

Original Paper

Effect of Diazepam on testicular tissue parameters and spermatogenesis in rats

Amir Bagher Ilkhani, M.Sc in Animal Biology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

ORCID ID: 0000-0002-4829-1914

***Maryam Tehranipour (Ph.D)**, Corresponding Author, Associate Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. E-mail: maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

ORCID ID: 0000-0001-5302-5808

Saeedeh Zafar Balanezhad (Ph.D), Assistant Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

ORCID ID: 0000-0002-0530-1270

Abstract

Background and Objective: Sperm dysfunction and damage in spermatogenesis are the most common causes of male infertility. Diazepam is also a painkiller for benzodiazepines that can be addictive for a long time. This study was done to determine the effect of Diazepam on testicular tissue parameters and spermatogenesis in Rats.

Methods: In this experimental study, 30 Wistar male rats with a 250-200 gram weight were randomly allocated into 5 groups. Experimental groups were received diazepam with doses of (2, 3, 4, 5 mg/kg/bw) for 14 days, intraperitoneally. Serum physiology was injected in control group. The animals were anesthetized and the testes and epididymis ductus defran were removed for examination, sperm motility, and percentage of live sperm.

Results: Weight, large and small testicular diameter, percentage of live sperm and number of sperm moving forward were reduced with injection groups, at a dose of 3 mg / kg in all factors except the number of sperm moving forward in compared to the control group. In other groups, only testicular weight was significantly reduced at a dose of 2 mg/kg ($P < 0.05$).

Conclusion: Diazepam can affect spermatogenesis process in rats.

Keywords: Diazepam, Spermatogenesis, Fertility, Rat

Received 12 Feb 2019

Revised 30 Apr 2019

Accepted 15 Jun 2019

Cite this article as: Ilkhani AB, Tehranipour M, Zafar Balanezhad S. [Effect of Diazepam on testicular tissue parameters and spermatogenesis in Rats]. J Gorgan Univ Med Sci. 2020 Spring; 22(1): 57-64. [Article in Persian]

اثر دیازپام بر پارامترهای بافتی بیضه و اسپرماتوژنز موش‌های صحرائی

ORCID ID: 0000-0002-4829-1914

امیر باقر ایلخانی، کارشناس ارشد زیست‌شناسی فیزیولوژی جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

ORCID ID: 0000-0001-5302-5808

* دکتر مریم طهرانی پور، دکتری فیزیولوژی جانوری، دانشیار گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

ORCID ID: 0000-0002-0530-1270

دکتر سعیده ظفر بالانژاد، دکتری علوم جانوری گرایش تکوین، استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: ناباروری، ناتوانی جنسی فعال است. عوامل مردانه مسؤول ۵۰ درصد از موارد ناباروری است. اختلال در عملکرد اسپرم و آسیب در اسپرماتوژنز از شایع‌ترین علل ناباروری مردان است. دیازپام نیز دارویی مسکن و خواب‌آور از گروه بنزودیازپین‌ها است که مصرف طولانی مدت آن می‌تواند اعتیادآور باشد. این مطالعه به منظور تعیین اثر داروی دیازپام بر پارامترهای بافتی بیضه و اسپرماتوژنز موش‌های صحرائی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۳۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انتخاب و به طور تصادفی به پنج گروه شش تایی تقسیم شدند. دوزهای ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن دیازپام به مدت ۱۴ روز به گروه‌ها به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. به گروه کنترل سرم فیزیولوژی تزریق شد. سپس موش‌ها بیهوش و بیضه، دفران و اپیدیدیم خارج و برای بررسی بیضه، تحرک اسپرم و درصد اسپرم زنده مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: وزن، قطر بزرگ و کوچک بیضه، درصد اسپرم‌های زنده و تعداد اسپرم با تحرک رو به جلو در مقایسه گروه کنترل با گروه‌های تزریقی در دوز ۳ mg/kg/bw در تمامی فاکتورها غیر از تعداد اسپرم با تحرک رو به جلو، کاهش نشان دادند. در سایر گروه‌ها تنها وزن بیضه در دوز ۲ mg/kg/bw کاهش آماری معنی‌داری داشت ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: داروی دیازپام می‌تواند بر روند اسپرماتوژنز تاثیر کاهشی داشته باشد.

کلید واژه‌ها: دیازپام، اسپرماتوژنز، باروری، موش صحرائی

* نویسنده مسؤول: دکتر مریم طهرانی پور، پست الکترونیکی maryam_tehrani@mshdiau.ac.ir

نشانی: مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی، تلفن و نمابر ۰۵۱-۳۸۴۳۵۰۵۰

وصول مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۲۳، اصلاح نهایی: ۱۳۹۸/۲/۱۰، پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۳/۲۵

مقدمه

اجتماعی همراه است (۶). به دلیل این که تفاوت‌های بسیار در عواملی نظیر سن ازدواج، تعدد شریک جنسی، آلودگی‌های محیطی، مصرف الکل، سیگار و شیوع بیماری‌های عفونی در بین جوامع مختلف وجود دارد؛ سبب‌شناسی بروز ناباروری و الگوی فراوانی علل مختلف ناباروری در مناطق مختلف، متفاوت است (۷). برخی مطالعات نشان داده‌اند که عوامل محیطی از جمله مواد سمی، آفت‌کش‌ها و تشعشعات بر روی ناباروری مردان اثرات مضر دارند (۸). مصرف الکل و دخانیات و همچنین کار بدنی سنگین و مشاغل نشسته نیز می‌توانند با ناباروری مردان در ارتباط باشند (۹). بعضی مطالعات نشان‌دهنده اختلال روند اسپرماتوژنز در موش‌های صحرائی در اثر سموم دیازینون و هینوزان و نیز نانوذرات اکسید مس بوده است (۱۰-۱۲).

