلیت باروری آزمایشگاهی (IVF): در این مطالعه برای به دست آوردن اووسیت به منظور بررسی درصد لقاح وکیفیت جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی نیاز به تحریک تخمک‌گذاری در موش‌های ماده است که به این شرح صورت گرفت: تزریق ۷/۵ واحد (IU) هورمون PMSG (Pregnant mores serum gonadotropin – شرکت Folligon هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر و ۴۸-۴۶ ساعت بعد، تزریق ۷/۵ واحد (IU) هورمون HCG(Human Chorionic gonadotropin – شرکت Folligon هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر داخل صفاقی صورت گرفت. عمل تخمک‌گذاری معمولا ۱۲-۱۰ ساعت بعد از تزریق hCG رخ می‌دهد(۱۴).

تخمک‌گیری و لقاح داخل آزمایشگاهی: ۱۲-۱۰ ساعت بعد از تزریق hCG (صبح روز بعد) بعد از کشتن حیوان به روش جابجایی گردن، لوله‌های رحمی را جدا

کرده و در داخل محیط کشت ۳۷ درجه که از قبل آماده شده بود، قرار داده و با استفاده از روش شکافتن dissecting تخمک‌ها را خارج نموده و پس از شستشو تخمک‌ها را به قطرات محیط لقاح در زیر روغن معدنی حاوی محیط کشت HTF حاوی ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA منتقل کرده و سپس اسپرم‌های متحرک جدا شده مربوط به سه گروه آزمایشی به روش شناور سازی (Swim up) بعد از طی روند ظرفیت یابی (capacitation) که ۱/۵ ساعت طول کشید، به طور مجزا به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، اضافه شدند. عمل لقاح حدود ۶-۵ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم صورت می‌گیرد. بعد از این مدت زمان تعداد زیگوت‌های تشکیل شده در هر گروه بررسی شده و به صورت درصد لقاح در هر گروه بیان می‌گردد(۱۴).

حدود ۱۳-۱۲ ساعت قبل از تزریق hCG به موش‌های ماده، موش‌های نر به روش انسانی کشته شدند. نمونه‌های اسپرم مربوط به هر گروه که قبلا نحوه آماده سازی آن ذکر شد شستشو داده شده و با استفاده از روش شناور سازی، اسپرم‌های متحرک جدا شده و جهت ظرفیت یابی در انکوباتور $CO_2$ با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. اسپرم‌های متحرک به توانایی رسیده قطره لقاح محتوی اووسیت‌های به دست آمده اضافه شد(۱۴).

برای ارزیابی هایپرپرولاکتینمی بر روی باروری آزمایشگاهی و روند رشد جنینی، بعد از لقاح مراحل رشد جنینی در زیر میکروسکوپ اینورت مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی میزان شکافتگی ۲۴ ساعت بعد از کشت صورت گرفته و در جنین‌های موجود در هر گروه جنین‌ها از نظر میزان فراگمانتاسیون و میزان طی مراحل رشد جنینی یا تعداد جنین‌های متوقف شده و تیپ‌بندی جنین‌های متوقف شده با توجه به فاکتورهای مختلفی نظیر لیز شدن جنین‌ها، نکروتیک بودن آنها و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمی مقایسه گردیدند. تیپ‌بندی جنین‌های متوقف شده به شرح زیر بود: تیپ یک جنین‌هایی با لیز، فراگمانته شدن و نکروتیک بودن کامل، تیپ دو جنین‌هایی با لیز و فراگمانته شدن در تعدادی از بلاستومرها، تیپ سه جنین‌هایی با تعداد کمی بلاستومرهای لیز و فراگمانته و وزیکول سایتوپلاسمیک، کیفیت جنین‌ها و تعداد جنین‌های رشد کرده، درصد شکافتگی، میزان جنین‌های متوقف شده و درصد بلاستوسیست‌های ایجاد شده در طی ۱۲۰ ساعت در هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم افزار مینی تب (Minitab) و روش نسبت دوتایی (2 proportion) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به صورت درصد بیان شد. مقایسه درصد تحرک و بلوغ هسته اسپرم در سه گروه فوق توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و روش آماری آنووا یک طرفه و تست تعقیبی توکی با سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ انجام شد.

