Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

The effect of Zolpidem and *Passiflora incarnata* extract on the changes at the levels of sex steroid hormones and Ultrastracture of ovary in three spot Gourami (*Trichogaster trichopterus*)

Farzan Fouladi[1], Tahere Naji[*2], Homayoun Hoseinzade Sahafi[3]

1. Pharmacy Student, Dept. of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: farzanfd72@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: tnaji2002@gmail.com
3. Full Prof., Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Promotion Organization, Tehran, Iran. E-mail: h_hosseinzadeh@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 04.04.2023
Revised: 05.05.2023
Accepted: 06.10.2023

Keywords:
Ovary,
Passiflora incarnata,
Trichogaster trichopterus,
Zolpidem

ABSTRACT

Zolpidem and *Passiflora incarnata* can do calming and sleep-inducing effects by affecting GABA, which is one of the known brain neurotransmitters. There are evidences that GABA receptors exist in the body's endocrine glands, including the ovary. 120 pieces of *Trichogaster trichopterus* with an average weight of 2.76 ± 0.49 g were purchased. The fishes were divided into 8 treatments, each treatment containing 15 fishes, the control groups were: Intact and solvent, three treatment groups which received zolpidem with a dose of 5, 10 and 20 mg/kg and three treatment groups receiving *Passiflora incarnata* extract with doses of 25, 50, and 100 mg/kg. Intramuscular injection was done every other day to reduce stress on the fish for twenty days. Then the fishes were dissected and the ovarian tissue was separated for examination with light and electron microscope and steroid hormones were measured. The results showed that 17-beta-estradiol hormone increased in all doses of zolpidem and decreased in all doses of *Passiflora incarnata* extract compared to the control groups ($P \leq 0.05$). In all three doses of zolpidem, the oocytes were mostly in the vitellogenic phase compared to the control group. While in the treated fish in all three doses of *Passiflora incarnata*, they were mostly in the prenuclear phase.

Cite this article: Fouladi, Farzan, Naji, Tahere, Hoseinzade Sahafi, Homayoun. 2024. The effect of Zolpidem and *Passiflora incarnata* extract on the changes at the levels of sex steroid hormones and Ultrastracture of ovary in three spot Gourami (*Trichogaster trichopterus*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13 (2), 39-51.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2023.21232.1768
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳۴۵-۴۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳۴۵-۴۲۸۸

مقایسه عصاره گل‌ساعتی و زولپیدم بر هورمون‌های استروئیدی جنسی و فراساختار تخمدان ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*)

فرزان فولادی[۱]، طاهره ناجی*[۲]، همایون حسین‌زاده صحافی[۳]

۱. دانشجوی داروسازی گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: farzanfd72@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. رایانامه: tnaji2002@gmail.com

۳. استاد مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: h_hosseinzadeh@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۰

واژه‌های کلیدی:
تخمدان،
ماهی گورامی سه خال،
گل‌ساعتی *Passiflora incarnata*،
زولپیدم

چکیده

مطالعات نشان می‌دهد زولپیدم و گل‌ساعتی با اثر بر GABA که یکی از نوروترنسمیترهای شناخته شده مغز است اثرات آرام‌بخشی و خواب‌آوری ایجاد می‌کنند. شواهد، مبنی بر وجود گیرنده‌های GABA در غدد درون‌ریز بدن از جمله تخمدان است. هدف از پژوهش مقایسه اثر عصاره گیاه گل‌ساعتی و زولپیدم بر تغییرات سطح هورمون‌های استروئیدی جنسی و فراساختار بافت تخمدان در ماهی بالغ گورامی بود. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی گورامی سه‌خال با میانگین وزنی ۰/۴۹±۲/۷۶ گرم ماهی خریداری شد. ماهی‌ها به ۸ تیمار که شامل ۱۵ قطعه ماهی تقسیم شدند شامل گروه کنترل، حلال، سه گروه تیماری دریافت‌کننده زولپیدم با دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و سه گروه تیماری عصاره گل‌ساعتی با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. تزریق به صورت عضلانی و جهت کم کردن استرس ماهی‌ها یک روز درمیان صورت گرفت. سپس ماهی‌ها تشریح و بافت تخمدان برای بررسی با میکروسکوپ نوری و الکترونی جدا و هورمون‌های استروئیدی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که سطح هورمون تستوسترون و ۱۷-هیدروکسی پروژسترون در دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم زولپیدم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P\leq ۰/۰۵$). در ماهی‌های تحت تیمار در هر سه دوز زولپیدم، اووسیت‌ها نسبت به گروه کنترل اغلب در فاز ویتلوژنی بودند، درحالی‌که در هر سه دوز گروه‌های عصاره ماهی‌های تحت تیمار اکثر آن‌ها در مرحله پیش هستکی قرار داشتند. با توجه به نتایج احتمالاً زولپیدم محرک تکامل گنادی بود و عصاره گل‌ساعتی آن را مهار کرد.

استناد: فولادی، فرزان، ناجی، طاهره، حسین‌زاده صحافی، همایون (۱۴۰۳). مقایسه عصاره گل‌ساعتی و زولپیدم بر هورمون‌های استروئیدی جنسی و فراساختار تخمدان ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۳ (۲)، ۵۱-۳۹.

DOI: 10.22069/japu.2023.21232.1768

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

گل‌ساعتی با نام علمی *Passiflora incarnata* گیاهی تزئینی بوده که در طب سنتی برای آن خواص و فوایدی نیز ذکر شده است و در حال حاضر یکی از پرمصرف‌ترین آرام‌بخش‌های گیاهی به‌شمار می‌رود. این گیاه دارای انواع مختلف فلاونوئیدها، آلکالوئیدهای گروه هارمالا اسیدسیانیدریک، اسید سیتریک، پرولین، مالتول و اتیل مالتول می‌باشد. اثرات درمانی گل‌ساعتی به‌طور عمده مربوط به فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و قندهای موجود در آن است. مصرف این گیاه با آثار مختلفی بر روی سیستم عصبی مرکزی مانند آرام‌بخشی، کاهش اضطراب و افسردگی همراه است. مهم‌ترین آلکالوئید موجود در گل ساعتی، هارمان و هارمالین بوده که موجب مهار فعالیت آنزیم مونوآمینواکسیداز[1] (MAO) شده و در نتیجه، میزان انتقال‌دهنده‌های عصبی‌ای مانند: سروتونین، نوراپی نفرین و دوپامین را در مغز افزایش می‌دهند اما تاکنون بر روی آبزیان پژوهشی انجام نشده (۱).

