

اثر سولپیراید بر بیان ژن پروتئین ترانسلوکاتور و شاخص‌های ریخت‌شناسی بافتی در بیضه‌ی موش‌های صحرایی تحت اثر استرس فیزیکی یا روانی

حسینعلی محمودی، دکتر فرین بابائی بالدرلو

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، نشانی مکاتبه‌ی نویسندگی مسئول: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، دکتر فرین بابائی بالدرلو؛ e-mail: f.babaei@urmia.ac.ir

چکیده

مقدمه: مطالعات پیشین به خوبی نشان داده‌اند که اعمال استرس یا مصرف داروی آنتی‌سایکوتیک سولپیراید باعث اختلال در سیستم تولیدمثلی می‌شود. پروتئین ترانسلوکاتور (TSPO) در غشای میتوکندریایی بافت‌های استرئوژنز؛ نظیر گنادها، با انتقال کلسترول به داخل میتوکندری در تنظیم تولید هورمون‌های استروئیدی دخالت دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر استرس و سولپیراید بر تغییرات بیان ژن TSPO و بافت‌شناسی بیضه در موش‌های صحرایی بود. مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار، بطور تصادفی به دو گروه دریافت‌کننده‌ی سالین و سولپیراید (۴-میلی‌گرم بر کیلوگرم درون‌صفاقی) تقسیم شدند. هر گروه نیز به سه زیرگروه شاهد، استرس روانی و استرس فیزیکی تقسیم‌بندی شدند. استرس فیزیکی (جریان الکتریکی ۰/۵-هرتز، ۲-میلی‌آمپر، ۴۸-ولت) یا روانی (مشاهده‌ی موش‌های تحت استرس فیزیکی) بمدت ۱۴ روز بوسیله جعبه ارتباطی القا گردید. در پایان دوره تیمار؛ بیان نسبی ژن TSPO در بیضه با روش Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR، شاخص‌های ریخت‌شناسی بافتی بیضه با تهیه‌ی مقاطع میکروسکوپی و غلظت تستوسترون سرم به روش رادیوایمونواسی بررسی شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از روش ANOVA یکطرفه و آزمون توکی، به کمک نرم‌افزار SPSS استفاده شد. یافته‌ها: استرس موجب آسیب بافت بیضه، کاهش معنی‌دار بیان TSPO (فیزیکی $P=0/034$ ، روانی $P=0/039$) و تستوسترون (فیزیکی $P=0/004$ ، روانی $P=0/019$) در مقایسه با گروه کنترل گردید. تجویز سولپیراید علاوه بر کاهش شدید تعداد سلول‌های زایا، باعث تخریب و عدم انسجام اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز و افزایش فضای بینابینی بافت بیضه و کاهش هر چه بیشتر TSPO و تستوسترون نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده‌ی سالین گردید. نتیجه‌گیری: استرس فیزیکی و روانی هر دو منجر به آسیب در بیضه و کاهش بیان TSPO و غلظت سرمی تستوسترون گردید. تجویز سولپیراید عمدتاً آثار سوء ناشی از استرس بر سیستم تولیدمثل را افزایش داد که حاکی از عارضه جانبی مصرف این دارو بود.

واژگان کلیدی: سولپیراید، TSPO، استرس، بیضه، تستوسترون

دریافت مقاله: ۹۹/۶/۱۵ - دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۰/۱/۱۵ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۲/۲۲

مقدمه

استرس مجموعه واکنش‌هایی است که در پاسخ به محرک‌های فیزیکی، روانی و یا هر عاملی که باعث برهم خوردن تعادل درونی بدن (هومئوستاز) شود بوجود می‌آید.^۱ استرس در کنار تمام اثراتی که بر اندام‌ها و بافت‌های مختلف

بدن دارد بطور ویژه باعث ایجاد آسیب‌های جدی در سیستم تولیدمثلی و ناباروری می‌گردد.^{۲،۳} الگوهای استرس را می‌توان به دو دسته اصلی استرس فیزیکی و استرس روانی تقسیم کرد؛^۴ عوامل استرس‌زا سبب فعال‌سازی محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال (HPA)^۵ می‌شوند که به نوبه

i- Hypothalamo-Pituitary- Adrenal

سلول و آپوپتوز نقش دارد.^{۱۴،۱۵} این پروتئین برای جابجایی کلسترول و تنظیم ساخت استروئیدها مورد نیاز است.^{۱۴} هورمون‌های LH و FSH در کنترل بیان پروتئین ترانسلوکاتور نقش دارند و هر عاملی که بر میزان تولید و ترشح هورمون‌های LH و FSH تأثیر داشته باشد؛ احتمالاً به واسطه تأثیر بر بیان TSPO، بر عملکرد استروئیدوزنر گنادها نیز اثر می‌گذارد.^{۱۶} با توجه به اثرات سوء استرس بر سیستم تولیدمثل و از سوی دیگر اثرات مخرب تولیدمثلی سولپیراید، که می‌تواند بعنوان داروی آنتی‌سایکوتیک همراه با استرس تجویز شود، بر آن شدیم تا تغییرات احتمالی بیان ژن کلیدی TSPO و تغییرات ریخت‌شناسی بافتی در بیضه را به دنبال اعمال استرس و یا مصرف داروی سولپیراید مورد بررسی قرار دهیم. پیش از این مطالعه‌ای در این خصوص انجام نشده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه تجربی، از ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با میانگین سنی ۴/۵ ماه و در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده گردید. موش‌ها در خانه حیوانات گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه تحت شرایط استاندارد؛ ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۲۰ تا ۳۰ درصد، در قفس‌های مخصوص پرورش موش نگهداری شدند. حیوانات به صورت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. تمام حیوانات طبق دستورالعمل نگهداری و کار با حیوانات، مصوب کمیته اخلاقی، نگهداری شدند (کد کمیته اخلاق دانشگاه ارومیه: IR-UU-AEC-385/DA3/).

قبل از شروع آزمایش، موش‌ها به مدت ۱۴ روز در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی در کنار هم و به صورت گروه‌بندی شده قرار داده شدند تا با شرایط محیط سازش پیدا کنند و تنش محیطی بر نتیجه آزمایش‌ها تأثیر خاصی نداشته باشد. موش‌های صحرایی نر بطور تصادفی ساده به دو گروه دریافت‌کننده‌ی سالین و سولپیراید (۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم درون‌صفاقی) تقسیم شدند (n=۲۱)؛ هر گروه به سه زیرگروه کنترل، استرس روانی و استرس فیزیکی تقسیم‌بندی شدند (n=۷). غلظت سولپیراید (سیگما، آمریکا) بر مبنای مطالعات پیشین انتخاب گردید.^{۱۷} اعمال

خود منجر به سرکوب فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد-(HPGⁱ) می‌گردد.^۶ امروزه برای کنترل عوارض روانی و افسردگی ناشی از استرس^۵ از داروهای آنتی‌سایکوتیک مختلف استفاده می‌شود. برخی از این داروها با مکانیسم کنترل ترشح میانجی عصبی دوپامین اعمال اثر می‌نمایند که یکی از آن‌ها سولپیراید، آنتاگونیست گیرنده D2 دوپامین می‌باشد.^۷

دوپامین از میانجی‌های عصبی مهم، از اسید آمینه تیروزین ساخته می‌شود.^۸ پنج زیرگروه گیرنده‌های دوپامین از D₁ تا D₅ وجود دارد.^۹ بعضی از داروهای آنتی‌سایکوتیک غیرکلاسیک نظیر مشتقات بنزآمیدها (سولپیراید، آمی سولپیراید و متاکلوپرامید) گیرنده‌های دوپامین را مهار می‌کنند و باعث از بین رفتن سیستم کنترلی بر روی سلول‌های لاکتوتروف و ترشح پرولاکتین و در نتیجه ایجاد هیپرپرولاکتینمی می‌شوند.^{۱۰} پرولاکتین ترشح ضربانی هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRHⁱⁱ) را از هیپوتالاموس مهار می‌کند و مستقیماً از عمل هیپوفیزی هورمون‌های محرک فولیکول (FSHⁱⁱⁱ) و هورمون لوتئینی (LH^{iv}) روی گنادها جلوگیری می‌نماید؛ به این ترتیب باعث ایجاد هیپوگنادیسم ثانویه و کاهش ترشح تستوسترون می‌شود. همچنین این عوامل باعث کاهش تحرک و کیفیت اسپرم و اختلالات باروری می‌گردند.^{۱۱} سولپیراید، دارای فعالیت ضدافسردگی و ضد اضطرابی^۷ است و از نظر بالینی بعنوان دارویی برای درمان اسکیزوفرنی و سایر اختلالات روانی مانند توهم به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد.^{۱۲} مصرف سولپیراید با القای هیپرپرولاکتینمی و مهار محور HPG می‌تواند به کاهش غلظت تستوسترون و اختلالات باروری منجر شود.^{۱۳}

یکی از مهم‌ترین فاکتورهای درگیر در تولید و ترشح تستوسترون در بیضه، پروتئینی موسوم به گیرنده بنزدیازپینی محیطی یا پروتئین ترانسلوکاتور (TSPO) می‌باشد.^{۱۴} TSPO، پروتئین ۱۸ کیلودالتونی، یکی از پروتئین‌های محافظت شده‌ی غشای خارجی میتوکندری می‌باشد که در عملکردهای متعدد سلول و بافت، اعم از بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی، تنفس، تکثیر و تمایز

i- Hypothalamo-Pituitary- Gonad

ii- Gonadotropin Releasing Hormone

iii- Follicul Stimulating Hormone

iv -Luteinizing Hormone

سنجش بیان ژن با روش (qRT-PCR)Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR

برای انجام qRT-PCR به ترتیب سه عمل استخراج RNA، سنتز cDNA و PCR انجام شد.

