

The effects of ceftriaxone on sperm parameters, DNA damage and *in vitro* fertilization in mice

Seidabadi M., DVM¹, Najafi Gh., PhD², Hasanzadeh Sh., PhD³

1. Doctor of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Basic Science, Anatomy and Embryology section, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-44-33653271, g.najafi2006@yahoo.com

3. Associate Professor, Department of Basic Science, Histology Ward, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: Ceftriaxone is a cephalosporin derivative used in the treatment of respiratory infections and meningitis. The main purpose of this study was to evaluate ceftriaxone effects on sperm quantity, quality, damages and *in vitro* fertilization (IVF) in adult mice.

Material and Methods: 40 adult male mice were randomly divided into 3 groups as following: control group received intraperitoneal normal saline every day; experimental groups 1 and 2 received 20 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of ceftriaxone respectively through intraperitoneal route. Samples were obtained one week and 45 days after treatment Half of the animals in the test groups were analyzed after one week and the other half after 45 days. The sperm parameters including, sperm count, sperm viability, percentages of immature sperms, DNA damages, status of acrosomal enzymes, percentages of zygotes, two cell embryos and blastocysts were evaluated. Data were analyzed by repeated measure test. $P < 0.05$ was considered significant.

Results: Ceftriaxone caused a significant reduction ($P < 0.05$) in the total number of the sperms, percentage of viable sperms, increased number of immature sperms and sperms with DNA damage. Use of ceftriaxone in the test groups led to decreased population of zygotes, two cell embryos, blastocysts and increased percentage of arrested embryos compared to the control group.

Conclusion: Ceftriaxone decreased sperm fertility potential by affecting the quality and quantity of sperms in mice.

Keywords: Ceftriaxone, Sperm parametrs, DNA damage, In vitro fertilization, mice.

Received: Jan 23, 2016 **Accepted:** Feb 7, 2017

مطالعه اثرات سفتریاکسون بر پارامترهای اسپرم، آسیب DNA اسپرمی و توان باروری آزمایشگاهی (IVF) در موش سوری

مرتضی سیدآبادی^۱، غلامرضا نجفی^۲، شاپور حسنزاده^۳

۱. دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. استادیار، گروه علوم پایه دامپزشکی، بخش آناتومی و جنین‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، تلفن ثابت: ۰۴۴-۳۳۶۵۲۲۷۱

g.najafi2006@yahoo.com

۳. دانشیار، گروه علوم پایه دامپزشکی، بخش بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سفتریاکسون یکی از مشتقات سفالوسپورین‌ها می‌باشد که در درمان عفونت‌های تنفسی و مننژیت مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف اصلی از این مطالعه، بررسی اثر سفتریاکسون بر کمیت، کیفیت، آسیب و توان باروری آزمایشگاهی و روند رشد جنین‌ها در موش سوری بالغ بود.

روش بررسی: ۴۰ قطعه موش سفید کوچک آزمایشگاهی به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: گروه کنترل که روزانه سرم فیزیولوژی به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند، گروه‌های تیمار ۱ و ۲ که روزانه داروی سفتریاکسون را به ترتیب با دوز ۲۰ mg/kg و ۵۰ mg/kg از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. متعاقب ۷ و ۴۵ روز از شروع تیمار، نمونه‌برداری انجام شد. پارامترهای اسپرم شامل تعداد اسپرم‌ها، درصد اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم‌های بالغ، آسیب به DNA اسپرم، وضعیت آنزیم‌های آکروزومی، درصد زیگوت، جنین‌های دوسلولی و بلاستوسیست‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها با روش آماری Repeated Measure آنالیز شدند و سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: داروی سفتریاکسون باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) تعداد اسپرم‌ها، درصد اسپرم‌های زنده، افزایش درصد اسپرم‌های نابالغ و با DNA آسیب‌دیده در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل شد. سفتریاکسون در هر دو دوز مصرف شده باعث کاهش درصد زیگوت، جنین‌های دوسلولی، بلاستوسیست در مقایسه با گروه کنترل و افزایش درصد جنین‌های متوقف شده، گردید.

نتیجه‌گیری: سفتریاکسون با اثر بر فاکتورهای کیفی و کمی اسپرم، باعث کاهش توان باروری اسپرم در موش سوری می‌گردد.

کلید واژه‌ها: سفتریاکسون، پارامترهای اسپرم، آسیب DNA، لقاح داخل آزمایشگاهی، موش سوری

وصول مقاله: ۹۴/۱۱/۳ اصلاحیه نهایی: ۹۵/۱۱/۹ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۸

مقدمه

به علت استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها، مطالعه اثرات سوء آنها ضروری به نظر می‌رسد. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر ایجاد مقاومت باکتری‌ها، اثرات زیانباری نیز بر سایر ارگان‌های بدن می‌گذارد. در حال حاضر یکی از این موارد، کاهش توان باروری در پی استفاده از آنها است (۱). آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، کلروکوین، اریترومايسين و کوتریموکسازول اثرات غیر قابل برگشتی بر اسپرم داشته و باعث کاهش حرکت و توانایی حیات اسپرم در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) می‌شوند (۲).

سفتریاکسون آنتی‌بیوتیکی وسیع‌الطیف از نسل سوم خانواده سفالوسپورین‌ها بوده که در مقابله با انواع باکتری‌ها و برای درمان عفونت‌های تنفسی، دستگاه ادراری مثل سوزاک، استخوان‌ها و مفاصل، پوست و مننژیت در انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنتی‌بیوتیک با اختلال در سنتز دیواره سلولی از طریق ممانعت از سنتز پپتیدوگلیکان‌ها، سبب تخریب باکتری‌ها می‌گردد. سفتریاکسون با فرمول $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$ و وزن مولکولی ۵۵۴/۵۸ گرم بر مول برای تجویز داخل وریدی و داخل عضلانی در درمان عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شود (۳).

فناوری تولید جنین در شرایط آزمایشگاهی به ما اجازه تولید تعداد انبوه جنین در مراحل تکاملی گوناگون را می‌دهد و از اینرو بسیار مورد استقبال دانشمندان علوم زیستی، تولیدمثلی و بیوتکنولوژی قرار گرفته است (۴)، این روش امکان بررسی اثرات سوء داروها را در شرایط آزمایشگاهی امکان‌پذیر و تسهیل نموده است. کاهش کیفیت اسپرم نیز اغلب وابسته به فاکتورهای محیطی است. مواد شیمیایی و داروهایی که به طور نادرست مصرف می‌شوند، از جمله این عوامل محیطی محسوب می‌گردند (۵). همچنین در مطالعاتی توقف تقسیم اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌های اولیه، تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده شده است (۶).

سفالوسپورین‌ها با اینکه ممکن است مقاومت دارویی شدیدی را در فرد ایجاد نمایند، اما ریسک ایجاد اثرات جانبی در آنها بالاست (۸ و ۷). مطالعاتی مبنی بر اینکه سفالوسپورین‌ها اثرات توکسیک بر بافت بیضه و کاهش تولید اسپرم در رت‌ها اعمال می‌نمایند، وجود دارد (۹). این آنتی‌بیوتیک‌ها بیشترین اثرات تخریبی را بر تقسیم میتوز و میوز سلول‌های اسپرماتوگونی دارند. آنها سبب کاهش سنتز پروتئین در هسته اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌های اولیه شده، در نتیجه سبب کاهش متابولیسم گلوکز در سلول‌های سری اسپرماتوژنز می‌گردند (۳). همچنین دوز درمانی سفالوسپورین‌ها ممکن است تحریک (۱۰) و درصد اسپرم‌های زنده (۱۱) را تحت تاثیر قرار داده و باعث کاهش توان باروری شوند. نمونه‌ای از آنها باعث واکنش شدن سلول‌های اسپرماتوگونی، ادم در فضای بین لوله‌ها، وجود اسپرماتوزوآ نابالغ در اکثریت لوله‌های سمنی فر در رت‌های آلبینو می‌گردد (۱۲).