بنزوفلاوون از تبدیل تستوسترون به متابولیت‌های آن جلوگیری می‌کند، در نتیجه باعث افزایش سطح تستوسترون در بافت غدد جنسی می‌شود (۲) سطح تستوسترون پلاسما بر گنادوتروپین‌ها تأثیر دارد. گیاه گل‌ساعتی نیز به‌دلیل وجود بنزوفلاوون‌های مختلف، یک گیاه فیتواستروژنی است که با اثر بر گیرنده‌های گابا خواص آرام‌بخشی، ضداضطرابی و خواب‌آوری دارد (۳).

بنزودیازپین‌ها داروهایی هستند که به‌عنوان ضد اضطراب استفاده می‌شوند ولی به‌علت عوارضی مانند اعتیاد، خواب‌آلودگی و اختلال در یادگیری، مصرف آن‌ها با محدودیت همراه است (٤). زولپیدم، از دسته داروهای غیر بنزودیازپینی، می‌باشد که استفاده از آن در درمان اختلالات عصبی اضطرابی اخیراً گسترش یافته است (۵). زولپیدم با نام تجاری Ambien داروی خواب‌آور غیر بنزودیازپین است و به شکل قرص قابل مصرف می‌باشد. زولپیدم به‌وسیله سیتوکروم‌های کبدیp450 به متابولیت‌های غیرفعال تجزیه می‌شود (٦). این ماده با تأثیر آگونیستی بر روی گیرنده گابا A باعث ورود یون کلر به درون سلول گردیده و در نتیجه باعث ایجاد هایپر پولاریزاسیون می‌گردد (۷، ۸، ۹)، زولپیدم موجب عدم خواب آلودگی بعد از خواب از طریق اتصال به زیر واحد آلفا ۱ (آرام بخش) گیرنده گابا A شده و کیفیت خواب را بهبود می‌بخشد (۱۰، ۱۱).

هدف از این پژوهش بررسی اثر عصاره گل‌ساعتی بر بافت تخمدان و سطح هورمون‌های جنسی ماهی گورامی سه خال و مقایسه آن با داروی زولپیدم می‌باشد. سیستم کنترل غدد درون‌ریز تولیدمثل ماهیان از جمله ماهی گورامی سه خال با پستانداران مشابه است و دارای محور هیپوتالاموس هیپوفیز گناد می‌باشد که به‌عنوان مدل در شرایط آزمایشگاهی در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعه جامعی که اختصاصاً به‌صورت نموداری و مقایسه‌ای با افزایش دوز زولپیدم و گیاه گل‌ساعتی، رابطه معنی‌داری بین هورمون‌های استروئیدی با تغییرات فراساختاری بافت تخمدان (به‌صورت تغییرات مرحله‌ای با عکسبرداری میکروسکوپ نوری همراه با میکروسکوپ الکترونی) تا به حال انجام نگرفته است. حال با توجه به مکانیسم‌های بررسی شده و فرضیات ذکر شده، داده جامع حاصل از این مطالعه می‌تواند در بررسی‌های جنین‌شناسی و مطالعات فارماکولوژی-هیستولوژی حیطه هورمونی و ناباروری، در پژوهشگاه‌ها، مراکز درمانی ناباروری مورد استفاده قرار بگیرد؛ هم‌چنین تناسب بین مکانیسم‌های فرض شده با تغییرات هیستولوژیکی می‌تواند در مطالعات فازهای کلینیکال ترایال داروها مورد استفاده قرار بگیرد.

1- Monoamine oxidase (MAO)

مواد و روش‌ها

این پژوهش در خرداد سال ۱۴۰۱ در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1400.482 انجام شد. برای این منظور تعداد ۱۲۰ ماهی گورامی سه خال ماده (*Trichogaster trichopterus*) با میانگین وزنی ۰/۴۹±۲/۷۶ گرم از یک کارگاه پرورش ماهی در همدان خریداری شدند. ماهی‌ها به ۸ گروه ۱۵ تایی شامل گروه کنترل شاهد، کنترل حلال، سه گروه تیماری دریافت‌کننده زولپیدم با دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و سه گروه تیماری دریافت‌کننده عصاره گل‌ساعتی با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند.

عصاره گیاه ساعتی از شرکت دینه با شماره بچ ۱۱۴۱۲ ساخت ایران تهیه گردید. روش آماده‌سازی و استخراج گیاه گل‌ساعتی در شرکت بدین شرح بود. ابتدا گیاه ساعتی خشک شد و ذرات خارجی، خاشاک و گرد و غبار جداسازی گردید. پس از آسیاب کردن گیاه، عصاره به روش خیساندن در اتانول با درجه خلوص ۹۶ درصد استخراج گردید. عصاره گیاه گل‌ساعتی در غلظت‌های کم (۲۵ mg/kg)، متوسط (۵۰ mg/kg) و زیاد (۱۰۰ mg/kg) آماده شد (۱۲).

داروی زولپیدم از شرکت تهران دارو با شماره بچ E۱۵۱۱۲۱ ۱۲۲ گردید. دارو در غلظت‌های کم، متوسط، زیاد به ترتیب ۵ mg/kg، ۱۰ و ۲۰ آماده شد (۹). پس از تعیین وزن ماهی‌ها و محاسبه دوز تیمارها بر حسب میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، مقادیر دوز موردنظر در هر تیمار با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم وزن شد. دوز تیمارها در ۲ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد به‌عنوان حلال حل شد و پس از تهیه در بالون ژوژه ۵ میلی‌لیتری به حجم رسانیده شد. برای انتخاب تیمارها ابتدا بیومتری تمام ماهیان (طول و وزن) اندازه‌گیری شد. ماهی‌ها به ۸ گروه به‌شرح زیر تقسیم‌بندی شدند که در هر گروه ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۵ قطعه ماهی بود:

جدول ۱- گروه‌های مورد استفاده در مطالعه.