استخراج RNA تام به کمک کیت ستونی استخراج RNA (شرکت دنا زیست آسیا، ایران)، طبق دستورالعمل کیت انجام گردید. بطور خلاصه؛ ۱۰۰ میلی گرم از بافت بیضه در داخل ازت مایع، که باعث انجماد شدید بافت می شود، لیز گردید. به هر نمونه یک میلی لیتر محلول DR1 اضافه شد و پس از ۵ دقیقه ورتکس و انکوباسیون، به مدت ۱۰ دقیقه با RCF ۱۷۷۰۰ سانتیفریژ شد. پس از انتقال مایع رویی به میکروتیوپ جدید، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده و مراحل دمائی و ورتکس طی گردید. نمونه های به دست آمده با RCF ۱۷۷۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی به میکروتیوپ جدید منتقل و ۳۰۰ میکرولیتر اتانول به آن افزوده شد و پس از مخلوط کردن به ستون استخراج RNA انتقال داده شد. سپس نمونه ها به مدت ۱ دقیقه با RCF ۱۲۳۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع حذف گردید و به مواد باقیمانده ۷۰۰ میکرولیتر محلول DR2 افزوده شد. پس از طی دو مرحله دیگر سانتریفیوژ مواد باقیمانده، ۱۰۰ میکرولیتر محلول DR3 به مواد اضافه و مجدداً سانتریفیوژ گردید. کیفیت و خلوص RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی شد. RNA تام به مقادیر کمتر تقسیم و تا زمان سنتز cDNA در فریزر نگهداری گردید.

سنتز cDNA با استفاده از کیت پارس توس ساخت کشور ایران و طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به هر میکروتیوب، زیرهودلامینار، به ترتیب به مقدار ۲ میکرولیتر RNA تام، ۱ میکرولیتر رندوم هگزامر و ۷ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد. محلول حاصل ابتدا به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد و پس از سرد شدن Rtpimer 2x اضافه گردید و به ترتیب ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد و در آخر ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بدین ترتیب cDNA سنتز و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد برای انجام PCR نگهداری شد.

برای انجام RT-PCR از میکروتیوب های مخصوص RT-PCR، آماده مصرف micro ti- ABI استفاده شد. در زیر هود لامینار، به هر یک از میکروتیوب های ذکر شده به مقدار ۱۰ میکرولیتر مستر میکس سایبرگرین، ۰/۴ میکرولیتر رنگ

استرس نیز بر اساس مطالعه آتاکا^{۱۸} و همکاران انجام شد که در ذیل شرح داده شده است.

القای استرس فیزیکی و روانی

برای القای استرس فیزیکی و روانی از یک جعبه شفاف به نام جعبه ارتباطی (communication box) استفاده شد.^{۱۸} این جعبه شامل ۹ خانه مربعی شکل به ابعاد ۱۵ در ۱۵ سانتی متر می باشد که بصورت شطرنجی پنج خانه آن قابلیت هدایت جریان الکتریکی با جریان ۲ میلی آمپر و ولتاژ ۴۸ ولت و فرکانس ۰/۵ هرتز می باشد و چهار خانه آن فاقد قابلیت هدایت جریان الکتریکی بوده و کاملاً عایق بودند. حیوانات روزانه به مدت ۶۰ دقیقه (در هر دقیقه دو بار به مدت ده ثانیه) در معرض جریان الکتریسیته قرار گرفتند. القای استرس فیزیکی و روانی روزانه بین ساعات ۹ الی ۱۳ به مدت ۱۴ روز انجام شد. استرس فیزیکی در موش ها با برقراری جریان الکتریسیته و برق گرفتگی و لرزش مستقیم القا می شد؛ موش های گروه استرس فیزیکی با ایجاد سر و صدا و متصاعد شدن بوی بدن در زمان برق گرفتگی، سبب ایجاد استرس (استرس روانی) در موش های موجود در ۴ خانه عایق می شدند. از آنجا که این ۴ موش در خانه های عایق جریان الکتریسیته قرار داشتند و فقط شاهد موش های در معرض استرس فیزیکی بودند، در گروه استرس روانی جای گرفتند.^{۱۸}

پس از ۱۴ روز تیمار، موش ها با اتر بیهوش و سپس تشریح شدند. بعد از جدا کردن بافت همبندی اطراف، بیضه چپ همه موش ها جهت ارزیابی بیان نسبی ژن TSPO به ازت مایع و سپس به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل شد. بیضه راست همه موش ها نیز، جهت بررسی های بافت شناسی با روش رنگ آمیزی همتوکسیلین-ئوزین، پس از خارج کردن از بدن به محلول فرم آلدهید ۱۰٪ منتقل شد. خون گیری بطن قلبی نیز همزمان با استخراج بیضه انجام گردید. نمونه های خونی بعد قرار گرفتن در دمای آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه و لخته شدن، به دستگاه سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با RCF ۱۱۰۰ سانتریفیوژ شدند. سرم حاصل در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان سنجش تستوسترون نگهداری شد.

زمینه Rox، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت، ۱ میکرولیتر cDNA و ۷/۶ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد. حجم واکنش Real time PCR، ۲۰ میکرولیتر بود. پس از انجام مراحل فوق میکروتیوب‌ها در دستگاه Step one Real time PCR-ABI (۴۸ تایی (ABI، امریکا) قرار

گرفت و برنامه دمائی مطابق جدول شماره یک برای ژن‌های TSPO و GAPDH تعریف و انجام شد. توالی‌های اولیگونوکلوئیدی ویژه که بعنوان پرایمرهای TSPO و GAPDH استفاده شدند و محصولات حاصل از تشدید ژنی به شرح جدول شماره دو بود.^{۱۹،۲۰}

جدول ۱- سیکل دمائی q-RT-PCR

مدت زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی‌گراد)	تعداد سیکل
۳۰۰ (واسرشت اولیه)	۹۴	۱
۳۰ (واسرشت در ابتدای هر سیکل)	۹۴	
۳۰ (اتصال پرایمرها)	۵۸ TSPO ۵۹ GAPDH	۳۵
۳۰ (گسترش در پایان هر سیکل)	۷۲	
۴۲۰ (گسترش نهائی)	۷۲	۱

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای استفاده شده

پرایمر	توالی (از چپ به راست در جهت ۵' به ۳')	طول قطعه ژنی حاصل (bp)	مرجع انتخاب پرایمر
TSPO	(F): AGAGCTGGGAGGTTTCACA (R): CCAGGCCAGGTAAGGATACA	۲۲۳	۱۹
GAPDH	(F): AAGAAGGTCGTCAAGCAGGCATC (R): CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG	۱۱۲	۱۸

(F): Forward; (R): Reverse

$$\Delta ct_1 = ct - ct_{H-K}$$

$$\Delta ct_2 = ct - ct_{H-K}$$

$$\Delta \Delta ct = \Delta ct_1 - \Delta ct_2$$

$$2^{-\Delta \Delta ct} = \text{میزان بیان ژن}$$

ارزیابی ریخت‌شناسی بافتی بیضه

مقاطع میکروسکوپی بافت بیضه پس از انجام مراحل پاساژ بافتی و برش‌گیری تهیه و با همتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی گردید. پس از انجام مطالعات کیفی بر روی مقاطع بافتی، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، ارتفاع اپی‌تلیوم زایا و ضخامت کپسول بیضه، تعداد سلول‌های لیدیک، تعداد سلول‌های سرتولی، ضرایب اسپرمیوژن و تمایز لوله‌ای در مقاطع بافتی مورد بررسی قرار گرفت.

داده‌های بدست آمده از Real time، در فرمول زیر قرار داده شد و در نهایت میزان بیان نسبی ژن‌ها در هر گروه با مقیاس "مرتبه‌ی تغییر" بدست آمد. ابتدا میانگین ct ژن تک تک گروه‌ها بدست آورده شد، سپس با فرمول زیر، مقدار Δct محاسبه شد. در اینجا Δct_1 مربوط به گروه‌های قبل از تیمار و مربوط به گروه‌های بعد تیمار می‌باشد. در انتها از (گروه کنترل)، میانگین گرفته و مقدار تک تک از مقدار کم می‌شود و مقدار $\Delta \Delta ct$ به دست می‌آید. نهایتاً برای بدست آوردن میزان نهائی بیان ژن، عدد ۲ به توان منفی $\Delta \Delta ct$ می‌رسد.

نانوگرم بر میلی‌لیتر^{۲۴} و روش رادیو ایمنونواسی طبق دستورالعمل کیت (ضریب تغییرات درون سنجش و برون سنجش به ترتیب ۵/۴٪ و ۶/۳٪) اندازه‌گیری شد.