## یافته‌ها

اندازه‌گیری پرولاکتین سرمی نشان داد که در گروه درمان شده مقدار میانگین پرولاکتین (۲/۳۷±۸/۰۷ نانوگرم) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شم (۱/۴۴±۵/۲۵ نانوگرم) و کنترل (۱/۷۷±۴/۱۸ نانوگرم) داشت($p<0/05$).

درصد اسپرم‌های غیرمتحرک در سه گروه تیمار، کنترل شم و کنترل توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد که در گروه تیمار میانگین درصد اسپرم‌های غیرمتحرک (۲/۳۲±۶۷/۸) افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل شم (۳/۹۱±۳۸/۴) و کنترل (۱/۳۱±۴۱) داشت($p<0/05$) (جدول ۱).

اسپرم‌های مرده که در روش رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین رنگ گرفته بودند در سه گروه تیمار، کنترل شم و کنترل شمارش و درصد آنها به دست آمد که در گروه تیمار افزایش معنی‌داری در میانگین اسپرم‌های مرده (۵/۱۵±۵۷/۵۰) نسبت به گروه کنترل شم (۱/۸۹±۳۳/۷۱) و کنترل (۱/۲۹±۳۱/۵) قابل مشاهده است($p<0/05$)(جدول ۱ و شکل A.1).

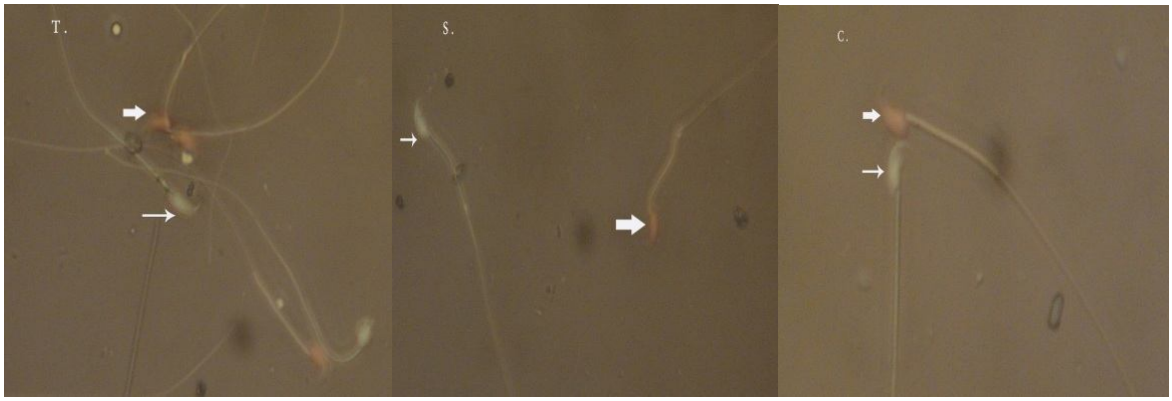
**جدول ۱. اثرداروی سولپراید بر کیفیت DNA، میزان تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم در گروه‌های آزمایشی**

| گروه‌های آزمایشی | DNA تک رشته‌ای و شکسته ($AO^+$) (درصد) | عدم تحرک اسپرم (درصد) | قابلیت زنده ماندن اسپرم (درصد اسپرم‌های مرده) |
|---|---|---|---|
| تیمار | ۴۰/۷۵±۲/۸۷* | /۸±۲/۳۲* ۶۷ | ۵۷/۵۰±۵/۱۵* |
| کنترل-شم | ۸±۱/۴۱ | ۴۱±۱/۳۱ | ۳۳/۷۱±۱/۸۹ |
| کنترل | ۶/۲±۱/۳۰ | /۴±۳/۹۱ ۳۸ | ۳۱/۵±۱/۲۹ |