گروه‌ها	توضیحات
گروه ۱	کنترل یک شاهد
گروه ۲	کنترل دو حلال (اتانول ۷۰ درصد)
گروه ۳	زولپیدم با دوز ۵ mg/kg.b.w
گروه ٤	زولپیدم با دوز ۱۰ mg/kg.b.w
گروه ۵	زولپیدم با دوز ۲۰ mg/kg.b.w
گروه ٦	عصاره *Passiflora incarnate* با غلظت ۲۵ mg/kg.b.w
گروه ۷	عصاره *Passiflora incarnate* با غلظت ۵۰ mg/kg.b.w
گروه ۸	عصاره *Passiflora incarnate* با غلظت ۱۰۰ mg/kg.b.w

ابتدا ماهی‌ها توسط محلول ۵۰ گرم از پودر گل میخک و یک لیتر آب بدون کلر بیهوش شده و سپس تزریق به‌صورت یک روز در میان و به‌صورت درون عضلانی (IM) با توجه به دوزهای مشخص شده در جدول ۱ عصاره گیاه ساعتی و زولپیدم انجام گرفت (۱۳). برای این منظور مقادیر مشخص شده از تیمارهای موردنظر به‌وسیله سرنگ انسولین BD (با حجم نیم سی‌سی) برداشته شد و به‌میزان ۰/۰۲ سی‌سی (یک خط از درجات سرنگ) از دارو به آرامی بین باله پشتی و خط جانبی درون عضله با زاویه ۳۰ درجه تزریق گردید.

پس از تزریق، ماهیان در آبی که از روز قبل کلرزدایی شده و به تعادل با دمای آزمایشگاه رسیده منتقل شدند و سپس توسط شیلنگ اکسیژن عملیات احیاء صورت گرفت و ماهی‌ها به آکواریوم منتقل شدند. هر کدام از گروه‌های تیمار و کنترل به مدت ۲۰ روز و به‌صورت یک روز در میان در ۱۰ نوبت مورد تزریق قرار گرفتند (۱٤). پس از پایان دوره، به‌مدت ۲٤ ساعت هیچ فعالیتی بر روی ماهیان صورت نگرفت. ماهی‌های بیهوش شده روی سینی تشریح قرار گرفتند و از هر گروه تعدادی تخمدان جدا گردید و با ترازوی دیجیتالی وزن شدند. جهت اندازه‌گیری سطوح هورمون‌های تستوسترون، ۱۷-α هیدروکسی پروژسترون تهیه و توسط دستگاه سانترفیوژ یخچال‌دار جداسازی صورت گرفت و جهت سنجش هورمون‌ها از تست الایزا استفاده گردید (۱٤).

بافت تخمدان برای بررسی با میکروسکوپ نوری در فرمالین ۱۰ درصد به‌عنوان ثابت‌کننده قرار داده شد، پس از ثابت کردن نمونه‌ها طی مراحلی (پاساژ بافت) برای قالب‌گیری آماده شد (۱۳). سپس برای تهیه قالب پارافینی پس از ریختن پارافین در قالب فلزی، تخمدان به‌وسیله پنس گرم به آهستگی داخل آن قرار گرفت. زمانی‌که پارافین کاملاً سفت و سخت شد آن را از قالب جدا کرده و بلوک‌ها تا زمان برش‌گیری در داخل یخچال قرار گرفت. برای برش بافتی از دستگاه میکروتوم روتاری مدل KD2508 استفاده شد و برش‌هایی به ضخامت ۱۰-۵ میکرون تهیه شد. پس از سوار کردن برش‌ها بر روی لام، لام‌ها به مدت ۲٤ ساعت در آون ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند تا پارافین آن‌ها ذوب و آب اضافه تبخیر شود تا عمل رنگ‌آمیزی بهتر صورت گیرد. برای رنگ‌آمیزی برش‌های بافتی از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین استفاده گردید (۱۳). پس از آماده‌سازی لام‌ها، توسط میکروسکوپ نوری دو چشم مدل NIKON دارای مانیتور دیجیتالی از آن‌ها عکس‌برداری صورت گرفت. برای تهیه گرید میکروسکوپ الکترونی ابتدا نمونه‌های تخمدان با استفاده از پنس و اسکالپل جدا گردید، سپس مراحل زیر برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی بر روی هر یک از نمونه‌ها صورت گرفت. در تثبیت اولیه که به‌منظور حفظ ساختمان بافت زنده و جلوگیری از اتولیز صورت می‌گیرد، ابتدا هر کدام از نمونه‌های تخمدان در گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد در دمای ٤ درجه به‌مدت یک ساعت قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در زیر هود به محلول تتراکسید اسمیم به غلظت ۱/۵ درصد به‌مدت یک ساعت و نیم قرار گرفت. بعد از فیکساتیو اولیه برای حذف گلوتارآلدهیدی که وارد واکنش نشده و درون بافت باقی مانده است، شستشو انجام گرفت. شستشوی هر نمونه سه مرتبه و هر کدام به مدت ۵ دقیقه در بافر کاکودیلات سدیم ۰/۱ مولار صورت پذیرفت. سپس نمونه‌ها ۲ مرتبه با آب مقطر شسته شدند. رنگ‌آمیزی با محلول ۲ درصد آبی استات اورانیل به‌مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت. به‌منظور ثابت‌سازی ثانویه هر نمونه به‌مدت ۲۰ دقیقه در تتراکسید اسمیم ۱ درصد فیکس گردید. برای جایگزینی آب درون سلول به‌وسیله اتانول (۵۰، ۷۰ و ۹۵ درصد) آبگیری صورت پذیرفت. برای این‌که تمام قسمت‌های بافت به صورت جامد و سخت شکل گیرد، مرحله قالب‌گیری انجام گرفت، این کار به‌وسیله منومرهای اپوکسی رزین انجام شد که در ابتدا مایع هستند و در اثر حرارت و