محاسبات آماری

مقایسه تمامی داده‌ها در بین گروه‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (Version 19.00)، آزمون ANOVA یک طرفه و پس‌آزمون توکی صورت پذیرفت. تمامی داده‌ها بر اساس میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان گردید و مقدار $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

طبق نمودار شماره یک، اعمال هر دو نوع استرس فیزیکی ($p = 0.034$) یا روانی ($p = 0.039$) بطور معنی‌دار بیان ژن TSPO را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد. تجویز سولپیراید به موش‌های سالم به طور معنی‌دار ($p = 0.041$) باعث کاهش بیان ژن TSPO در مقایسه با گروه کنترل گردید. همچنین تیمار گروه‌های تحت استرس فیزیکی یا روانی با سولپیراید به طور معنی‌دار در مقایسه با گروه‌های تحت استرس فیزیکی ($p = 0.026$) یا روانی ($p = 0.030$) دریافت‌کننده‌ی سالیین باعث کاهش بیان ژن TSPO شد. هیچ تفاوت معنی‌داری در شاخص مورد بررسی بین گروه‌های استرس فیزیکی و روانی مشاهده نشد ($p = 0.875$) (نمودار ۱).

مطابق شکل شماره یک، لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه کنترل سالیین به صورت فشرده و منظم در کنار هم قرار گرفته‌اند و در داخل لوله‌ها، سلول‌های اسپرماتوژنیک به صورت طبیعی مشاهده می‌شوند و ضریب تمایز لوله‌ای (TDI) و ضریب اسپرمیوژن (SPI) در اکثر لوله‌ها مثبت می‌باشد. اما بررسی بافت بیضه گروه‌هایی که سولپیراید دریافت کرده بودند و همچنین گروه‌هایی که در معرض استرس بوده‌اند، نشان داد که لومن مرکزی در اغلب لوله‌ها، نامتقارن، اغلب خالی و فاقد سلول بالغ می‌باشند که حاکی از اختلال در فرایند اسپرماتوژن می‌باشد. در گروه‌های استرس فیزیکی و روانی دریافت‌کننده‌ی سالیین یا سولپیراید، اکثر لوله‌های اسپرم‌ساز دارای حالت TDI منفی بوده و کاهش چشمگیری در تعداد لایه‌های سلولی اسپرم‌ساز مشاهده شد. همچنین تخریب، عدم انسجام و بهم‌ریختگی اپی‌تلیوم و افزایش بافت بینابینی نیز مشاهده گردید (شکل ۱).

اندازه‌گیری قطر لوله‌های اسپرم‌ساز: لوله‌های اسپرم‌ساز در هر برش عرضی به صورت تصادفی انتخاب و قطر کوچک و قطر بزرگ لوله‌ها با استفاده از عدسی مدرج چشمی اندازه‌گیری شد. عدسی مدرج، به ۱۰ واحد کوچک تقسیم می‌شود که هر یک از این واحدها خود به ۱۰ واحد کوچکتر تقسیم می‌گردند. پس از اندازه‌گیری، عدد حاصل در ضریب مخصوص که برای هر عدسی شیئی متفاوت است، ضرب شد و اندازه‌ی نهایی بر حسب میکرومتر با استفاده از فرمول مقابل محاسبه گردید (بزرگ‌نمایی $\times 40$): میانگین قطر لوله = مجذور (قطر کوچک * قطر بزرگ * ضریب عدسی).

اندازه‌گیری ارتفاع اپی‌تلیوم زایا و ضخامت کپسول

بیضه: ارتفاع اپیتلیوم زایا در لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت کپسول بیضه با استفاده از خط‌کش اکولری (گراتیکول) اندازه‌گیری شد و نتایج بر حسب میکرومتر و با اعمال ضریب عدسی شیئی ($\times 40$) محاسبه گردید.^{۲۱}

تعیین ضریب اسپرمیوژنⁱ (SPI): برای این منظور لوله‌های اسپرم‌سازی که در داخل لومن خود دارای اسپرماتوزوآ بودند به عنوان لوله‌هایی با اندیس اسپرمیوژن مثبت و آن دسته از لوله‌هایی را که دارای لومن خالی از اسپرماتوزوآ بودند به عنوان لوله‌هایی با اندیس منفی در نظر گرفته شدند. به منظور تعیین ضریب اسپرمیوژن، از هر مقطع بافتی ۱۰۰ لوله اسپرم‌ساز به صورت تصادفی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ بررسی شدند و نتایج به صورت درصد لوله‌های با اندیس اسپرمیوژن مثبت گزارش شد.^{۲۲}

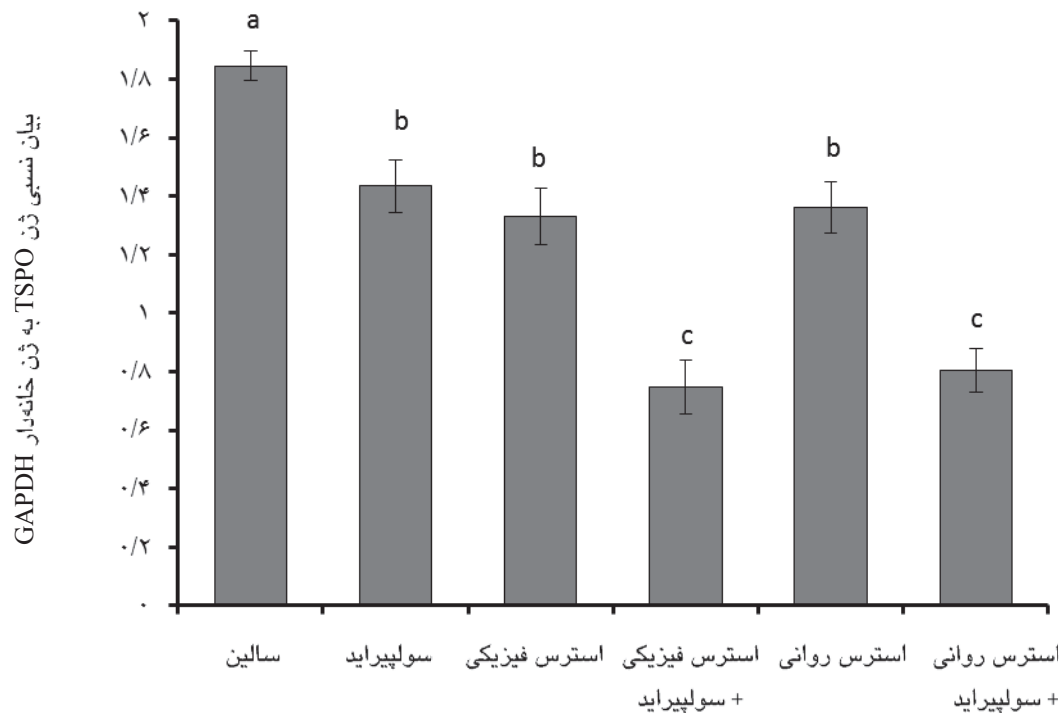
تعیین ضریب تمایز لوله‌ایⁱⁱ (TDI): بدین منظور، ۱۰۰ لوله اسپرم‌ساز به ازای هر مقطع بافت بیضه در گروه‌های آزمایشی به صورت تصادفی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ بررسی شد و درصد لوله‌های اسپرم‌سازی که بیشتر از سه رده سلول‌های اسپرماتوژن تمایز یافته از سلول‌های اسپرماتوگونی نوع A داشتند، محاسبه گردید.^{۲۳}

سنجش غلظت تستوسترون

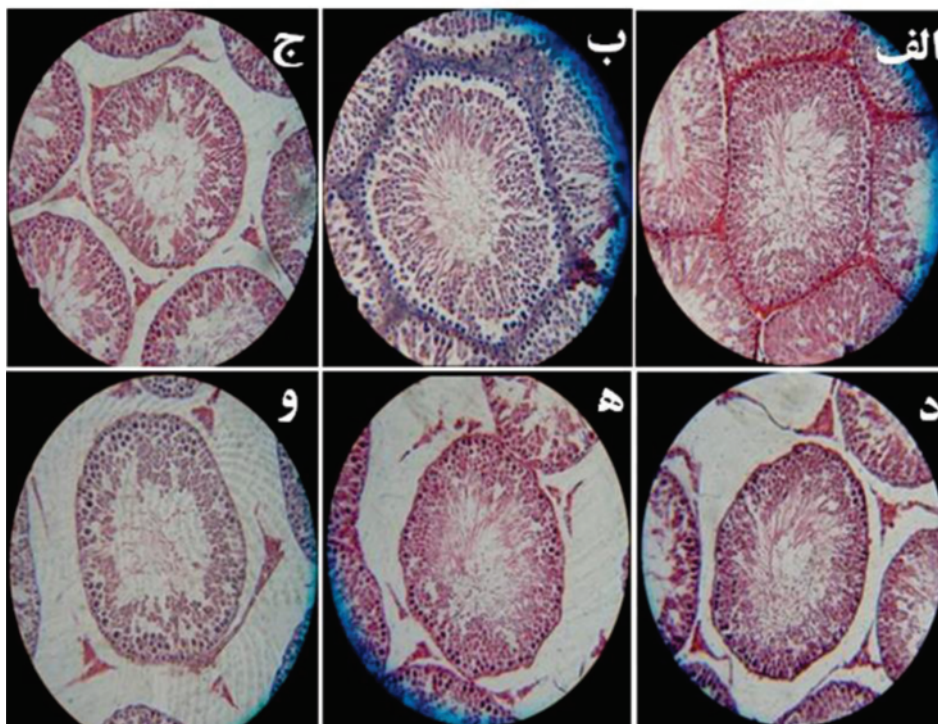
سرم‌های جمع‌آوری شده پس از خروج از دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و دفریز شدن جهت سنجش سطوح تستوسترون مورد استفاده قرار گرفت. غلظت تستوسترون سرم با استفاده از کیت سنجش تستوسترون انسانی RIA (I-125) (I-125) KIT (#RK-61M، شرکت Institute of Isotopes، مجارستان) با حساسیت ۰/۱۸ نانومول بر لیتر معادل ۰/۰۵

i-Spermiation Index (SPI)

ii-Tubule Differentiation Index (TDI)



نمودار ۱- مقایسه میزان بیان نسبی ژن TSPO در بافت بیضه گروه‌های مختلف آزمایشی. گروه‌هایی که هیچ حرف مشابهی نگرفته‌اند دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند ($p < 0.05$) و گروه‌هایی که حتی یک حرف مشابه با هم گرفته‌اند اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند ($p > 0.05$). داده‌ها بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند.