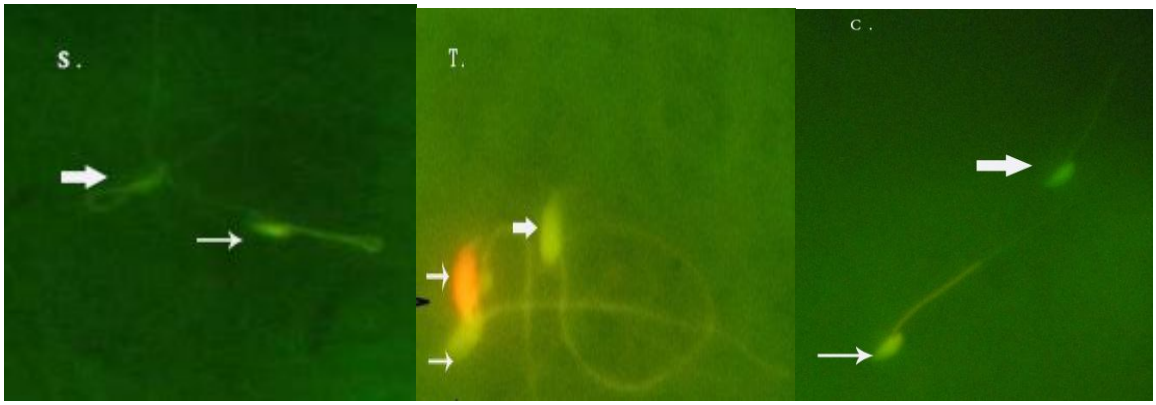
*** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه تیمار با گروه‌های کنترل شم و کنترل است. اختلاف معنی داری بین گروه های کنترل-شم و کنترل وجود ندارد. تمامی داده‌ها براساس میانگین±انحراف معیار خطا گزارش شده‌اند** ($p<۰/۰۵$).

تعداد اسپرم‌هایی با کروماتین آسیب دیده در روش رنگامیزی با آکریدین اورنج در سه گروه با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت محاسبه و درصد آنها به دست آمد که اسپرم‌هایی با هسته سبز رنگ طبیعی و هسته نارنجی تا قرمز بسته به میزان آسیب کروماتین، به عنوان اسپرم‌هایی با DNA آسیب دیده در نظر گرفته می‌شود. اختلاف بین میانگین درصد اسپرم‌هایی با DNA آسیب دیده در گروه تیمار (۴۰/۷۵±۲/۸۷) نسبت به گروه کنترل شم (۸±۱/۴۱) و کنترل (۶/۲±۱/۳۰) معنی‌دار بود($p<۰/۰۵$)(جدول ۱ و شکل B.1).

A.




B.




**شکل ۱. A تصویر میکروسکوپیک از اسپرم‌هایی با رنگ آمیزی ائوزین نگروزین در گروه درمان شده با سولپراید (T) ، گروه کنترل شم (S) و گروه کنترل(C).اسپرم‌هایی با سر قرمز رنگ نشان دهنده اسپرم های مرده و با سر سفید رنگ نشان دهنده اسپرم‌های زنده می-باشد. B تصویر میکروسکوپیک از اسپرم‌هایی با رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج در گروه درمان شده با سولپراید (T) ، گروه کنترل شم(S) و گروه کنترل(C). اسپرم‌هایی با سر سبز رنگ با DNA سالم و اسپرم‌هایی با سر زرد تا قرمز نشان دهنده DNA آسیب دیده می باشد.**