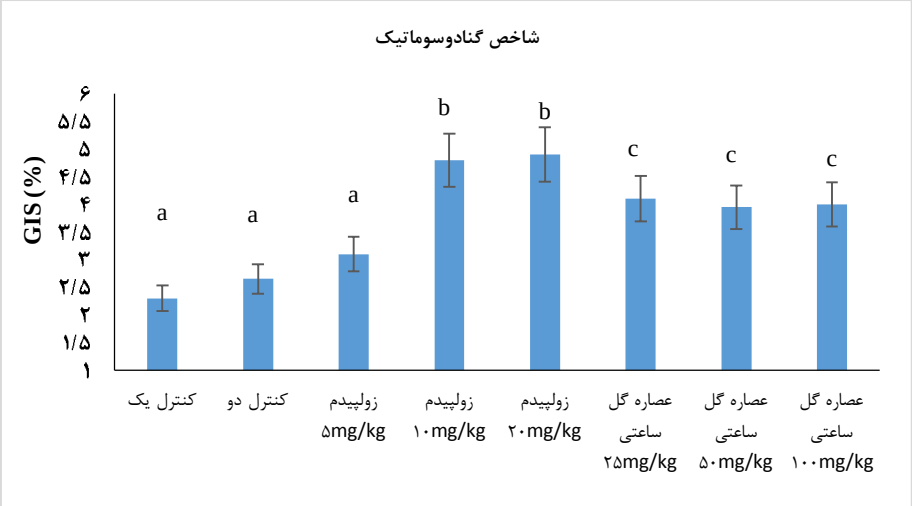
زمان پلیمریزه و سخت می‌شوند سپس قالب‌ها در اتو با دمای ۶۰ درجه به‌مدت ۳-۲ روز گذاشته شد. سپس با دستگاه اولترامیکروتوم بر روی نمونه تخمدان برش‌هایی به ضخامت ۶۰-۵۰ نانومتر صورت گرفت. پس از آماده شدن نمونه‌ها بر روی صفحات مخصوص (گرید) برای بالا بردن کنتراست (رنگ‌آمیزی مثبت)، نمونه‌های تخمدان هر کدام را جداگانه در چاهک‌های مخصوص اورانیل استات به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق غوطه‌ور و سپس آن‌ها را با پنس گرفته و با آب مقطر شست و شو داده شد (۱۳). در انتها نیز گریدها با میکروسکوپ الکترونی مدل Philips EM 208 S کیلوولت و با مش مسی ۲۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. شاخص گنادوسوماتیک به‌طور وسیعی به‌عنوان ابزاری ساده در اندازه‌گیری ظرفیت تولیدمثل به‌کار برده می‌شود. این شاخص با معادله نسبت وزن گناد ماهی به وزن بدن ماهی به‌دست می‌آید که در آن WG وزن گناد (گرم) و W وزن بدن ماهی (گرم) است (۱۵).

$$GSI = WG / W \times 100 \quad (۱۵)$$

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی میزان معنی‌دار بودن اختلافات مشاهده شده در تیمارهای مختلف از ورژن ۲۶ نرم‌افزار SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way Anova) استفاده شد. به‌منظور مقایسه میانگین‌ها، از آزمون دانکن، استفاده شد. برای رسم نمودارها از ورژن ۲۰۱۹ نرم‌افزار Excel کمک گرفته شد. در همه آزمون $P<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج و بحث

- مقایسه شاخص گنادوسوماتیک در گروه‌های تحت تیمار و کنترل



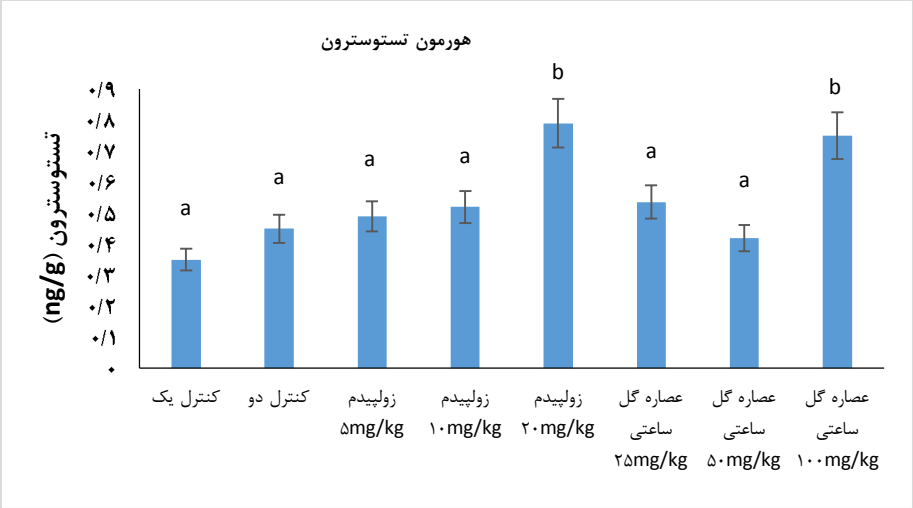
شکل ۱- مقایسه شاخص گنادوسوماتیک در گروه‌های تحت تیمار و کنترل.

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح $P\leq۰/۰۵$ می‌باشد.

با توجه به نتایج حاصل شده تفاوت معنی‌داری در تزریق دوزهای کم زولپیدم و دوز کم و متوسط عصاره گیاه گل‌ساعتی با تیمارهای کنترل مشاهده نشد اما در دوزهای متوسط و بالا زولپیدم افزایش معنی‌دار شاخص گنادوسوماتیک و در دوز بالای عصاره گیاه گل‌ساعتی کاهش معنی‌دار شاخص

گنادوسوماتیک نسبت به تیمار کنترل مشاهده شد ($P<۰/۰۱$).

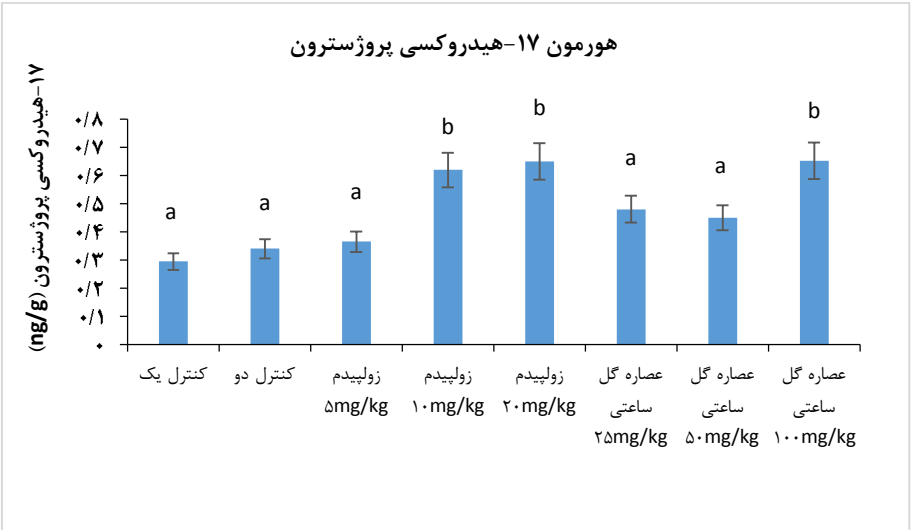
– مقایسه هورمون تستوسترون ۱۷– هیدروکسی پروژسترون



شکل ۲– مقایسه هورمون تستوسترون در گروه‌های تحت تیمار و کنترل.