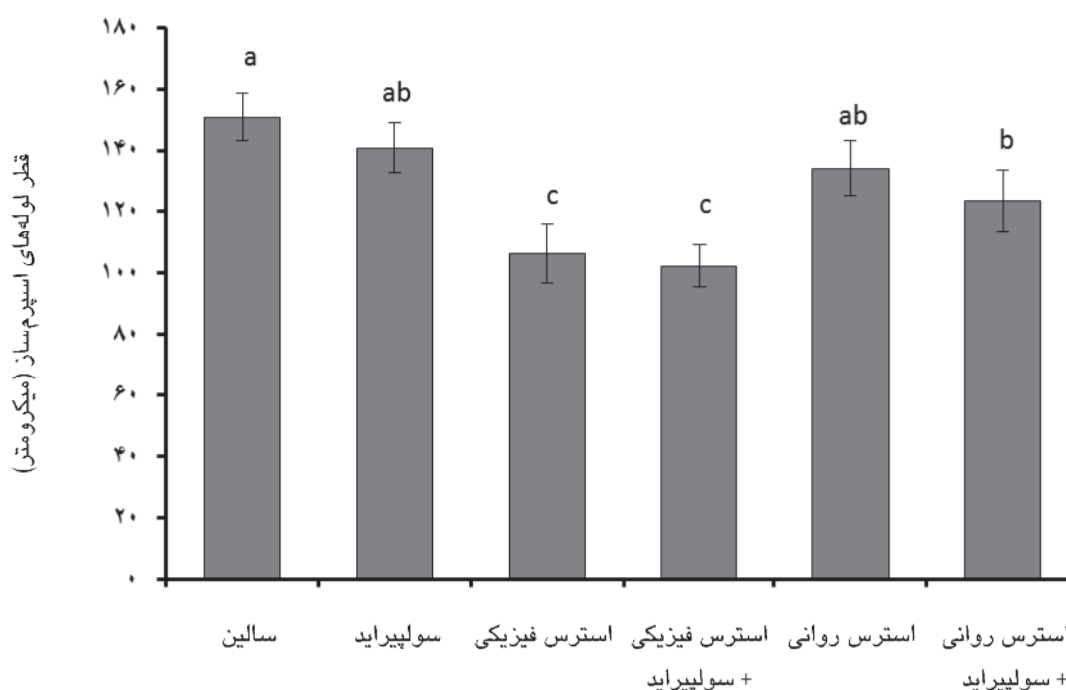


شکل ۱- برش عرضی از بافت بیضه با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین با بزرگ‌نمایی $\times 400$ در گروه‌های کنترل (سالین) (الف)، استرس روانی (ب)، استرس فیزیکی (ج)، سولپیراید (د)، استرس روانی دریافت‌کننده سولپیراید (ه) استرس فیزیکی دریافت‌کننده سولپیراید (و). در گروه کنترل لوله‌های اسپرم‌ساز با انسجام بیشتر و SPI و TDI مثبت مشاهده شد. در گروه‌های استرس فیزیکی و روانی دریافت‌کننده سالین یا سولپیراید بافت بینابینی و لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده شد.

قطر لوله‌های اسپرم‌ساز

طبق نمودار شماره دو، اعمال هر دو نوع استرس فیزیکی یا روانی سبب کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در مقایسه با گروه کنترل گردید؛ با این وجود فقط استرس فیزیکی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار نشان داد ($p=0/042$) و گروه استرس روانی تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل نداشت ($p=0/354$). تجویز سولپیراید به موش‌های سالم باعث کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در مقایسه با گروه کنترل گردید اما این کاهش معنی‌دار نبود ($p=0/672$). همچنین تیمار گروه‌های

تحت استرس فیزیکی یا روانی با سولپیراید به طور غیرمعنی‌دار به ترتیب در مقایسه با گروه‌های تحت استرس فیزیکی ($p=0/881$) یا روانی ($p=0/635$) دریافت‌کننده‌ی سالین باعث کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز شد. بین گروه‌های استرس فیزیکی و روانی تفاوت معنی‌دار در شاخص مورد بررسی وجود داشت ($p=0/039$) به طوری که استرس فیزیکی بیشتر از استرس روانی سبب کاهش معنی‌دار قطر لوله‌های اسپرم‌ساز گردید (نمودار ۲).

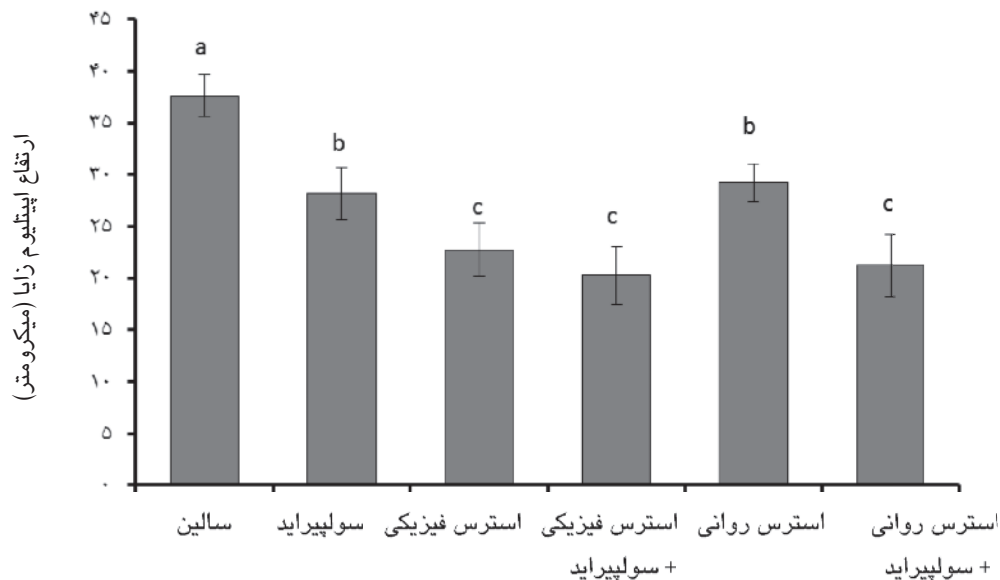


نمودار ۲- مقایسه قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های مختلف آزمایشی. گروه‌هایی که هیچ حرف مشابهی نگرفته‌اند دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند ($p<0/05$) و گروه‌هایی که حتی یک حرف مشابه با هم گرفته‌اند اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند ($p>0/05$). داده‌ها بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند.

ارتفاع اپیتلیوم زایا

طبق نمودار شماره سه، اعمال هر دو نوع استرس فیزیکی ($p=0/009$) یا روانی ($p=0/029$) سبب کاهش معنی‌دار ارتفاع اپیتلیوم زایا در مقایسه با گروه کنترل گردید. تجویز سولپیراید نیز به موش‌های سالم باعث کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایا در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p=0/015$). همچنین تیمار گروه‌های تحت استرس فیزیکی یا روانی با سولپیراید به ترتیب در مقایسه با گروه‌های تحت استرس فیزیکی

($p=0/073$) یا روانی ($p=0/047$) دریافت‌کننده‌ی سالین باعث کاهش ارتفاع اپیتلیوم زایا شد؛ با این وجود این مقدار کاهش فقط بین گروه‌های استرس روانی دریافت‌کننده‌ی سالین و سولپیراید معنی‌دار بود ($p=0/047$). بین گروه‌های استرس فیزیکی و روانی تفاوت معنی‌دار در شاخص مورد بررسی مشاهده شد ($p=0/050$) به طوری که استرس فیزیکی بیشتر از استرس روانی سبب کاهش معنی‌دار ارتفاع اپیتلیوم زایا گردید (نمودار ۳).

