

بررسی سطح هورمون‌های استروئیدی و بلوغ تخمک‌های ماهی ماده‌ی بالغ گورامی سه‌خال (*Trichogaster trichopterus*) در مواجهه با عصاره الکلی گیاه پنج‌انگشت (*Vitex agnus castus*) و فلوکستین (Fluoxetine)

معصومه بطحائی^۱، طاهره ناجی^{۱*} و همایون حسین زاده صحافی^۲

^۱ تهران، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه علوم پایه

^۲ تهران موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۲۴

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۳

چکیده

کاهش قدرت باروری از دیرباز جزو مشکلات هر دو جنس نر و ماده بوده است. پنج‌انگشت گیاهی است از تیره شاه‌پسند که در طب سنتی به‌عنوان کاهنده مشکلات قاعدگی مورد استفاده قرار می‌گیرد. فلوکستین دارویی ضدافسردگی از خانواده‌ی داروهای مهارکننده‌ی انتخابی باز جذب سروتونین (SSRIs) می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره الکلی گیاه پنج‌انگشت و داروی فلوکستین بر سطح هورمون‌های استروئیدی و بافت تخمدان در ماهی ماده بالغ گورامی سه‌خال بود. بدین منظور تعداد ۲۰ قطعه ماهی ماده بالغ گورامی سه‌خال با میانگین وزنی (۳-۴) گرم در ۱۰ گروه به گروه‌های کنترل ۱ (دست‌نخورده)، کنترل ۲ (تزریق با اتانول) و تیمارهای دریافت‌کننده دوزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ mg/kg از عصاره الکلی میوه گیاه پنج‌انگشت و ۷/۵ mg/kg از داروی فلوکستین تقسیم شدند. کلیه تجویزها در ۱۰ نوبت و در ۳ تکرار، به‌صورت یک روز در میان در طول مدت ۲۰ روز و به‌صورت تزریقی درون عضله انجام گرفت. پس از بیهوش نمودن ماهیان، بافت تخمدان و سطح هورمون‌های استروئیدی بررسی شدند. نتایج آماری سطح هورمون‌های استروئیدی در میان گروه‌های کنترل و تیمار، اختلاف معناداری را نشان داد ($P < 0.05$). همچنین نتایج، اثر مهار عصاره گیاه پنج‌انگشت و فلوکستین را بر بلوغ تخمک از خود نشان دادند. بررسی یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره گیاه پنج‌انگشت و فلوکستین با افزایش دوز، سطح هورمون‌های جنسی در ماهی ماده‌ی بالغ گورامی سه‌خال را کاهش دادند.

واژه‌های کلیدی: ماهی گورامی سه‌خال، گیاه پنج‌انگشت، فلوکستین، هورمون‌های استروئیدی، بافت تخمدان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۲۶۴۰۰۵۱، پست الکترونیکی: naji.t@iaups.ir

مقدمه

نشان داده شده است که عصاره توتال میوه پنج‌انگشت موجب کاهش هورمون LH (Luteinizing hormone) و FSH (Follicle stimulating hormone) در موش نر می‌شود. به نظر می‌رسد این عصاره می‌تواند بر روی تخمک‌گذاری نیز مؤثر بوده و آن را کاهش دهد (۷). فلوکستین دارویی ضدافسردگی از خانواده‌ی داروهای مهارکننده‌های انتخابی باز جذب سروتونین (Selective

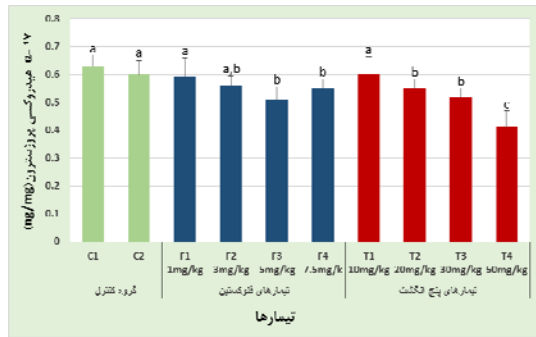
گیاه پنج‌انگشت بانام علمی (*Vitex agnus castus*) از خانواده شاه‌پسند (*Verbenaceae*) به‌صورت درختچه‌ای با ارتفاع ۱ تا ۲/۵ متر است. این گیاه بومی ایران و نواحی مرکزی آسیا است. از اثرات آن می‌توان به ضدالتهابی (۱۳)، ضد قارچ و آنتی‌اکسیدانی (۱۱). مؤثر بر عوارض ناشی از سندرم پیش از قاعدگی (Premenstrual syndrome) (PMS) (۲۶ و ۳۵) و گرگرفتگی (۳) نام برد. در مطالعه‌ای

Electric Griander آسیاب گردید. آنگاه مقدار ۵۰ گرم از پودر حاصل و ۳۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه (خریداری شده از شرکت Merck)، درون دکانتور ریخته شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و در محیط آزمایشگاه قرارداده شدند. پس از تخلیه عصاره از دکانتور، مجدداً شستشو با حلال اتانول صورت گرفته و ۵۰۰ میلی‌لیتر دیگر از حلال اضافه شد. این عمل پس از گذشت ۴۸ ساعت دیگر، تکرار شد. سپس عصاره حاصل، در محیط آزمایشگاه جهت خشک شدن قرار داده شد تا افزایش ویسکوزیته و خلوص آن، حاصل شود (۹). برای تهیه داروی فلوکستین، ابتدا میزان ۲ گرم پودر خالص فلوکستین از شرکت داروسازی عبیدی خریداری و به میزان لازم برای تهیه دوزهای ۷/۵، ۵، ۳، ۱، وزن شده و با اتانول ۹۶ درجه حل گردید. سپس در حجم‌های ۵ میلی‌لیتری به حجم رسانیده شده و جهت تزریق نگهداری شد. روش دریافت دارو به صورت تزریقی درون عضلانی در بالای خط جانبی و زیر باله پشتی ماهیان انجام پذیرفت. کلیه تزریقات در ۱۰ نوبت با سرنگ انسولین BD به میزان ۰/۰۲ میلی‌لیتر، یک روز در میان به صورت ۳ تکرار در طول مدت ۲۰ روز انجام گرفت. در پایان دوره پس از گذشت ۲۴ ساعت از آخرین تزریق، ابتدا تمام ماهیان بوسیله پودر گل میخک، (که ترکیبی مناسب با اثرات منفی کمتر بر ماهی می‌باشد) بیهوش گردیده (۲۹) و با استفاده از ترازوی دیجیتال (۰/۰۰۱ گرم) و خط‌کش بیومتری (طول استاندارد) مورد بررسی قرار گرفتند. جهت اندازه‌گیری هورمون‌های استروئیدی، پس از جدا نمودن سر و باله‌ها و احشای داخلی، از مایعات بافتی بدن ماهیان استفاده و روش هموژنایز استفاده گردید. سپس تخمدان ماهیان پس از توزین، در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. پس از انجام مراحل آماده‌سازی بافت، برش‌گیری با میکروتوم به ضخامت ۱۰-۵ میکرومتر، و رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-آئوزین صورت پذیرفت (۱۹). سپس جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری نیکون (مدل EclipseE100) و

serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) می‌باشد. در مطالعات، دریافت فلوکستین در ماهی *Zebra fish* موجب کاهش تولید تخمک، کاهش سطح ۱۷-بتا استرادیول تخمدان و سطح LH و FSH شده است (۱۷). ماهی گورامی سه‌خال از دسته ماهیان تخم‌گذار بانام علمی (*Trichogaster trichopterus*) و متعلق به خانواده‌ی (*Anabantidae*) یا لایبرنت‌دار است که به دلیل شباهت به محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد در انسان به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی مناسب در مطالعات تولیدمثلی به کار می‌رود (۱۵). با استناد به وجه تشابه این دو دارو در درمان بیماری‌هایی چون سندرم پیش از قاعدگی است (۱۲). هدف از این پژوهش بررسی اثرات آن‌ها بر تخمدان و سطح هورمون‌های استروئیدی جنسی است تا بتوان پس از کسب نتایج، اثرات منفی احتمالی آن‌ان را در تجویز مدنظر قرارداد.

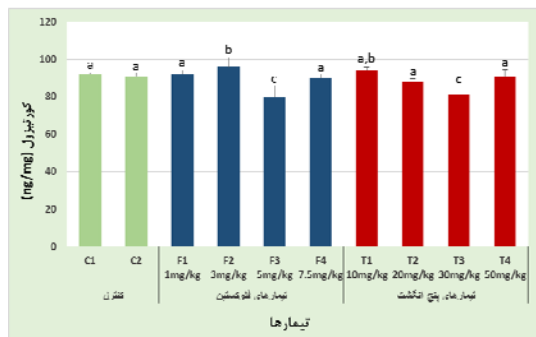
مواد و روشها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد علوم دارویی بر روی تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی ماده بالغ گورامی سه‌خال با میانگین وزنی (۳-۴) گرم انجام گردید. ماهیان در محیط رهاسازی شده و به مدت ۴۸ ساعت با شرایط آداپته شدند. پس از کلرزدایی آب، اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب نظیر دما (۱±۲۳)، pH (۱±۷) و سختی آب انجام شد. سپس آزمایشات در ۱۰ گروه با ۳ تکرار که هرکدام شامل ۱۲ قطعه ماهی بودند، انجام گرفت که در گروه‌های کنترل ۱ (دست‌نخورده)، کنترل ۲ (تزریق با اتانول ۹۶ درجه)، ۴ گروه تیمار با پنج‌انگشت با دوزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ mg/kg (۲۴) و ۴ گروه تیمار با داروی فلوکستین با دوزهای ۱، ۳، ۵، ۷/۵ mg/kg تقسیم شدند (۲۷). در این مطالعه برای تهیه عصاره گیاه از روش خیساندن (Maceration) استفاده شد. بدین منظور ابتدا میوه گیاه پنج‌انگشت خریداری و پس از خشک نمودن در شرایط مناسب از لحاظ تهویه، پس از الک کردن با استفاده از دستگاه آسیاب برقی مدل



شکل ۲- نمودار مقایسه هورمون $17-\beta$ هیدروکسی پروژسترون میان گروه‌های تیمار و کنترل.

این نمودار نشان دهنده نتایج بررسی اختلاف بین گروه تیمار با پنج انگشت با دوزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ mg/kg و ۴ گروه تیمار با داروی فلوکستین با دوزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۵ و گروه کنترل دست نخورده و تزریق با اتانول می‌باشد. نتایج، توسط آزمونهای تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح معناداری ۵٪ در میان گروه‌های کنترل و تیمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند که اختلاف معناداری را نشان داد. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف در سطح معناداری ۵٪ می‌باشند ($P < 0.05$).



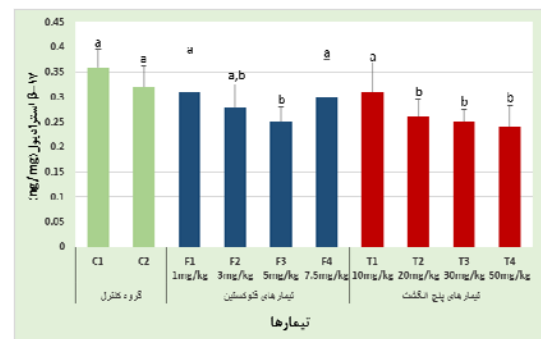
شکل ۳- نمودار مقایسه هورمون تستوسترون میان گروه‌های تیمار و کنترل

این نمودار نشان‌دهنده نتایج بررسی اختلاف بین گروه‌های تیمار با پنج انگشت با دوزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ mg/kg و ۴ گروه تیمار با داروی فلوکستین با دوزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۵ و گروه کنترل دست‌نخورده و تزریق با اتانول می‌باشد. نتایج، توسط آزمونهای تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح معناداری ۵٪ در میان گروه‌های

بزرگنمایی ۴۰×، مورد بررسی قرار گرفتند. سطح هورمون‌های استروئیدی نیز توسط کیت‌های شرکت EASTBIOPHARM و روش الایزا مورد محاسبه قرار گرفتند. داده‌های به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری غلظت سرمی هورمونهای استروئیدی، توسط نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۳) از طریق آزمونهای تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح معناداری ۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده شد.