بیماری واریکوسل نیز از عوامل مهم محیطی مؤثر بر ناباروری مردان است؛ اما تأثیر درمان آن در بهبود نازایی نامشخص است (۱۳). در مورد بیماری سیلیاک نیز درمان و یا عدم درمان بیماری و تاثیر آن بر روند ناباروری ضد و نقیض است (۱۴). در برخی

اختلال در تولید عملکرد اسپرم و آسیب در روند اسپرماتوژنز از شایع‌ترین علل ناباروری مردان به‌شمار می‌رود. تروما یا نقص‌های آناتومیکی در سیستم تناسلی و یا استفاده از برخی داروها برای درمان بیماری‌ها باعث اختلال در تولید اسپرم و در نهایت منجر به عقیمی در مردان می‌شود (۱).

ناباروری به معنای عدم توانایی زوجین در بچه‌دار شدن پس از حداقل یک سال مقاربت بدون استفاده از وسایل پیشگیری از بارداری اطلاق می‌شود (۲). بنابر گزارش سازمان بهداشت جهانی، ناباروری حدود ۸۰ میلیون زوج در سراسر دنیا را تحت تاثیر قرار داده است (۳) که ۵۰ درصد آنها وابسته به علل مردانه است (۴). براساس مطالعات انجام شده، شیوع ناباروری در آمریکا حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد و در استرالیا حدود ۱۹ درصد برآورد شده است (۳). در ایران در سال ۲۰۰۹ شیوع ناباروری در زوجین سنین ۲۶-۲۱ ساله ۱۷/۲ درصد برآورد شد (۵). تجربه ناباروری که برخی آن را بحران ناباروری نامیده‌اند؛ با استرس فیزیکی، اقتصادی روانشناختی

مطالعات، افزایش شاخص توده بدنی بر ناباروری موثر و در برخی دیگر بی‌تاثیر ذکر شده است (۱۵ و ۱۶). از آنجایی که مهم‌ترین و منطقی‌ترین رویکرد در خصوص کاهش مشکل ناباروری، تلاش جهت کاهش بروز آن و ارتقاء بهداشت باروری به منظور پیشگیری از بروز ناباروری است؛ اطلاع از فراوانی علل مختلف ناباروری در هر منطقه، از اهمیت بهداشت درمانی برخوردار بوده و می‌تواند در تصمیم‌گیری‌های مدیران مربوطه موثر باشد (۱۷).

بنزودیازپین‌ها داروهای آرامبخش- خواب‌آور محلول در چربی هستند و به خوبی از دستگاه گوارش جذب شده و وارد مغز می‌شوند (۱۸). این گروه دارویی با تسهیل ورود یون کلر (Cl-) از طریق افزایش عمل گاما آمینوبوتیریک اسید به داخل نورون پیش‌سیناپسی، باعث ایجاد هیپرپلاریزاسیون در سلول‌های عصبی شده و باعث کاهش تحریک‌پذیری در نورون‌ها می‌شوند که اثر آرام‌بخش و تضعیف‌کننده بر فعالیت‌های مغزی دارند. این داروها براساس طول مدت اثر به انواع کوتاه اثر، مدت اثر متوسط و طولانی اثر تقسیم می‌شوند. اغلب بنزودیازپین‌ها در کبد متابولیزه شده و به متابولیت‌های فعال تبدیل می‌شوند (۱۹).

دیازپام جزء گروه بنزودیازپین‌ها است که به عنوان داروی ضدصرع و ضداضطراب، شل‌کننده عضلات اسکلتی، ضد تشنج، آرام‌بخش و خواب‌آور استفاده می‌شوند و در درمان اضطراب و تنش، سندرم قطع مصرف حاد الکل، درمان کمکی در اسپاسم عضلات اسکلتی، تانوس، درمان کمکی در اختلالات همراه با تشنج، درمان کمکی در بیهوشی و اقدامات آندوسکوپی و استاتوس اپی‌لپتیکوس (بحران صرعی یا حمله‌های مکرر صرعی) استفاده می‌شود که به صورت قرص، شیاف، شربت، تزریقی و استفاده داخل مقعدی وجود دارد. از قطع ناگهانی مصرف دارو باید پرهیز کرد. حداکثر تاثیر درمانی دارو ۲-۱ هفته بعد از شروع مصرف آن رخ می‌دهد (۲۰). در آغاز قرن ۲۱ میلادی یک تیم تحقیقاتی مدارکی را ارائه کرد که نشان می‌داد ممکن است بنزودیازپین‌ها باعث آسیب در رشد مغزی جنین شوند. علم در این ارتباط که آیا استفاده از بنزودیازپین‌ها در دوران بارداری بی‌خطر است یا نه حکمی صادر نکرده است. نوزادانی که در دوران بارداری در معرض این داروها قرار گرفته‌اند؛ شاید در حالی متولد شوند که به این داروها وابستگی دارند. این داروها از راه شیر مادر منتقل می‌شود؛ اما احتمالاً مقادیر کم آن برای نوزادان شیرخوار بی‌خطر است (۲۱). در مورد دیگر Fernandez و همکاران به این نتیجه رسیدند که تزریق غیر همزمان دیازپام و بوسپیرون (Buspione) باعث می‌شود تا فعالیت‌های ضداضطرابی مشابهی را در موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار شیرده که تخمدان آنها برداشته شده؛ ایجاد نماید (۲۲). در مطالعه‌ای اثر بوسپیرون با دوزهای

۵ mg/kg، ۲/۵، ۱/۲۵ و دیازپام با دوزهای ۴ mg/kg، ۰/۵، ۱، ۲ بین موش‌های صحرایی که تخمدانشان برداشته شده و موش‌های صحرایی که اواسط شیردهی آنهاست؛ مقایسه شد. نتایج نشان داد اثرات رفتاری شامل فعالیت‌های ضداضطرابی، هیپودرمی، سندرم سروتونرژیک (Serotonergic syndrome)، رفتارها و پرخاشگری مادری و کاهش تحرک، کاملاً در موش‌های صحرایی ماده شیرده از بین رفتند (۲۲). Soares-Rachetii و همکاران در سال ۲۰۱۶ به این نتیجه رسیدند که فلوکستین (Fluoxetine) با دوز پایین و در کوتاه مدت تغییرات مرتبط با دوره فعلی را در پاسخگویی نسبت به دیازپام در موش‌های صحرایی ماده مسدود می‌کند (۲۳).