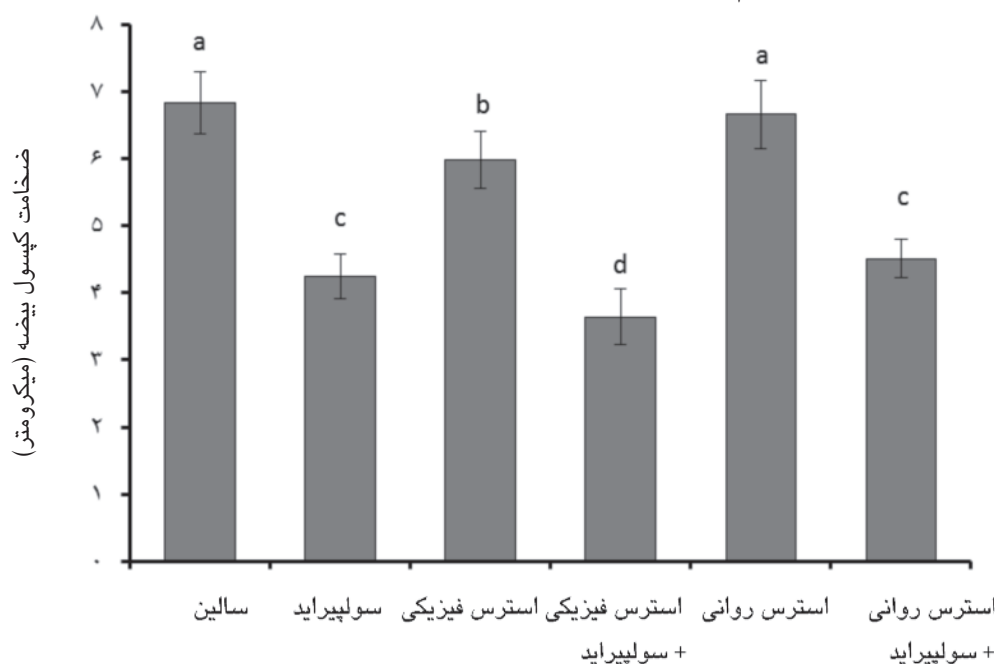


نمودار ۳- مقایسه ارتفاع اپیتلیوم زایا در گروه‌های مختلف آزمایشی. گروه‌هایی که هیچ حرف مشابهی نگرفته‌اند دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند ($p < 0/05$) و گروه‌هایی که حتی یک حرف مشابه با هم گرفته‌اند اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند ($p > 0/05$). داده‌ها بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند.

ضخامت کپسول بیضه

گروه‌های تحت استرس فیزیکی یا روانی با سولپیراید باعث کاهش معنی‌دار ضخامت کپسول بیضه به ترتیب در مقایسه با گروه‌های تحت استرس فیزیکی ($p = 0/009$) یا روانی ($p = 0/008$) دریافت‌کننده‌ی سالین شد. بین گروه‌های استرس فیزیکی و روانی تفاوت معنی‌دار در ضخامت کپسول بیضه مشاهده شد ($p = 0/046$) به طوری که استرس فیزیکی بیشتر از استرس روانی سبب کاهش معنی‌دار ضخامت کپسول بیضه گردید (نمودار ۴).

طبق نمودار شماره چهار، اعمال هر دو نوع استرس فیزیکی یا روانی سبب کاهش ضخامت کپسول بیضه در مقایسه با گروه کنترل گردید؛ اما این کاهش فقط در گروه استرس فیزیکی تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل داشت ($p = 0/045$) و گروه استرس روانی با گروه کنترل تفاوت معنی‌دار نداشت ($p = 0/072$). تجویز سولپیراید به موش‌های سالم باعث کاهش معنی‌دار ضخامت کپسول بیضه در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p = 0/007$). همچنین تیمار

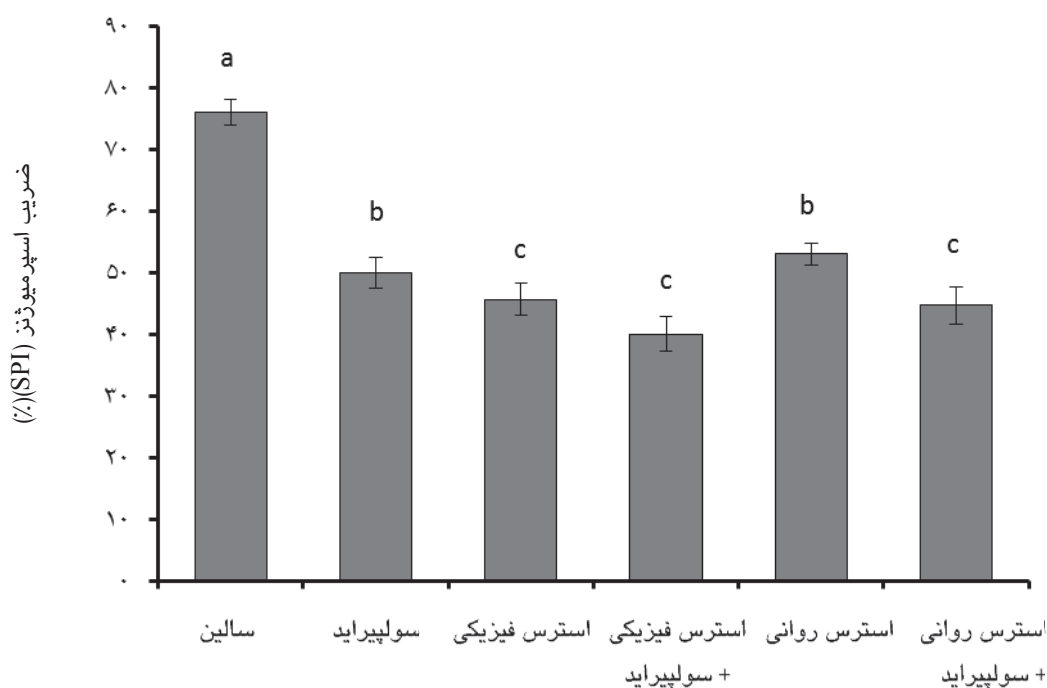


نمودار ۴- مقایسه ضخامت کپسول بیضه در گروه‌های مختلف آزمایشی. گروه‌هایی که هیچ حرف مشابهی نگرفته‌اند دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند ($p < 0/05$) و گروه‌هایی که حتی یک حرف مشابه با هم گرفته‌اند اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند ($p > 0/05$). داده‌ها بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند.

ضریب اسپرمیوژن (SPI)

طبق نمودار شماره پنج، اعمال هر دو نوع استرس فیزیکی ($p=0/027$) یا روانی ($p=0/046$) سبب کاهش معنی‌دار ضریب اسپرمیوژن در مقایسه با گروه کنترل گردید. تجویز سولپیراید نیز به موش‌های سالم باعث کاهش معنی‌دار ضریب اسپرمیوژن در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p=0/041$). همچنین تیمار گروه‌های تحت استرس فیزیکی یا روانی با سولپیراید باعث کاهش ضریب اسپرمیوژن به

ترتیب در مقایسه با گروه‌های تحت استرس فیزیکی یا روانی دریافت‌کننده‌ی سالین شد؛ با این وجود این کاهش فقط بین گروه‌های استرس روانی معنی‌دار بود ($p=0/050$) و تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های استرس فیزیکی وجود نداشت ($p=0/127$). بین گروه‌های استرس فیزیکی و روانی تفاوت معنی‌دار در ضریب اسپرمیوژن مشاهده شد ($p=0/028$) به طوری که استرس فیزیکی بیشتر از استرس روانی سبب کاهش معنی‌دار ضریب اسپرمیوژن گردید (نمودار ۵).

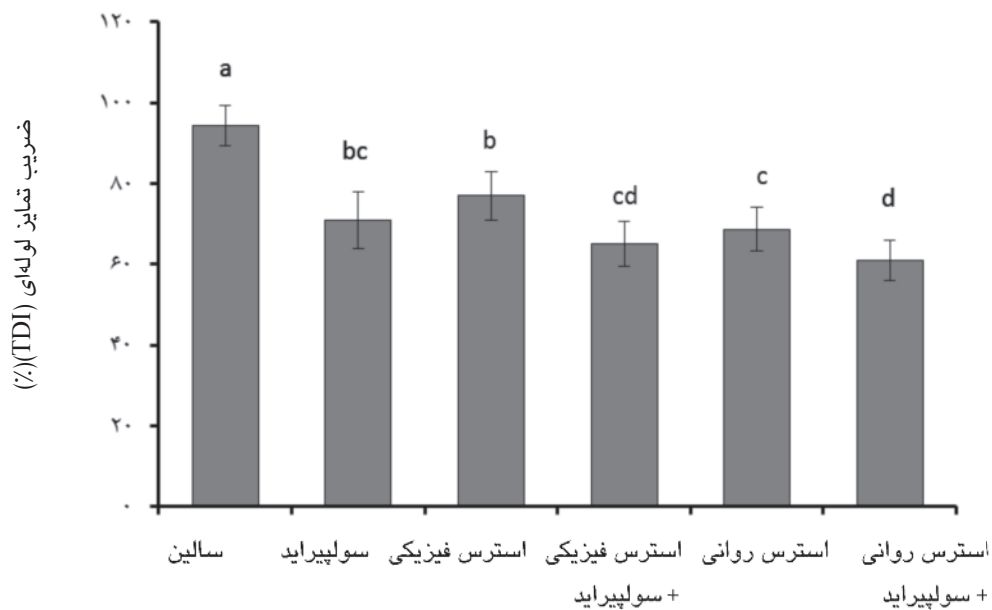


نمودار ۵- مقایسه ضریب اسپرمیوژن در گروه‌های مختلف آزمایشی. گروه‌هایی که هیچ حرف مشابهی نگرفته‌اند دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند ($p<0/05$) و گروه‌هایی که حتی یک حرف مشابه با هم گرفته‌اند اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند ($p>0/05$). داده‌ها بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند.

ضریب تمایز لوله‌ای (TDI)

طبق نمودار شماره شش، اعمال هر دو نوع استرس فیزیکی ($p=0/035$) یا روانی ($p=0/012$) سبب کاهش معنی‌دار ضریب تمایز لوله‌ای در مقایسه با گروه کنترل گردید. تجویز سولپیراید نیز به موش‌های سالم باعث کاهش معنی‌دار ضریب تمایز لوله‌ای در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p=0/025$). همچنین تیمار گروه‌های تحت استرس فیزیکی یا

روانی با سولپیراید باعث کاهش معنی‌دار ضریب تمایز لوله‌ای به ترتیب در مقایسه با گروه‌های تحت استرس فیزیکی ($p=0/034$) یا روانی ($p=0/045$) دریافت‌کننده‌ی سالین شد. بین گروه‌های استرس فیزیکی و روانی تفاوت معنی‌دار در ضریب تمایز لوله‌ای مشاهده شد ($p=0/036$) به طوری که استرس روانی بیشتر از استرس فیزیکی سبب کاهش معنی‌دار ضریب تمایز لوله‌ای گردید (نمودار ۶).

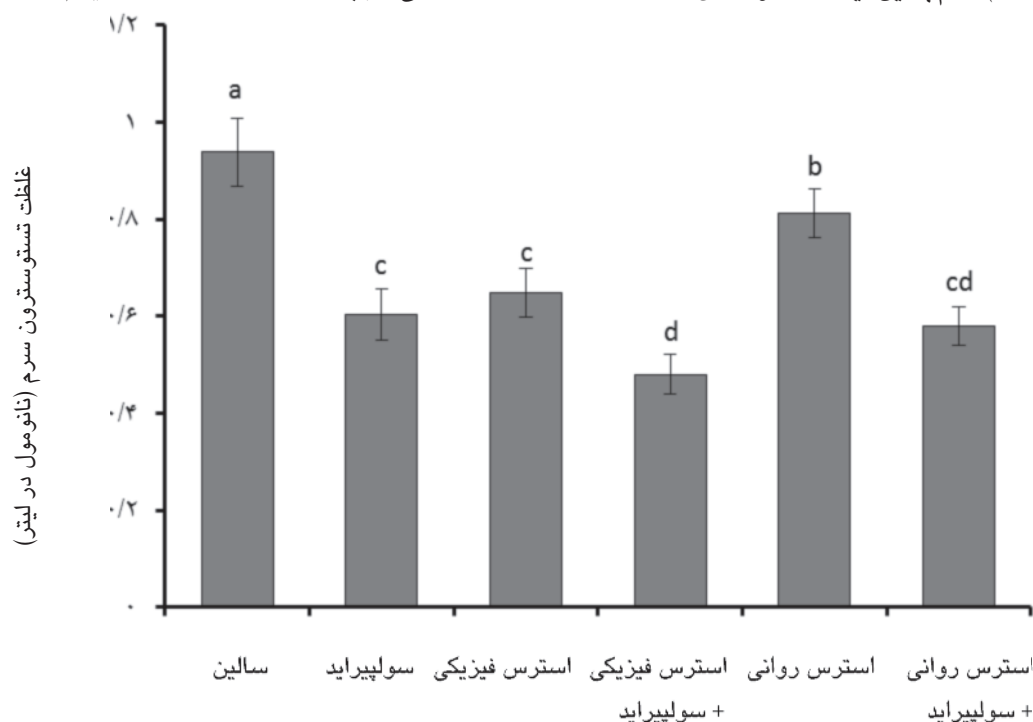


نمودار ۶- مقایسه ضریب تمایز لوله‌ای در گروه‌های مختلف آزمایشی. گروه‌هایی که هیچ حرف مشابهی نگرفته‌اند دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند ($p < 0/05$) و گروه‌هایی که حتی یک حرف مشابه با هم گرفته‌اند اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند ($p > 0/05$). داده‌ها بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند.

استرس فیزیکی یا روانی با سولپیراید باعث کاهش معنی‌دار غلظت سرمی تستوسترون به ترتیب در مقایسه با گروه‌های تحت استرس فیزیکی ($p = 0/036$) یا روانی ($p = 0/013$) دریافت‌کننده‌ی سالین شد. بین گروه‌های استرس فیزیکی و روانی تفاوت معنی‌دار در غلظت سرمی تستوسترون مشاهده شد ($p = 0/027$) به طوری که استرس فیزیکی بیشتر از استرس روانی سبب کاهش تستوسترون گردید (نمودار ۷).

غلظت سرمی تستوسترون

طبق نمودار شماره هفت، اعمال هر دو نوع استرس فیزیکی ($p = 0/004$) یا روانی ($p = 0/019$) سبب کاهش معنی‌دار غلظت سرمی تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل گردید. تجویز سولپیراید نیز به موش‌های سالم باعث کاهش معنی‌دار غلظت سرمی تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p = 0/002$). همچنین تیمار گروه‌های تحت



نمودار ۷- مقایسه غلظت سرمی تستوسترون در گروه‌های مختلف آزمایشی. گروه‌هایی که هیچ حرف مشابهی نگرفته‌اند دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشند ($p < 0/05$) و گروه‌هایی که حتی یک حرف مشابه با هم گرفته‌اند اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند ($p > 0/05$). داده‌ها بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده‌اند.

بحث

در این مطالعه اثر استرس روانی یا فیزیکی و تجویز داروی آنتی‌سایکوتیک سولپیراید به عنوان مهارکننده‌ی گیرنده D2 دوپامینی بر بیان ژن پروتئین ترانسلوکاتور (TSPO) و بر شاخص‌های ریخت‌شناسی بافتی در بیضه‌ی موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین غلظت سرمی تستوسترون بعنوان هورمون گنادی جنس نر که رابطه مستقیمی با میزان فعالیت پروتئین TSPO در بیضه دارد^{۲۰} اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشان دادند که هر دو نوع استرس فیزیکی و روانی موجب کاهش چشمگیر بیان TSPO، آسیب به بافت بیضه، کاهش تعداد لایه‌های سلول‌های اسپرم‌ساز و کاهش سطوح سرمی تستوسترون در مقایسه با موش‌های کنترل شدند. تجویز سولپیراید به موش‌های سالم و تحت استرس علاوه بر کاهش شدید تعداد سلول‌های زایا، باعث تخریب هر چه بیشتر بافت بیضه و کاهش هر چه بیشتر TSPO و تستوسترون گردید.

پیش از این اثرات سوء استرس مزمن بر ساختار و عملکرد غدد جنسی موش‌های صحرایی نر نشان داده شده است.^{۳۶} نیشیمورا و همکاران نشان دادند که استرس باعث اختلال در عملکرد سلول‌های اسپرماتوژنز و از بین رفتن لایه سلول‌های اسپرماتوژنیک در بیضه می‌شود.^{۳۷} استرس بواسطه‌ی تحریک بیان ژن‌های آپوپتوتیک در بیضه منجر به آسیب سلول‌های این بافت و کاهش تولید و ترشح تستوسترون می‌شود.^{۳۸} علاوه بر این، استرس مزمن باعث فعال شدن محور HPA و افزایش ترشح هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی می‌گردد؛ این هورمون‌ها نیز به نوبه خود سبب مهار فعالیت محور HPG و در نهایت منجر به کاهش تولید و ترشح تستوسترون و اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز می‌گردند.^{۳۹} علاوه بر این، گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی بر روی سلول‌های لیدیگ حضور دارند و تحت تأثیر مستقیم استرس دچار کاهش فعالیت و باعث کاهش ترشح تستوسترون می‌شوند.^{۴۰} تستوسترون برای پیشبرد تکثیر سلول‌های جنسی و تولید اسپرم بالغ ضروری است.^{۴۱} لذا استرس با اثر بر ترشح تستوسترون بر روند تولید اسپرم نیز مؤثر خواهد بود. همچنان‌که در مطالعه حاضر مشاهده شد مطابق با مطالعات پیشین اعمال استرس مزمن در موش‌های صحرایی علاوه بر تحلیل بافت بیضه و افزایش فضا‌های میان‌بافتی، کاهش ضخامت کپسول بیضه و کاهش

ارتفاع اپیتلیوم زایا در لوله‌های اسپرم‌ساز، از طریق کاهش ترشح تستوسترون تأثیر منفی بر تولید و تمایز اسپرم گذاشت.

علاوه بر این، در مطالعه حاضر اثر استرس فیزیکی و روانی بر میزان بیان TSPO مورد بررسی قرار گرفت. TSPO تقریباً در تمام بافت‌های بدن و به مقدار بیشتر در بافت‌های سنتزکننده‌ی استروئید مانند قشر آدرنال و گنادها بیان می‌شود.^{۴۲} TSPO با میل ترکیبی بالا به کلسترول متصل می‌شود و ورود آن را به داخل میتوکندری میانجیگری می‌کند که مرحله کلیدی (محدود کننده‌ی سرعت) در تولید استروئیدها بشمار می‌رود.^{۴۳} در مطالعه حاضر نشان داده شد که اعمال هر دو نوع استرس فیزیکی یا روانی سبب کاهش بیان ژن TSPO در بیضه گردید. پیش از این اثر استرس اعم از فیزیکی یا روانی بر بیان ژن TSPO مورد بررسی قرار نگرفته بود. TSPO به میزان قابل توجهی در قشر آدرنال بیان می‌شود.^{۴۴} قشر آدرنال محل سنتز هورمون‌های استروئیدی گلوکوکورتیکوئیدها و مینرالوکورتیکوئیدها است که برای رشد پستانداران، پاسخ به استرس، عملکرد ایمنی و عملکرد مغز بسیار مهم است. افزایش TSPO رابطه مستقیمی با افزایش تولید و ترشح استروئیدهای آدرنالی دارد.^{۴۵،۴۶} و اختلال در بیان ژن TSPO باعث کاهش پاسخ قشر آدرنال به هورمون آدرنرژیک (ACTH) و کاهش ترشح کورتیکواستروئیدها می‌شود؛^{۴۷،۴۸} بنابراین، احتمال می‌رود که افزایش ترشح کورتیکواستروئیدها در طی استرس فیزیکی یا روانی تأثیر فیدبک منفی بر میزان بیان TSPO داشته باشد. با این وجود، پی بردن به مکانیسم دقیق تأثیر استرس بر TSPO نیازمند طراحی مطالعات مبتنی بر بررسی اثرات تجویز کورتیکواستروئیدها بر بیان و فعالیت TSPO می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که لیگندهای دارویی TSPO قادر به فعال کردن سلول‌های لیدیگ برای تولید تستوسترون و سایر استروئیدها می‌باشند.^{۴۹،۵۰} جهش در ژن TSPO در مدل موش آزمایشگاهی منجر به تجمع کلسترول استری در میتوکندری و سیتوزول و کاهش تولید تستوسترون پایه می‌شود.^{۵۱} بنابراین ممکن است کاهش بیان TSPO به دنبال استرس، از دیگر دلایل کاهش سطح تستوسترون در موش‌های تحت استرس فیزیکی یا روانی باشد.

هم‌چنین، نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که تجویز داروی سولپیراید به موش‌های سالم یا موش‌های

تحت استرس، علاوه بر اثرات سوء بر بافت بیضه، تأثیر منفی بر بیان TSPO در این بافت داشت و باعث کاهش هر چه بیشتر بیان این ژن در مقایسه با موش‌های کنترل گردید. طبق مطالعات انجام شده استرس می‌تواند سبب بروز عوارض متعدد روحی روانی اعم از افسردگی و اضطراب شود.^{۲۰} داروهای ضد روان‌پریشی (آنتی‌سایکوتیک) که گیرنده‌های دوپامینی را هدف قرار می‌دهند، گزینه‌ای برای کنترل عوارض ناشی از استرس می‌باشد.^{۲۳،۲۴} پیش از این نشان داده شده است که داروهای ضد روان‌پریشی مسدودکننده گیرنده D2 به دلیل القای هایپرپرولاکتینمی منجر به اختلال در عملکرد جنسی می‌شوند.^{۲۶} پرولاکتین با مهار ترشح هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) باعث کاهش تولید و ترشح گنادوتروپین‌ها و تستوسترون و اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز می‌شود.^{۲۶} بنابراین مصرف برخی آنتاگونیست‌های گیرنده‌ی D2 دوپامین مانند سولپیراید با عوارض جانبی جنسی و اختلالات تولید مثلی همراه است؛ این داروها در مردان باعث اختلال در میل جنسی، اختلال در نعوظ و تأخیر در انزال می‌شوند.^{۲۳،۲۴} سولپیراید از جمله داروهای ضد روان‌پریشی است که امروزه توسط اغلب بیماران مبتلا به اسکیزوفرنی، افسردگی، اضطراب و زخم دوازدهه مورد استفاده قرار می‌گیرد.^{۲۳،۲۴} سولپیراید با مهار گیرنده D2 دوپامینی در توپروایفانندیولار اثر مهاری دوپامین بر ترشح پرولاکتین را از بین می‌برد.^{۱۶} مصرف مداوم سولپیراید از طریق القای هایپرپرولاکتینمی منجر به هیپوگنادی، اختلالات تولیدمثلی و اختلالات اسپرمی می‌شود.^{۱۶} از سوی دیگر مهار گیرنده‌های D2 دوپامینی باعث افزایش ترشح دوپامین و تشدید انتقال پیام مسیره‌ای دوپامینرژیک می‌شود.^{۲۰} نشان داده شده است که افزایش غلظت دوپامین بصورت موضعی منجر به القای استرس اکسیداتیو می‌گردد.^{۲۰} دوپامین بعلت داشتن گروه‌های هیدروکسیل، مستعد تولید ماده بسیار فعال دوپامین کینون می‌باشد که تولید رادیکال‌های فعال به روش آنزیمی و اتواکسیداسیونی را افزایش می‌دهد.^{۲۰} نشان داده‌اند که تجویز سولپیراید با افزایش انتقال پیام مسیره‌ای دوپامینرژیک سبب کاهش محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز می‌گردد.^{۱۶} لذا تجویز سیستمیک سولپیراید، مشابه آنچه که در مطالعه حاضر انجام شد، ممکن است در بافت‌هایی مانند مغز و بیضه که گیرنده‌ی D2 دوپامینی را دارند سبب تشدید انتقال پیام 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 می‌باشد.^{۳۶} طبق مطالعات قبلی، گیرنده D2 دوپامین در مایع منی و اسپرم و در تخمدان حضور دارد.^{۳۶} حضور گیرنده‌های D2 در سلول‌های جوانه‌زای نر حاکی از نقش‌های جدید و غیرمترقبه برای انتقال پیام دوپامین در فیزیولوژی بیضه و اسپرم است.^{۳۷،۳۸} نشان داده شده است که دوپامین در غلظت‌های پائین از طریق فعال کردن گیرنده‌های D2 اثرات محافظتی بر روی اسپرم و پیشبرد لقاح دارد.^{۳۷} در حالی که مسدود کردن گیرنده‌های D2 دوپامین، که به دنبال تجویز آنتاگونیست این گیرنده‌ها مانند سولپیراید اتفاق می‌افتد از طریق افزایش ترشح دوپامین باعث کاهش فسفوریلاسیون تیروزین و اختلالات اسپرمی و القای استرس اکسیداتیو می‌شود.^{۳۸} در خصوص تأثیر دوپامین و نقش گیرنده‌های آن در سنتز یا فعالیت TSPO اطلاعاتی در دست نیست. در مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داده شد که مهار گیرنده‌های D2 دوپامینی توسط سولپیراید سبب کاهش بیان TSPO در موش‌های سالم و موش‌های تحت استرس گردید. گونگ و همکاران نشان داده‌اند که امپونیل، لیگاند صنایع TSPO، بطور معنی‌داری از حذف شدن و مرگ نرون‌های دوپامینرژیک در موش‌های مبتلا به پارکینسون می‌کاهد.^{۳۹} به این ترتیب که فعالیت پروتئین ترانسلوکاتور (TSPO) اولاً از طریق مهار پاسخ به پروتئین‌های آنفولد و ثانیاً از طریق کاهش استرس سلولی و کاهش آپوپتوز سبب افزایش غلظت دوپامین می‌شود و از پیشرفت علائم پارکینسون جلوگیری می‌کند.^{۳۹} بر اساس آن مطالعه، فعالیت طبیعی TSPO برای تداوم ترشح دوپامین از نرون‌های دوپامینرژیک مؤثر است.^{۳۹} اما تاکنون تأثیر تغییرات غلظت دوپامین مشابه حالتی که سولپیراید تجویز می‌شود بر میزان بیان یا فعالیت TSPO مورد بررسی قرار نگرفته است. در مطالعه حاضر برای اولین بار کاهش بیان TSPO بدنبال تجویز سولپیراید نشان داده شد که احتمال دارد ناشی از اثرات فیدبکی افزایش دوپامین به دنبال تجویز سولپیراید بر بیان ژن TSPO باشد. طراحی مطالعاتی که ارتباط دقیق بین سیستم دوپامینرژیک و TSPO را آشکار کند می‌تواند چشم‌انداز جدیدی در کنترل و درمان طیفی از بیماری‌های نورواندوکرینولوژیک ایجاد نماید.

اثرات متقابل دوپامین و TSPO از جمله مهم‌ترین محدودیت‌های پژوهشی مطالعه حاضر بود. در ادامه این تحقیق، طراحی مطالعات مبتنی بر بررسی اثرات تجویز کورتیکوستروئیدها و سایر آنتاگونیست‌ها و آگونیست‌های دوپامین بر بیان و فعالیت TSPO پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری: این مطالعه از محل بودجه اختصاص یافته به پایان‌نامه کارشناسی ارشد آقای حسینعلی محمودی در دانشگاه ارومیه انجام گردید. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه جناب آقای دکتر بهرام دلیر نقده به خاطر همکاری در تهیه تجهیزات و تأمین بودجه مورد نیاز برای انجام تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

در مجموع بر اساس مطالعه صورت گرفته می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اعمال استرس فیزیکی یا روانی باعث آسیب زدن به بافت بیضه و لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش بیان پروتئین انتقال‌دهنده‌ی کلسترول به میتوکندری (TSPO) در بیضه و کاهش تستوسترون گردید؛ استرس روانی تقریباً به همان اندازه استرس فیزیکی اثرات مخرب بر ساختار و عملکرد بیضه داشت. استفاده از سولپیراید به تنهایی یا هم‌زمان با استرس سبب افزایش هر چه بیشتر تخریب در بافت بیضه و کاهش هر چه بیشتر بیان TSPO و سطح سرمی تستوسترون گردید. بودجه محدود برای بررسی اثرات سایر آنتی‌دپرسانت‌ها و آنتاگونیست‌های گیرنده‌های دوپامین، تعداد محدود موش‌های مورد بررسی در هر گروه و محدودیت تعداد مقالات پژوهشی پیشین در خصوص