بر مبنای مطالعات پیشین سفتریاکسون باعث افزایش فعالیت آنزیم هیالورونیداز شده است که این عمل به نوبه خود باعث تراوش آنزیم فوق‌الذکر از سلول‌ها در بافت بیضه و در نهایت آسیب به اسپرم می‌گردد (۱۳). در مطالعه‌ای دیگر مشخص شده است که سفتریاکسون باعث افزایش رادیکال‌های آزاد می‌گردد که این خود می‌تواند باعث پراکسیداسیون چربی و آسیب به غشای سلول و در نهایت آسیب به سلول‌ها شود (۱۴). مطالعات حاکی از تراکم عروق خونی و ادم در بافت بینابینی بیضه، بی‌نظمی سلول‌های جنسی در لوله‌های سمنی فر و چین خوردگی در غشای پایه برخی از لوله‌ها در رت‌های تیمار شده با سفتریاکسون‌ها هستند. کاهش معنی‌دار در تعداد و تحرک اسپرم رت‌های تحت تیمار با سفالوسپورین‌ها نیز، دیده شده است (۱۵).

با وجود گزارشات متفاوتی که در مورد بررسی اثر سوء آنتی‌بیوتیک‌ها بر دستگاه تولیدمثلی وجود دارد، همچنان خلاء‌هایی در مطالعات مذکور دیده می‌شوند. داروی

این گروه ۱۵ عدد بود. نمونه برداری در روزهای ۷ (IP2-) و ۴۵ (IP2-45) انجام گرفت. لازم به ذکر است مقدار سفتریاکسون موثر (LD50) در موش سوری بر اساس بروشور شرکت تولید کننده، برابر با ۲۲۰۰ میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن می باشد (Hospira Co-USA).

تهیه و شمارش اسپرمها

پس از بیهوش کردن موشها توسط کتامین، موشها توسط جابجایی مهره‌های گردنی آسان‌کشی شدند. ناحیه شکم باز شده و دم اپیدیدیم از بیضه جدا شده و درون اپندورف حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت Human Tubal HTF Fluid, (Sigma, USA) حاوی ۴ میلی گرم بر میلی لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA=Bovine Serum Albumin, Sigma, USA) در داخل انکوباتور CO₂ % با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه گذاشته شدند تا اسپرمها وارد محیط کشت شوند. از اسپرمهای به دست آمده رقت ۱ به ۲۰ (۵ میکرولیتر اسپرم موجود در محیط کشت با ۹۵ میکرولیتر رقیق کننده) تهیه شده و با استفاده از لام هموسیتمتر تعداد اسپرمها در گروههای مختلف در هر میلی لیتر از محیط کشت به دست آمد (۱۹) و (۱۸).

بررسی درصد اسپرمهای زنده (Sperm viability) برای تعیین درصد اسپرمهای زنده از رنگ آمیزی ائوزین نگرزین استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از اسپرم مورد نظر روی لامی تمیز با ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگی ائوزین مخلوط گشته و پس از گذشت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه، ۲۰ میکرولیتر محلول رنگی نگرزین به آن افزوده شد. پس از تهیه گسترش و خشک شدن، لامها توسط میکروسکوپ نوری جهت تعیین درصد اسپرمهای زنده و مرده بررسی شدند (۲۰).

بررسی درصد اسپرمها با DNA آسیب دیده:

سفتریاکسون یکی از آنتی بیوتیکهای پرمصرف و تا حدودی مخاطره آمیز می باشد که می تواند کیفیت و کمیت اسپرمها را تحت تاثیر قرار دهد، بر این اساس در این مطالعه اثرات سفتریاکسون بر کیفیت، آسیب DNA و توان باروری آزمایشگاهی اسپرم در موش سوری بررسی شده است.

روش بررسی

حیوانات مورد مطالعه:

این مطالعه از نوع تجربی بوده و تعداد ۴۰ قطعه موش سوری نر بالغ (گونه Bulb/c) با وزن $23 \pm 1/1$ گرم استفاده شد. موشها در شرایط استاندارد با دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۲-۶۵% و با سیکل نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند (۱۷) و آب و غذا به صورت آزاد در اختیار موشها گذاشته شد. داروی سفتریاکسون (Ceftriaxone, Hospira Inc. 275 North field Drive, lake Forest, Illinois- USA) تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفت. سپس موشها به طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل (C): در این گروه به موشها سرم فیزیولوژی استریل از طریق داخل صفاقی (IP=Intra Peritoneal) تزریق شد. تعداد موشهای این گروه ۱۰ عدد بود. نمونه برداری از گروه کنترل در روز ۷ و در روز ۴۵ انجام گرفت.

۲- گروه آزمایشی ۱ (IP-1): در این گروه موشها روزانه داروی سفتریاکسون را با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم (داخل صفاقی) دریافت کردند. تعداد موشهای این گروه ۱۵ عدد بود. نمونه برداری در روزهای ۷ (IP-1-) و ۴۵ (IP1-45) انجام گرفت.

۳- گروه آزمایشی ۲ (IP-2): در این گروه موشها روزانه داروی سفتریاکسون را با دوز ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم (داخل صفاقی) دریافت کردند. تعداد موشهای

۵۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۵ عبور داده شده و به مدت ۲ دقیقه در محلول OG6 رنگ آمیزی شده و از سه ظرف الکل ۵٪ عبور داده شدند. در نهایت رنگ آمیزی با محلول EA50 به مدت ۲ دقیقه انجام شد. پس از عبور از سه ظرف الکل ۵٪، دو ظرف الکل ۱۰٪ و چهار ظرف زایلن، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند (۲۵ و ۲۶).

بررسی توان باروری آزمایشگاهی (IVF) برای به دست آوردن تخمک جهت انجام توان باروری آزمایشگاهی، موش‌های ماده بالغ آماده تحریک تخمک-گذاری شدند. به ازای هر موش نر، ۳ موش ماده در نظر گرفته شد. تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از تزریق ۱۰ واحد هورمون PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, Folligon Co, Netherlands) و ۴۸ ساعت بعد آن، با تزریق ۱۰ واحد هورمون HCG (Human Chorionic Gonadotropin, Folligon Co, Netherlands) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به روش داخل صفاقی صورت گرفت. روز پیش از لقاح، محیط کشت‌های لازم آماده شدند و جهت به تعادل رسیدن ۱۲ ساعت قبل از لقاح در انکوباتور با ترکیب گازی ۵٪ CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. دیش‌های لقاح محتوی محیط کشت HTF (Human Tubal Fluid, Sigma, USA) که با ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA, Sigma, USA) ترکیب شده بود، قطره-گذاری شدند. یک قطره ۵۰۰ میکرولیتری در هر دیش برای لقاح و چندین قطره ۱۰۰ میکرولیتری برای شست‌وشو و کشت در دیش‌های استریل گذاشته و روی سطح آن‌ها با روغن معدنی (Mineral oil, Sigma, USA) پوشانده شد. ۱۰ تا ۱۲ ساعت پس از تزریق هورمون HCG، موش-های ماده آسان‌کشی شدند. پس از قرار گرفتن لوله‌های رحمی در محیط کشت ۳۷ درجه، با استفاده از تکنیک دیسکت (Dissecting) تخمک‌ها (تصویر ۱) از آمپول

برای این منظور از رنگ آمیزی آکریدین اورنج (Acridine Orange) استفاده شد. این رنگ آمیزی جهت تفریق DNA سالم از DNA تخریب شده تک - رشته‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. بعد از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ اسپرم‌ها با DNA سالم به رنگ سبز دیده می‌شوند، در حالیکه انواع آسیب دیده به رنگ نارنجی مشاهده می‌گردند (۲۱). پس از تهیه اسمیر از اسپرم‌ها، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت توسط محلول کارنوی فیکس شدند. سپس لام‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در جریان هوا قرار گرفتند. رنگ آکریدین اورنج تازه تهیه شده در بافر سترات فسفات (۰/۱۹ میلی‌گرم پودر آکریدین اورنج در ۱۰۰ میلی - لیتر بافر سترات فسفات) برای رنگ آمیزی استفاده شد. پس از ۱۰ دقیقه، لام‌ها با میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر ۴۶۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند (۲۴ ۲۲).