نتایج

یافته‌های حاصل از داده‌های هورمونهای استروئیدی این مطالعه در نمودارهای زیر نشان داده شده است.

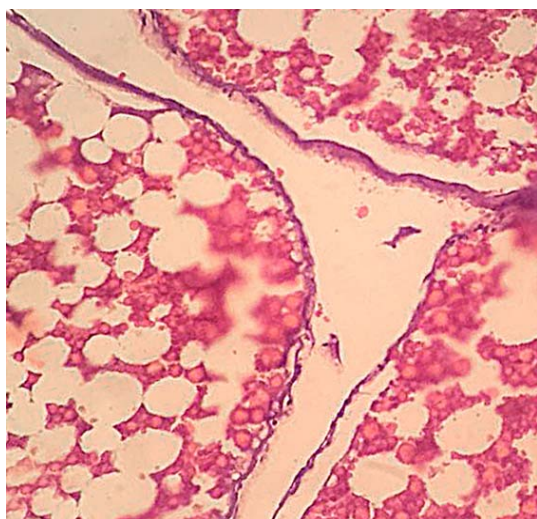


شکل ۴- نمودار مقایسه هورمون ۱۷-بتا استرادیول میان گروه‌های تیمار و کنترل

این نمودار نشان دهنده نتایج بررسی اختلاف بین گروه‌های تیمار با گیاه پنج انگشت با دوزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ mg/kg و ۴ گروه تیمار با داروی فلوکستین با دوزهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۵ و گروه کنترل دست نخورده و تزریق با اتانول می‌باشد. نتایج، توسط آزمونهای تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح معناداری ۵٪ در میان گروه‌های کنترل و تیمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند که اختلاف معناداری را نشان داد. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف در سطح معناداری ۵٪ می‌باشند ($P < 0.002$).

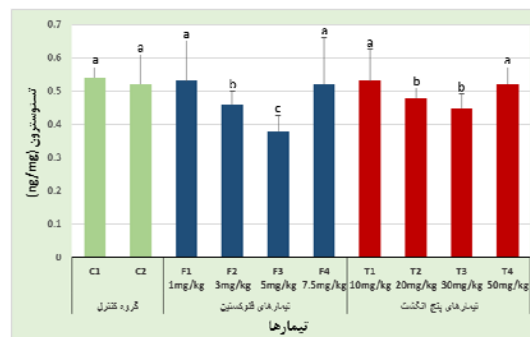
کاهش پیدا کرد. در بالاترین دوز از تیمار فلوکستین اما، افزایش در مقدار هورمون مشاهده شد. نتایج حاصل از هورمون α -17 هیدروکسی پروژسترون نیز بیانگر کاهش سطوح با افزایش دوز در تیمارهای پنج‌انگشت و فلوکستین نسبت به گروه کنترل بود به‌گونه‌ای که در بالاترین دوز از دریافت عصاره گیاه این کاهش، اختلاف محسوس‌تری را نسبت به گروه کنترل از خود نشان داد. در نتایج حاصل از هورمون تستوسترون در تیمار فلوکستین، سطوح هورمونی کاهش محسوس‌تری را نسبت به گروه کنترل از خود نشان داد. در حالیکه در بالاترین دوز از هر دو گروه تیمار، افزایش در سطوح هورمونی مشاهده شد. نتایج حاصل از هورمون کورتیزول نیز به‌عنوان هورمونی دیگر با ساختار استروئیدی، بیانگر کاهش در مقدار با افزایش دوز در میان گروه‌های تیمار و کنترل بود. علی‌رغم وجود اختلاف معنادار در تیمارها نسبت به گروه کنترل ($P < 0.05$)، روند کلی تغییرات در دو گروه تیمار تقریباً مشابه بود.

یافته‌های حاصل از تصاویر میکروسکوپ نوری نشان داد که در هر دو گروه کنترل، اغلب اووسیت‌ها در مرحله ویتلوژنز قرار داشتند.



شکل ۵- مقطعی از بافت تخمدان ماهی کنترل اتانول، فاز غالب تخمک‌ها در مرحله ویتلوژنز، (H&E)، بزرگنمایی $\times 40$

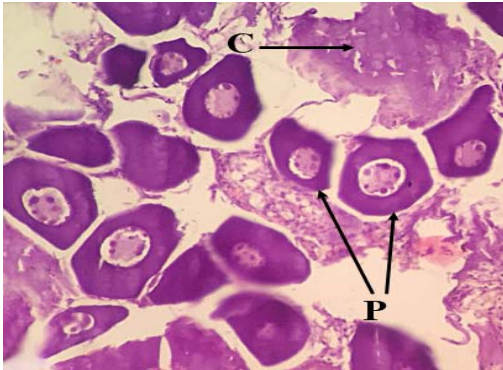
کنترل و تیمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند که اختلاف معناداری را نشان داد. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف در سطح معناداری ۵٪ می‌باشند ($P < 0.05$).