داروی دیازپام که از خانواده بنزودیازپین است؛ عوارض جانبی شامل افسردگی خواب‌آلودگی، سرگیجه، سنکوب برادی کاردی و دیس ریتمی در نوع تزریقی، راش و کهیر، تاری دید و حساسیت به نور، بیوست و تغییر در ترشح بزاق دارد. این مطالعه به منظور تعیین اثر داروی دیازپام بر پارامترهای بافتی بیضه و اسپرما توژنز موش‌های صحرایی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار حدوداً سه ماهه با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم در دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد طی سال ۱۳۹۶ انجام شد.

اصول کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌های صحرایی از سرم‌سازی رازی خریداری و در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی، در دمای 20 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت مناسب و دسترسی آسان به آب و غذا (انستیتو پاستور ایران شعبه آمل) نگهداری شدند.

از داروی تزریقی دیازپام ۱۰ (شرکت سبحان)، رنگ آمیزی ائوزین، نگروزین و رنگ هماتوکسین، پارافین جامد و چسب اتلان تهیه شده از شرکت Merck آلمان، کتامین و زایلازین تهیه شده از شرکت (ALFASAN (WOERDEN-HOLLAND)، اتیل هیدروکساید مطلق از شرکت کیمیا تهران و نمک سدیم خالص از شرکت گلپاک شیمی گلپایگان استفاده شد.

حیوانات به‌طور تصادفی به پنج گروه شش‌تایی به شرح زیر تقسیم شدند.

گروه کنترل: دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی.

گروه تیمار اول: دریافت‌کننده دوز تزریقی ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از دیازپام به مقدار ۰/۰۸ میلی‌لیتر.

گروه تیمار دوم: دریافت‌کننده دوز تزریقی ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از دیازپام به مقدار ۰/۱۲ میلی‌لیتر.

گروه تیمار سوم: دریافت‌کننده دوز تزریقی ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از دیازپام به مقدار ۰/۱۶ میلی‌لیتر.

دیازپام جزء گروه بنزودیازپین‌ها است که به عنوان داروی ضدصرع و ضداضطراب، شل‌کننده عضلات اسکلتی، ضد تشنج، آرام‌بخش و خواب‌آور استفاده می‌شوند و در درمان اضطراب و تنش، سندرم قطع مصرف حاد الکل، درمان کمکی در اسپاسم عضلات اسکلتی، تانوس، درمان کمکی در اختلالات همراه با تشنج، درمان کمکی در بیهوشی و اقدامات آندوسکوپی و استاتوس اپی‌لپتیکوس (بحران صرعی یا حمله‌های مکرر صرعی) استفاده می‌شود که به صورت قرص، شیاف، شربت، تزریقی و استفاده داخل مقعدی وجود دارد. از قطع ناگهانی مصرف دارو باید پرهیز کرد. حداکثر تاثیر درمانی دارو ۲-۱ هفته بعد از شروع مصرف آن رخ می‌دهد (۲۰). در آغاز قرن ۲۱ میلادی یک تیم تحقیقاتی مدارکی را ارائه کرد که نشان می‌داد ممکن است بنزودیازپین‌ها باعث آسیب در رشد مغزی جنین شوند. علم در این ارتباط که آیا استفاده از بنزودیازپین‌ها در دوران بارداری بی‌خطر است یا نه حکمی صادر نکرده است. نوزادانی که در دوران بارداری در معرض این داروها قرار گرفته‌اند؛ شاید در حالی متولد شوند که به این داروها وابستگی دارند. این داروها از راه شیر مادر منتقل می‌شود؛ اما احتمالاً مقادیر کم آن برای نوزادان شیرخوار بی‌خطر است (۲۱). در مورد دیگر Fernandez و همکاران به این نتیجه رسیدند که تزریق غیر همزمان دیازپام و بوسپیرون (Buspione) باعث می‌شود تا فعالیت‌های ضداضطرابی مشابهی را در موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار شیرده که تخمدان آنها برداشته شده؛ ایجاد نماید (۲۲). در مطالعه‌ای اثر بوسپیرون با دوزهای

فعال با تحرک رو به جلو فیلمبرداری شد. سپس مطابق فرمول زیر مقدار اسپرم‌های فعال با تحرک رو به جلو در هر میلی‌لیتر از مخلوط اپیدیدیم و محیط کشت اندازه‌گیری شد و نتایج به دست آمده ثبت گردید (۲۴).

$$\frac{A+B+C+D+E}{5} \times 25 \times 10^4$$

خانه‌های A، B، C، D در چهار گوشه و E در وسط مربع مبانی لام نوبار قرار دارند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab و آزمون ناپارامتری در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

اثر بر وزن بیضه: گروه تیمار اول کاهش وزن معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P < 0/01$) (جدول یک).

جدول ۱: میانگین و خطای معیار ابعاد بیضه در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	وزن (گرم)	قطر کوچک (mm)	قطر بزرگ (mm)
کنترل	۱/۳۳±۰/۰۴۸	۹/۹۱±۰/۰۸۳	۱۸/۵±۰/۲۵۸
تیمار اول	۱/۱۴±۰/۰۳#	۹/۶۶±۰/۲۱۱	۱۹±۰/۲۵۸
تیمار دوم	۱/۲۲±۰/۰۵۸	۹/۷۵±۰/۱۶۷	۱۸±۰/۳۶۵
تیمار سوم	۱/۲۶±۰/۰۶۳	۹/۶۶±۰/۲۱۱	۱۹/۵±۰/۳۴۲*
تیمار چهارم	۱/۳۴±۰/۰۳۲	۹/۸۳±۰/۱۶۷	۲۰/۳۳±۰/۳۳۳**

$P < 0/01$ * $P < 0/05$ ** $P < 0/001$

گروه‌های تیمار اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب دریافت کننده دوزهای تزریقی دیازپام با مقادیر ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم وزن بدن

اثر بر قطر بزرگ بیضه: در گروه تیمار دوم قطر بزرگ بیضه نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. در حالی که در سایر گروه‌های تیمار، افزایش مشاهده شد و این افزایش در گروه‌های تیمار سوم ($P < 0/05$) و چهارم ($P < 0/01$) معنی‌دار بود.

اثر بر قطر کوچک بیضه: در تمامی گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل قطر کوچک کاهش یافت.

اثر بر درصد اسپرم‌های زنده: با توجه به جدول ۲، در گروه تیمار دوم کاهش درصد اسپرم‌های زنده نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌گردد. در گروه تیمار شده اول درصد اسپرم‌های زنده نسبت به گروه کنترل افزایش آماری معنی‌داری داشت ($P < 0/05$).

اثر بر تعداد اسپرم با تحرک رو به جلو: در تمامی گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل، شاهد افزایش تعداد اسپرم‌های رو به جلو بودیم که در گروه تیمار اول ($P < 0/01$)، گروه تیمار سوم ($P < 0/01$) و در گروه تیمار چهارم ($P < 0/004$) این افزایش معنی‌دار بود و در گروه تیمار دوم معنی‌دار نبود.

در برش‌های تهیه شده از بافت بیضه در گروه‌های مختلف که با متد اتوزین-هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند؛ انواع سلول‌های بافتی

گروه تیمار چهارم: دریافت کننده دوز تزریقی ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از دیازپام به مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر.

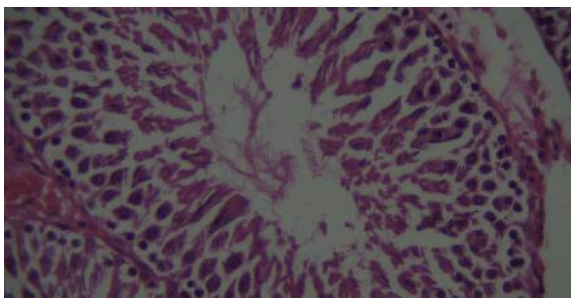
گروه‌های تیمار با دوز تزریقی در نظر گرفته شده به وسیله سرنگ انسولین به مدت ۱۴ روز و با فاصله یک روز و از طریق تزریق عضلانی به عضله فمور ران تیمار گردیدند. برای حذف استرس تزریق به گروه کنترل نیز سرم فیزیولوژی تزریق شد (۲۴).

یک روز پس از پایان تزریق تمام حیوانات ابتدا به وسیله مخلوط کتامین (۶۰ mg/kg) و زایلازین (۶ mg/kg) بیهوش شدند (۲۱). پس از بیهوش کردن نمونه‌ها و شکافتن شکم، بیضه‌ها خارج و در دو پلیت مجزا قرار گرفتند. دفران و اپیدیدیم از بیضه جدا و توسط سرم فیزیولوژی شستشو گردید. سپس مجرای دفران قطعه قطعه شده و داخل محیط کشت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲-۴ ساعت قرار گرفتند. همچنین مجرای اپیدیدیم نیز قطعه قطعه شده و داخل محیط کشت با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در انتها بیضه‌ها وزن و توسط کولیس، قطر بزرگ و قطر کوچک آنها اندازه‌گیری و داده‌ها ثبت گردید.

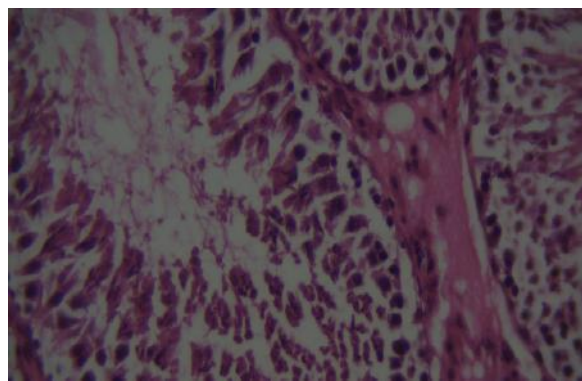
برای تعیین درصد زنده و مرده بودن اسپرم در هر گروه و مقایسه آن با گروه کنترل از روش‌هایی که توسط سازمان بهداشت جهانی ارائه شده؛ با اندکی تغییر استفاده شد. هر دو مجرای دفران قطعه شده و در ۵ ml محیط کشت Hams, F10 به مدت ۲-۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها از انکوباتور خارج و با همزن همگن شده تا اسپرم‌های موجود در محلول شناور شوند. سپس یک میلی‌لیتر از آن بر روی لام قرار گرفت و متناسب با مقدار نمونه، رنگ اتوزین-نگروزین اضافه و عمل گسترش انجام گردید. لام‌ها در محیط آزمایشگاه خشک شدند و بلافاصله زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند. اسپرم‌های زنده بر اثر رنگ‌آمیزی یا رنگ نگرفته بودند و یا به رنگ بنفش کم رنگ درآمده بودند. در حالی که اسپرم‌های مرده با رنگ بنفش قابل مشاهده بودند. پس از آن درصد اسپرم‌های زنده و مرده نسبت به کل اسپرم‌های موجود در میدان دید محاسبه و نتایج ثبت شد (۱).

برای شمارش اسپرم‌های فعال با حرکت رو به جلو در هر گروه و مقایسه آن با گروه کنترل از روش‌هایی که توسط سازمان بهداشت جهانی ارائه شده؛ با اندکی تغییر استفاده شد. کل مجرای اپیدیدیم قطعه قطعه شده و در ۱۰ ml محیط کشت Hams, F10 در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس مخلوط نمونه‌ها با همزن همگن شده و یک میلی‌لیتر از آن بر روی لام نوبار انتقال داده شد و گسترش یافت. سپس از تمام نمونه‌ها توسط نرم‌افزار Dino capture و به وسیله دوربین نصب شده بر روی چشمی میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰ x و ۴۰ x برای شمارش اسپرم‌های

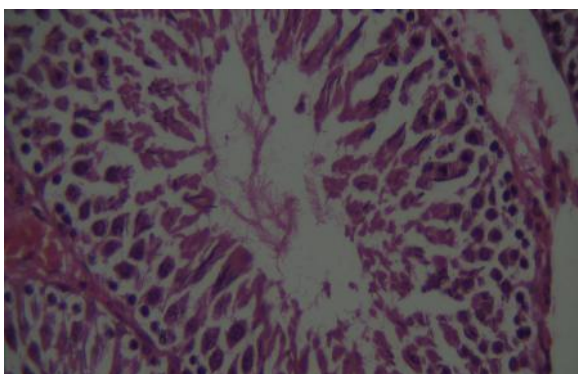
شناسایی گردید (شکل های ۹-۱).