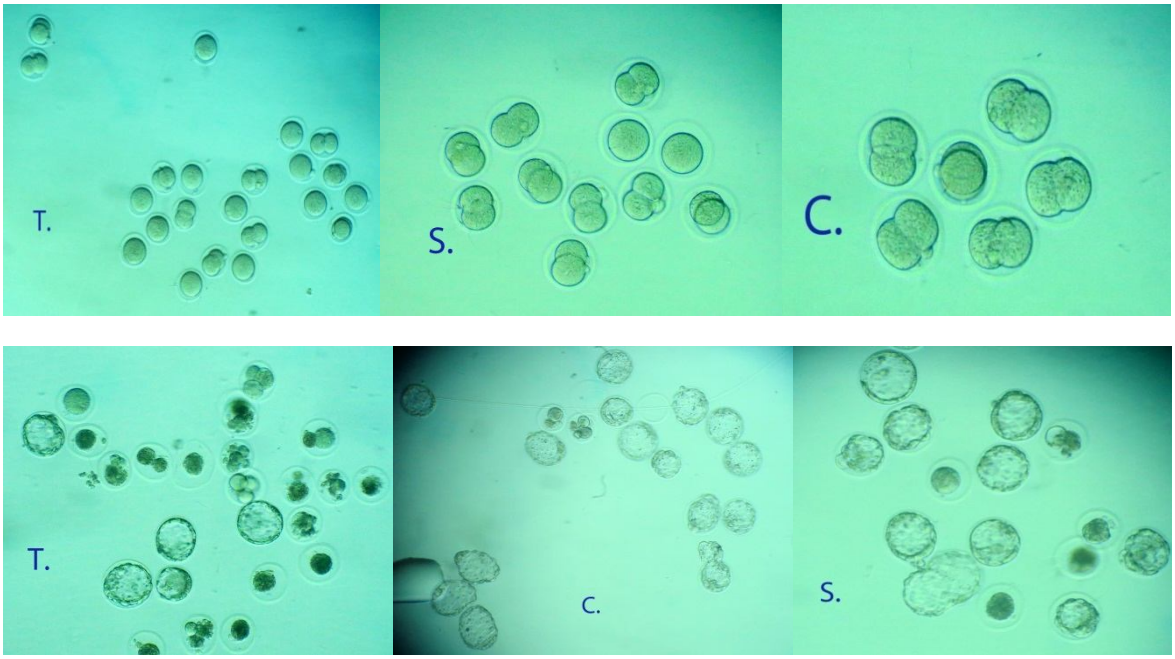
توان باروری آزمایشگاهی اسپرماتوزوئید و رشد جنینی در گروه‌های آزمایشی: نتایج حاصل از سه گروه آزمایشی درمان، کنترل شم و کنترل نشان داد که در گروه هیپرپرولاکتینمی، درصد لقاح (۷۵/۱۳) به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شم با ۸۹/۲۶ درصد و کنترل با ۹۳/۵۵ درصد کاهش معنی‌دار از نظر آماری داشته است($p<۰/۰۵$)(جدول ۲). هرگونه اختلال در ساختار اسپرم که باعث کاهش قدرت نفوذپزیری، کاهش واکنش‌های آکروزومی و اتصال اسپرم-اووسیت گردد در میزان لقاح اثرات سوئی دارد . مقایسه درصد جنین‌های دو سلولی ایجاد شده که نشان‌گر شروع شکافتگی است، مشخص کرد که تعداد این جنین‌ها تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های کنترل و کنترل شم با گروه تیمار دارد، به طوری که درصد آنها در گروه کنترل ۸۷/۹۳ درصد و کنترل شم ۸۴/۱۹ درصد بالاتر از درصد آن در گروه درمان شده با ۷۸/۳۹ درصد می‌باشد($p<۰/۰۵$)(جدول ۲).

**جدول ۲. میانگین درصد باروری، جنین های دو سلولی، بلاستوسیست‌ها و درصد جنین‌های متوقف شده و نوع آنها متعاقب لقاح آزمایشی اسپرم‌های حاصل از گروه های تیمار، کنترل-شم و کنترل.**

| گروه ها | تعداد اووسیت | میزان لقاح (درصد) | رویان‌های دوسلولی (درصد) | بلاستوسیست (درصد) | کل جنین-های متوقف شده (درصد) | جنین‌های متوقف شده تیپ یک(درصد) | جنین‌های متوقف شده تیپ دو(درصد) | جنین‌های متوقف شده تیپ سه (درصد) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| تیمار | ۳۸۲ | ۷۵/۱۳* | ۷۸/۳۹* | ۳۰/۳۱* | ۶۹/۶۸* | ۱۹/۸۶* | ۲۴/۰۴* | ۲۵/۷۸ |
| کنترل‌شم | ۳۲۶ | ۸۹/۲۶ | ۸۴/۱۹ | ۶۱/۵۱ | ۳۸/۴۸ | ۴/۸۱ | ۱۰/۹۹ | ۲۲/۹۸ |
| کنترل | ۱۸۶ | ۹۳/۵۵ | ۸۷/۹۳ | ۶۷/۲۴ | ۳۲/۷۵ | ۳/۴۴ | ۸/۶۲ | ۲۰/۶۸ |

*** نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه درمان شده با سولپراید با گروه‌های کنترل-شم و کنترل می‌باشد. اختلاف معنی‌داری بین داده‌های گروه کنترل-شم با گروه کنترل وجود ندارد**($p<۰/۰۵$) .