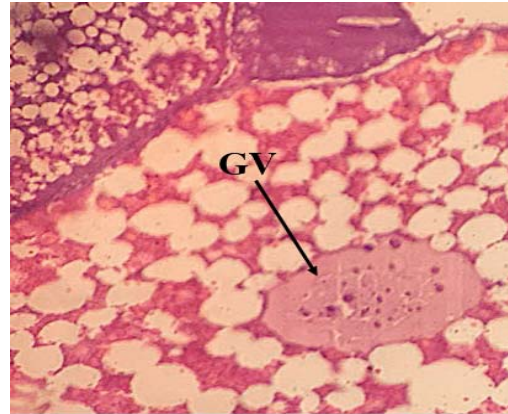
شکل ۴- نمودار مقایسه هورمون کورتیزول میان گروه‌های تیمار و کنترل

این نمودار نشان دهنده نتایج بررسی اختلاف بین گروه‌های تیمار با گیاه پنج‌انگشت با دوزهای با دوزهای $10, 20, 30, 50 \text{ mg/kg}$ و $1, 3, 5, 7.5 \text{ mg/kg}$ و گروه کنترل دست نخورده با دوزهای $10, 20, 30, 50 \text{ mg/kg}$ و $1, 3, 5, 7.5 \text{ mg/kg}$ و تزریق با اتانول می‌باشد. نتایج، توسط آزمونهای تجزیه واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح معناداری ۵٪ در میان گروه‌های کنترل و تیمار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند که اختلاف معناداری را نشان داد. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف در سطح معناداری ۵٪ می‌باشند ($P < 0.05$).

یافته‌های حاصل از داده‌های هورمونهای استروئیدی در این مطالعه در نمودارهای زیر نشان داده شده است. با توجه به نتایج حاصله، میان گروه‌های کنترل ۱ (دست‌نخورده)، کنترل ۲ (تزریق با اتانول) از لحاظ سطح هورمون‌ها اختلاف معناداری وجود نداشت. نتایج حاصله اما در میان گروه‌های کنترل و تیمار بیانگر وجود اختلاف معنادار بود. ($P < 0.002$) میزان هورمون α -17 بتا استرادیول در گروه‌های تیمار بیانگر وجود اختلاف با گروه کنترل بود (حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف در سطح معناداری ۵٪ می‌باشند) و با افزایش دوز سطح این هورمون



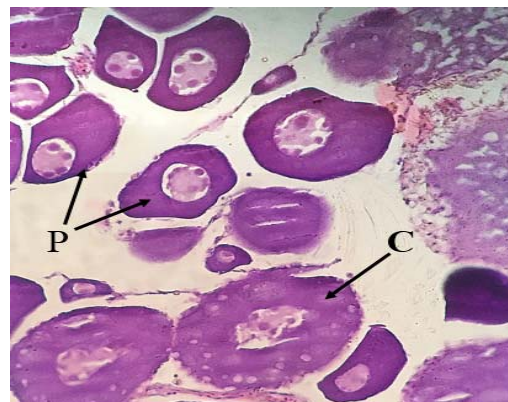
شکل ۹- مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار فلوکستین بادوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فاز غالب تخمک‌ها شامل مرحله پیش هستکی اولیه (P)، حضور تخمک‌هایی در مرحله کورتیکال (C)، (H&E)، بزرگنمایی ۴۰×



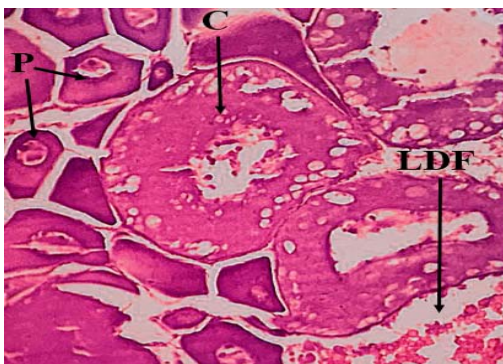
شکل ۶- مقطعی از بافت تخمدان ماهی کنترل دست‌نخورده، شروع حرکت وزیکول زایا (GV) به سمت قطب جانوری، (H&E)، بزرگنمایی ۴۰×



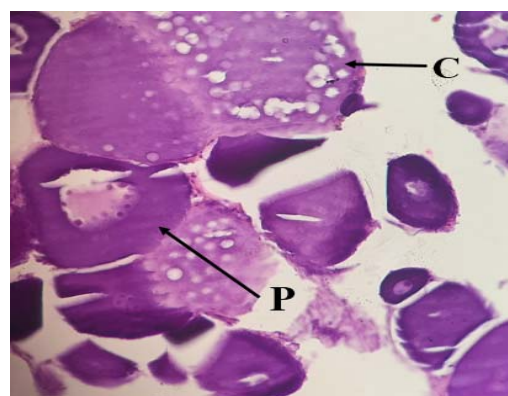
شکل ۱۰- مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار فلوکستین ادوز ۷٫۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فاز غالب تخمک‌ها شامل مرحله پیش هستکی اولیه (P)، حضور تخمک‌هایی در مرحله ورتیکال (C)، (H&E)، بزرگنمایی ۴۰×



شکل ۷- مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار فلوکستین با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم، حضور تخمک‌هایی در مرحله کورتیکال (C) و پیش هستکی اولیه (P)، (H&E)، بزرگنمایی ۴۰×



شکل ۱۱- مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار پنج‌انگشت با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، اتصال ذرات چربی به یکدیگر (LDF)، حضور تخمک‌هایی در مرحله پیش هستکی اولیه (P)، حضور تخمک‌هایی در مرحله کورتیکال (C)، (H&E)، بزرگنمایی ۴۰×



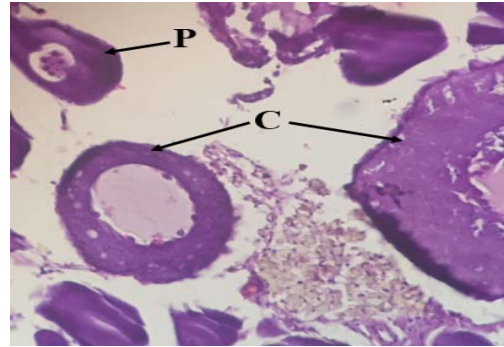
شکل ۸- مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار فلوکستین با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، حضور تخمک‌هایی در مرحله کورتیکال (C) و پیش هستکی اولیه (P)، (H&E)

در گروه کنترل دست‌نخورده شروع حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری نشان داده شده است. (شکل ۶) در تیمار فلوکستین با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم (شکل ۷) تعدادی اووسیت در مرحله کورتیکال و تعدادی در مرحله پیش هستکی مشاهده شد. در تیمار با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم (شکل ۸) نیز این نتیجه تکرار شد. در تیمار با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (شکل ۹) غالب اووسیت‌ها در مرحله پیش هستکی به سر می‌بردند که این تعداد در تیمار با دوز ۷/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (شکل ۱۰) اندکی کاهش یافت.