بررسی وضعیت بلوغ اسپرم

برای این منظور از رنگ آمیزی آنیلین بلو استفاده شد. از اسپرم‌های موجود در محیط کشت گسترش تهیه شده و پس از خشک شدن در جریان هوا، نمونه‌ها توسط فیکساتور گلو تار آلدئید ۸٪ به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شدند. اسمیرها توسط محلول رنگی آنیلین بلو ۵٪ (به همراه استیک اسید ۵٪ (pH = ۳/۵)) به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. درصد اسپرم‌های بالغ با سر بی‌رنگ و اسپرم‌های نابالغ با سر آبی رنگ با استفاده از میکروسکوپ نوری (X ۱۰۰) به دست آمدند (۲۲).

رنگ آمیزی پاپانیکولاو (Papanicolaou) برای بررسی آکروزوم

پس از ثبوت لام‌ها، نمونه‌ها در الکل‌های ۷۰، ۸۰، ۹۵ و ۵۰ و سپس در آب مقطر قرار داده شده، به مدت ۲ تا ۳ دقیقه با محلول همتاکسیلین رنگ آمیزی شدند. پس از شستشو با آب مقطر، لام‌ها در هیدروکلریک اسید ۲۵٪ و آب مقطر (۲ بار) غوطه‌ور گشتند. پس از شستشو، نمونه‌ها از الکل‌های

اوویداکت خارج شده و به قطرات حاوی محیط کشت HTF (به همراه ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA) منتقل شدند.

سپس از آن اسپرم‌های ظرفیت یافته، به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت به قطرات لقاح اضافه شدند. حدود ۴ الی ۶ ساعت بعد، عمل لقاح با مشاهده دو پیش هسته نر و ماده انجام شد. زیگوت‌های به دست آمده بعد از شست و شو در داخل قطرات ۱۰۰ میکرولیتری در زیر روغن معدنی به مدت ۱۲۰ ساعت (۵ روز) کشت داده شدند (۲۷). ۲۴ ساعت پس از کشت تعداد جنین‌های دو سلولی و ۱۲۰ ساعت بعد از کشت تعداد بلاستوسیست‌ها و جنین‌های متوقف شده در هر گروه در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت. جنین‌هایی که درصد بالایی از لیز شدگی و فراگماتنه شدن را نشان دادند، به عنوان تیپ I تعریف شدند. جنین‌هایی که در آن‌ها لیز شدن و فراگماتنه شدن در حد متوسطی بود، به عنوان تیپ II در نظر گرفته شدند. در نهایت جنین‌هایی که دارای حداقل لیز شدگی و فراگماتناسیون بودند، به عنوان تیپ III در نظر گرفته شدند (۲۸ و ۲۹).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS و نسخه ۲۰ (IBM CO. USA) و به روش آماری Repeated Measure مورد آنالیز آماری قرار گرفت. سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

اصول اخلاقی

تمامی مراحل این تحقیق تحت نظارت کمیته حمایت از حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی ارومیه و با کسب مجوز از کمیته اخلاقی دانشگاه ارومیه به شماره ۳/۱۸۹ پ انجام شده است.

یافته‌ها

شمارش تعداد اسپرم:

تعداد اسپرم‌ها در تمامی گروه‌های دریافت کننده سفتریاکسون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0.05$). تعداد اسپرم‌ها در گروه IP1-45 اختلاف معنی‌داری با گروه IP2-45 داشت ($p < 0.05$). این حالت نشانگر این است که با افزایش دوز مصرفی سفتریاکسون، تعداد اسپرم‌ها کاهش نشان می‌دهد. گروه‌های IP2-7 و IP1-7 دارای اختلاف معنی‌دار با هم نبودند ($p > 0.05$). گروه IP2-45 کاهش معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به تمامی گروه‌های IP1-45، IP2-7 و IP1-7 نشان داد. بیشترین کاهش به ترتیب مربوط به گروه‌های IP1-45، IP2-45، IP1-45، IP2-7 و IP1-7 بود (جدول ۱) و نمودار a). در نتیجه افزایش دوز مصرفی سفتریاکسون و افزایش طول زمان تاثیر دارو، بر کاهش تعداد اسپرم‌ها موثر بوده است.

قابلیت زنده ماندن اسپرم (Sperm viability):

درصد اسپرم‌های زنده در تمامی گروه‌های دریافت کننده سفتریاکسون، کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل داشته است ($p < 0.05$). تمامی گروه‌های آزمایشی (IP2-45، IP1-45، IP2-7 و IP1-7) دارای اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) نسبت به همدیگر بودند. کمترین درصد اسپرم‌های زنده به ترتیب مربوط به گروه‌های IP2-45، IP1-45، IP2-7 و IP1-7 بودند (جدول ۱، و نمودار b) و تصویر ۲، الف). بنابراین هم با افزایش دوز مصرفی سفتریاکسون و هم با گذر زمان، درصد اسپرم‌های زنده کاهش یافته است.

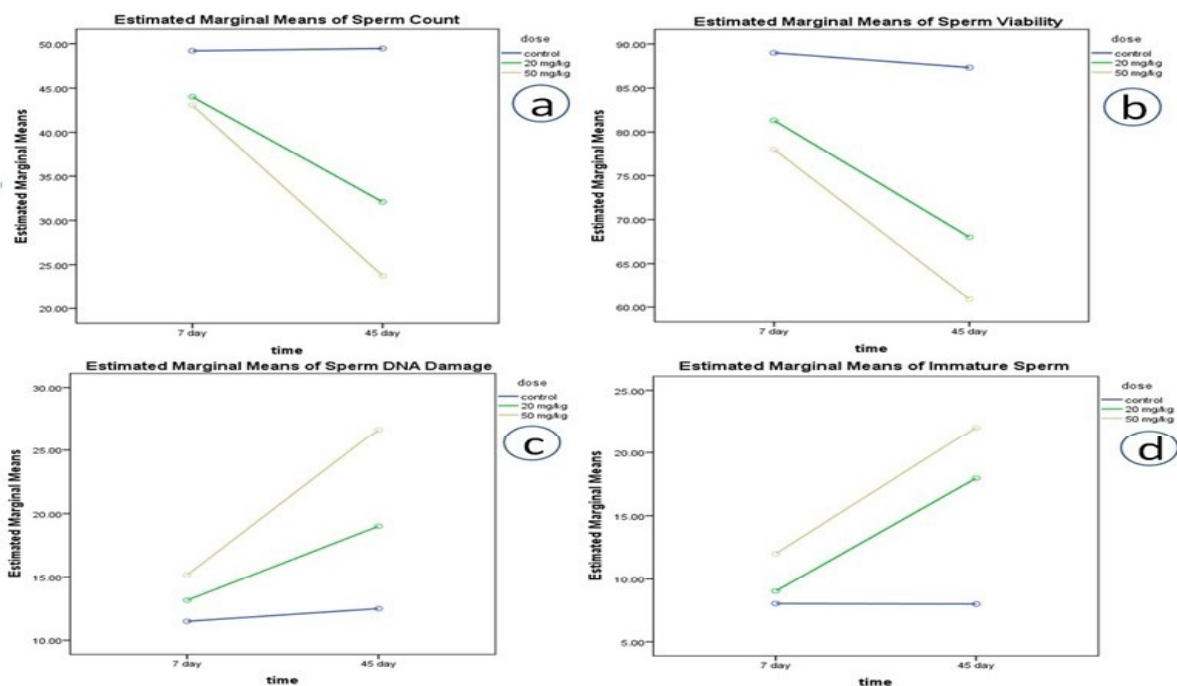
درصد اسپرم‌هایی با DNA آسیب دیده:

افزایش درصد اسپرم‌هایی با DNA آسیب دیده در گروه‌های دریافت کننده سفتریاکسون نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. تمامی گروه‌های آزمایشی به غیر از IP1-7 ($p > 0.05$) اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) را نسبت به گروه کنترل نشان دادند. تمامی گروه‌های IP1-7، IP2-7 و IP1-45 اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) را نسبت به همدیگر نشان دادند ولی هیچ اختلاف معنی‌داری بین IP1-

گروه‌های IP1-7 و IP2-7 هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p=0/340$) (نمودار ۱، d). درصد اسپرم‌های نابالغ در گروه IP2-45 افزایش معنی‌داری ($p<0/05$) را نسبت به IP2-7 نشان داد. همچنین این اختلاف معنی‌دار (جدول ۱ و نمودار ۱، d). در نتیجه با گذر زمان و افزایش دوز مصرفی سفتریاکسون، افزایش در درصد اسپرم‌های نابالغ مشاهده گردید. بررسی آکروزوم: در هیچ کدام از گروه‌های آزمایشی تغییرات خاصی در آکروزوم اسپرم‌ها مشاهده نگردید (تصویر ۲، د).