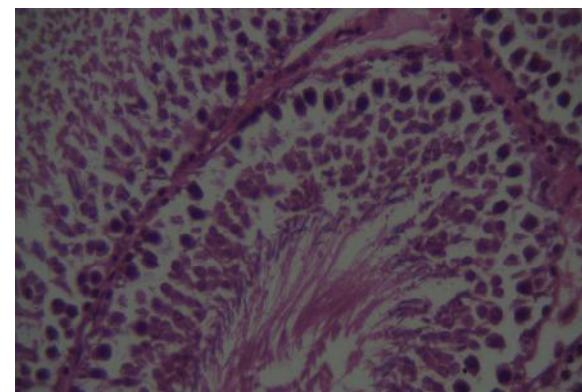
شکل ۲: تصویر نمونه بافت بیضه در گروه کنترل تیمار شده با سرم فیزیولوژی با بزرگ‌نمایی $40\times$ (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین)



شکل ۳: تصویر نمونه بافتی بیضه در گروه با دوز تزریقی 3 mg/kg بزرگ‌نمایی $40\times$ (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین)



شکل ۴: تصویر نمونه بافتی بیضه در گروه کنترل تیمار شده با سرم فیزیولوژی بزرگ‌نمایی $40\times$ (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین)



شکل ۵: تصویر نمونه بافتی بیضه در گروه با دوز تزریقی 2 mg/kg با بزرگ‌نمایی $40\times$ (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین)

جدول ۲: میانگین و خطای معیار اسپرم‌های فعال رو به جلو در گروه‌های مورد مطالعه

شماره گروه	تعداد اسپرم‌های فعال رو به جلو در هر میلی‌لیتر از مخلوط همگن شده ایدیدیم در محیط کشت
کنترل	$141667 \pm 3 \times 10^4$
تیمار اول	$433333 \pm 3/8 \times 10^4$ *
تیمار دوم	$225000 \pm 2/5 \times 10^4$
تیمار سوم	$666667 \pm 9/1 \times 10^4$ *
تیمار چهارم	$508333 \pm 9/3 \times 10^4$ #

$P < 0/001$ * $P < 0/01$ #

گروه‌های تیمار اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب دریافت کننده دوزهای تزریقی دیازپام با مقادیر ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی گرم وزن بدن

نتایج مربوط به اندازه‌های بیضه: نتایج مربوط به وزن، قطر بزرگ و قطر کوچک بیضه‌ها در گروه‌های کنترل و تیمار در جدول یک آمده است.

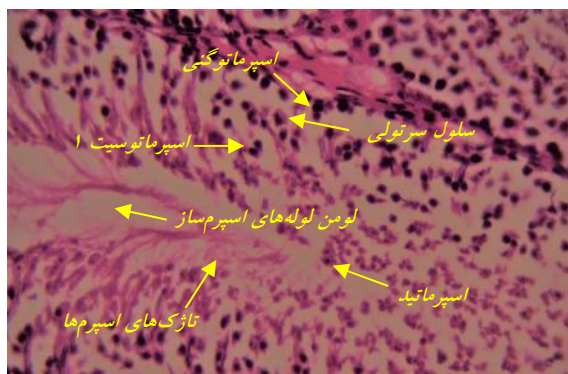
در مقایسه گروه‌های تیمار با گروه کنترل در گروه تیمار دوم قطر بزرگ بیضه نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. در حالی که در سایر گروه‌های تیمار افزایش مشاهده شد (جدول یک).

در تمامی گروه‌های تیمار شده با داروی دیازپام قطر کوچک بیضه نسبت به گروه کنترل کاهش آماری غیرمعنی داری داشتند (جدول یک).

طبق جدول یک، گروه‌های تیمار شده اول، دوم و سوم وزن کمتری نسبت به گروه کنترل دارند که این کاهش در گروه تیمار اول معنی دار است ($P=0/006$) و در گروه‌های تیمار دوم و سوم از نظر آماری معنی دار نیست. همچنین در گروه تیمار چهارم افزایش وزن آماری غیرمعنی داری نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید.

نتایج مربوط به تعداد اسپرم‌های فعال رو به جلو: منظور از اسپرم‌های فعال رو به جلو اسپرم‌هایی هستند که علاوه بر فعال بودن دارای تحرک رو به جلو هستند.

در تمامی گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل شاهد افزایش تعداد اسپرم‌های رو به جلو بودیم و این افزایش در گروه تیمار اول



شکل ۱: برش بافتی بیضه که انواع سلول‌های اسپرم‌ساز در آن قابل مشاهده است. بزرگ‌نمایی $40\times$ (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین)

نیود (جدول ۲).

بحث

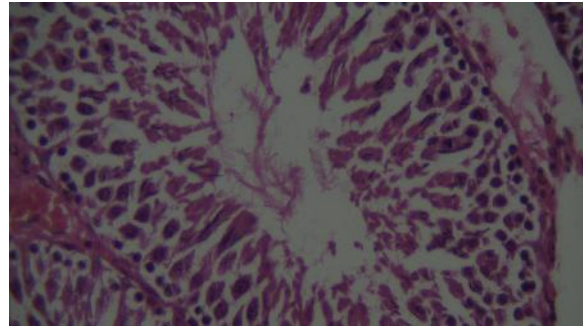
با توجه به نتایج به دست آمده اثر داروی دیازپام با دوز تزریقی ۳mg/kg/bw بر روند اسپرماتوژنز اثر کرده و بر پارامترهای مرتبط با آن اثر کاهشی نشان داد.

همانگونه که مطالعات نشان داده‌اند عوامل خطر سازی مانند افسردگی و اضطراب با کاهش میزان باروری و عوارض داروهای روانپزشکی به دنبال مشکلات روانی با اثر بر محور هیپوتالاموسی - هیپوفیزی - گنادی (HPG) می‌توانند بر عملکرد جنسی اثر گذار باشند. میانجی‌های عوامل روان گرا (دوپامین، سروتونین و اسید گاما آمینو بوتیریک) با تنظیم فیزیولوژیک محور جنسی مردانه و داروهای روانپزشکی با تغییر متابولیسم و پروتئین سازی هورمون‌ها بر سطح استروئیدهای جنسی اثر گذار هستند (۲۵).

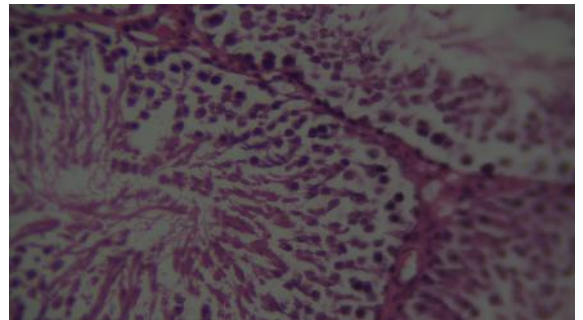
داروهای ضد افسردگی سروتونرژیک با کاهش فعالیت دوپامینرژیک، به طول متناوب و غیر مستقیم موجب اختلال جنسی می‌شوند. بسیاری از داروهای ضد افسردگی سروتونرژیک با ترشح زیاد پرولاکتین مرتبط هستند و ممکن است به طور خودبه خودی موجب اختلال جنسی شوند (۲۶).

داروهای ضد افسردگی سروتونرژیک و آنتی کولینرژیک خاص سبب تحریک گیرنده‌های سروتونینی می‌شوند. افزایش پرولاکتین نیز مانع آزاد شدن هورمون گنادوتروپین از هیپوتالاموس، لوتئینی و محرک فولیکولی از هیپوفیز و هورمون‌های گنادی از گنادها شده و باروری را از بین می‌برند؛ اما همیشه نمی‌توان گفت که داروهای ضد افسردگی به علت افزایش سطح پرولاکتین باروری را در بدن از بین می‌برند (۲۷).

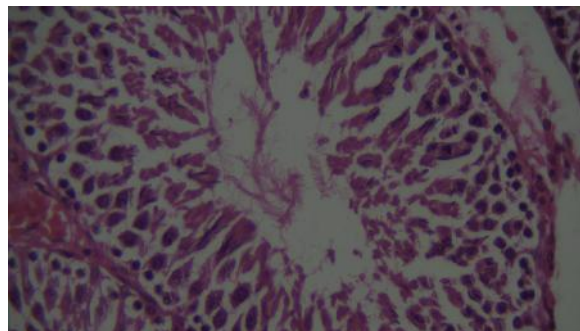
مطالعات اندکی در مورد رابطه میان استفاده از داروی ضد افسردگی و باروری در مردان انجام شده است. در مطالعه‌ای به تعدادی بیمار افسرده که قبل از شروع درمان مشخصات اسپرمی طبیعی داشتند؛ داروی ضد افسردگی دیس متیل ایمی پرامین با دوز ۲۰۰ میلی گرم در روز به مدت سه هفته تجویز شد و بعد از گذشت سه هفته کاهش معنی داری در تعداد اسپرم‌های زنده بیماران افسرده مشاهده گردید (۲۵). در مطالعه دیگری که بر روی ۱۱ مرد طبیعی داوطلب انجام شد؛ تغییر در اسپرماتوژنز به دنبال استفاده از ۷۵ تا ۳۰۰ میلی گرم تری می پرامین برای ۸ هفته گزارش گردید (۲۵). چون مکانیسم اثر داروهای ضد افسردگی در اسپرماتوژنز بر روی حرکت اسپرم آشکار نیست؛ احتمال دارد داروهای ضد افسردگی با اثر بر pH یا چسبندگی اسپرم، اثر بر روی نیتریک اکساید (مهار کننده حرکت اسپرم) و با اثر بر روی اسید گاما آمینو بوتیریک (تنظیم کننده فیزیولوژیک حرکت اسپرم) موجب تغییر در اسپرماتوژنز و حرکت اسپرم شده باشند (۲۵).



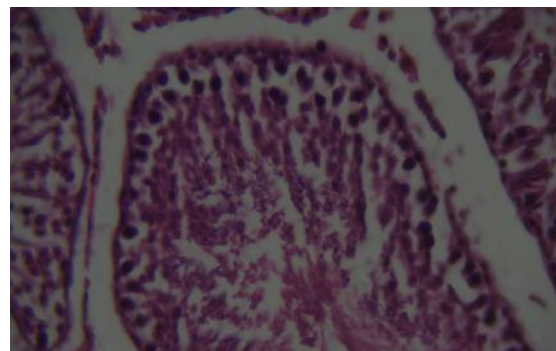
شکل ۶: تصویر نمونه بافتی بیضه در گروه کنترل تیمار شده با سرم فیزیولوژی با بزرگ‌نمایی ۴۰x (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین)



شکل ۷: تصویر نمونه بافتی بیضه در گروه با دوز تزریقی ۴mg/kg با بزرگ‌نمایی ۴۰x (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین)



شکل ۸: تصویر نمونه بافتی بیضه در گروه کنترل تیمار شده با سرم فیزیولوژی با بزرگ‌نمایی ۴۰x (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین)



شکل ۹: تصویر نمونه بافت بیضه در گروه با دوز تزریقی ۵mg/kg با بزرگ‌نمایی ۴۰x (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین)

($P < 0/001$)، گروه تیمار سوم ($P < 0/001$) و گروه تیمار چهارم معنی دار ($P < 0/01$) بود و در گروه تیمار دوم از نظر آماری معنی دار

همچنین افزایش عمل گیرنده‌های ویژه سروتونرژیک در سیستم عصبی مرکزی با کاهش رفتار جنسی در حیوان همخوانی دارد و مشخص شده فعال شدن گیرنده ویژه سروتونرژیک (5-HC2C) سبب مهار عمل جنسی می‌گردد (۲۵).