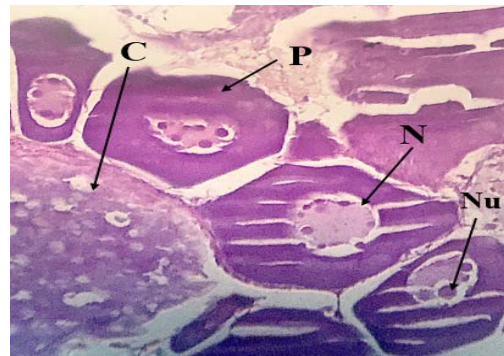
نتایج حاصل از تیمار پنج‌انگشت با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بیانگر آن بود که تخمک‌ها در مرحله کورتیکال و تعدادی نیز در مرحله پیش هستکی قرار داشتند. (شکل ۱۱) در تیمار پنج‌انگشت با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (شکل ۱۲) نیز غالب اووسیت‌ها در مرحله کورتیکال و تعدادی در مرحله پیش هستکی بودند. در تیمار پنج‌انگشت با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (شکل ۱۳) تعدادی از تخمک‌ها در مرحله پیش هستکی و تعدادی در مرحله کورتیکال قرار داشتند. اما در تیمار با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، (شکل ۱۴) تقریباً تمامی تخمک‌ها در مرحله پیش هستکی بودند که این تعداد در مقایسه با تیمار فلوکستین و گروه کنترل، افزایش یافت.

بحث

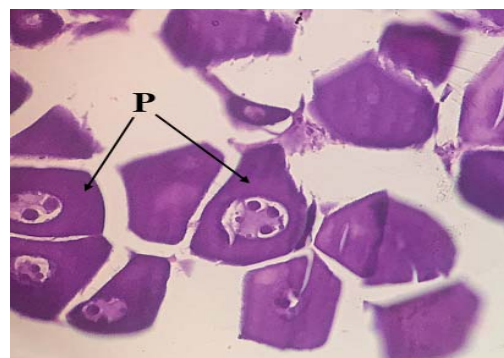
مطالعه تغییرات هورمونی و بیوشیمیایی نظیر تغییر در سطوح هورمون‌های جنسی و الکترولیت‌های سرم خون از جمله موارد مرتبط با فیزیولوژی تولیدمثل است که نقش مهمی در مطالعات پایه و کاربردی در این زمینه دارد. سنجش هورمون‌های جنسی در کنار استفاده از شاخص‌های بافت‌شناختی در بررسی چرخه تولیدمثلی ماهیان بسیار حائز اهمیت است (۶). هورمون‌های جنسی از مهم‌ترین هورمون‌های استروئیدی محسوب می‌شوند. در این بین ۱۷ - بتا استرادیول (E₂) از جمله هورمون‌های



شکل ۱۲- مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار پنج‌انگشت با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، حضور تخمک‌هایی در مرحله پیش هستکی اولیه (P)، حضور تخمک‌هایی در مرحله کورتیکال (C)، (H&E)، بزرگنمایی ۴۰×



شکل ۱۳- مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار پنج‌انگشت با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، حضور تخمک‌ها در مرحله پیش هستکی اولیه (P)، هسته (N) و هستک‌های کروماتینی (Nu)، حضور تخمک‌ها در مرحله کورتیکال (C) و پیش هستکی اولیه (H&E)، بزرگنمایی ۴۰×



شکل ۱۴- مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار پنج‌انگشت با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فاز غالب تخمک‌ها در مرحله پیش هستکی اولیه (P)، (H&E)، بزرگنمایی ۴۰×

روند محسوس‌تری را نسبت به گروه کنترل از خود نشان داد. این هورمون، پیش‌ساز استروئید الفاکندنده بلوغ نهایی است به‌طوری که بیش‌ترین مقدار آن همزمان با تجزیه هسته زاینده، بهم پیوستن قطرات چربی و حل شدن دانه‌های زرده مشاهده می‌گردد (۲۴). بنابراین با توجه به کاهش در سطوح هورمونی، روند مهار تکاملی تخمک‌ها محتمل به نظر می‌رسد. در مطالعات یوفوز و همکاران در سال ۲۰۰۶ نیز کاهش میزان پروژسترون در معرض قرارگیری بافلوکستین گزارش شده است (۳۲). همانگونه که اشاره شد، استفاده درازمدت از عصاره‌های گیاهی که حاوی فیتواستروژن‌ها هستند سبب اعمال فیدبک منفی بر LH شده و می‌توانند بر فاز تشکیل جسم زرد مؤثر باشند (۲۰). بنابراین به دنبال آن می‌توانند ترشح هورمون α -۱۷ هیدروکسی پروژسترون را نیز که در فاز بلوغ در ماهیان ترشح می‌شود، تحت تأثیر قرار دهند. در بررسی سطوح هورمون استروئیدی تستوسترون کاهش محسوس میزان در دوز 5 mg/kg در تیمار با فلوکستین، در مقایسه با گروه کنترل و تیمار پنج‌انگشت رؤیت شد. در تیمار پنج‌انگشت نیز کاهش در دوزهای 20 و 30 mg/kg روی داد، در حالیکه در بالاترین دوز افزایش در مقدار مشاهده شد. در همین راستا در پژوهشی که مینگن و همکاران بر روی جنس نر ماهی طلائی در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، فلوکستین موجب اختلال در محور تولیدمثلی و کاهش سطوح پلاسمایی تستوسترون گردید (۲۱). بررسی‌ها همچنین در تیمارهای هردو گروه نشان داد که بالاترین دوز از هردو گروه در برخی نتایج، اثری معکوس داشته است که می‌تواند نشان از سمیت دوز تزریقی در دوزهای موردنظر باشد. در مطالعه پیرلوسانی و همکاران در سال ۲۰۱۱ نیز در موش‌های سوری نر به‌صورت درون صفاقی، عصاره پنج‌انگشت موجب کاهش سطح سرمی تستوسترون، LH و FSH شده است که پیشنهاد می‌کند که می‌تواند اثر مستقیمی بر محور هیپوتالاموس، هیپوفیز و گناد داشته باشد (۵). در مطالعات نصری و همکاران در سال ۱۳۸۴ بر روی