45 و IP2-45 دیده نشد ($p>0/05$). بیشترین آسیب DNA مربوط به گروه IP2-45 بود (جدول ۱، نمودار ۱، C، و تصویر ۲، ب). این می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که هر دو عامل دوز مصرفی و گذشت زمان، بر میزان آسیب DNA اسپرم‌ها موثر است. ارزیابی اسپرم‌های نابالغ:

بیشترین درصد اسپرم‌های نابالغ در گروه IP2-45 مشاهده گردید (تصویر ۲، ج). تمامی گروه‌های آزمایشی به غیر از گروه IP1-7 ($p>0/05$) افزایش معنی‌داری ($p<0/05$) از درصد اسپرم‌های نابالغ را نسبت به گروه کنترل نشان دادند. گروه‌های آزمایشی IP1-45 و IP2-45 اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) را نسبت به همدیگر نشان دادند. بین



نمودار ۱: میانگین تعداد اسپرم‌ها (a)، درصد اسپرم‌های زنده (b)، درصد اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده (c) و درصد اسپرم‌های نابالغ (d) در گروه کنترل و گروه‌های مختلف آزمایشی در طول زمان.



تصویر ۱. تعدادی اووسیت به همراه توده کومولوسی اطراف آن‌ها دیده می‌شود (بزرگ‌نمایی X ۷۰، میکروسکوپ معکوس).

جدول ۱. مقایسه میانگین تعداد اسپرم‌ها، درصد اسپرم‌های زنده، درصد اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده و درصد اسپرم‌ها با هسته نابالغ در گروه‌های مختلف مورد مطالعه. داده‌ها بر اساس Mean \pm SE بیان شده‌اند ($p < 0.05$).

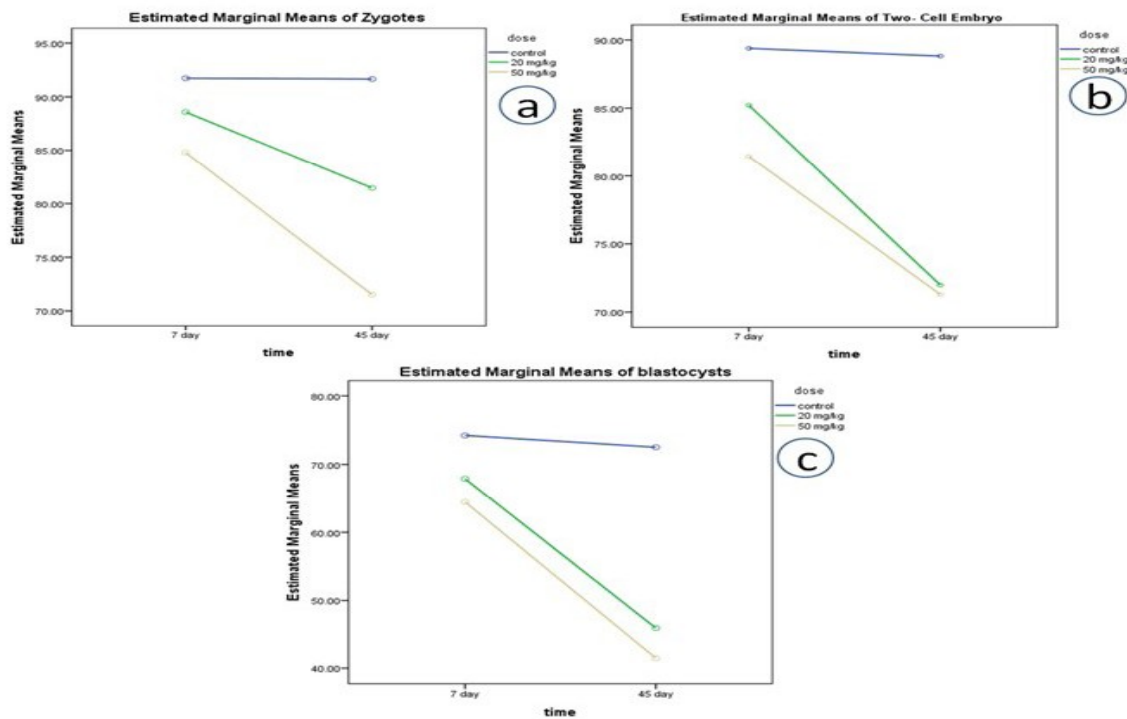
IP2-45	IP1-45	IP2-7	IP1-7	کنترل روز ۴۵	کنترل روز ۷	تعداد اسپرم‌ها (بر حسب میلیون بر میلی لیتر)
۲۳/۷۶ \pm ۱/۴۸ ^c	۳۲/۰۹ \pm ۲/۰۷ ^d	۴۳/۰۶ \pm ۱/۷۰ ^{bc}	۴۴/۰۱ \pm ۱/۱۶ ^b	۴۹/۴۶ \pm ۰/۲۶ ^a	۴۹/۲۰ \pm ۰/۴۳ ^a	درصد اسپرم‌های زنده
۶۰/۹۳ \pm ۱/۰۷ ^c	۶۸/۰۱ \pm ۱/۶۲ ^d	۷۸/۰۱ \pm ۰/۵۰ ^c	۸۱/۳۳ \pm ۰/۹۲ ^b	۸۷/۳۳ \pm ۱/۳۵ ^a	۸۹/۰۰ \pm ۰/۵۵ ^a	درصد اسپرم‌ها با DNA آسیب دیده
۲۶/۶۶ \pm ۱/۶۹ ^{cd}	۱۹/۰۱ \pm ۰/۸۶ ^c	۱۵/۱۶ \pm ۰/۳۵ ^b	۱۳/۱۶ \pm ۰/۴۰ ^a	۱۲/۵۰ \pm ۰/۴۰ ^a	۱۱/۵۰ \pm ۰/۳۴ ^a	درصد اسپرم‌ها با هسته نابالغ
۲۲/۰۳ \pm ۰/۴۸ ^d	۱۷/۹۶ \pm ۰/۸۳ ^c	۱۲/۰۰ \pm ۱/۲۷ ^{ab}	۹/۰۳ \pm ۰/۸۶ ^a	۸/۰۰ \pm ۰/۵۱ ^a	۸/۰۳ \pm ۰/۵۵ ^a	

* در هر ردیف حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) است.

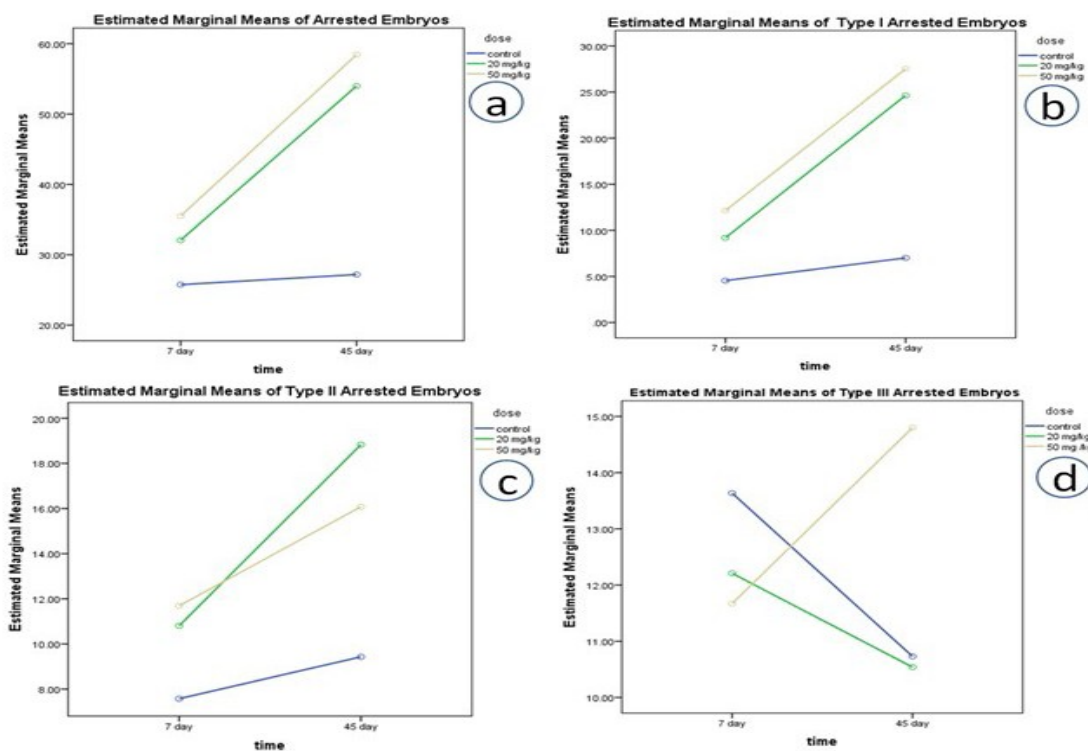
است. به طوریکه گروه‌های IP1-45 و IP2-45 اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) را نسبت به گروه کنترل و گروه‌های IP1-7 و IP2-7 نشان دادند، در حالیکه هیچ اختلاف معنی‌داری بین IP1-7 و IP2-7 با گروه کنترل مشاهده نشد ($p > 0.05$). تعداد جنین‌های تیپ II نیز تحت تاثیر سفتریاکسون افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) را نسبت به گروه کنترل داشته است. گروه‌های IP1-45 و IP2-45 اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) را نسبت به گروه کنترل و گروه‌های IP1-7 و IP2-7 نشان دادند، در حالیکه هیچ اختلاف معنی‌داری بین IP1-7 و IP2-7 با گروه کنترل مشاهده نشد ($p > 0.05$). تعداد جنین‌های تیپ III تحت تاثیر سفتریاکسون کاهش را نسبت به گروه کنترل نشان دادند، اما هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی و

بررسی توان باروری آزمایشگاهی: درصد زیگوت، جنین‌های دو سلولی و بلاستوسیست‌ها کاهش را در گروه‌های دریافت کننده سفتریاکسون نشان می‌دهند. این کاهش وابسته به دوز بوده، به طوریکه بیشترین کاهش در گروه IP2-45 دیده شد. هر دوی گروه‌های IP1-45 و IP2-45 کاهش معنی‌داری ($p < 0.05$) را نسبت به گروه کنترل نشان دادند. در حالیکه گروه‌های آزمایشی IP1-45 و IP2-45 نسبت به کنترل هیچ اختلاف معنی‌داری ($p > 0.05$) نشان ندادند. رشد جنین‌ها نیز با افزایش دوز دارو متوقف شده است. کیفیت جنین‌ها در اثر تزریق سفتریاکسون پایین آمده است، به طوریکه که تعداد جنین‌های تیپ I در گروه‌های تحت تاثیر با سفتریاکسون، افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) را نسبت به گروه کنترل داشته

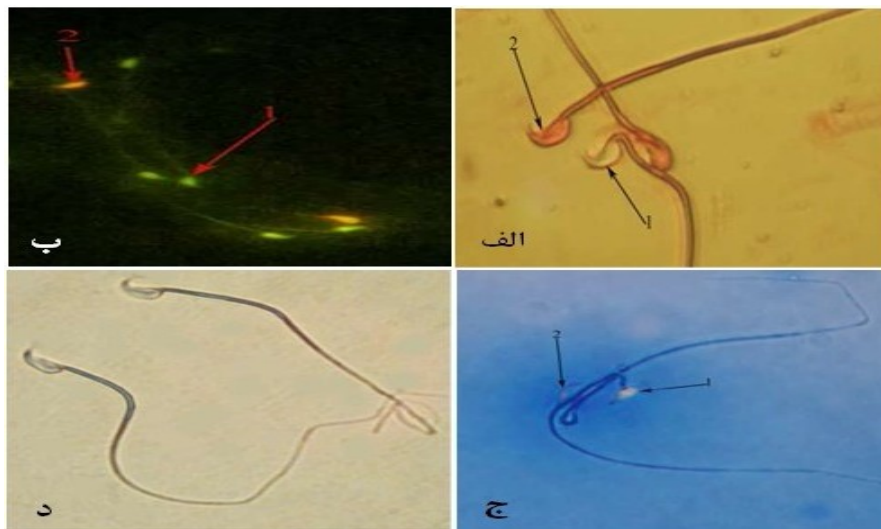
گروه کنترل دیده نشد ($p > 0.05$). در مقایسه بین گروه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p > 0.05$) (جدول ۲)



نمودار ۲: میانگین درصد لقاح (a)، درصد جنین‌های دو سلولی (b) و بلاستوسیتها (c) در گروه کنترل و گروه‌های مختلف آزمایشی در طول زمان.

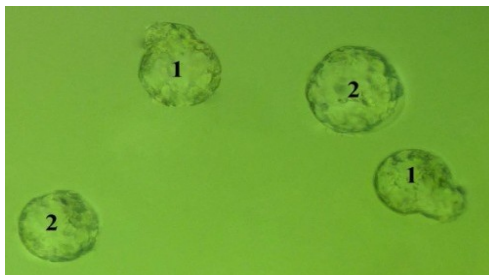


نمودار ۳: میانگین جنین‌های متوقف شده (a)، جنین‌های نوع ۱ (b)، جنین‌های نوع ۲ (c) و جنین‌های نوع ۳ (d) در گروه کنترل و گروه‌های مختلف آزمایشی در طول زمان.

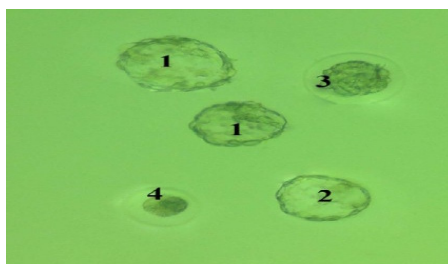


تصویر ۲. الف) پیکان شماره ۱ اسپرم زنده و پیکان شماره ۲ اسپرم مرده را نشان می‌دهد که انوزین به درون سیتوپلاسم نفوذ کرده است. (رنگ آمیزی انوزین نگرزین، بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰X، میکروسکوپ نوری)، ب) پیکان ۱ اسپرم‌های سالم و پیکان ۲ اسپرم‌های با DNA آسیب دیده را نشان می‌دهند (رنگ آمیزی آکریدین اورنج، بزرگ-بزرگ).

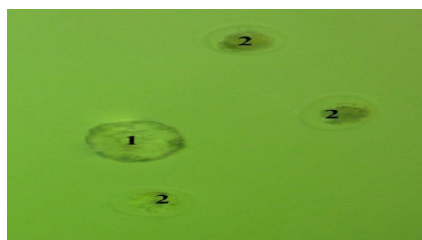
نمایی X ۴۰۰، میکروسکوپ فلورسنت، ج) پیکان ۱ اسپرم با هسته نابالغ و پیکان ۲ اسپرم با هسته بالغ را نشان می‌دهند (رنگ‌آمیزی آنیلین بلو، بزرگ‌نمایی X ۴۰۰، میکروسکوپ نوری)، د) تغییراتی در اسپرم‌های مورد تیمار مشاهده نمی‌گردد (رنگ‌آمیزی پاپانیکولا، بزرگ‌نمایی X ۱۰۰۰، میکروسکوپ نوری).