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح $P\leq۰/۰۵$ می‌باشد.

نتایج آزمون تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری را در هورمون تستوسترون در تیمار زولپیدم در دوز ۲۰mg/kg و عصاره گل‌ساعتی در دوز ۱۰۰ mg/kg با گروه کنترل نشان داد ($P<۰/۰۰۰۱$). تزریق با بالاترین دوز زولپیدم (۲۰mg/kg) و بالاترین دوز عصاره گل‌ساعتی (۱۰۰ mg/kg) موجب افزایش هورمون تستوسترون گردید ($P<۰/۰۰۱$). سایر تیمارها از جمله دوز کم و متوسط زولپیدم و دوزهای کم و متوسط عصاره گیاه گل‌ساعتی تفاوت معنی‌داری با گروه‌های کنترل نداشتند ($P>۰/۰۵$).



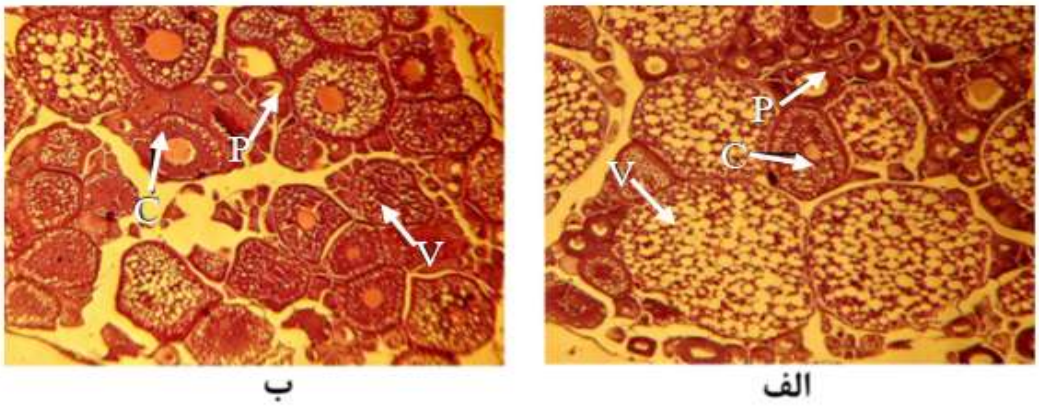
شکل ۳– مقایسه هورمون ۱۷– هیدروکسی پروژسترون در گروه‌های تحت تیمار و کنترل.

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح $P\leq۰/۰۵$ می‌باشد.

نتایج آزمون تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری را در هورمون ۱۷- هیدروکسی پروژسترون در تیمار زولپیدم در دوز ۱۰mg/kg و ۲۰ و عصاره گل‌ساعتی در دوز ۱۰۰ mg/kg با تیمارهای کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۰۱). تزریق در دوزهای متوسط و زیاد زولپیدم و دوز زیاد عصاره گیاه گل‌ساعتی موجب افزایش هورمون تستوسترون و ۱۷- هیدروکسی پروژسترون گردید (P<۰/۰۰۱). سایر تیمارها از جمله دوز کم زولپیدم و دوزهای کم و متوسط عصاره گیاه گل‌ساعتی تفاوت معنی‌داری با گروه‌های کنترل نداشتند (P>۰/۰۵).

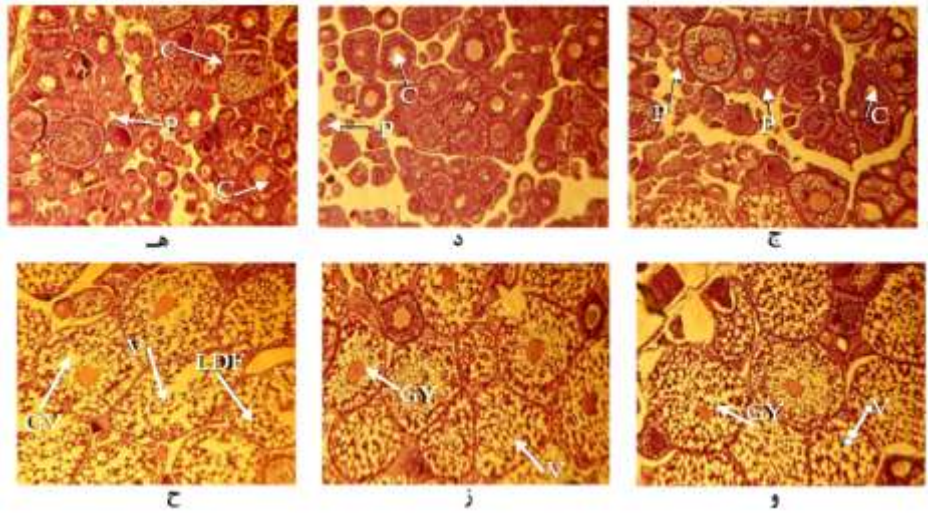
- **نتایج حاصل از میکروسکوپ نوری:** نتایج نشان داد که با افزایش دوز عصاره گل‌ساعتی به ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg تعداد اووسیت‌های فاز پیش هستکی افزایش یافت و با افزایش دوز زولپیدم به ۱۰ mg/kg و ۲۰ mg/kg تعداد اووسیت‌ها در مرحله پیش هستکی و کورتیکال آلوئولار کاهش و تعداد اووسیت‌ها در مرحله ویتلوژنی و وزیکول زایا افزایش یافتند (شکل ٤).

تخمک در گروه‌های کنترل، لایه گرانولوزا و تکا تشکیل شده بودند. فولیکول‌ها مسیر معمول بالغ شدن را طی می‌کردند و میزان بلوغ فولیکول‌ها نسبت به تیمار عصاره گل‌ساعتی بیش‌تر بود (شکل ۵).