استروئیدی است که نقش کلیدی آن در سنتز و تحریک ساخت پروتئین‌های زرده‌ای ویتلوژنین در هیپاتوسیت‌های کبد بسیار برجسته است (۸). نتایج حاصله از بررسی سطوح هورمونهای استروئیدی در میان گروههای کنترل (دست‌نخورده) و کنترل ۲ (تزریق با اتانول) اختلاف معناداری را نشان نداد. بررسی نتایج حاصل از هورمون ۱۷-بتا استرادیول نشان داد که با افزایش دوز، سطوح هورمونی کاهش می‌یابد و در تیمار پنج‌انگشت روند محسوس‌تری را نسبت به گروه کنترل از خود نشان داد ($P < 0.05$) علت این امر را می‌توان در ترکیبات شیمیایی فیتواستروژنی موجود در گیاه جستجو نمود. فیتواستروژن‌ها شامل چندین گروه از ترکیبات هستند که از جمله آنان می‌توان به ایزوفلاون، کومستان، لیگنان و لاکتونها رسورسیلیک نام برد. مشتقاتی از ایزوفلاون‌ها که ماده عمده آن کاستیسن می‌باشد در عصاره گیاه یافت می‌شود (۲). در مطالعات رفیعان و همکاران در سال ۲۰۱۷، ذکر شده است که ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه موجب کاهش ترشح هورمون FSH و استروژن در زنان و کاهش هورمون تستوسترون در مردان خواهد شد (۲۸). همچنین در بررسی سطوح هورمونی در تیمار فلوکستین، مطالعات مینگن و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر روی جنس ماده ماهی طلائی بیانگر آن بود که دریافت خوراکی فلوکستین منجر به کاهش سطوح هورمونی استرادیول شده است (۲۲). افزایش در مقدار هورمون در آخرین دوز نیز می‌تواند نشانگر فعال شدن مکانیسم منفی اثرگذاری هیپوفیز بر گناد باشد. مطالعات نشان داده‌اند که تغییر در سطح هورمون ۱۷-بتا استرادیول با رشد تخمک‌ها در تخمدان ارتباط دارد (۱۸). بنابراین کاهش در میزان سطوح هورمونی می‌تواند نشان از حضور تخمک در مراحل پیش از بلوغ بوده باشد. بررسی میزان سطوح هورمون α -۱۷ هیدروکسی پروژسترون، در تیمارهای پنج‌انگشت و فلوکستین بیانگر کاهش در مقدار هورمون در الگوی وابسته به دوز بود. که این کاهش در تیمارهای پنج‌انگشت

موش‌های سوری نیز عصاره‌ی میوه گیاه، موجب کاهش در میزان تستوسترون شده است (۱۰). باتوجه به کاهش محسوس‌تر سطوح تستوسترون نسبت به گروه کنترل و تیمار با پنج‌انگشت، به نظر می‌رسد فلوکستین جنس نر را بیشتر تحت تأثیر قرار خواهد داد. در بررسی سطوح هورمونی کورتیزول در تیمار فلوکستین و در دوز mg/kg ۵، کاهش در مقدار رؤیت شد و این در حالیست که در تیمار پنج‌انگشت نیز در روندی مشابه کاهش معنادار در مقدار، نسبت به گروه کنترل در دوز $30 mg/kg$ مشاهده شد. کورتیزول مهم‌ترین هورمون کورتیکو استروئیدی است که در پاسخ به استرس، از بخش قشری بافت کلیه به خون ترشح شده و غلظت آن از جمله شاخص‌های مناسب در ارزیابی پاسخ ماهیان به استرس محسوب می‌شود (۳۴). بنابراین روند تقریباً مشابه تغییرات در گروه‌های تیمار می‌تواند بیانگر قرارگیری ماهیان در شرایط محیطی مشابه باشد. از سویی دیگر اثرگذاری بر هیپوفیز می‌تواند ترشح گنادوتروپین‌های محرک برآدرنال و به دنبال آن ترشح کورتیزول را تحت تأثیر قرار دهد. در همین راستا، در مطالعات پیوارسکا و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی بیماران که جهت درمان افسردگی از داروی فلوکستین استفاده نمودند، میزان کورتیزول سرمی کاهش یافت (۲۵). در مطالعات سوسیک و همکاران در سال ۲۰۱۶ ذکر شده است که عصاره میوه گیاه در طول مدت سه هفته بر رت-های نر می‌تواند محور آدرنوکورتیکال را تحت تأثیر قرار دهد (۳۰).