تصویر ۳. گروه کنترل. تعدادی جنین در مرحله بلاستوسیست (۱) و تعدادی جنین در حال هچ شدن در روز ۵ بعد از لقاح دیده می‌شود (بزرگ‌نمایی X ۲۰۰، میکروسکوپ معکوس).



تصویر ۴. گروه آزمایشی IP1-45. تعدادی جنین در مرحله بلاستوسیست (۱) و تعدادی جنین هچ شده (۲) در روز ۵ بعد از لقاح دیده می‌شود (بزرگ‌نمایی X ۲۰۰، میکروسکوپ معکوس).



تصویر ۵. گروه آزمایشی IP2-45. تعداد یک جنین در مرحله بلاستوسیست (۱) و تعدادی اووسیت بارور نشده (۲) در روز ۵ بعد از لقاح دیده می‌شود (بزرگ‌نمایی X ۲۰۰، میکروسکوپ معکوس).

جدول ۲. مقایسه میانگین پارامترهای مختلف مطرح در بررسی توان باروری آزمایشگاهی. داده‌ها بر اساس Mean ± SE بیان شده‌اند (p < ۰/۰۵).

IP2-45	IP1-45	IP2-7	IP1-7	کنترل روز ۴۵	کنترل روز ۷	
۷۱/۵۲ ± ۴/۱۸ ^b	۸۱/۴۷ ± ۱/۵۴ ^a	۸۴/۷۹ ± ۱/۴۴ ^a	۸۸/۵۸ ± ۳/۶۱ ^a	۹۱/۶۶ ± ۱/۵۷ ^a	۹۲/۱۶ ± ۱/۵۳ ^a	زیگوت
۷۱/۲۹ ± ۲/۰۸ ^b	۷۱/۹۸ ± ۳/۳۵ ^b	۸۱/۴۵ ± ۳/۴۷ ^a	۸۵/۲۲ ± ۱/۲۹ ^a	۸۸/۸۲ ± ۱/۲۹ ^a	۸۹/۵۹ ± ۰/۸۹ ^a	جنین دو سلولی
۴۱/۵۵ ± ۴/۸۸ ^b	۴۵/۹۷ ± ۴/۹۸ ^b	۶۴/۴۷ ± ۳/۷۰ ^a	۶۷/۹۱ ± ۲/۸۷ ^a	۷۲/۷۹ ± ۰/۶۱ ^a	۷۴/۴۹ ± ۰/۹۱ ^a	بلاستوسیست
۵۸/۴۴ ± ۴/۸۸ ^b	۵۳/۹۹ ± ۴/۹۵ ^b	۳۵/۵۲ ± ۳/۷۰ ^a	۳۲/۰۷ ± ۲/۸۷ ^a	۲۷/۱۹ ± ۰/۶۱ ^a	۲۵/۵۰ ± ۰/۹۰ ^a	متوقف شده
۲۷/۵۳ ± ۳/۶۴ ^b	۲۴/۶۴ ± ۴/۳۴ ^b	۱۲/۱۴ ± ۱/۴۰ ^a	۹/۱۹ ± ۱/۰۵ ^a	۷/۰۱ ± ۰/۹۳ ^a	۵/۵۳ ± ۱/۳۱ ^a	تیپ I
۱۶/۰۸ ± ۱/۵۴ ^b	۱۸/۸۳ ± ۳/۴۴ ^b	۱۱/۶۹ ± ۱/۹۸ ^a	۱۰/۶۵ ± ۲/۶۹ ^a	۹/۴۳ ± ۰/۵۳ ^a	۸/۳۸ ± ۱/۱۹ ^a	تیپ II
۱۴/۸۰ ± ۱/۵۹ ^a	۱۰/۵۴ ± ۲/۸۶ ^a	۱۱/۶۷ ± ۱/۱۳ ^a	۱۲/۲۱ ± ۱/۷۱ ^a	۱۰/۷۳ ± ۱/۵۹ ^a	۱۱/۵۹ ± ۲/۲۲ ^a	تیپ III

* در هر ردیف حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (p < ۰/۰۵) است.

بحث

در حدود ۵۰٪ زوج‌های جوان ناباروری هستند. ۵۰٪ عوامل ناباروری مربوط به مردان بوده و این عارضه به علت اختلال و ناهنجاری‌های تولید مایع سمینال است (۳۰). عوامل مختلفی در ایجاد این اختلالات دخیل هستند که بیشتر آن‌ها بر کیفیت اسپرم تاثیرگذار می‌باشند (۳۱). از جمله آن‌ها فاکتورهای محیطی مثل مواد دارویی و شیمیایی می‌باشند که مورد استفاده انسان قرار می‌گیرند (۳۲). اثر بسیاری از مواد از جمله الکل، نیکوتین و داروهای همچون سپرومترین و کولشی‌سین فوکسیم و دیلتیازیم بر بافت بیضه، اسپرم و روند اسپرماتوژنز مشخص شده است که این مواد باعث تغییرات پاتولوژیک در بافت بیضه شده و اختلال در روند اسپرماتوژنز به وجود می‌آورند، همچنین باعث کاهش طول عمر، حرکت و تعداد اسپرم‌ها می‌شوند که این اختلالات می‌توانند منجر به کاهش باروری گردند (۳۳). برخی داروها از جمله سپرومترین (۳۴) و دیلتیازیم (۳۵) که در انسان مورد استفاده قرار می‌گیرند، می‌توانند باعث ایجاد یکسری تغییرات پاتولوژیک در بافت بیضه از جمله آتروفی و ادم گردند. مشخص شده است که داروی سیکلوسپورین A در رت‌ها باعث کاهش قابل توجهی در تعداد اسپرم‌ها و تحرک آن‌ها می‌شود (۳۶). سفتریآکسون آنتی‌بیوتیکی از خانواده سفالوسپورین‌ها می‌باشد که در برابر بروسلا ملتینیس (۳۷) و استرپتوکوکوس فکالیس (۳۸) موثر می‌باشد و از آن برای درمان عفونت‌های تنفسی و سوزاک در انسان استفاده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که سفتریآکسون باعث کاهش معنی‌داری در غلظت اسپرم و حجم منی در قوچ نر می‌شود (۱۳). اثر سفتریآکسون بر کاهش اسپرم را به علت ممانعت‌کنندگی آن از تقسیم میتوز و میوز در سلول‌های زایگر لوله‌های منی‌ساز می‌دانند. تحقیقات نشان داده که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر جنتامایسین سولفات و سفتریآکسون باعث پیکنوزه شدن هسته و کاربویلیز در سلول‌های رده اسپرماتوژنز در بافت بیضه رت‌های نر بالغ می‌گردند. همچنین مشخص شده

است که این آنتی‌بیوتیک‌ها، باعث کاهش در سنتز پروتئین‌ها در هسته سلول‌های اسپرماتوگونی و سلول‌های اسپرماتوسیت می‌گردند و متعاقب آن کاهش ثانویه در متابولیسم گلوکز در رده سلول‌های اسپرماتوسیت اتفاق می‌افتد (۳). گزارش شده که استفاده از سفتریآکسون در رت‌های نر باعث کاهش وزن بیضه و اپیدیدیم، کاهش تعداد و تحرک اسپرم‌ها و افزایش اسپرم‌های غیر طبیعی می‌گردد (۳۹). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که تزریق سفتریآکسون در موش سوری باعث کاهش تعداد و تحرک اسپرم‌ها می‌شود که با گزارشات پیشین همسویی دارد.

نشان داده شده است که قدرت زیست‌پذیری اسپرم در رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین به دلیل آسیب در غشای پلاسمایی اسپرم‌های مرده رنگ ائوزین را جذب کرده و به رنگ قرمز در می‌آیند (۴۰). در مطالعه حاضر درصد اسپرم‌های مرده به مرور زمان و وابسته به دوز مصرفی سفتریآکسون افزایش نشان داد.

یکی از علل ناباروری مردان علاوه بر کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی، آسیب به DNA آن می‌باشد. تست‌های متعددی بر مبنای عملکرد فیزیولوژی و مولکولی اسپرم در روند لقاح معرفی شده‌اند که از جمله توانایی اتصال اسپرم به لایه شفاف اطراف تخمک در اولین مرحله لقاح، قدرت نفوذ شیمیایی اسپرم و به عبارتی توانایی انجام واکنش آکروزومی (AR=Acrosome reaction)، ارزیابی وضعیت DNA و کروماتین اسپرم را می‌توان نام برد. در تحقیقات متعددی ارتباط این عوامل با میزان لقاح و توان باروری اسپرم به اثبات رسیده است (۴۱). عملکرد مناسب اسپرم در ارتباط مستقیم با وضعیت کروماتین آن می‌باشد (۴۲).

تحقیقات نشان داده‌اند که داروی سیکلوسپورین باعث افزایش DNA تک‌رشته‌ای، DNA آسیب دیده، کاهش تعداد اسپرم‌ها و درصد اسپرم‌های زنده می‌گردد. این دارو روند بلوغ اسپرم‌ها را نیز تحت تاثیر قرار داده، جایگزینی

پروتئین‌های هیستون با پروتامین را دچار مشکل کرده و در نتیجه درصد اسپرم‌های نابالغ افزایش پیدا می‌کند (۴۳). تعداد زیادی مولکول‌های لیزین در ساختار پروتئین هیستون وجود دارند که این اسیدهای آمینه با رنگ‌هایی مثل آئیلین بلو واکنش نشان داده و آبی رنگ می‌شوند. در نتیجه اسپرم‌هایی که در مرحله بلوغ (متراکم شدن) دارای هیستون اضافی در کروماتین خود باشند، با رنگ‌آمیزی آئیلین بلو رنگ شده و آبی رنگ دیده می‌شوند. آن‌ها در واقع اسپرم‌هایی هستند که در مرحله بلوغ دچار مشکل شده‌اند و تحت عنوان اسپرم‌های نابالغ در نظر گرفته می‌شوند (۲۲). در این مطالعه مشخص گردید که داروی سفتریاکسون، درصد اسپرم‌های نابالغ و اسپرم‌ها با DNA آسیب‌دیده را افزایش می‌دهد. همچنین درصد بالایی از اسپرم‌های نابالغ در گروه‌های دریافت‌کننده دوز بالایی از سفتریاکسون دیده شد. در واقع باید گفت که آنتی‌بیوتیک مصرفی بر بلوغ و DNA اسپرم‌ها اثر سوء بارزی داشته است که با یافته‌های پیشین مطابقت دارند.

تحقیقات نشان داده است که فاکتور اسپرمی فعال‌کننده تخمک (SAOAFs=Sperm Associated Oocyte Activating Factors) در ارتباط با آکروزوم و غلاف خلف آکروزومی (تکای پری نوکلئار) اسپرم می‌باشد (۴۴). تصاویر میکروسکوپ الکترونی در اسپرم‌های دارای سر گرد نشان می‌دهند که احتمالاً کاهش لقاح در این گونه نمونه‌ها به علت عدم وجود آکروزوم و مخصوصاً غلاف خلف آکروزومی می‌باشد که در نهایت منجر به فعال نشدن تخمک می‌گردد (۴۵). به علاوه عدم موفقیت در لقاح را می‌توان به نقایص آکروزومی و محتویات آکروزینی آن نسبت داد. بنابراین این گونه اسپرم‌ها نه تنها قابلیت نفوذ به تخمک را ندارند، بلکه فاکتورهای فعال‌کننده تخمک در ارتباط با آکروزوم و غلاف خلف آکروزومی (تکای پری نوکلئار) آن‌ها ناقص است (۴۶).

آنزیم‌های آکروزومال به ویژه هیالورونیداز نقش مهمی در نفوذ اسپرم به توده کومولوسی و پرده شفاف احاطه‌کننده سلول تخمک دارند (۴۷). در طی سالیان گذشته مطالعات متعددی در زمینه فعالیت آکروزین و مورفولوژی اسپرم گزارش شده و مشخص گردیده است که بین مورفولوژی آکروزوم طبیعی (درصد اشکال طبیعی) با فعالیت آکروزین ارتباط وجود دارد (۴۸). برخی معتقدند که مورفولوژی آکروزوم اهمیت بیشتری نسبت به مورفولوژی سر اسپرم در لقاح آزمایشگاهی دارد (۴۹). در حالیکه عده‌ای معتقدند ارزیابی شاخص‌های آکروزومی نمی‌تواند به طور صحیح میزان لقاح را مشخص نماید (۵۰). در تحقیق حاضر در گروه‌های آزمایشی تغییر بارزی در آکروزوم و محتویات آکروزومی مشاهده نگردید.

تحقیقات نشان داده‌اند که اسپرم‌های نابالغ از لحاظ مورفولوژیکی دچار مشکل هستند و جنین‌های حاصل از آن‌ها علائمی مثل مرگ زودرس را بروز می‌دهند که این مسئله می‌تواند در ارتباط با آسیب به DNA اسپرم از جمله قطعه شدن آن باشد (۵۱). بنابراین در پی آسیب DNA اسپرم، درصد زنده‌مانی جنین‌ها نیز کاهش می‌یابد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که آسیب به DNA اسپرم باعث عدم توانایی بارورسازی تخمک توسط آن می‌گردد (۵۲). بر اساس نتایج ما در این مطالعه سفتریاکسون موجبات تخریب نسبی DNA اسپرم‌ها را فراهم نموده که این عمل بر درصد زیگوت‌ها و تقسیم جنین‌ها در مراحل مختلف دو سلولی و بلاستوسیست تأثیر نامطلوب می‌گذارد. درصد جنین‌های متوقف شده نیز افزایش می‌یابد. در پی آن نرخ باروری در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی کاهش نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

تزریق سفتریاکسون در موش سوری باعث کاهش تعداد اسپرم‌ها، کاهش درصد اسپرم‌های زنده، کاهش میزان بلوغ اسپرم و افزایش آسیب به DNA اسپرم می‌گردد. این دارو

تشکر و قدردانی

این تحقیق با کمک مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه و با مساعدت‌های ریاست و معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفته است که از آن‌ها تقدیر می‌گردد. از اعضای آزمایشگاه‌های بافت‌شناسی و جنین‌شناسی دانشکده نیز به خاطر مساعدت‌های تکنیکی تقدیر و تشکر می‌گردد.

با تحت تاثیر قرار دادن فاکتورهای کیفی و کمی اسپرم، باعث کاهش درصد لقاح اووسیت‌ها، درصد جنین‌های دو سلولی و بلاستوسیت‌ها و جنین با کیفیت پایین می‌شود. بنابراین، سفتریاکسون اثر بارزی در پایین آوردن توان باروری آزمایشگاهی موش سوری دارد.