تعداد بلاستوسیست‌ها نشان دهنده روند رشد جنینی می‌باشد. این رشد با عوامل مختلفی که از بیان صحیح ژنوم آن جلوگیری می‌کند، تحت تاثیر قرار می‌گیرد. بررسی درصد جنین‌هایی که پس از ۱۲۰ ساعت به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند مشخص کرد که اختلاف بین دو گروه کنترل شم و کنترل در مورد درصد بلاستوسیست‌ها معنی‌دار نمی‌باشد($p>۰/۰۵$) ولی این دو گروه تفاوت معنی‌دار و مشخصی را نسبت به گروه درمانی نشان می‌دهند($p<۰/۰۵$). جنین‌های متوقف شده که بر طبق میزان لیز و فراگمانتاسیون طبقه‌بندی می‌شوند، در سه گروه ارزیابی و باهم مقایسه شدند. در مورد تعداد کل جنین‌های متوقف شده تفاوت بین گروه تیمار (۶۹/۶۸) با گروه‌های کنترل (۳۲/۷۵) و کنترل شم (۳۸/۴۸) با $p<۰/۰۵$ معنی‌دار و بین دو گروه کنترل شم و کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد($p>۰/۰۵$)(جدول ۲). در مورد جنین‌های متوقف شده تفاوت معنی‌داری بین درصد جنین‌های تیپ یک و دو که در آنها میزان لیز و فراگمانتاسیون بالاست، بین گروه تیمار با گروه‌های کنترل و کنترل شم مشاهده شد ولی درصد جنین‌های متوقف شده تیپ سه با میزان لیز و فراگمانتاسیون کم و پائین، در گروه تیمار نسبت به گروه‌های دیگر افزایش یافته ولی این افزایش معنی‌دار نمی‌باشد(شکل ۲).




**شکل ۲. تصویر میکروسکوپیک از جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی اسپرم‌های گروه کنترل (C )، کنترل‌شم (S) و گروه دریافت کننده سولپراید (T). ردیف بالا جنین‌های دو سلولی و ردیف پایین جنین‌ها را بعد از ۱۲۰ ساعت نشان می‌دهد (درشت نمایی X ۴۰۰).**

## بحث

در حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد از زوج‌ها در سن تولید مثل از ناباروری رنج می‌برند که تقریبا نصف این میزان مربوط به عوامل ایجادکننده ناباروری در مردان است. هایپرپرولاکتینمی مهم‌ترین اختلال شناخته شده اُندوکرینی محورهیپوتالاموس ـ هیپوفیزی است. پرولاکتین نقش کلیدی در تنظیم رفتار و فعالیت جنسی و تولیدمثلی ایفا می‌کند(۳) و افزایش پرولاکتین سرمی باعث ایجاد ناباروری و گالاکتوره در هر دو جنس می‌شود. اثرات جانبی سوء میزان بالای پرولاکتین سرمی می‌تواند تاثیرات منفی بر روند زندگی فرد مبتلا داشته باشد.

برطبق نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر داروی آنتی سایکوتیک سولپراید باعث افزایش غلظت پرولاکتین سرمی می‌شود. مکانیسم اثر داروی سولپراید شامل بلوکه کردن گیرنده‌های D2 و D3 است که باعث کاهش غلظت دوپامین هیپوتالاموسی و افزایش تولید پرولاکتین می‌شود(۱۵). هر عاملی همانند افزایش پرولاکتین سرمی که باعث کاهش کیفیت اسپرم و ایجاد تغییرات پاتولوژیک در آن گردد، بر لقاح و رشد جنینی اثرگذار خواهد بود. ارتباط تنگاتنگی بین کیفیت اسپرم و میزان باروری و رشد جنینی وجود دارد.