معین شد که در دو گروه کنترل غالب تخمک‌ها در مرحله ویتلوژنز قرار داشتند. در مطالعات باقری و همکاران نیز اختلافی میان گروه‌های کنترل دست‌نخورده و اتانولی رؤیت نشد (۴). در بررسی نتایج حاصل از تیمار فلوکستین نشان داده شد که در الگوی وابسته به دوز، تعداد سلول‌ها در مرحله پیش هستکی، به‌طور کلی نسبت به گروه کنترل افزایش یافته و سلول‌های بالغ کمتری به چشم می‌خوردند. در همین راستا مطالعات لیستر و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی ماهی *Zebra fish* نشان داد، فلوکستین موجب مهار تکامل تخمک و کاهش تجمعی تعداد تخم‌های تولیدشده می‌گردد (۱۷). در مطالعه دورل و همکاران در سال ۲۰۱۷، نیز نشان داده شد که فلوکستین می‌تواند اثرات خفیفی بر محور باروری ماهی *Cichlasoma dimerus* از خود نشان داد (۱۶)، بنابراین می‌توان مهار روند تکاملی تخمک‌ها را توجیه نمود. بررسی نتایج بافتی حاصل از تیمار پنج‌انگشت نیز بیانگر آن بود که با افزایش دوز، تعداد سلول‌ها در مرحله پیش هستکی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت که این تعداد نسبت به تیمار فلوکستین نیز بیشتر بوده است. همچنین در مطالعات تاندن و همکاران عصاره گونه دیگری از جنس گیاه پنج‌انگشت (*vitex negundo*) سبب ایجاد تغییرات مورفولوژیک بافتی گردیده است (۳۱). در پژوهش‌هایی که بر روی ماهی گورامی سه‌خال انجام گرفت نیز نشان داده شد که در تیمار با عصاره گیاه پنج‌انگشت شاخص جنسی و قطر تخمک کاهش پیدا کرد (۲۳). بنابراین می‌توان توجیه نمود که روند تکوین تخمک‌ها نیز تحت تأثیر قرار گرفتند. باتوجه به نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره گیاه پنج‌انگشت و داروی فلوکستین هر دو اثر مهاری بر روند تکوین تخمک داشته و منجر به کاهش سطوح هورمون‌های استروئیدی جنسی در ماهی ماده بالغ گورامی سه‌خال گردیده‌اند.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با مساعدت آزمایشگاه علوم پایه دانشکده

بهترین راه جهت تشخیص و بررسی مراحل تکوین جنسی در ماهیان، بررسی سطوح شاخص‌های تولیدمثلی و نشانه‌های بافت‌شناسی گناد می‌باشد (۱۴). ریخت‌سنجی بافتی به اندازه‌گیری بافت‌ها و اجزاء مختلف موجود در آن پرداخته و در حقیقت محاسبه کمی تغییرات بافت‌ها و اجزاء تشکیل‌دهنده آنها را با استفاده از تصاویر دوبعدی ممکن می‌سازد (۱). تخمک‌ها در طی رشد مراحل مختلفی را طی می‌کنند (۳۳). در بررسی نتایج بافت‌شناسی تخمدان

همکاران این مرکز که در انجام این پژوهش همکاری داشتند، مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

داروسازی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی صورت پذیرفته است. بدینوسیله نویسندگان مقاله از تمامی

منابع

- ۱- آب پیکر، ز.، لهراسبی، پ.، و منصفی، م. ا.، ۱۳۹۴. مقایسه عصاره آبی بذر و برگ شویده (*Anethum graveolens L*) بر تغییرات هیستورمورفولوژیک رحم و تخمدان موش صحرایی، مجله پژوهش‌های جانوری، دوره ۲۸، شماره ۲، صفحات ۱۲۴-۱۱۶.
- ۲- آزاد بخت، م.، بها الدینی، ا.، و شوریده ضیابری، س. م.، ۱۳۸۴. بررسی تأثیر عصاره فلاونوئیدی میوه و برگ گیاه پنج‌انگشت بر تغییرات میزان سرمی هورمون پرولاکتین در موش‌های صحرایی ماده، فصلنامه گیاهان دارویی، دوره ۴، شماره ۱۶، صفحه ۵۷.
- ۳- اخوان، س.، زندوکیلی، ف.، عرب، م.، و کریمی، ح.، ۱۳۹۰. مقایسه اثر درمانی فلوکستین، سیتالوپرام، استروژن و پروژسترون و دارونما در بهبود گرگرفتگی در زنان پری منوپاز، مجله علوم پزشکی دانشگاه کردستان، دوره ۱۶، شماره ۳، صفحات ۳۱-۳۸.
- ۴- باقری زیاری، ص.، ناجی، ط.، و حسین‌زاده صحافی، ه.، ۱۳۹۴. اثرات LHRH-A₂ ۱۷ بتا استرادیول و عصاره‌ی سرشاخه‌ی هوایی مرزنجوش بر القا باروری در ماهی گورامی سه خال، مجله نشریه توسعه‌ی آبی‌پرووری، سال ۹، شماره ۳، صفحات ۵۹-۶۹.
- ۵- پیرسلوانی، م.، شیروی، ع.، و حیدری نصرآبادی، م.، ۱۳۹۰. بررسی اثر عصاره آبی گیاه رازیانه و پنج‌انگشت بر محور HPG و اسپرماتوژنز در موش سوری نر نژاد NMRI، مجله زیست‌شناسی جانوری، دوره ۴، شماره ۱، صفحات ۷-۱۸.
- Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 3(1), PP: 183-189.
- 14- Crime, L. W., and Glebe, B. D., 1990. Reproduction In: Methods for Fish Biology edit, Schreck and Moyle American Fisheries Society Publication, PP: 529-55.
- 15- Degani, G., Jakson, K., and Marmelstein, G., 1995. The effect of LHRH analogue on sex steroid profiles in female *Trichogaster trichopterus* (Anabantidae, Pallas). Journal of aquaculture in the tropics, 10, PP: 297-307.
- 16- Dorelle, L. S., Da Cuña, R. H., Vázquez, G. R., Höcht, C., Shimizu, A., and Genovese, G., Nostro, F. L., 2017. The SSRI fluoxetine exhibits mild effects on the reproductive axis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes). Chemosphere, 171, PP: 370-378.
- ۶- حسین زاده صحافی، ه.، ۱۳۸۰. بیولوژی تولیدمثل ماهی با تأکید بر ماهیان ایران، انتشارات معاونت توسعه آبی‌پرووری، اداره کل ترویج مؤسسه نشرجهاد وابسته به دانشگاه تهران، صفحه ۲۷۲.
- ۷- رمضانی، م.، نصری، س.، و بهادران، ح.، ۲۰۰۸. اثر عصاره توتال میوه گیاه پنج‌انگشت بر اسپرماتوژنز موش نژاد بلب سی ارمغان دانش، دوره ۱۳، شماره ۳، صفحات ۳۵-۴۴.
- ۸- فلاحتکار، ب.، رعناى اخوان، س.، طلوعی گیلانی، م. ح.، و مجازی امیری، ب.، ۱۳۹۳. اثر ایمپلنت هورمون ۱۷-بتا استرادیول در مرحله پیش زرده سازی، مجله پژوهش‌های جانوری، دوره ۲۷، شماره ۲، صفحات ۲۳۹-۲۵۰.
- ۹- نجاتی، س. ا.، ۲۰۱۶. اثر عصاره الکلی گیاه پنج‌انگشت و ویتامین E بر میزان سرمی آنزیمهای کبدی، گلوکز، پروفایل لیپیدی و انسولین در موشهای صحرایی ماده بالغ، مجله زیست‌شناسی جانوری، دوره ۹، شماره ۲، صفحات ۹۴-۸۷.
- ۱۰- نصری، س.، عریان، ش.، حائری روحانی، س. ع.، امین، غ.، و تقی زاده، م.، ۱۳۸۴. تأثیر عصاره میوه گیاه پنج‌انگشت و تداخل آن با بروموکرپتین بر میزان هورمون لوتئینی و تستوسترون در موش سوری نر، مجله پزشکی هرمزگان، دوره ۹، شماره ۲، صفحات ۱۱۳-۱۱۸.
- 11- Asdadi, A., Hamdouch, A., Oukacha, A., Moutaj, R., Gharby, S., Harhar, H., El Hadek, M., Chebli, B., and Hassani, L. I., 2015. Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L., seeds growing in area of argan tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections. Journal of Medical Mycology, 25(4), PP: 118-127.
- 12- Atmaca, M., Kumru, S., and Tezcan, E., 2003. Fluoxetine versus *Vitex agnus castus* extract in the treatment of premenstrual dysphoric disorder. Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental, 18(3), PP: 191-195.
- 13- Chhabra, G. S., and Kulkarni, K. S., 2014. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vitex agnus castus* leaves. Quantitative analysis of flavonoids as possible active constituents.