Reference

1. Toovey S, Hudson E, Hendry WF, Levi AJ. Sulphasalazine and male infertility: reversibility and possible mechanism. *Gut* 1981; 22: 445-51.
2. Hargreaves C, Rogers S, Hills F, Rahman F, Howell R, Homa S. Effect of co-trimoxazole, erythromycin, amoxycillin, tetracycline and chloroquine on sperm function in vitro. *Hum Reprod* 1998; 13: 1878-86.
3. Timmermans LM. Modifications in spermatogenesis following antibiotic therapy. *Acta Urol Blog* 1989; 57: 35-46.
4. Ebert K, Schindlre M. Transgenic farm animals: progress report. *Theriogenol* 1993; 39: 121-35.
5. Jorgensen N, Carlsen E, Nermoen I, Punab M, Suominen J, Anderson AG, et al. East-west gradient in semen quality in the Nordic-Baltic area: a study of men from the general population in Denmark, Noaway, Estonia and Finland. *Hum Reprod* 2001; 17: 2199-208.
6. Dokov VK, Timmermans L. Arrest of spermatogenesis by various antibiotics: preliminary experimental results. *Acta Urol Bleg* 1970; 38: 277-87.
7. Yao Y, Zhou R, Wang Y. Fatal adverse effects of injected ceftriaxone sodium in China. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2012; 21: 1197-201.
8. Romano A, Caubet JC. Antibiotic allergies in children and adults: from clinical symptoms to skin testing diagnosis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014; 2: 3-12.
9. El-Homosany SR, El-Ashmawy IM, El-Sawy ASF. Remove from marked records adverse effects of cefotaxime on male rats. *Alex J Vet Sci* 2012; 35: 31-40.
10. Antohi E, Gales C, Nechifor M. Pharmacological agents that affect sperm motility. *Rev Med Chir Soc Med Nat Lasi* 2011; 115: 1183-8.
11. Khaki A, Ghafari M, Jabari H, Khaki A, Gharaghourlo S, Haidari M. Evaluation of aminoglycosides (gentamicin, neomycin, streptomycin) and fluoroquinolones (ofloxacin) antibiotics on spermatogenesis in rat. *J Tabriz Univ Med Sci* 2007; 28: 24-8. [In Persian]
12. Shaheen HM, Sawsan ME, Alkelch AM, Naima AA. Studies on some side effects of cephalosporins: Studying the teratogenic effects of ceftiofur sodium. 1st Sc Cong for Provincial Laboratories 2000; pp: 56-68.
13. Sadettin T, Gaffari T. The effects of diminazene aceturate and ceftriaxone on ram sperm. *Theriogenol* 2003; 61: 529-35.

14. Chakraborty S, Dev Bhuti P, Supratim R, Chandana S, Kunal R. A study on ceftriaxone-induced lipid peroxidation using 4-hydroxy-2-nonenal as model marker. *Acta Pol Pharm* 2005; 62: 141-3.
15. El-Maddawy ZK, Bogzil AH. Adverse effects of cefotaxime sodium in comparison with ceftiofur sodium in male rats. *Int J Pharm Life Sci* 2015; 6: 4291-303.
16. Deb K, Reese J, Paria BC. Methodologies to study implantation in mice. *Methods Mol Med* 2006; 121:9-34.
17. Manami T, Toshitaka H, Ryuzo Y, Shobara H, Honolulu HI. Effects of light on development of mammalian zygotes. *PNAS* 2007; 104:14289–14293.
18. Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicol* 2006; 217: 71-8.
19. Zambrano E, Rodriguez-Gonzalez GL, Guzman C, Garcia-Becerra R, Boeck L, Menjivar M, et al. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol* 2005; 563: 275-84.
20. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, et al. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and sub-fertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod* 2001; 16: 1165-71.
21. Najafi Gh, Hobenaghi R, Hoshyari A, Moghadaszadeh M, Ghorbanzadeh. The effect of atrazine on spermic parameters and fertility potential in mature rats. *Arak Med Univ J* 2013; 15: 85-94. [In Persian]
22. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Gen* 2001; 18(4): 221-7.
23. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, et al. Relationship between ROS reduction, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004; 19: 129-38.
24. Sadeghi MR, Hodjat M, Lakpour N, Arefi S, Amirjannati N, Modarresi T, et al. Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. *Avicenna J Med Biotechnol* 2009; 1: 173-80.
25. Singh S, Sharma S, Manjula J, Chauhan R. Importance of papanicolaou staining for sperm morphologic analysis. *Am J Clin Pathol* 2011; 136: 247-51.
26. Nabi A, Khalili M, Halvaei I, Roodbari F. Prolonged incubation of processed human spermatozoa will increase DNA fragmentation. *Andrologia* 2014; 46: 374-9.
27. Gonzalez R, Ruiz-Leon Y, Gomendio M, Roldan ER. The effect of glucocorticoids on mouse oocyte in vitro maturation and subsequent fertilization and embryo development. *Toxicol In vitro* 2010; 24: 108-15.
28. Zahmatkesh E, Najafi GH, Nejati Vahid. protective effect of royal jelly on in vitro fertilization (ivf) in male mice treated with oxymetholone. *Cell Journal (Yakhteh)* 2015; 17: 569-5.

29. Najafi GH, Farokhi F, Shalizar Jalali A, Akbarizadeh Z. Protection against cyclosporine-induced reprotoxicity by satreja khuzestanica essential oil in male rats. *Int J Fertil Steril* 2016; 9: 548-7.
30. Schmidt L, Münster K, Helm P. Infertility and the seeking of infertility treatment in a representative population. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102: 978-84.
31. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effect of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril* 2001; 75: 237-48.
32. Schlegel PN, Chang TS, Marshall FF. Antibiotics: Potential hazards to male fertility. *Fertil Steril* 1991; 55: 235-42.
33. El-Sokkary GH, Cuzzocrea S, Reiter RJ. Effect of chronic nicotine administration on the rat lung and liver: Beneficial role of melatonin. *Toxicol* 2007; 239: 60-7.
34. Yousef M, El-Demerdash F, Al-Salhen K. Protective role of isoflavones against the toxic effect of cypermethrin on semen quality and testosterone levels of rabbits. *J Environ Sci Heal B* 2003; 38: 463-78.
35. Wood BL, Doncel GF, Reddy PR, Sokal DC. Effect of diltiazem and methylene blue on human sperm motility, viability and cervical mucus penetration: potential use as vas irrigants at the time of vasectomy. *Contraception* 2003; 67: 241-5.
36. Hisatomi A, Fujihira S, Fujimoto Y, Fujii T, Mine Y, Ohara K. Effect of Prograf (FK506) on spermatogenesis in rats. *Toxicol* 1996; 109: 75-83.
37. Varon E, Cohen R, Bouhanna CA, Canet J, Janaud JC, Geslin P. Incidental detection of brucellosis in a 3-month-old infant. *Presse Med* 1990; 19: 14-62.
38. Sahm DF, Baker CN, Jones RN, Thornsberry C. Influence of growth medium on the in vitro activities of second and third generation cephalosporins against *Streptococcus faecalis*. *J Clin Microb* 1984; 20: 561-7.
39. Mahmoud NA, El-Sawy ASF, El-Ashmawy IM. Effects of ceftriaxone on reproductive and biochemical aspects of male rats. *AJVS* 2011; 33: 43-50.
40. Bakhtiari M, Sobhani A, Akbari M, Shabani A, Barbarestani M, Pasbakhsh P, et al. The effect of hyaluronan on morphology, motility and vitality of mouse sperm before cryopreservation and after the thawing. *J Kermanshah Univ Med Sci* 2008; 12: 221-33. [In Persian]
41. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 602-7.
42. Spano M, Kolstad H, Larsen SB, Cordelli E, Leter G, Giwereman A, et al. The applicability of the flowcytometric sperm structure chromatin assay in epidemiological studies. *Hum Reprod* 1998; 13: 2495-505.
43. Akbarizadeh Z, Najafi Gh, Farokhi F. Effect of aquatic extract of *Achillea millefolium* on sperm and in vitro fertilization in adult rats treated with cyclosporine A. *Zabol Univ Med Sci J* 2012; 4: 9-18. [In Persian]
44. Dozortsev D, De Sutter P, Rybouchkin A, Dhont M. Timing of sperm and oocyte nuclear progression after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995; 10: 3012-7.
45. Yamano S, Koji N, Toshihoro A. Fertilization failure and oocyte activation. *J Med Inves* 2000; 47: 1-8.

46. Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9: 511-8.
47. Meyers S, Rosenberger A. A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. *Biol Reprod* 1999; 61: 134-9.
48. Menkveld R, Rhemrev JP, Franken DR, Vermeiden JP. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1996; 65: 637-44.
49. El-Ghobashy AA, Christopher R. The human sperm head: A key for successful fertilization. *J Androl* 2003; 24: 232-8.
50. Soderlund B, Lundin K. Acrosome index is not an absolute predictor of the outcome following conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 483-9.
51. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039-49.
52. Duru NK, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000; 74: 1200-7.