References

- Russell G, Lightman S. The human stress response. *Nat Rev Endocrinol* 2019; 15: 525-34.
- Surwit RS, van Tilburg MA, Zucker N, McCaskill CC, Parekh P, Feinglos MN, et al. Stress management improves long-term glycemic control in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 30-4.
- Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. *Hum Reprod* 1998; 13: 33-44.
- Bali A, Singh N, Jaggi AS. Investigations into mild electric foot shock stress-induced cognitive enhancement: possible role of angiotensin neuropeptides. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2013; 14: 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 Imag Behav* 2019; 13: 1780-8.
- Rivier C, Rivest S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod* 1991; 45: 523-32.
- Kamkar M, Zare S, Babaei F. The Effect of Sulpiride and Food Restriction on Depression and Anxiety Control in Adult Male Rats. *J Arak Uni Med Sci* 2019; 22: 107-17. [Farsi] Available from: URL: <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-5556-en.html>
- Gelowitz DL, Kokkinidis L. Enhanced amygdala kindling after electrical stimulation of the ventral tegmental area: implications for fear and anxiety. *J Neurosci* 1999; 9: 41.
- Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. Dopamine receptors—IUPHAR review 13. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 1-23.
- Pandiyan N. Medical drugs impairing fertility. *Reproductive Health and the Environment: New York: Springer*; 2007. p. 187-205. Available from: URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-4829-7_9
- Halbreich U, Kinon B, Gilmore J, Kahn L. Elevated prolactin levels in patients with schizophrenia: mechanisms and related adverse effects. *Psychoneuroendocrinol* 2003; 28: 53-67.
- Liu J, Cao W, Qiu H, Sun X, Yang X, Wang E. Determination of sulpiride by capillary electrophoresis with end-column electrogenerated chemiluminescence detection. *Clin Chem* 2002; 48: 1049-58.
- Cookson J, Hodgson R, Wildgust HJ. Prolactin, hyperprolactinaemia and antipsychotic treatment: a review and lessons for treatment of early psychosis. *J Psychopharmacol* 2012; 26: 42-51.
- Selvaraj V, Tu LN. Current status and future perspectives: TSPO in steroid neuroendocrinology. *J Endocrinol* 2016; 23: 30.
- Vassilios Papadopoulos V, Fan J, Zirkkin B. Translocator protein (18 kDa): an update on its function in steroidogenesis. *J Neuroendocrinol* 2018; 30(2): 10.
- Khorasani A, Fartootzadeh R, Khazali H, Mahmoudi F. Effect of Orexin Infusion into Third ventricle on the Translocator protein (TSPO) Gene Expression in the Ovary of Pubertal Androgenized Female Rats. *J Cell Tissue* 2014; 5: 301-7. [Farsi] Available from: URL: <https://www.sid.ir/En/Journal/ViewPaper.aspx?ID=465644>
- Benelli A, DePol A, Poggioli R, Cavazzuti E, Arletti R, Bertolini A, et al. L-sulpiride, at antidepressant dosage, prevents conditioned- fear stress- induced gastric lesion in rats. *Pharmacol Res* 2000; 42: 157-60.
- 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. *Neuroregul Motil* 2012; 15: 303: 519-28.
- Salehi MS, Jafarzadeh Shirazi MR, Zamiri MJ, Pazhoohi F, Namavar MR, Niazi A, et al. Hypothalamic Expression of KiSS1 and RFamide-related Peptide-3 mRNAs during The Estrous Cycle of Rats. *Int J Fertil Steril* 2013; 6: 304-9.
- Bar-Ami S, Bendel N, Leschiner S, Levin E, Veenman L, Gavish M. The effects of prostaglandin F2alpha treatment on peripheral-type benzodiazepine receptors in the ovary and uterus during pseudopregnancy of rats. *Biocchem Pharmacol* 2006; 14: 71: 472-8.
- Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc* 2008; 2008: 4986.

22. Rezvanfar M A, Sadrkhanlou R A, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Rezvanfar MA, 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. *Hum Exp Toxicol* 2008; 27: 901-10.
23. Porter K L, Shetty G, Meistrich ML. Testicular edema is associated with spermatogonial arrest in irradiated rats. *Endocrinol* 2006; 147: 1297-305.
24. Azizi V, Oryan S, Khazali H, Hosseini A. The involvement of kisspeptin in centrally regulatory mechanism of neuropeptide Y on testosterone secretion in male Wistar rats. *Physiol Pharmacol* 2016; 20: 267-76.
25. Owen DR, Fan J, Campioli E, Venugopal S, Midzak A, Daly E, et al. TSPO mutations in rats and a human polymorphism impair the rate of steroid synthesis. *Biochem J* 2017; 474: 3985-99.
26. Zou P, Wang X, Yang W, Liu C, Chen Q, Yang H, et al. Mechanisms of Stress-Induced Spermatogenesis Impairment in Male Rats Following Unpredictable Chronic Mild Stress (uCMS). *Int J Mol Sci* 2019; 20: 4470.
27. Nishimura H, L'Hernault SW. Spermatogenesis. *Current Biol* 2017; 27: 988-94.
28. Guo Y, Sun J, Li T, Zhang Q, Bu S, Wang Q, et al. Melatonin ameliorates restraint stress-induced oxidative stress and apoptosis in testicular cells via NF- κ B/iNOS and Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Sci Rep* 2017; 7: 1-3.
29. Orr TE, Mann DR. Role of glucocorticoids in the stress-induced suppression of testicular steroidogenesis in adult male rats. *Horm Behav* 1992; 26: 350-63.
30. Batarseh A, Papadopoulos V. Regulation of translocator protein 18 kDa (TSPO) expression in health and disease states. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 327: 1-12.
31. Chung JY, Chen H, Midzak A, Burnett AL, Papadopoulos V, Zirkin BR. Drug Ligand-Induced activation of Translocator Protein (TSPO) stimulates steroid production by aged Brown Norway rat leydig cells. *Endocrinol* 2013; 154: 2156-65.
32. Barron AM, Ji B, Kito S, Suhara T, Higuchi M. Steroidogenic abnormalities in translocator protein knockout mice and significance in the aging male. *Biochem J* 2018; 475: 75-85.
33. Beeder LA, Samplaski MK. Effect of antidepressant medications on semen parameters and male fertility. *Int J Urol* 2020; 27: 39-46.
34. Kato K. Response of patients in mixed state of anxiety and depression to low dose sulpiride. *Igaku Kenkyu* 1993; 63: 15-9.
35. Miyazaki I, Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Act Med Okayama* 2008; 62: 141-50.
36. Rampino A, Marakhovskaia A, Soares-Silva T, Torretta S, Veneziani F, Beaulieu JM. Antipsychotic drug responsiveness and dopamine receptor signaling: old players and new prospects. *Fronts Psychiatry* 2019; 9: 702.
37. Otth C, Torres M, Ramirez A, Fernandez JC, Castro M, Rauch MC, et al. Novel identification of peripheral dopaminergic D2 receptor in male germ cells. *J Cell Biochem* 2007; 100: 141-50.
38. Jafarpour Fard M, Karami M, Jalali Nadoushan M. Interaction of sulpiride with morphine in induction of male rat infertility. *J Basic Clin Pathophysiol* 2019; 7: 6-11.
39. Gong J, Szego EM, Leonov A, Benito E, Becker S, Fischer A, et al. Translocator protein ligand protects against neurodegeneration in the MPTP mouse model of Parkinsonism. *J Neurosci* 2019; 39: 3752-69.

Original Article

Effect of Sulpiride on Translocator Protein (TSPO) Gene Expression and Histomorphometric Indices in the Testis of Rats under Physical or Psychological Stress

Mahmoodi H.A, Babaei-Balderlou F

Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, I.R.Iran

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

Received: 05/09/2020 Accepted: 12/05/2021

Abstract

Introduction: It is well established that stress or the use of sulpiride, an antipsychotic, disrupts the reproductive system. Translocator protein (TSPO) in the mitochondrial membrane of steroidogenic tissues, such as gonads, is involved in the regulation of steroid hormone production by transporting cholesterol into the mitochondria. The present study aimed to investigate the effects of stress and sulpiride on changes in TSPO gene expression and testicular histology. **Materials and Methods:** In this experimental study, 42 adult male Wistar rats were randomly divided into two groups, receiving saline and sulpiride (4 mg/kg, intraperitoneally). Each group was divided into three subgroups: control, psychological stress, and physical stress. Physical stress (electricity current: -0.5 Hz, -2 mA, -48v) or psychological stress (observation of rats under physical stress) was induced using a communication box for 14 days. At the end of the treatment period, the relative expression of TSPO gene in the testis was assessed by real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) and measurement of testicular histomorphometric indices and serum testosterone concentration. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test in SPSS. **Results:** Stress caused testicular tissue damage and significant decrease in the TSPO expression and testosterone, compared to the control group (physical stress P...., psychological stress P...). Besides reducing the number of germ cells drastically, sulpiride administration led to the destruction and disruption of the epithelium of seminiferous tubules, increased interstitial space of the testicular tissue, and further reduction of TSPO and testosterone. **Conclusion:** Both physical and psychological stress led to testicular damage, besides decreasing the TSPO expression and serum testosterone concentration. Sulpiride administration mainly increased the adverse effects of stress on reproduction system, suggesting the side effects of this drug.

Keywords: Sulpiride, TSPO, Stress, Testis, Testosterone