شکل ٤- مقطع بافت تخمدان. الف: گروه کنترل دست‌نخورده (شاهد)، ب: گروه کنترل حلال.
p[1]: پیش‌هستکی، C[2]: کورتیکال آلوئولار، V[3]: ویتلوژنی، GV[4]: وزیکول زایا، LDF[5]: چربی ادغام شده، رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی ٤٠×.

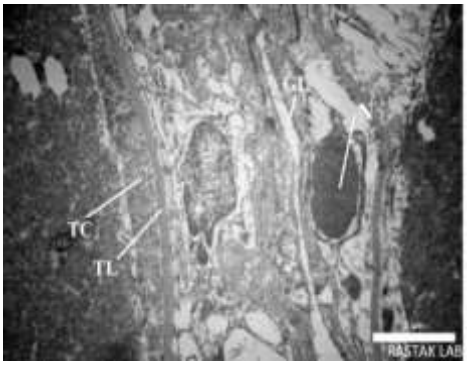
1- Prenuclear
2- Cortical Alveoli
3- Vitellogenic
4- Germinal Vesicles
5- Lipid Droplet Fusion



شکل ۵- مقطع بافت تخمدان. ج: گروه mg/kg ۲۵ عصاره گل‌ساعتی، د: گروه mg/kg ۵۰ عصاره گل‌ساعتی، هـ: گروه mg/kg ۱۰۰ عصاره گل‌ساعتی و: گروه mg/kg ۵ زولپیدم، ز: گروه mg/kg ۱۰ زولپیدم، ح: گروه mg/kg ۲۰ زولپیدم

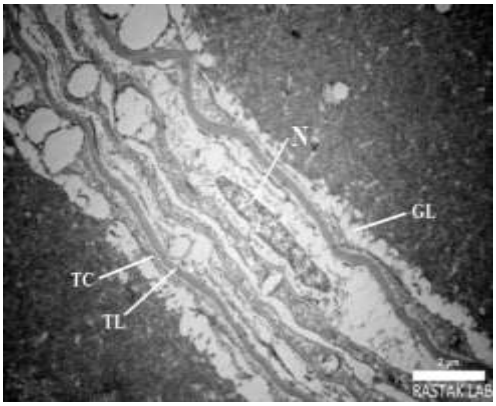
p: پیش‌هستکی، C: کورتیکال آلوئولار، V: ویتلوژنی، GV: وزیکول زایا، LDF: چربی ادغام شده، رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی ۴۰×.

- تصاویر میکروسکوپ الکترونی سلول تخمک: بافت تخمدان به ترتیب در گروه‌های کنترل، عصاره گل‌ساعتی و زولپیدم در تصاویر نشان داده شده است (شکل ٦). در سلول تخمک ماهی‌های تیمار شده با عصاره گل‌ساعتی لایه گرانولوزا و تکا تشکیل شده بود و زونارادیانا قابل مشاهده نبود اما در درون سیتوپلاسم، منطقه‌ای همگن و دانه‌دار دیده شد که نشان‌دهنده مرحله کورنیکال آلوئولار بود (شکل ۷). در ماهی‌های تیمارشده با زولپیدم وزیکول زرده در اووپلاسم به وضوح مشاهده شد و ذرات درشت چربی تشکیل شده بودند (شکل ۸).

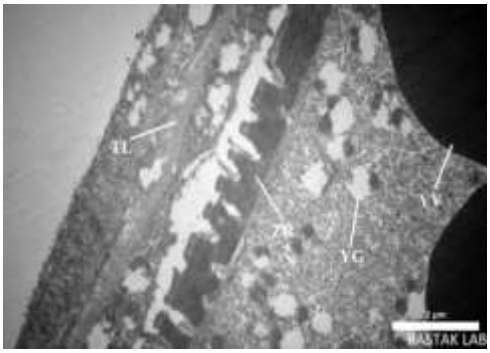


شکل ٦- مقطع سلول تخمک در الف: گروه شاهد، ZR[1]: زونارادیاتا، TL[2]: لایه تکا و TC[3] سلول‌های تشکیل‌دهنده آن، GL[4]: لایه گرانولوزا، YG[5]: گرانول زرده، YV[6]: وزیکول زرده و C[7]: هسته.

1- Zona Radiata
2- Theca Layer
3- Theca Cell
4- Granulosa Layer
5- Yolk Granules
6- Yolk Vesicles
7- Cell Nucleus



شکل ۷- مقطع سلول تخمک در الف: گروه عصاره گل‌ساعتی، ZR: زونارادیاتا، TL: لایه تکا و TC: سلول‌های تشکیل‌دهنده آن، GL: لایه گرانولوزا، YG: گرانول زرده، YV: وزیکول زرده و C: هسته.



شکل ۸- مقطع سلول تخمک در الف: گروه زولپیدم، ZR: زونارادیاتا، TL: لایه تکا و TC: سلول‌های تشکیل‌دهنده آن، GL: لایه گرانولوزا، YG: گرانول زرده، YV: وزیکول زرده و C: هسته.

بحث

مطالعات نشان داد که تاکنون پژوهش جامعی به‌صورت هم‌زمان بین زولپیدم و گیاه گل‌ساعتی، در رابطه با اندازه‌گیری هورمون‌های استروئیدی و تغییرات فراساختاری بافت تخمدان انجام نگرفته است. لازم به ذکر است که هر یک از فاکتورهای مقایسه‌ای این مطالعه به‌صورت غیرمستقیم و پراکنده در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به مکانیسم‌های بررسی شده و فرضیات، داده جامع حاصل از این مطالعه می‌تواند در بررسی‌های جنین‌شناسی و مطالعات فارماکولوژی- هیستولوژی حیطه هورمونی و ناباروری، در پژوهشگاه‌ها، مراکز درمانی ناباروری مورد استفاده قرار بگیرد؛ هم‌چنین تناسب بین مکانیسم‌های فرض شده با تغییرات هیستولوژیکی می‌تواند در مطالعات فازهای کلینیکال ترایال داروها مورد استفاده قرار بگیرد.