در مطالعه‌ای دیگر، به ۳۵ مرد داوطلب ۱۸ تا ۶۵ ساله، ۲۰ میلی‌گرم در روز پاروکستین به مدت ۵ هفته تجویز شد. سطح هورمونی سرم و درصد شکست DNA اسپرم به‌طور معنی‌داری در مقایسه با حالتی که پاروکستین دریافت نکرده بودند؛ تغییر یافت (۲۸). داروهای ضدافسردگی سروتونرژیک با کاهش فعالیت دوپامینرژیک، به‌طور متناوب و غیرمستقیم موجب اختلال جنسی می‌شوند. بسیاری از داروهای ضدافسردگی سروتونرژیک با ترشح زیاد پرولاکتین مرتبط بوده و ممکن است به‌طور خودبه‌خودی موجب اختلال جنسی شوند (۲۸).

مطالعه داروها در محیط آزمایشگاهی نشان داده ایمی‌پرامین، دیس‌متیل‌ایمی‌پرامین و نورتریپتیلین سبب مهار تحرک اسپرم می‌شوند. نفاذودون نیز موجب کاهش تعداد و تحرک اسپرم می‌گردد (۲۲). مطالعه‌ای بر روی مردان ۳۷ ساله مصرف کننده نفاذودون نشان داد که با قطع آن برای ۱۲ هفته، افزایش معنی‌داری در حجم، تحرک و تعداد اسپرم مشاهده گردید (۲۲).

در مطالعه حاضر یافته‌های به‌دست آمده از قطر بزرگ بیضه‌ها نشان داد که در دوز تزریقی ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل کاهش دیده شد. در حالی که در دوزهای تزریقی ۲، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن شاهد افزایش قطر بزرگ بیضه بودیم که این پارامتر در دوزهای ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن معنی‌دار بود. همچنین داده‌های به‌دست آمده از قطر کوچک بیضه، نشان داد که در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش قطر کوچک بیضه مشاهده شد. نتایج حاصل از توزین بیضه‌ها نشان داد که در دوزهای تزریقی ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش وزن بیضه نسبت به گروه کنترل دیده شد. در حالی که در دوز تزریقی ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن افزایش وزن بیضه نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید و این نتایج همراستا با نتایج مطالعه Zhou و همکاران است (۲۸).

همچنین در این مطالعه دوزهای تزریقی ۲، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در گروه‌های تیمار، سبب افزایش درصد اسپرم‌های زنده نسبت به گروه کنترل گردید و این افزایش در دوز تزریقی ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن معنی‌دار بود. همچنین در گروه تیمار شده با دوز تزریقی ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش درصد اسپرم‌های زنده نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. تعداد اسپرم‌ها با تحرک رو به جلو در تمامی گروه‌های تیمار شده

نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که در گروه‌های با دوز تزریقی ۲، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن معنی‌دار بود و افزایش در دوز تزریقی ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن معنی‌دار نبود. این نتایج همراستا با نتایج مطالعه Zhou و همکاران است (۲۸).

با توجه به این که بنزودیازپین‌هایی مانند ديازپام با تسهیل ورود یون کلر (Cl-) از طریق افزایش عمل گاما آمینوبوتیریک اسید به داخل نورون پیش‌سیناپسی، باعث ایجاد هیپرپلاریزاسیون در سلول‌های عصبی می‌شوند؛ لذا باعث کاهش تحریک‌پذیری در نورون‌ها شده که اثر آرام‌بخش و تضعیف کننده بر فعالیت‌های مغزی دارند. همچنین عمل بازجذب سروتونین آزاد شده از پایانه‌های آکسونی کاهش می‌یابد (۱۹). افزایش غلظت سروتونین باعث مهار دوپامین گردیده و با تحریک عامل آزاد کننده پرولاکتین (PRF) سطح پرولاکتین را افزایش می‌دهد. افزایش پرولاکتین طی سه مکانیسم می‌تواند باروری را مختل کند. الف) در سطح هیپوتالاموسی باعث بالا رفتن سطح دوپامین گردیده و مانع ترشح هورمون رها کننده گنادوتروپین (GnRH) می‌شود. ب) در سطح هیپوفیزی مانع ترشح هورمون‌های لوتهینی (LH) و محرک فولیکولی (FSH) می‌شود. ج) در سطح گنادی مانع ترشح هورمون‌های گنادی می‌گردند (۲۷). بدین طریق مصرف داروی ديازپام اثر کاهنده بر پارامترهای مربوط به باروری خواهد داشت که این کاهش در دوز تزریقی ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مطالعه حاضر نسبت به سایر گروه‌های تیمار به‌جز در تعداد اسپرم‌ها با تحرک رو به جلو دیده شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد که اثر داروی ديازپام با دوز تزریقی ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر روند اسپرماتوژنز اثر کرده و بر پارامترهای مرتبط با آن اثر کاهشی دارد که موافق نظریه سلمانی و بذرافشان است (۲۷).

درک و تفهیم کامل مکانیسم عمل داروی ديازپام با وجود چرخه‌های طولیل اسپرماتوژنز و عواملی که ممکن است در محور تولید مثلی مداخله کنند؛ نیاز به انجام مطالعات بیشتری دارد. احتمالاً با افزایش طول دوره درمان و یا آزمون سایر دوزها بتوان نسبت به اثرات جانبی این دارو به‌طور دقیق‌تری اظهار نظر نمود. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به محدود بودن مقالات مرتبط با پژوهش حاضر اشاره نمود. با توجه به یافته‌های این مطالعه که دوزهای بالاتر، کم‌اثرتر بودند؛ مطالعات بیشتری توصیه می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ديازپام با دوز تزریقی ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر روند اسپرماتوژنز اثر کرده و بر پارامترهای مرتبط با آن اثر کاهشی دارد.

دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مدیریت گروه سرکار خانم دکتر نغعی مقدم و ریاست محترم دانشکده علوم آقای دکتر ملک نژاد به خاطر همکاری بی دریغ تشکر و قدردانی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۱۴۵۰۴) آقای امیر باقر ایلخانی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی - فیزیولوژی جانوری از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد بود. بدین وسیله از همه همکاران گروه زیست شناسی دانشکده علوم

References

- Hosseini A, Zare S, Ghadiri Pakdel F, Ahmadi A. Effects of Vitamin E and Ginseng Extract on Fertility Changes Induced by Cyclophosphamide in Rats. *J Reprod Fertil*. 2010 Dec; 11(4): 227-37. [Article in Persian]
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. 2010.
- Mohammadi K, Ardalan A, Vahidi S. [Assessment of prevalence of primary infertility in Islamic republic of Iran in 2005]. *J FertilInfertil*. 2006; 7(3): 243-51. [Article in Persian]
- Nangia AK, Luke B, Smith JF, Mak W, Stern JE; SART Writing Group. National study of factors influencing assisted reproductive technology outcomes with male factor infertility. *Fertil Steril*. 2011 Sep; 96(3): 609-14. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.06.026
- Vahidi S, Ardalan A, Mohammad K. Prevalence of primary infertility in the Islamic Republic of Iran in 2004-2005. *Asia Pac J Public Health*. 2009 Jul; 21(3): 287-93. doi: 10.1177/1010539509336009
- Sadeghian A, Heydarianpour A, Abed P. [Comparison of psychiatric problems in infertile men and women referring to infertility clinic of Hamadan fatemeh hospital]. *J Arak Univ Med Sci*. 2006; 9(2): 31-39. [Article in Persian]
- Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S. Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. *Hum Reprod Update*. 2011 Sep-Oct; 17(5): 575-88. doi: 10.1093/humupd/dmr015
- Ghahremani F, Ghaem H. [The effective factors on men infertility: a case - control study]. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2005; 7(2): 42-45. [Article in Persian]
- Koskimies AI, Savander M, Ann-Marie N, Kurunmäki H. [Sperm DNA damage and male infertility]. *Duodecim*. 2010; 126(24): 2837-42. [Article in Finnish]
- Rahimi S, Zamiri MJ, Shariati M, Changizi-Ashtiyani S, Moghadamnia D, Rahimi A. [Effect of Diazinon on pituitary-gonadal axis and histological alteration of seminiferous tubules in adult rat testis]. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2016; 18(1): 23-29. [Article in Persian]
- Rajabi S, Noori A, Shahbazi F. [Copper oxide nanoparticles toxicity on pituitary gonadal axis and spermatogenesis in male rats]. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2019; 21(3): 49-56. [Article in Persian]
- Fattahy E, Jorsaraei SGA, Parivar K, Moghaddamnia AA. [The long-term effect of Hinosan on Spermatogenesis on the Balb/C Mice]. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2008; 9(4): 5-10. [Article in Persian]
- Abdel-Meguid TA, Al-Sayyad A, Tayib A, Farsi HM. Does varicocele repair improve male infertility? An evidence-based perspective from a randomized, controlled trial. *Eur Urol*. 2011 Mar; 59(3): 455-61. doi: 10.1016/j.eururo.2010.12.008
- Fraczek M, Kurpisz M. Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl*. 2007 Mar-Apr; 28(2): 325-33. doi: 10.2164/jandrol.106.001149
- Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril*. 2010 May; 93(7): 2222-31. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.01.100
- Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E, Agarwal A. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2010 Mar; 7(3): 153-61. doi: 10.1038/nrurol.2010.6
- Choobineh H, Sadighi Gilani M, Hassanzadeh G, Saeepour N, Habibi M, Falahi P, et al. [Assessment of Socio-Demographic Characteristics of Infertile Men Who Referred to Shariati Hospital, Tehran, Iran]. *Iran J Obstet Gynecol Infertil*. 2013; 16(47-48): 6-12. [Article in Persian]
- Direkvand Moghadam A, Delpisheh A, Sayehmiri K. The trend of infertility in Iran, an original review and meta-analysis. *Nursing Practice Today*. 2014; 1(1): 46-52.
- Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. The molecular basis of fertilization (Review). *Int J Mol Med*. 2016 Oct; 38(4): 979-86. doi: 10.3892/ijmm.2016.2723
- Tehrani-pour M, Javadmoosavi BZ. [The neuroprotective effect of alcoholic extract of cannabis sativa on neuronal density of spinal cord alpha motoneurons after sciatic nerve injury in rats]. *J Shahid Sadoughi Uni Med Sci*. 2011; 19(3): 339-49. [Article in Persian]
- Miller RL. [Encyclopedia of Addictive Drugs]. Translate by: Peshangzadeh A. Tehran: University Jihad Publications. 2014; pp: 31-33. [Persian]
- Fernández-Guasti A, Ferreira A, Picazo O. Diazepam, but not buspirone, induces similar anxiolytic-like actions in lactating and ovariectomized Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2001 Sep; 70(1): 85-93. doi: 10.1016/s0091-3057(01)00586-x
- Soares-Rachetti Vde P, de Sousa Pinto ÍA, Santos RO, André E, Gavioli EC, Lovick T. Short term, low dose fluoxetine blocks estrous cycle-linked changes in responsiveness to diazepam in female rats. *J Psychopharmacol*. 2016 Oct; 30(10): 1062-68. doi: 10.1177/0269881116636106
- Khoddam R. [Pocket Guide to Iranian Generic Drugs]. 7th ed. Tehran: Dibaj Publicaton. 2009; pp: 290-92. [Persian]
- Zhang X, Zhang Z, Cheng W, Mou X, Reynolds GP. The effect of chronic antipsychotic treatment on sexual behaviour, hormones and organ size in the male rat. *J Psychopharmacol*. 2007 Jun; 21(4): 428-34. doi: 10.1177/0269881106068702
- Sigman M. Medications that impair male fertility. *Sex Reprod Menopause*. 2007; 5(2): 11-15.
- Salmani A, Bazrafshan M. [Effects of antidepressant medications on male reproduction and sexual function]. *J Qazvin Univ Med Sci*. 2013; 17(4): 54-61. [Article in Persian]
- Zhou H, Yu CL, Wang LP, Yang YX, Mao RR, Zhou QX, Xu L. NMDA and D1 receptors are involved in one-trial tolerance to the anxiolytic-like effects of diazepam in the elevated plus maze test in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015 Aug; 135: 40-45. doi: 10.1016/j.pbb.2015.05.009