کاهش تحرک اسپرم از عوامل تاثیرگزار بر درصد لقاح است. در این مطالعه تجویز سولپراید با افزایش میزان اسپرم‌های غیر متحرک همراه است. اعتقاد بر این است که درصد تحرک اسپرم یکی از مهم‌ترین فاکتورهای دخیل در میزان لقاح است(۱۵). تولید رادیکال‌های آزاد در میتوکندری اسپرم موش ثابت شده است. اولین نشانه در افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش قدرت تحرک اسپرم است(۱۶). ارتباط بین افزایش رادیکال‌های آزاد و کاهش تحرک اسپرم به دلیل فسفوریلاسیون پروتئین‌های آکسونم و فلج کردن اسپرم است که هر دو آنها با کاهش سیالیت اسپرم که برای اتصال آن ضروری است، مشخص شده است(۱۷). با توجه به توضیحات فوق می‌توان این گونه برداشت کرد که مصرف داروی سولپراید باعث سوق دادن شرایط فیزیولوژیک دفاعی به سمت استرس‌های اکسیداتیو شده و با آسیب رساندن به غشاء پلاسمایی اسپرم‌ها باعث کاهش توان حرکتی آنها می‌شود. در گروه هایپرپرولاکتینمیک کاهش بارزی در تحرک اسپرم مشاهده شده است که پائین بودن معنی‌دار درصد لقاح در گروه

درمان شده با سولپراید در مقایسه با گروه‌های کنترل شم و کنترل، موید این مطلب است.

پروتامینه شدن و فشردگی ژنوم اسپرم از طریق کاهش و محدود کردن برخورد مستقیم عوامل مضر خارجی، DNA آن را در برابر استرس‌های گوناگون مقاوم می‌سازد(۱۸). هرگونه اختلال در عملکرد سلول‌های سرتولی باعث اختلال در روند پروتامیناسیون صحیح DNA اسپرم‌ها شده و احتمال تماس عوامل مضر خارجی با DNA و ایجاد شکستگی را در آن افزایش می‌دهد. هم‌چنین با شکست در هر دو یا یک رشته DNA نیز همراه است(۱۹). در این مطالعه به منظور بررسی میزان شکستگی و آسیب DNA اسپرم از رنگ آمیزی آکریدین اورنج استفاده شده که مشاهدات بیان‌گر میزان بالای اسپرم‌هایی با DNA آسیب دیده در موش‌های گروه تیمار(مصرف کننده سولپراید) در مقایسه با دو گروه دیگر درمانی است. از سویی دیگر برطبق مطالعات انکیسو و همکاران وجود آسیب در DNA اسپرم باعث ایجاد اسپرم‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی می‌گردد که وجود این اسپرم‌های غیرطبیعی نیز درصد لقاح را کاهش می‌دهد(۲۰). افزایش اسپرم‌هایی با DNA آسیب دیده با افزایش درصد اسپرم‌های مرده نیز در ارتباط است. افزایش اسپرم‌های مرده باعث کاهش درصد لقاح می‌شود(۲۱). نتایج حاصل از این مطالعه در مورد کیفیت اسپرم با نتایج حاصل از مطالعه احمدی و همکاران مطابقت دارد(۱۵).

ارتباط مستقیمی بین درصد لقاح آزمایشگاهی و میزان آسیب DNA وجود دارد. اختلال در ساختار کروماتینی اسپرم در زمان لقاح باعث اختلال در روند بیان ژنوم پدری در جنین اولیه (زیگوت) می‌شود(۲۲). هنگامی که آسیب DNA کم باشد اسپرم‌ها توانایی ظرفیت یابی برای لقاح و بارورسازی اووسیت را دارند(۲۳) ولی در صورت ایجاد آسیب شدید به DNA پتانسیل لقاح در نتیجه آسیب پراکسیداتیو به غشاء پلاسمایی به شدت کاهش می‌یابد. این اسپرم‌ها قادر نیستند تا اووسیت را در شرایط آزمایشگاهی بارور سازند(۲۴). مشاهدات نشان دادند که اسپرم‌های موش‌های هایپرپرولاکتینمیک به دلیل آسیب بالای DNA ، درصد باروری پائینی داشتند.