در این مطالعه تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی ماده بالغ گورامی سه خال در ۸ تیمار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه حاضر نشان داد در ماهی‌های گورامی سه خال تیمارشده با دوزهای ۱۰mg/kg و ۲۰mg/kg زولپیدم شاخص GSI به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمارهای کنترل افزایش یافت. شاخص GSI ماهی‌ها نشان‌دهنده بلوغ غدد جنسی ماهی‌ها و GSI پایین‌تر، مربوط به مرحله اولیه بلوغ می‌باشد و افزایش این شاخص در تیمار با زولپیدم نشان داد که زولپیدم تأثیر مثبتی بر بلوغ جنسی ماهی‌ها دارد. در مطالعه‌ای

مشابه که تأثیر دیازپام بر روی گیرنده‌های بنزودیازپینی در ماهی‌های *Fathead Minnow* و *Pimephale spromelas* انجام شده بود گزارش شد دیازپام با غلظت ۰/۱ میکروگرم در لیتر به‌مدت ۲۱ روز موجب افزایش اندازه اووسیت‌ها در ماهی‌ها شد اما غلظت‌های بالاتر (۱ و ۱۰ میکروگرم بر لیتر) تأثیر منفی بر سایز اووسیت‌ها داشت (۱۶). در پژوهش حاضر نیز مشاهده گردید دوزهای ۲۵ mg/kg و ۵۰ mg/kg عصاره گیاه گل‌ساعتی تأثیر معنی‌داری بر شاخص GSI ماهی‌ها ندارد اما در دوز بالاتر (۱۰۰ mg/kg) کاهش معنی‌دار شاخص GSI در مقایسه با تیمارهای کنترل مشاهده شد. مشابه با یافته‌های پژوهش حاضر Ramírez و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند ۶۲/۳۰ و ۱۲۴/۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گیاه گل‌ساعتی موجب کاهش شاخص GSI گردید (۱۷).

در مطالعه حاضر بررسی هورمون ۱۷- هیدروکسی پروژسترون نشان داد که زولپیدم در دوزهای ۱۰ mg/kg و ۲۰ mg/kg موجب افزایش معنی‌دار هورمون ۱۷- هیدروکسی پروژسترون نسبت به تیمار کنترل گردید اما افزایش دوز زولپیدم از ۱۰ mg/kg به ۲۰ mg/kg تأثیر معنی‌داری بر افزایش هورمون ۱۷- هیدروکسی پروژسترون نداشت. Dhawan و همکاران در سال ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴ نشان می‌دهد که ترکیب شناخته شده تحت عنوان بنزوفلاون که از عصاره متانولی گیاه گل ساعتی استخراج می‌شود، دارای یک فعالیت ضد آروماتاز قوی با اثرات کاهش میل جنسی، تعداد اسپرم و باروری در موش‌های نر می‌باشد که در معرض موادی مانند کانابینوئیدها، الکل یا نیکوتین قرار دارند (۱۸، ۱۹). تصور می‌شود که مکانیسم عصاره گیاه گل‌ساعتی از طریق مهار آنزیم آروماتاز عمل می‌کند که از تبدیل تستوسترون به استروژن جلوگیری می‌کند. به‌نظر می‌رسد که مطالعات مذکور با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه همخوانی دارد، زیرا آروماتاز آنزیم کلیدی در رشد و بلوغ تخمدان در ماهی است و در بیوسنتز استرادیول تخمدان نقش دارد (۲۰).

نتایج این مطالعه نشان داد عصاره گیاه گل‌ساعتی در دوزهای ۵۰-۲۵ mg/kg موجب کاهش هورمون ۱۷- هیدروکسی پروژسترون در ماهی‌ها در مقایسه با تیمارهای کنترل گردید. تصور می‌شود که مکانیسم عصاره گیاه گل‌ساعتی از طریق مهار آنزیم آروماتاز عمل می‌کند که از تبدیل تستوسترون به استروژن جلوگیری می‌کند. مطالعه حاضر اثرات تحریکی دوز بالای زولپیدم (۲۰ mg/kg) و دوز بالای عصاره گیاه گل‌ساعتی (۱۰۰ mg/kg) بر سطح هورمون‌های تستوسترون در ماهی‌ها در مقایسه با تیمارهای کنترل را نشان داد. تستوسترون یکی از هورمون‌های استروئیدی است که ساخت آن در سلول‌های غیرجنسی گنادها (سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های تکا) می‌باشد که باعث افزایش عملکردهای مرتبط با تولیدمثل در جنس نر می‌باشد (۲۱).

ارزیابی بافت تخمدان نشان داد در تیمارهای کنترل بیش‌تر اووسیت‌ها در مرحله کورتیکال آلوئولار و پیش هستکی بودند و تعدادی اووسیت‌ها نیز در فاز ویتلوژنی مشاهده شد. تغییرات زیادی در بافت تخمدان ماهی‌های تیمار شده با حلال با تیمار شاهد (بدون تزریق) وجود نداشت که نشان داد تزریق اتانول ۷۰ درصد بر رشد اووسیت‌ها تأثیر ندارد. در تیمارهای عصاره گیاه گل‌ساعتی در مقایسه با تیمارهای کنترل بیش‌تر اووسیت‌ها در مرحله پیش هستکی و کورتیکال آلوئولار بودند و با افزایش دوز عصاره نیز تعداد اووسیت‌های فاز پیش هستکی افزایش یافت که با توجه به نتایج هورمون‌های استروئیدی، عصاره گیاه گل‌ساعتی با کاهش هورمون ۱۷- هیدروکسی پروژسترون مانع رشد اووسیت‌ها گردیده است،

همان‌طورکه بررسی سلول تخمک ماهی‌های تیمارشده با گیاه گل‌ساعتی در میکروسکوپ الکترونی نیز نشان‌دهنده آغاز تشکیل لایه گرانولوزا و تکا بودند. بالاترین نرخ اووسیت‌ها در تخمدان ماهی‌های تیمارشده با زولپیدم مشاهده که با افزایش دوز نیز بهبود رشد و مراحل ویتلوژنز و وزیکول زایا دیده شد و بررسی فراساختاری سلول تخمک نیز وزیکول زرده در اووپلاسم را نشان داد که نشان‌دهنده اثرات تحریکی زولپیدم بر رشد اووسیت‌ها می‌باشد. زولپیدم با افزایش هورمون‌های استروئیدی موجب تحریک تخمدان و تکامل مرحله ویتلوژنی شد.