- 17- Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., and Van Der Kraak, G., 2009. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation. *Aquatic toxicology*, 95(4), PP: 320-329.
- 18- Lee, W. K., and Yang, S. W., 2002. Relationship between ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones, and induction of oocyte maturation and ovulation in the cultured female Korean spotted sea bass *Lateolabrax maculatus* (Jeom-nong-eo). *Aquaculture*, 207(1), PP: 169-183.
- 19- Lenhardt, M., Finn, R. N., Cakic, P., Kolarevic, J., Krpocetkovic, J., Radovic, I., and Fyhn, H. J., 2005. Analysis of the post-vitellogenic oocytes of three species of Danubian Acipenseridae. *Belgian journal of zoology*, 135(2), 205p.
- 20- Malaivijitnond, S., Kiatthaipipat, P., Cherdshewasart, W., Watanabe, G., and Taya, K., 2004. Different effects of *Pueraria mirifica*, a herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rats. *Journal of pharmacological sciences*, 96(4), PP: 428-35.
- 21- Mennigen, J. A., Lado, W. E., Zamora, J. M., Duarte-Gutermna, P., Langlois, V. S., Metcalfe, C. D., Chang, J. P., Moon, T. W., and Trudeau, V. L., 2010. Waterborne fluoxetine disrupts the reproductive axis in sexually mature male goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology* 100, PP: 354-64.
- 22- Mennigen, J. A., Zamora, J. M., Chang, J. P., and Trudeau, V. L., 2017. Endocrine disrupting effects of waterborne fluoxetine exposure on the reproductive axis of female goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 202, PP: 70-78.
- 23- Naji, T., Ghafouri, S., and Sahafi, H. H., 2014. The Histological Effects of Cucurbita pepo, *Silybum marianum*, *Linum usitatissimum*, *Vitex agnus-castus* 17 β estradiol on ovarian tissue in three Spot Gorami (*Trichogaster trichopterus*). *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*, 3, PP: 120-127.
- 24- Ortiz-Delgado, J. B., Porcelloni, S., Fossi, C., and Sarasquete, C., 2008. Histochemical characterisation of oocytes of the swordfish *Xiphias gladius*. *Scientia Marina*, 72(3), PP: 549-64.
- 25- Piwowarska, J., Chimiak, A., Matsumoto, H., Dziklińska, A., Radziwoń-Zaleska, M., Szelenberger, W., and Pachecka, J., 2012. Serum cortisol concentration in patients with major depression after treatment with fluoxetine. *Psychiatry research* 198(3), PP: 407-11.
- 26- Prilepskaya, V. N., Ledina, A. V., Tagiyeva, A. V., and Revazova, F. S., 2006. *Vitex agnus castus*: successful treatment of moderate to severe premenstrual syndrome. *Maturitas*, 55, PP: 55-63.
- 27- Raap, D. K., Evans, S., Garcia, F., Li, Q., Muma, N. A., Wolf, W. A., Battaglia, G., and Van De Kar, L. D., 1999. Daily injections of fluoxetine induce dose-dependent desensitization of hypothalamic 5-HT_{1A} receptors: reductions in neuroendocrine responses to 8-OH-DPAT and in levels of G α and G β proteins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288(1), PP: 98-106.
- 28- Rafieian-Kopaei, M., and Movahedi, M., 2017. Systematic Review of Premenstrual, Postmenstrual and Infertility Disorders of *Vitex Agnus Castus*. *Electronic physician*. 9(1), 3685 p.
- 29- Sattari, A., Mirzargar, S. S., Abrishamifar, A., Lourakzadegan, R., Bahonar, A., Mousavi, H. E., and Niasari, A., 2009. Comparison of electroanesthesia with chemical anesthesia (MS222 and Clove Oil) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using plasma cortisol and glucose responses as physiological stress indicators. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advance*, 4, PP: 306-313.
- 30- Susic-Jurjevic, B., