

Assessment of Fertility in Female Offspring of Stressed Male Rats Treated with Sulpiride

Shahla Amiri¹,
Farrin Babaei-Balderlou²,
Gholamreza Najafi³

¹ MSc in Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

³ Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received May 13, 2020 ; Accepted August 11, 2020)

Abstract

Background and purpose: Chronic stress has detrimental effects on reproductive system. Offspring are likely to be vulnerable to adverse effects from antipsychotic medication and stress transmitted through gonads and gametes. The present study aimed to investigate the fertility of female rats from male rats treated with sulpiride because of chronic physical or psychological stress.

Materials and methods: In this experimental study, 36 adult male Wistar rats weighing 190 ± 10 g were divided into six groups: control, sulpiride (the antagonist of dopamine D2 receptors) (4mg/kg,bw,ip), physical or psychological stress, and physical or psychological stress that received sulpiride. After 14 days, each male rat mated with three adult female rats. The female offspring of these rats were raised in normal conditions until adulthood. Then, the ovaries and body weight, and fertility of offspring were assessed using IVF.

Results: The weight of the body and ovaries, percentage of egg cells, bicellular embryos, blastocysts, and hatched embryos after IVF, significantly reduced in offspring of stressed male rats compared with control group ($P < 0.05$). Administration of sulpiride in male rats caused further reduction of these indices in IVF results of their female offspring ($P < 0.05$). The percentage of arrested embryos did not differ significantly between the stress groups ($P > 0.05$), but administration of sulpiride significantly increased that in all groups compared with saline groups ($P < 0.05$).

Conclusion: Physical or psychological stress in parents reduced the fertility of female offspring and administration of sulpiride to parents exacerbated these disorders in offspring.

Keywords: physical stress, psychological stress, sulpiride, fertility, IVF, offspring

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (189): 24-36 (Persian).

* Corresponding Author: Farrin Babaei-Balderlou - Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
(E-mail: babaei@urmia.ac.ir)

بررسی توان باروری فرزندان ماده موش های صحرانی نر تحت استرس تیمار شده با داروی سولپیراید

شهلا امیری¹
فرین بابایی بالدرلو²
غلامرضا نجفی³

چکیده

سابقه و هدف: استرس مزمن اثرات زیانباری بر دستگاه تولیدمثل دارد. احتمال دارد عوارض ناشی از استرس و یا مصرف داروهای آنتی سایکوتیک با اثر بر گنادها و سلول های جنسی به فرزندان منتقل شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی توان باروری موش های ماده حاصل از موش های نر تحت تأثیر استرس مزمن فیزیکی یا روانی تیمار شده با داروی سولپیراید بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، 36 رأس موش صحرایی نر بالغ و بیستار به 6 گروه شامل: گروه های کنترل، سولپیراید (آنتاگونیست گیرنده های D2 دوپامینی) (4mg/kg, bw, ip)، استرس فیزیکی یا روانی و استرس فیزیکی یا روانی دریافت کننده سولپیراید تقسیم شدند. در پایان تیمار 14 روزه، هر موش نر با سه موش ماده بالغ جفتگیری نمود، فرزندان ماده حاصل از این موش ها تا سن بلوغ پرورش یافتند. سپس وزن بدن و تخمدان ها و توان باروری فرزندان با روش IVF ارزیابی شد.

یافته ها: وزن بدن و تخمدان ها، درصد سلول های تخم، جنین های دوسلولی، بلاستوسیست ها و جنین های هچ شده پس از IVF در فرزندان ماده موش های نر تحت استرس در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری یافت ($P < 0/05$). تجویز سولپیراید به والدین باعث کاهش هر چه بیش تر شاخص های مذکور در نتایج IVF فرزندان ماده شد ($P < 0/05$). درصد جنین های متوقف شده حاصل از IVF در گروه های تحت استرس اختلاف معنی داری نداشت ($P > 0/05$), اما تجویز سولپیراید در تمام گروه ها سبب افزایش معنی دار این شاخص در مقایسه با گروه های سالی ن شد ($P < 0/05$).

استنتاج: اعمال استرس فیزیکی یا روانی در والدین توان باروری فرزندان ماده را کاهش داد. تجویز سولپیراید به والدین باعث تشدید این اختلالات در فرزندان شد.

واژه های کلیدی: استرس فیزیکی، استرس روانی، سولپیراید، باروری، IVF، فرزند

مقدمه

جهانی (WHO) تحت تاثیر عوامل چندگانه محیطی (شرایط فیزیکی، شیمیایی، بیولوژیکی، رفتاری، اجتماعی و اقتصادی) است (1).
اختلال در فرایند تولیدمثل موجب بروز ناباروری

تولیدمثل فرآیند زیست شناختی است که طی آن موجود زنده جدید و منحصر به فردی به وجود می آید. زادآوری از خصوصیات بنیادی تمام انواع حیوانات است. سلامت تولید مثل بر اساس تعریف سازمان بهداشت

E-mail: f.babaei@urmia.ac.ir

مؤلف مسئول: فرین بابایی بالدرلو: ارومیه، دانشگاه ارومیه، پردیس نازلو، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

1. کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

2. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

3. دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: 1399/2/24 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/2/28 تاریخ تصویب: 1399/5/21

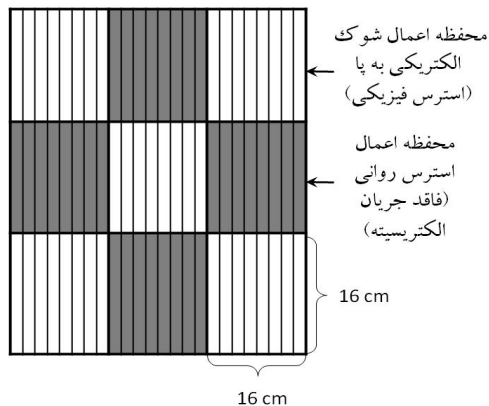
روانی از طریق کاهش ترشح استرادیول از سلول های گرانولوزا و با هدف قرار دادن تخمدان، فولیکول و تخمک سبب اختلال در فعالیت تولیدمثلی می گردد (12). مطالعاتی که پیش از این انجام شده اند عمدتاً آثار سوء استرس دوران بارداری را در فرزندان ثابت کرده اند (13، 14)، با این وجود در مطالعه حاضر برای اولین بار احتمال تأثیر استرس در والد نر بر توان باروری فرزندان ماده مورد بررسی قرار گرفت.

امروزه برای کنترل عوارض روانی و افسردگی ناشی از استرس از داروهای ضد روان پریشی (Antipsychotic) مختلف استفاده می شود. سولپیراید (Sulpiride) یک ترکیب بنز آمیدی است که جزو داروهای آنتی سایکوتیک محسوب می شود و به طور عمده برای درمان بیماری های روان پریشی مورد استفاده قرار می گیرد. این دارو به طور انتخابی گیرنده D2 دوپامینی را مسدود می کند (15). همچنین سولپیراید برای درمان بیماری های هانگتینگتون، زخم دوازدهه، افسردگی، اضطراب و تشویش تجویز می شود و ممکن است عوارض جانبی مانند خواب آلودگی، سردرد، سرگیجه، کاهش تمایلات جنسی، کاهش تستوسترون و اضافه وزن نیز داشته باشد (16). سولپیراید با مهار گیرنده D2 دوپامینی در توبرو اینفاندیبولار اثر مهاری دوپامین بر ترشح پرولاکتین را از بین می برد (17). مصرف مداوم سولپیراید از طریق هیپر پرولاکتینمی منجر به هیپوگنادی، اختلالات تولیدمثلی و اختلالات اسپرمی می شود (17، 18). عوارض جانبی که برخی از داروها ممکن است بر سیستم تولیدمثلی داشته باشند احتمال دارد با ایجاد تغییرات ساختاری یا ژنومی در گامت ها به فرزندان نسل بعد نیز منتقل گردد. با توجه به موارد استفاده درمانی سولپیراید برای کنترل برخی عوارض ناشی از استرس (19، 20) و نیز با توجه به یافته های موجود در خصوص اثرات سوء داروی سولپیراید بر سیستم تولیدمثلی (16، 21)، مطالعه حاضر با هدف بررسی عوارض احتمالی این دارو بر توان باروری و عملکرد تولیدمثلی فرزندان ماده موش های نر تحت استرس که

می شود. ناباروری یکی از مهم ترین بحران های زندگی است که به عنوان یک مساله جدی می تواند به بهداشت خانوادگی جامعه صدمه بزند (2). ناباروری امری شایع است که یک ششم زوج ها با آن درگیر هستند (3). رایج ترین دلیل ناباروری زنان که 30 درصد ناباروری را به خود اختصاص می دهد معمولاً مربوط به تخمک گذاری می باشد (4). اهمیت عوامل ژنتیکی، محیطی و شغلی از جمله انواع استرس ها در بروز ناباروری ثابت شده است (3). استرس بخش جدایی ناپذیری از زندگی انسان ها و حیوانات می باشد. موجودات همواره تحت تاثیر محرک های استرس زا قرار می گیرند و این محرک ها اثرات خود را به صورت مثبت یا منفی نشان می دهند (5). الگوهای استرس را می توان به دو دسته اصلی استرس فیزیکی و استرس روانی تقسیم کرد که از طریق مولفه های متفاوت اعمال می شوند (6). عوامل استرس زای فیزیکی و روانی سبب فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (Hypothalamo-Pituitary-Adrenal:HPA) می شوند که به نوبه خود منجر به سرکوب فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گنناد (Hypothalamo-Pituitary-Gonad:HPG) می شوند. این امر تغییراتی را در فعالیت هر دو محور ایجاد کرده و تولید مثل را کاهش می دهد (7). نشان داده شده است که سلول های زایا (Germ cells) در غدد جنسی نسبت به محرک های استرس زا بسیار حساس هستند؛ به طوری که این سلول ها در معرض استرس های متعدد دچار تغییر در بیان ژن های پاسخ به استرس می شوند که در نهایت بر روی عملکرد سلول اثر می گذارد (8). تحقیقات نشان داده اند که استرس های محیطی با تغییر مورفولوژی و ماده ژنتیکی اسپرم سبب کاهش کیفیت و تحرک اسپرم ها می شوند (9، 10). از طرفی استرس از طریق افزایش سطوح کورتیزول باعث آپوتوز در سلول های جنسی و لیدینگ و در نتیجه اختلال در عملکرد بیضه می شود (10). همچنین استرس روانی مزمن سبب اتوفازوی در بیضه موش های صحرایی نر می شود (11). در جنس ماده نیز استرس

اعمال استرس فیزیکی یا روانی

برای القای استرس فیزیکی و روانی از یک جعبه شیشه‌ای به نام جعبه ارتباطی (Communication box) با ابعاد (50×50×50cm) استفاده شد. این جعبه بر اساس مشخصات جعبه ارتباطی Ataka و همکاران توسط محققان ساخته شد (22). این جعبه شامل 9 خانه مربعی شکل با ابعاد 16 در 16 سانتی‌متر می‌باشد که به صورت شطرنجی پنج خانه آن قابلیت هدایت جریان الکتریسیته با جریان 2 میلی‌آمپر و ولتاژ 48 ولت و فرکانس 0/5 هرتز و چهارخانه آن قابلیت هدایت جریان الکتریسیته و کاملاً عایق می‌باشد. حیوانات روزانه به مدت 60 دقیقه (در هر دقیقه دو بار به مدت ده ثانیه) در معرض جریان الکتریسیته قرار گرفتند. در این مطالعه شوک الکتریکی کف پا به طور تصادفی بین ساعات 9 الی 13 القا شد. استرس فیزیکی در موش‌ها با برقراری جریان الکتریسیته و برق‌گرفتگی و لرزش مستقیم القا می‌شد، موش‌های گروه استرس فیزیکی با ایجاد سر و صدا و متساعد کردن بوی خاص در زمان برق‌گرفتگی، سبب ایجاد استرس (استرس روانی) در موش‌های موجود در 4 خانه عایق می‌شدند. از آن‌جا که این 4 موش در خانه‌های عایق جریان الکتریسیته بودند و فقط شاهد موش‌های در معرض استرس فیزیکی بودند، در گروه استرس روانی جای گرفتند (22) (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: جعبه ارتباطی برای القای استرس فیزیکی و روانی

داروی سولپیراید مصرف کردند طراحی و اجرا شد. پیش از این، تأثیر استرس یا عوارض جانبی ناشی از مصرف سولپیراید تحت استرس بر سلامت فرزندان حاصل از والدین مصرف‌کننده این دارو مورد بررسی قرار نگرفته است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه تجربی برای نسل‌گیری، از 36 راس موش صحرائی نر بالغ جوان 90 روزه از نژاد ویستار با محدوده وزنی 10 ± 190 گرم استفاده شد. حیوانات در قفس‌های استاندارد نگهداری شده و در تمام مدت آزمایش به استثنای زمان اعمال استرس به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. دمای محیط نگهداری آن‌ها نیز 2 ± 22 درجه سانتی‌گراد و سیکل نوری آن‌ها 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی بود. تمام حیوانات طبق دستورالعمل نگهداری و کار با حیوانات کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیستی دانشگاه ارومیه نگهداری شدند (کد کمیته اخلاق دانشگاه ارومیه: IR-UU-AEC-61/DA3).

حیوانات در 6 گروه 6 تایی به صورت تصادفی به شرح ذیل تقسیم‌بندی شدند: گروه کنترل (دریافت روزانه 1 میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نرمال سالیان به صورت درون صفاقی)، گروه سولپیراید (دریافت روزانه 4 mg/kg bw سولپیراید به صورت محلول در نرمال سالیان)، گروه‌های استرس فیزیکی و استرس روانی (روزانه 20 دقیقه بعد از دریافت 1 ml/kg آنرمال سالیان به صورت درون صفاقی، در دستگاه شوک الکتریکی پا قرار می‌گرفتند)، گروه‌های استرس فیزیکی + سولپیراید و استرس روانی + سولپیراید (روزانه 20 دقیقه بعد از دریافت 4 mg/kg سولپیراید به صورت درون صفاقی، در دستگاه شوک الکتریکی پا قرار می‌گرفتند). غلظت داروی سولپیراید براساس مطالعه Benelli و همکاران انتخاب گردید (19). اعمال استرس نیز براساس مطالعه Ataka و همکاران انجام شد (22) که در ذیل شرح داده شده است. تیمار حیوانات به مدت 14 روز ادامه یافت (23).

جفت گیری و تولد فرزندان

در این مطالعه، هر موش نر پس از پایان دوره تیمار با سه موش ماده بالغ جوان که یک بار سابقه باروری داشتند و در مرحله استروس بودند در یک قفس گذاشته شدند. مشاهده پلاک واژنی و وجود اسپرم در اسمیر واژینال موش ماده در صبح روز بعد نشان دهنده آمیزش بوده و به عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. بعد از 21 روز با تولد فرزندان دوره بارداری به پایان رسید (24). فرزندان قبل از بلوغ از یکدیگر جدا شدند. فرزندان ماده در شرایط دمایی و نوری والدین خود بدون اعمال هیچ گونه استرس یا تیمار و با دسترسی آزاد به آب و غذا و جهت اطمینان از بلوغ جنسی و تکامل مسیرهای تولید مثلی تا روز پنجاهم بعد از تولد (25) نگهداری شدند. فرزندان ماده در روز پنجاهم پس از تولد، توسط ترازوی دیجیتالی با حساسیت 0/0001 (6110 BALANCE, Sartorius for tecator) توزین شدند و سپس مورد بررسی از جهت توان باروری قرار گرفتند.

استحصالی تخمک و باروری برون تنی (IVF: In Vitro Fertilization)

جهت انجام باروری برون تنی ابتدا اووسیت ها در مرحله متافاز 2 از موش های ماده که فرزندان موش های نر تحت تیمار بودند اخذ گردید. پس از پایان دوره تیمار برای به دست آوردن اووسیت جهت بررسی درصد سلول تخم و مقایسه روند تکاملی جنین های حاصل از لقاح آزمایشگاهی در گروه های مختلف، نیاز به تحریک تخمک گذاری در موش های ماده بود که به صورت زیر انجام گرفت. بعد از پایان دوره تیمار ابتدا به موش های ماده بالغ 25 واحد (International Unit :IU) هورمون (PMSG) Pregnant Mare Serum Gonadotropin با حجم 0/2 میلی لیتر و 54-56 ساعت بعد، 15 واحد IU هورمون (hCG) Human Chorionic Gonadotropin با حجم 0/2 میلی لیتر به روش داخل صفاقی تزریق شد. تخمک گذاری معمولاً 14-16 ساعت بعد از تزریق

hCG آغاز می شود. این موش ها پس از بیهوشی به وسیله تزریق داخل صفاقی زایلازین به میزان 3 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و کتامین 10 درصد به میزان 75 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش و توسط جابه جایی مهره های گردنی آسان کشی شدند، سپس محوطه شکمی حیوان باز شده و تخمک گیری با استفاده از روش شکافتن آمپول اویدکت توسط سرنگ انسولینی گیج 28 انجام گرفت. اووسیت های به دست آمده به قطرات لقاح حاوی محیط کشت Modified Rat 1-Cell Embryo Culture Medium (mRIECM) حاوی 4 میلی گرم به ازای هر میلی لیتر محیط، سرم آلبومین گاوی (BSA: Bovine Serum Albumin) منتقل شدند. داخل هر پتری دیش استریل یک قطره 500 میکرولیتری برای لقاح و یک قطره 100 میکرولیتری حاوی محیط کشت mRIECM ترکیب شده با 4 mg/ml (BSA) برای شست و شو گذاشته شد و در آخر روی سطح قطرات با روغن معدنی (Mineral oil) پوشانده شد. محیط کشت برای لقاح آزمایشگاهی از روز قبل تهیه و سپس به مدت 12 ساعت در انکوباتور با ترکیب گازی 5 درصد CO₂ و دمای 37 درجه سانتی گراد قرار داده شد. برای لقاح اووسیت، از اسپرم موش های نر بالغ سالم استفاده شد. بدین منظور ابتدا باید اسپرم ها ظرفیت یابی می شدند. لذا موش های نر بعد از بیهوشی آسان کشی شدند و جهت ظرفیت یابی اسپرم ها، دم اپیدیدیم بعد از ایجاد چند برش در داخل لوله های اپندروف محتوی 1 میلی لیتر محیط کشت mRIECM قرار داده شد و به مدت یک ساعت در انکوباتور با ترکیب گازی 5 درصد CO₂ و دمای 37 درجه سانتی گراد انتقال داده شد. سپس اسپرم ها به تعداد یک میلیون اسپرم ظرفیت یابی شده در ازای هر میلی متر محیط کشت به قطرات لقاح اضافه شدند. ویژگی سلول های تخم (زیگوت) شامل بررسی پیش هسته های نر و ماده، 6 ساعت پس از اضافه کردن اسپرم ها، در هر گروه مورد بررسی قرار گرفت و به صورت درصد لقاح بیان شد.

تخمندان فرزندان موش‌های نر تحت تیمار در مقایسه با فرزندان گروه کنترل گردید ($P < 0/05$). تجویز سولپیراید به موش‌های نر دریافت‌کننده استرس فیزیکی یا روانی سبب کاهش معنی‌دار در وزن تخمدان فرزندان در مقایسه با فرزندان گروه سولپیراید گردید ($P < 0/05$).

جدول شماره 1: اثر استرس و داروی سولپیراید بر وزن بدن و وزن تخمدان در فرزندان ماده بالغ موش‌های نر تحت تیمار

گروه	وزن بدن (گرم)	وزن تخمدان (گرم)	نسبت وزن تخمدان به بدن (درصد)
کنترل	153/16 ± 2/4 ²	0/0480 ± 0/040 ²	0/031 ^{a,b}
سولپیراید	115/33 ± 4 ^{b,c}	0/035 ± 0/023 ^c	0/030 ^b
استرس فیزیکی	115/33 ± 2/59 ^b	0/0410 ± 2 ^{b,c}	0/034 ^a
استرس فیزیکی + سولپیراید	102/00 ± 4/7 ^d	0/0260 ± 0/020 ^d	0/026 ^c
استرس روانی	143/16 ± 2/18 ^b	0/0450 ± 0/025 ^{a,b}	0/031 ^{a,b}
استرس روانی + سولپیراید	107/33 ± 3 ^{c,d}	0/0250 ± 0/021 ^d	0/024 ^c

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف ($P < 0/05$) است. تمامی داده‌ها به صورت Mean ± SD گزارش شده‌اند.

درصد تغییرات وزن تخمدان به وزن بدن نسبت به هم در گروه‌های استرس فیزیکی و استرس روانی نسبت به کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$) اما در گروه‌های دریافت‌کننده استرس و سولپیراید نسبت به سولپیراید کاهش معنی‌داری یافته است ($P < 0/05$). درصد تغییرات وزن تخمدان به وزن بدن در گروه سولپیراید نسبت به کنترل اختلاف معنی‌دار داشت ($P > 0/05$)؛ همچنین این شاخص در گروه استرس روانی + سولپیراید نسبت به استرس روانی و استرس فیزیکی + سولپیراید نسبت به استرس فیزیکی کاهش معنی‌داری یافته بود ($P < 0/05$).

مطابق نمودار شماره 1، درصد سلول‌های تخم حاصل از لقاح آزمایشگاهی در گروه استرس فیزیکی و استرس روانی نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری یافته بود ($P < 0/05$). همچنین این پارامتر در گروه‌های دریافت‌کننده سولپیراید اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه‌های کنترل نشان داد ($P < 0/05$). درصد سلول‌های تخم در گروه‌های سولپیراید نسبت به کنترل و استرس روانی + سولپیراید نسبت به استرس روانی و استرس فیزیکی + سولپیراید در مقایسه با استرس فیزیکی کاهش معنی‌داری یافته بود ($P < 0/05$).

همچنین تعداد جنین‌های دو سلولی بعد از گذشت 24 ساعت از زمان لقاح، و بلاستوسیست‌ها 4 روز بعد از لقاح و جنین‌های هچ شده و جنین‌های متوقف شده 5 روز بعد از لقاح با نگهداری آن‌ها در محیط کشت در داخل انکوباتور بررسی گردیدند (26).

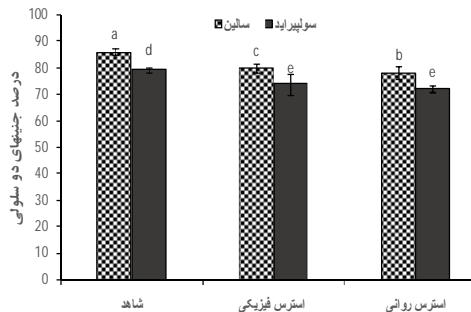
محاسبات آماری

آنالیز آماری داده‌ها در بین گروه‌ها توسط نرم‌افزار ANOVA (version 21.00) SPSS به کمک آزمون ANOVA یک طرفه و پس از آزمون دانکن و بررسی اثر متقابل گروه‌ها با آزمون ANOVA دو طرفه صورت پذیرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد و مقدار $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

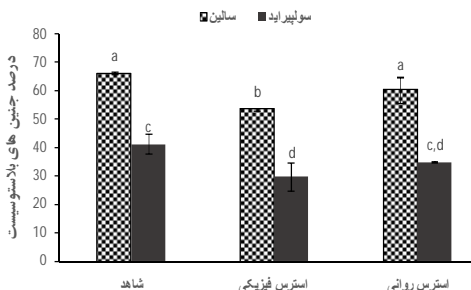
تغییرات وزن بدن و وزن تخمدان و درصد تغییرات آن‌ها نسبت به هم در فرزندان ماده موش‌های نر تحت تیمار در جدول شماره 1 ارائه شده است. نتایج نشان دادند که استرس فیزیکی سبب کاهش معنی‌دار در وزن بدن موش‌های ماده حاصل از موش‌های تحت استرس فیزیکی نسبت به گروه کنترل گردید ($P < 0/05$). اما استرس روانی تغییر معنی‌داری را در این شاخص ایجاد نکرد ($P > 0/05$). تجویز سولپیراید به تنهایی یا همراه با دریافت استرس فیزیکی یا روانی سبب کاهش معنی‌دار در وزن بدن فرزندان ماده در مقایسه با فرزندان گروه‌های سالی‌ن و استرس فیزیکی و روانی دریافت‌کننده سالی‌ن گردید ($P < 0/05$). اما تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دریافت‌کننده سولپیراید در شاخص مذکور مشاهده نشد ($P > 0/05$).

مطابق جدول شماره 1، وزن تخمدان در فرزندان گروه استرس فیزیکی نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری یافته است ($P < 0/05$). اما در فرزندان گروه استرس روانی نسبت به کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$). تجویز سولپیراید به تنهایی سبب کاهش معنی‌دار در وزن

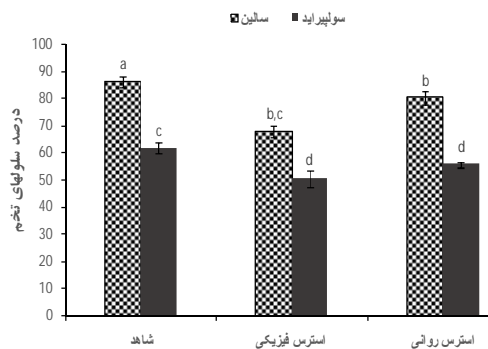


نمودار شماره 2: درصد جنبش های دوسلولی؛ حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین آن گروه ها می باشد ($P < 0/05$) و گروه هایی که حرف مشابه گرفته اند اختلاف معنی دار با یکدیگر ندارند ($P > 0/05$). داده ها به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شده اند.

نمودار شماره 3 نشان دهنده تعداد بلاستوسیست ها و روند رشد جنین می باشد. بررسی درصد جنین هایی که بعد از 5 روز به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند نشان داد که در گروه استرس فیزیکی نسبت به کنترل کاهش معنی داری وجود دارد ($P < 0/05$) اما استرس روانی نسبت به کنترل اختلاف معنی داری را در درصد بلاستوسیست ها نشان نداد ($P > 0/05$). درصد بلاستوسیست ها در گروه استرس فیزیکی + سولپیراید نسبت به سولپیراید کاهش معنی داری یافته بود ($P < 0/05$) اما این شاخص گروه استرس روانی + سولپیراید نسبت به استرس روانی اختلاف معنی داری نیافته بود ($P > 0/05$). درصد جنین های بلاستوسیست در گروه های مورد مطالعه نسبت به کنترل خود کاهش معنی داری یافته بودند ($P < 0/05$).

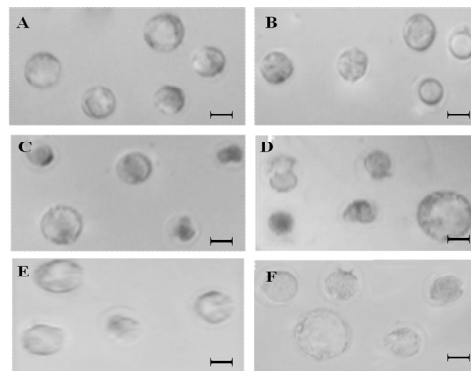


نمودار شماره 3: درصد جنین های بلاستوسیست، حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین آن گروه ها می باشد ($P < 0/05$) و گروه هایی که حرف مشابه گرفته اند اختلاف معنی دار با یکدیگر ندارند ($P > 0/05$). داده ها به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شده اند.



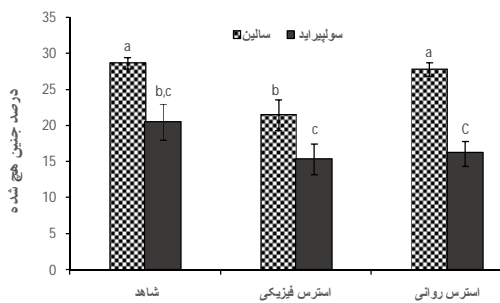
نمودار شماره 1: درصد سلول های تخم حاصل از لقاح آزمایشگاهی؛ حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین آن گروه ها می باشد ($P < 0/05$) و گروه هایی که حرف مشابه گرفته اند اختلاف معنی دار با یکدیگر ندارند ($P > 0/05$). داده ها به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شده اند.

تصویر شماره 2 تعدادی از سلول های تخم حاصل از هر گروه را نشان می دهد. در نمودار شماره 2 مقایسه درصد جنین های دو سلولی در گروه های استرس فیزیکی و استرس روانی نسبت به کنترل کاهش معنی داری یافته بود ($P < 0/05$) همچنین شاخص مورد مطالعه در گروه های استرس فیزیکی + سولپیراید و استرس روانی + سولپیراید نسبت به سولپیراید کاهش معنی داری یافته بود ($P < 0/05$) در گروه های آزمایشی درصد جنین های دو سلولی نسبت به گروه کنترل خود کاهش معنی داری یافته بودند ($P < 0/05$).

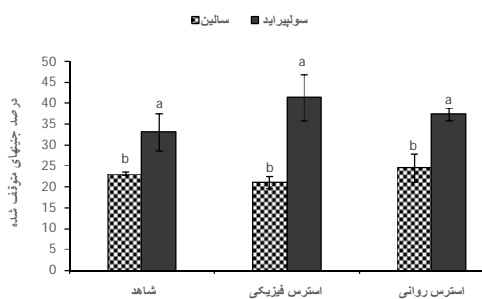


تصویر شماره 2: سلول های تخم حاصل از لقاح آزمایشگاهی در گروه های مختلف تحت تیمار، کنترل (A)، سولپیراید (B)، استرس فیزیکی (C)، استرس فیزیکی + سولپیراید (D)، استرس روانی (E)، استرس روانی + سولپیراید (F) نشان داده شده است؛ درشت نمایی $\times 400$ و خط مقیاس = 50 میکرومتر

طبق اطلاعات جدول شماره 2، دو نوع استرس فیزیکی و روانی تفاوت معنی دار در وزن بدن، درصد جنین های دو سلولی و بلاستوسیت داشته اند ($P < 0/05$) و در سایر شاخص ها تفاوت معنی داری نداشتند ($P > 0/05$). همچنین تیمار سولپیراید در تمام شاخص ها تفاوت معنی داری را در مقایسه با گروه های سالیین ایجاد کرد ($P < 0/05$). بررسی اثر متقابل استرس و تیمار در هیچ کدام از شاخص ها تفاوت معنی داری را نشان نداد ($P < 0/05$).



نمودار شماره 4: درصد جنین های متوقف شده حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین آن گروه ها می باشد ($P < 0/05$) و گروه هایی که حرف مشابه گرفته اند اختلاف معنی دار با یکدیگر ندارند ($P > 0/05$). داده ها به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شده اند.



نمودار شماره 5: درصد جنین های متوقف شده، حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین آن گروه ها می باشد ($P < 0/05$) و گروه هایی که حرف مشابه گرفته اند اختلاف معنی دار با یکدیگر ندارند ($P > 0/05$). داده ها به صورت $Mean \pm SD$ گزارش شده اند.

نمودار شماره 4 نشان می دهد که درصد جنین های متوقف شده در گروه استرس فیزیکی نسبت به کنترل کاهش معنی داری یافته است ($P < 0/05$). اما استرس روانی نسبت به کنترل اختلاف معنی داری را در درصد جنین های متوقف شده نشان نداد ($P > 0/05$). شاخص مورد مطالعه در گروه های استرس فیزیکی + سولپیراید و استرس روانی + سولپیراید نسبت به سولپیراید کاهش معنی داری یافته بود ($P < 0/05$). درصد جنین های متوقف شده در گروه های مورد مطالعه نسبت به کنترل خود کاهش معنی داری یافته بودند ($P < 0/05$).

طبق نمودار شماره 5، درصد جنین های متوقف شده در گروه های تحت استرس و سولپیراید اختلاف معنی داری را نشان نداد ($P > 0/05$). درصد جنین های متوقف شده در گروه های سولپیراید نسبت به کنترل، استرس فیزیکی + سولپیراید نسبت به استرس روانی و استرس روانی + سولپیراید نسبت به استرس روانی افزایش معنی داری یافته بود ($P < 0/05$).

نتایج اصلی تحلیل واریانس دو طرفه در جدول شماره 2 (جدول اثرات بین آزمودنی) نشان داده شده است. در جدول شماره 2 سطح معنی داری (P) برای متغیرهای مستقل و اثر متقابل آن ها به طور آماری نشان داده شده است. $P < 0/05$ سطح معنی داری در نظر گرفته شد. متغیرهای وابسته شامل درصد سلول های وزن بدن فرزندان ماده و وزن تخمدان آن ها، درصد سلول های تخم، جنین های دو سلولی، بلاستوسیت، جنین های متوقف شده و متوقف شده می باشند. متغیرهای مستقل شامل انواع استرس (استرس فیزیکی و استرس روانی) و انواع تیمار (سالیین و سولپیراید) می باشد. اثرات متقابل انواع استرس و تیمار نیز برای هر یک از متغیرهای وابسته نشان داده شده است.

جدول شماره 2: سطح معنی داری (P) متغیرهای مستقل و اثر متقابل آن ها حاصل از آنالیز واریانس دو طرفه

متغیرهای عامل	متغیر وابسته	وزن بدن	وزن تخمدان	درصد سلول های تخم	درصد جنین های دو سلولی	درصد بلاستوسیت	درصد جنین های متوقف شده	درصد جنین های متوقف شده
استرس	0/005	0/671	0/334	0/008	0/013	0/119	0/935	
تیمار	0/000	0/006	0/030	0/000	0/000	0/005	0/003	
استرس * تیمار	0/052	0/488	0/140	0/115	0/227	0/387	0/195	

$P < 0/05$ سطح معنی داری در نظر گرفته شده است.

بحث

در مطالعه حاضر توان باروری فرزندان ماده موش های صحرایی نر که تحت استرس فیزیکی یا روانی قرار داشتند و با داروی سولپیراید تیمار شدند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که اولاً وزن بدن و وزن تخمدان در فرزندان ماده حاصل از این موش های نر دچار تغییرات کاهشی معنی داری شد. همچنین یافته های حاصل از لقاح برون تنی تخمک های حاصل از فرزندان ماده موش های تحت استرس نشان داد که اختلاف معنی داری در میانگین درصد سلول های تخم، درصد جنین های دو سلولی، درصد بلاستوسیست و درصد جنین های هچ شده با گروه های کنترل وجود داشت. تیمار موش های نر با سولپیراید سبب کاهش معنی دار و هرچه بیش تر توان باروری فرزندان ماده گردید. تغییرات معنی دار مشاهده شده در موش های ماده احتمالاً ناشی از اعمال استرس به والد نر و تیمار آن ها با سولپیراید بوده است. لذا بررسی علت بروز این تغییرات در فرزندان را باید در والد نر ریشه یابی نمود.

تحقیقات نشان داده اند که تغییر در مورفولوژی و ماده ژنتیکی اسپرم که ممکن است تحت تأثیر استرس های محیطی ایجاد شود، تاثیر عمده ای در بروز اختلالات تولیدمثلی داشته باشد (9). قرار گرفتن در معرض استرس های مزمن فعالیت محور HPA را افزایش و همزمان فعالیت محور HPG را کاهش می دهد. این رابطه آنتاگونیستی ناشی از استرس بین دو محور مبنای ناباروری می باشد (7). مطالعات صورت گرفته بر روی مایع منی در مردانی که تحت استرس قرار گرفته بودند نشان داد که افزایش استرس سبب کاهش کیفیت اسپرم، کم تحرکی اسپرم و افزایش درصد اسپرم های غیرطبیعی می شود و از طرفی استرس عملکرد بیضه را مختل می کند زیرا بافت بیضه تحت استرس و سطوح بالای کورتیزول آپوپتوز را در سلول های جنسی و لیدینگ نشان می دهد (10). علاوه بر این استرس روانی مزمن سبب اتوفازای بافت بیضه نیز می شود (11). مطالعات نشان داده اند که استرس در موش نر

علاوه بر کاهش غلظت هورمون های جنسی و کاهش کیفیت مایع منی سبب کاهش ظرفیت لقاح درونی می گردد (27,9). نشان داده شده است که افسردگی ناشی از استرس بر ساختار و عملکرد غدد جنسی و همچنین بر کیفیت مایع منی، میزان قطعه قطعه شدن DNA و افزایش استرس اکسیداتیو در اندام های تولیدمثلی اثر می گذارد (28). در مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داده شد که اعمال استرس مزمن اعم از فیزیکی یا روانی به موش های نر بر سیستم تولیدمثلی فرزندان ماده موش های تحت تیمار نیز تأثیر گذاشته و سبب ایجاد اختلال در آن ها شده است. احتمال می رود مطابق با مطالعات پیشین، استرس سبب آسیب دیدگی ماده ژنتیکی اسپرم در موش های والد شده و این آسیب دیدگی به صورت اختلالات تولیدمثلی در افراد نسل بعد بروز پیدا کرده است؛ به طوری که قدرت باروری فرزندان ماده حاصل از موش های نر تحت استرس به میزان قابل توجهی کاهش یافت و درصد سلول های تخم و درصد سلول هایی که به روند طبیعی رشد خود ادامه داده بودند تقریباً در تمام گروه های متأثر از استرس کاهش یافته بود. نکته قابل توجه این است که بر اساس نتایج حاصل، در تیمارهای مشابه، اثرات سوء استرس روانی در اغلب شاخص های مورد بررسی تقریباً با اثرات سوء ناشی از استرس فیزیکی برابری می کند، اگرچه به طور غیر معنی دار تأثیر استرس فیزیکی بیش تر بود. در مطالعه حاضر تفاوت معنی داری در درصد جنین های متوقف شده بین گروه های متأثر از استرس با گروه کنترل مشاهده نشد. از آنجایی که ترتیب مراحل رشد جنین ها بعد از تشکیل سلول تخم شامل ایجاد جنین های دو سلولی، بلاستوسیت، هچ و سپس متوقف شده می باشد، به نظر می رسد که در گروه های تحت استرس تعداد بیش تری از سلول ها در مراحل قبل از رسیدن به مرحله توقف رشد دچار آتروفی می شوند بنابراین در گروه های تحت استرس درصد کم تری از سلول ها به این مرحله می رسند که در مقایسه با گروه کنترل باعث ایجاد تفاوت غیر معنی دار می شوند. علاوه بر این، استرس در والد نر

داده شده است که سولپیراید، آنتاگونیست گیرنده‌های D2 دوپامینی و از دسته داروهای ضد روان‌پریشی، دارای اثرات منفی بر پارامترهای اسپرمی است و مصرف مداوم آن منجر به هیپوگنادی می‌شود (18). به طوری که اختلالات جنسی یکی از مهم‌ترین عوارض مصرف داروهای آنتی‌سایکوتیک به شمار می‌رود (29). احتمال دارد سولپیراید از طریق مکانیسم‌های مختلفی بر سیستم تولیدمثلی افراد اثر بگذارد. این دارو با مهار گیرنده D2 دوپامینی در توپرواینفاندیولار اثر مهاری دوپامین بر سلول‌های لاکتوتروف را در هیپوفیز از بین می‌برد و باعث افزایش ترشح پرولاکتین و ایجاد هیپرپرولاکتینمی می‌شود (17، 30). پرولاکتین موجب به تأخیر افتادن بلوغ جنسی، کاهش وزن گندها و کاهش فعالیت جنسی می‌شود و می‌تواند سبب سقط جنین گردد (21). احتمال دارد سولپیراید با افزایش پرولاکتین خون موجبات بروز اختلال در اسپرم‌ها و سیستم تولیدمثلی افراد مصرف کننده را فراهم آورد. از سوی دیگر مهار گیرنده‌های D2 دوپامینی باعث افزایش ترشح دوپامین و تشدید سیگنالینگ مسیره‌های دوپامینرژیک می‌شود (31، 32). همچنین افزایش غلظت دوپامین به صورت موضعی منجر به القای استرس اکسیداتیو می‌گردد (33، 34). دوپامین به علت داشتن گروه‌های هیدروکسیل، مستعد تولید ماده بسیار فعال دوپامین کینون می‌باشد که تولید رادیکال‌های فعال به روش آنزیمی و اتواکسیداسیونی را افزایش می‌دهد (35). Tiwari و همکاران نشان داده‌اند که تجویز سولپیراید با افزایش سیگنالینگ مسیره‌های دوپامینرژیک سبب کاهش محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز می‌گردد (33). لذا تجویز سیستمیک سولپیراید، مشابه آنچه که در مطالعه حاضر انجام شد، ممکن است در بافت‌هایی مانند مغز و بیضه که گیرنده D2 دوپامینی را دارند (36) سبب تشدید سیگنالینگ دوپامین و افزایش فرآیندهای اکسیداتیو و آسیب موضعی در آن بافت‌ها شود. با این وجود مقدار طبیعی دوپامین برای فعالیت‌های طبیعی اندام‌های تولیدمثلی لازم و مفید

منجر شد تا وزن بدن و وزن تخمدان نیز در فرزندان ماده کاهش یابد. اگرچه کاهش وزن بدن و تخمدان در هر دو گروه استرس فیزیکی و روانی مشهود بود اما استرس فیزیکی بیش‌تر از استرس روانی باعث کاهش وزن بدن گردید. احتمال می‌رود استرس فیزیکی بیش از استرس روانی بر عملکرد مسیره‌های متابولیکی تنظیم وزن مؤثر باشد و باعث کاهش وزن بدن شود. تعیین دقیق مکانیسم درگیر در این فرآیند نیازمند طراحی مطالعات اختصاصی برای بررسی اثر استرس والدی بر وزن بدن فرزندان می‌باشد. پیش از این مطالعه‌ای در خصوص بررسی تأثیر استرس بر عملکرد تولیدمثلی فرزندان انجام نگرفته بود. در مطالعه حاضر همچنین مشاهده شد که تجویز سولپیراید، به تنهایی باعث ایجاد اختلالات جنسی در فرزندان شد و هنگامی که مصرف آن با اعمال استرس همراه شد سبب تشدید این اختلالات گردید. با این وجود اثرات استرس فیزیکی به همراه سولپیراید در هیچ یک از شاخص‌ها تفاوت معنی‌داری با اثرات استرس روانی به همراه سولپیراید نداشت. نکته قابل توجه در بین گروه‌های دریافت‌کننده سولپیراید، در مورد وزن بدن و تخمدان است؛ اگرچه وزن بدن در گروه استرس فیزیکی + سولپیراید کم‌تر از گروه استرس روانی + سولپیراید بود، اما در مورد وزن تخمدان در این دو گروه، موضوع برعکس است. با اینکه این تفاوت‌ها معنی‌دار نیستند اما می‌توان گفت اگرچه به ظاهر وزن بدن در گروه استرس روانی + سولپیراید بیش‌تر است ولی تجویز سولپیراید به گروه استرس روانی باعث کاهش 25 درصدی وزن بدن و کاهش 44 درصدی وزن تخمدان در فرزندان در مقایسه با گروه استرس روانی شده است؛ در حالی که تجویز سولپیراید به گروه استرس فیزیکی منجر به کاهش فقط 11 درصد وزن بدن و کاهش 36 درصد وزن تخمدان در فرزندان گردیده است. بنابراین با توجه به این که اثر متقابل استرس روانی و سولپیراید اثر کاهشی بیش‌تری بر وزن بدن داشته، انتظار می‌رود وزن تخمدان نیز در این گروه، کاهش بیش‌تری را نشان دهد. پیش از این نشان

استرس منجر به تشدید عوارض تولیدمثلی ناشی از استرس می شود. به نظر می رسد افرادی که به هر دلیل ملزم به استفاده از برخی داروهای آنتی سایکوتیک مانند سولپیراید می شوند نه تنها ممکن است در معرض خطر جدی اختلالات جنسی قرار گیرند بلکه احتمال انتقال برخی اختلالات به نسل بعد نیز در آنها تقویت می شود. در مجموع می توان گفت که اعمال استرس فیزیکی یا روانی در والد نر علاوه بر کاهش وزن بدن و وزن تخمدان فرزندان ماده، توان باروری آنها را نیز کاهش داد و تجویز سولپیراید باعث تشدید این اختلالات گردید. اصلی ترین مکانیسم احتمالی در گیر در این اختلالات براساس مطالعات پیشین، آسیب های اکسیداتیو ناشی از استرس یا ناشی از افزایش سیگنالینگ دوپامین در اسپرم والد و انتقال اختلالات به نسل بعدی می باشد؛ با این وجود بررسی مستقیم مکانیسم بروز این تغییرات در فرزندان به دنبال اعمال استرس یا تجویز سولپیراید به والدین ضروری می نماید.

می باشد. حضور گیرنده های دوپامین در اندام های تولیدمثلی و اسپرم موش و سایر حیوانات گواهی از نقش دوپامین در تولید مثل و باروری است؛ دوپامین در تعدیل تحرک، زنده مانی و مورفولوژی اسپرم نقش دارد. همچنین دوپامین در کنترل لقاح داخلی بدن نیز نقش دارد و دارای اثرات محافظتی بر روی اسپرم می باشد (37). شواهد حاکی از آن است که غلظت های پایین دوپامین سبب فعال شدن گیرنده مهاری D2 و باعث افزایش زنده مانی و تحرک اسپرم و فسفوریلاسیون تیروزین می شود، اما غلظت های بالاتر دوپامین، که می تواند به دنبال تزریق آنتاگونیست گیرنده D2 مانند سولپیراید نیز مشاهده شود، باعث کاهش فسفوریلاسیون تیروزین و اختلالات اسپرمی و القای استرس اکسیداتیو می شود (38). بنابراین احتمال می رود سولپیراید از طریق مکانیسم های فوق الذکر باعث اختلال در ساختار و عملکرد بیضه و ماده ژنتیکی اسپرم موش های والد شده و این اختلالات به نسل بعد منتقل و باعث کاهش توان باروری فرزندان گردیده است. همزمانی مصرف سولپیراید با اعمال

References

- Hajela S, Prasad S, Kumaran A, Kumar Y. Stress and infertility: A review. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology* 2016; 5(4): 940-943.
- Moridi A, Roozbeh N, Yaghoobi H, Soltani S, Dashti S, Shahrahmani N, Banaei M. Etiology and Risk Factors Associated With Infertility. *International Journal of Womens Health and Reproduction Sciences* 2019; 7(3): 346-353 (Persian).
- Ayaz KF, Miah MT, Ahasan HN, Raihan MR, Islam MA. Male Infertility A Review. *J Med* 2012; 13(2): 190-199.
- Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB. Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21(3): 219-222.
- Bali A, Singh N, Jaggi AS. Investigations into mild electric foot shock stress-induced cognitive enhancement: possible role of angiotensin neuropeptides. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2013; 14(3): 197-203.
- Li Y, Qin J, Yan J, Zhang N, Xu Y, Zhu Y, et al. Differences of physical vs. psychological stress: evidences from glucocorticoid receptor expression, hippocampal subfields injury, and behavioral abnormalities. *Brain Imaging Behav* 2019; 13(6): 1780-1788.
- Rivier C, Rivest S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol reprod* 1991; 45(4): 523-532.

8. Aguilar Mahecha A, Hales BF, Robaire B. Expression of stress response genes in germ cells during spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 2001; 65(1): 119-127.
9. Retana Márquez S, Viguera Villaseñor RM, Juárez Rojas L, Aragón Martínez A, Torres GR. Sexual behavior attenuates the effects of chronic stress in body weight, testes, sexual accessory glands, and plasma testosterone in male rats. *Hormones and Behavior* 2014; 66(5): 766-778.
10. Nordkap L, Jensen TK, Hansen ÅM, Lassen TH, Bang AK, Joensen UN, et al. Psychological stress and testicular function: a cross-sectional study of 1,215 Danish men. *Fertil Steril* 2016; 105(1): 174-187.
11. Shen Y, He D, He L, Bai Y, Wang B, Xue Y, Hou G. Chronic psychological stress, but not chronic pain stress, influences sexual motivation and induces testicular autophagy in male rats. *Front Psychol* 2020; 11: 826.
12. Prasad S, Tiwari M, Pandey AN, Shrivastav TG, Chaube SK. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. *Journal of Biomedical Science* 2016; 23(1): 1-5.
13. Götz AA, Stefanski V. Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring. *Physiol Behav* 2007; 90(1): 108-115.
14. Nakhjiri E, Saboory E, Roshan Milani S, Rasmi Y, Khalafkhani D. Effect of prenatal restraint stress and morphine co-administration on plasma vasopressin concentration and anxiety behaviors in adult rat offspring. *Stress* 2017; 20(2): 205-211 (Persian).
15. Omori IM, Wang J, Soares B, Fenton M. Sulpiride versus other antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2009; (2).
16. Muench J, Hamer AM. Adverse effects of antipsychotic medications. *Am Fam Physician* 2010; 81(5): 617-622.
17. Ambrosi B, Travaglini P, Beck Peccoz P, Bara R, Elli R, Paracchi A, et al. Effect of sulpiride-induced hyperprolactinemia on serum testosterone response to HCG in normal men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1976; 43(3): 700-703.
18. Ahmadi A, Khanlou RA, Salami SI, Ahmadi A. Evaluation of sperm quality, maturation and DNA integrity in adult mice treated with sulpiride. *Tehran Univ Med J* 2012; 70(4): 205-211 (Persian).
19. Benelli A, De Pol A, Poggioli R, Cavazzuti E, Arletti R, Bertolini A, Vergoni AV. L-sulpiride, at antidepressant dosage, prevents conditioned-fear stress-induced gastric lesions in rats. *Pharmacol Res* 2000; 42(2): 157-160.
20. Kato K. Response of patients in mixed state of anxiety and depression to low dose sulpiride. *Igaku Kenkyu* 1993; 63(1): 15-19.
21. Cookson J, Hodgson R, Wildgust HJ. Prolactin, hyperprolactinaemia and antipsychotic treatment: a review and lessons for treatment of early psychosis. *J Psychopharmacol* 2012; 26(5 suppl): 42-51.
22. Ataka K, Nagaishi K, Asakawa A, Inui A, Fujimiya M. Alteration of antral and proximal colonic motility induced by chronic psychological stress involves central urocortin 3 and vasopressin in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2012; 303(4): G519-G528.
23. Salarkia E, Sepehri G, Torabzadeh P, Abshenas J, Saberi A. Effects of administration of cotrimoxazole and folic acid on sperm quality and histological changes of testes in male rats. *International Journal of Reproductive BioMedicine* 2017; 15(10): 625-634 (Persian).

24. Saki G, Rahim F, Vaysi OA. Effect of forced swimming stress on in-vivo fertilization capacity of rat and subsequent offspring quality. *Journal of Human Reproductive Sciences* 2010; 3(1): 32-34 (Persian).
25. Eyigor O, Jennes L. Expression of glutamate receptor subunit mRNAs in gonadotropin-releasing hormone neurons during the sexual maturation of the female rat. *Neuroendocrinology* 1997; 66(2): 122-129.
26. Zahmatkesh E, Najafi G, Nejati V. Protective effect of royal jelly on in vitro fertilization (IVF) in male mice treated with oxymetholone. *Cell Journal (Yakhteh)* 2015; 17(3): 569-575.
27. REN L, LI X, Weng Q, Trisomboon H, Yamamoto T, Pan L, et al. Effects of acute restraint stress on sperm motility and secretion of pituitary, adrenocortical, and gonadal hormones in adult male rats. *Journal of Veterinary Medical Science* 2010; 72(11): 1501-1506.
28. Beeder LA, Samplaski MK. Effect of antidepressant medications on semen parameters and male fertility. *International Journal of Urology* 2020; 27(1): 39-46.
29. Cutler AJ. Sexual dysfunction and antipsychotic treatment. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 28(supplement 1): 69-82.
30. Solomon R, Shvartsur R, Azab AN. The Association between psychotropic drug use and fertility problems among male subjects. *J Psychiatr Pract* 2019; 25(1): 22-33.
31. Ford CP. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience* 2014; 282: 13-22.
32. Baik JH. Dopamine signaling in food addiction: role of dopamine D2 receptors. *BMB Rep* 2013; 46(11): 519-526.
33. Tiwari P, Dubey SK, Sahu PK. *Tinospora cordifolia* attenuates antipsychotic drug induced hyperprolactinemia in Wistar rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction* 2019; 8(3): 132-140.
34. Miyazaki I, Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med Okayama* 2008; 62(3): 141-150.
35. Ben-Shachar D, Zuk R, Gazawi H, Ljubuncic P. Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(10): 1965-1974.
36. Terland O, Flatmark T, Tangerås A, Grønberg M. Dopamine oxidation generates an oxidative stress mediated by dopamine semiquinone and unrelated to reactive oxygen species. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1997; 29(6): 1731-1738.
37. Otth C, Torres M, Ramírez A, Fernandez JC, Castro M, Rauch MC, et al. Novel identification of peripheral dopaminergic D2 receptor in male germ cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007; 100(1): 141-150.
38. Jafarpour Fard M, Karami M, Jalali Nadoushan M. Interaction of sulpiride with morphine in induction of male rat infertility. *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology* 2019; 7(2): 6-11 (Persian).