زولپیدم با افزایش هورمون‌های استروئیدی موجب تحریک تخمدان و تکامل مرحله ویتلوژنی شده است. از سوی دیگر عصاره به‌دلیل دارا بودن ترکیباتی که فعالیت ضد آروماتاز قوی دارند از رشد و بلوغ تخمدان ماهی‌ها جلوگیری کرده است.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه با بررسی شاخص GSI و هورمون‌های تستوسترون و ۱۷- آلفا هیدروکسی پروژسترون مشخص گردید زولپیدم حداکثر تا غلظت ۲۰ mg/kg دارای اثرات تحریکی بر باروری ماهی‌ها بوده به‌طوری‌که موجب افزایش شاخص GSI و هورمون‌های استروئیدی در ماهی‌ها گردید و شواهد میکروسکوپ نوری و الکترونی نیز رشد اووسیت‌ها را نشان داد. از سوی دیگر عصاره گیاه گل‌ساعتی در دوزهای ۱۰۰ mg/kg اثر تحریکی بر سطح هورمون‌های جنسی و فراساختار بافت تخمدان در ماهی ماده بالغ گورامی سه خال داشت به‌طوری‌که منجر به تحریک اووسیت‌ها شد. بنابراین نتیجه‌گیری نهایی این پژوهش نشان داد که هر دو این داروها بر سطح هورمون‌های جنسی اثر تحریکی دارند اما میزان اثر و عارضه عصاره گیاه گل‌ساعتی نسبت به زولپیدم کم‌تر است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران برای یاری و حمایت در اجرای این طرح، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1. Moloudizargari, M., Mikailip Aghajanshakeri, S., Asghari, M. H., & Shayegh, J. (2013). Pharmacological and therapeutic effects of *Peganum harmalan* and its main alkaloids. *Pharmacogl. Rev.* 7 (14), 199-212.
2. Chen, S., Kao, Y. C., & Laughton, C. (1997). Binding characteristics of aromatase inhibitors and phytoestrogens to human aromatase. *Steroid Biochem. Mol. Biol*. 61, 987-992.
3. Patel, S., Saleem, T. M., Ravi, V., Shrestha, B., Verma, N., & Gauthaman, K. (2009). Passiflora incarnata Linn: *Pharmacol. Rev.* (IJGP). 3, 54-62.
4. Siribaddana, S. (2012). Cardiac dysfunction in the CABG patient. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12 (2), 166-71.
5. Cao, X. L., Wang, S. B., Zhong, B. L., Zhong, L., Un gvari, G. S., Ng, C. H., et al. (2017). The prevalence of insomnia in the general population China: A meta-analysis. pLoS One. 12 (2), 447-453.
6. Rizou, I., Gucht, V. D., Papa Vasiliou, A., & Maes, S. (2016). The contribution of illness perceptions to fatigue and sleep problems in youngsters with epilepsy. *Eur. J. Paediatr. Neuro.* 20 (1), 93-99.
7. Shrivastava, D., Jung, S., Saadat, M., Sirohi, R., & Crewson, K. (2014). How to interpret the results of a sleep study.

J. Comm. Hosp. Intern. Med. Perspect. 4 (5), 249-258.
8. Leventhal, H., Phillips, L. A., & Burns, E. (2016). The Common Sense Model of self regulation (CSM): A dynamic framework for understanding illness self management. *J. Behav. Med.* 39 (6), 935-46.
9. Roth, T., Hull, S. G., Lankford, D. A., Rosenberg, R., & Scharf, M. B. (2008). Low-dose of sublingual Zolpidem tartrate is associated with dose-related improvement in sleep onset and duration in insomnia characterized by Middle- Of-The-Night (MOTN) awakening. Sleep. 31 (9), 1277.
10. Malviya, S., Voepel-Lewis, T., Ramamurthi, R. J., Burke, C., & Tait, A. R. (2006). Clonidine for the prevention of emergence agitation in young children: efficacy and recovery profile. *Paediatr Anaesth*. 16 (5), 554-9.
11. Gravlee, G. P., Davis, R. F., Kurusz, M., & Utley, J. R. (2002). Cardiopulmonary bypass: principles and practice. 2nd. Philadelphia, pA: *Lippincott Williams and Wilkins*. 17 (3), 403-31.
12. Dhawan, K., Kumar, S., & Sharma, A. (2001). Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata linneaus* Ethnopharmacol. 78 (2-3), 165-70.
13. Hosseini Jebeli, M. S., Naji, T., & Hosseinzadeh Sahafi, H. (2021). Effects of Escitalopram on sex steroids and oocyte ultrastructure in three spot Gourami after increasing Dopamine level By Bromocriptine injection, *Journal of Applied Biology*, 34 (2), 68.
14. Barzegari, N., Naji, T., & Hosseinzadeh Sahafi, H. (2023). Comparison of the effect of *Passiflora incarnata* extract and Alprazolam on sex hormone levels and ovarian tissue ultra-structure in Adult Female fish. (*Trichogaster trichopterus*). *Armaghan Danesh Journal*. 28 (2).
15. Htun-Han, C. (1979). The reproduction biology of the dab *limanda limanda* in the North sea. Gonadosomatic index, Hepatosomatic index & condition factor. *J. Fish. Biol.* 369-378.
16. Lorenzi, V., Choe, R., & Schlenk, D. (2016). Effects of environmental exposure to diazepam on the reproductive behavior of fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol. Chem*. 31 (5), 561-8.
17. Ramírez, E., López-Cardiel, J., Lezama, C., García-Márquez, L., Borja-Gómez, I., & Tintos Gómez, A. (2017). Effect of *Passiflora incarnata* (L) extract on gonadal maturation in young tilapia (*Oreochromis sp*.). *Journal Aqua. Res.* 45 (5), 908-14.
18. Dhawan, K., & Sharma, A. (2003). Restoration of chronic-Δ9-THC-induced decline in sexuality in male rats by a novel benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata Linn* British. *Journal of pharmacology*. 138 (1), 117-120.
19. Dhawan, K. (2004). Drug/substance reversal effects of a novel tri substituted benzoflavone moiety (BZF) isolated from *Passiflora incarnata Linn*. A brief perspective. *Addiction biology*. 8 (4), 379-86.
20. Guiguen, Y., Fostier, A., Piferrer, F., & Chang, C. F. (2010). Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish General and comparative endocrinology. 165 (3), 352-66.
21. Cabrita, E., Robles, V., Herráezp, editors. (2008). Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species. CRC Press, 17(4), 449-461.