آسیب کروماتین اسپرم نه فقط در لقاح بلکه در رشد طبیعی جنین نیز موثر است. در مورد رشد جنینی، به نظر می‌رسد تا زمانی که اووسیت قدرت ترمیم اختلالات موجود در اسپرم را دارد، رشد صورت می‌گیرد، ولی هنگامی که قدرت ترمیمی اووسیت در مورد ترمیم DNA آسیب دیده اسپرم کاهش یابد، رشد جنینی متوقف می‌شود(۲۵). اختلال کروماتین اسپرم که باعث عدم رشد جنینی در محیط‌های برون تنی و درون تنی می‌شود، اثر تاخیری پدری (Late paternal effect)نامیده می‌شود(۲۶). تغییر در ساختار کروماتین اسپرم در آغاز و تنظیم بیان ژنوم پدری در جنین اولیه تاثیرگذار است(۲۷). توقف در رشد جنینی نیز با رونوشت برداری از این ژنوم معیوب انتقال یافته توسط اسپرم، در ارتباط است(۲۸). مشخص شده اختلال و حالات غیر طبیعی در ساختار کروماتین با کاهش میزان شکافتگی جنینی در ارتباط است که اهمیت ارتباط بین آسیب کروماتینی و پتانسیل رشد جنین را نشان می‌دهد. این حالت باعث کاهش جنین‌های دو سلولی در محیط می‌باشد(۲۹). به طور کلی عواملی هم‌چون عدم بلوغ هسته، عدم بلوغ مرفولوژیک و آسیب به غشاء اسپرم‌ها نقش مهمی در میزان لقاح و توان باروری اسپرم‌ها داراست. نیز هرگونه اختلال در فرایند بلوغ داخل اپیدیدیمی اسپرم‌ها باعث ایجاد اختلال در توان باروری آنها می‌شود(۲۹). اختلال در ساختار اسپرم باعث کاهش درصد جنین‌های تبدیل شده به بلاستوسیت(۳۰) و کیفیت پایین بلاستوسیت‌ها می‌شود(۲۸). عوامل فوق الذکر احتمالا دلیل کاهش جنین‌های دوسلولی و بلاستوسیت‌ها و نیز افزایش درصد جنین‌های متوقف شده در محیط برون تنی در گروه دریافت‌کننده سولپراید نسبت به گروه‌های دیگر است.

## نتیجه‌گیری

براساس نتایج مطالعه حاضر شواهد مهمی که نشان هنده ارتباط مستقیم بین ساختار کروماتین اسپرم و پایداری

آن و باروری در جنس نراست، وجود دارد که با ادامه رشد جنینی بعد از لقاح مشخص می‌شود. چگونگی ساختار کروماتین اسپرم در زمان لقاح بر بیان ژن‌های پدری در ادامه رشد جنین اثرگذار است. هم‌چنین زنده بودن و میزان تحرک اسپرم از عوامل بسیار مهم در تعیین درصد لقاح است که عوامل فوق در ادامه رشد جنینی به عنوان فاکتورهای ناباروری در جنس مذکر مطرح می‌گردد. بنابراین کاهش مصرف داروهایی مثل سولپراید یا جایگزین کردن آن با داروهایی با عوارض کمتر بر دستگاه تولید مثلی باعث افزایش کیفیت زندگی در بیماران خواهد بود.

## تشکر و قدردانی

در پایان از تمام کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، تشکر و قدردانی صورت می‌گیرد. این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه تحت عنوان "مطالعه اثر هایپرپرولاکتینمی ناشی از سولپراید در ساختار بافتی بیضه،کیفیت اسپرم و توان باروری در موش سوری نر" در مقطع دکترای تخصصی در سال ۱۳۹۰ و کد ۲۸۰ می‌باشد که با حمایت دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه اجرا شده است.

## منابع

1. Cutler A. Sexual dysfunction and antipsychotic treatment. Psychoneuroendocrinology. 2003;28:69-82.
2. Hamner M. The effects of atypical antipsychotics on serum prolactin levels. Annals of clinical psychiatry. 2002;14(3):163-73.
3. Clayton AH. Sexual function and dysfunction in women. Psychiatric Clinics of North America. 2003;26(3):673-82.
4. Knegtering H, Van der Moolen A, Castelein S, Kluiter H, Van Den Bosch R. What are the effects of antipsychotics on sexual dysfunctions and endocrine functioning? Psychoneuroendocrinology. 2003;28:109-23.
5. Rodriguez de La Rosa R, Eberth D, Brinkman D, Sampson S, Espinoza JL. Dinosaur tracks from the late Campanian Las Aguilas locality, southeastern Coahuila, Mexico. Journal of Vertebrate Paleontology. 2003; 23(3): 90A-1.
6. Halbreich U, Kinon B, Gilmore J, Kahn L. Elevated prolactin levels in patients with schizophrenia: mechanisms and related adverse effects. Psychoneuroendocrinology. 2003; 28: 53-67.
7. Pandiyan N. Medical drugs impairing fertility. Reproductive Health and the Environment: Springer; 2007. p. 187-205.
8. Sharpe M, Harrison PC, Gedde J. Lecture Notes: Psychiatry. Wiley-Blackwell. 2005;64-5.
9. Maitre M, Ratomponirina C, Gobaille S, Hodé Y, Hechler V. Displacement of [3H] γ-hydroxybutyrate binding by benzamide neuroleptics and prochlorperazine but not by other antipsychotics. European journal of pharmacology. 1994;256(2):211-4.
10. Ratomponirina C, Gobaille S, Hodé Y, Kemmel V, Maitre M. Sulpiride, but not haloperidol, up-regulates γ-hydroxybutyrate receptors in vivo and in cultured cells. European journal of pharmacology. 1998;346(2):331-7.
11. Hedrich HJ. The laboratory mouse (Handbook of experimental animals). 2ed ed. Academic Press, New York. 2006;439-46.
12. Rezvanfar M, Sadrkhanlou R, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Mohammadirad A, Salehnia A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Human & experimental toxicology. 2008; 27(12):901-10.
13. Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. Journal of andrology. 2001;22(1):45-53.
14. Sadeghi MR, Hodjat M, Lakpour N, Arefi S, Amirjannati N, Modarresi T, et al. Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. Avicenna journal of medical biotechnology. 2009;1(3):173-80.
15. Ahmadi A, Salami S. Evaluation of sperm quality, maturation and DNA integrity in adult mice treated with sulpiride. Tehran University of Medical Sciences. 2012;70(4).

16. Saleh RA, HCLD AA. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. Journal of andrology. 2002;23(6):737-52.
17. De Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Human Reproduction. 1995;10(suppl 1):15-21.
18. Shen GY, Chen WR, Midtgaard J, Shepherd GM, Hines ML. Computational analysis of action potential initiation in mitral cell soma and dendrites based on dual patch recordings. Journal of neurophysiology. 1999;82(6):3006-20.
19. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction. 2001; 122(4):497-506.
20. Enciso M, Cisale H, Johnston S, Sarasa J, Fernández J, Gosálvez J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. Theriogenology. 2011;76(1):23-32.
21. Hammadeh M, Al Hasani S, Rosenbaum P, Schmidt W, Hammadeh CF. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. Archives of gynecology and obstetrics. 2008; 277(6): 515-26.
22. De Jonge C. Paternal conributions to embryogenesis. Reproductive Medicine Review. 2000;8(03):203-14.
23. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biology of reproduction. 1998;59(5):1037-46.
24. Morris I, Ilott S, Dixon L, Brison D. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. Human Reproduction. 2002;17(4):990-8.
25. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. Journal of experimental zoology. 1999; 284(6):696-704.
26. Katayose H, Takayama T, Hayashi S, Sato A. Role of mammalian sperm nuclear structure in fertilization and embryo development. Reproductive Medicine and Biology. 2006; 5(3): 161-8.
27. Haaf T, Ward DC. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. Experimental cell research. 1995; 219(2): 604-11.
28. D'Occhio M, Hengstberger K, Johnston S. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. Animal reproduction science. 2007; 101(1): 1-17.
29. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez M, Sharma R, Alvarez J, Thomas A, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Human Reproduction. 2001; 16(9):1922-30.
30. Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? Human Reproduction. 1998; 13(6):1632-7.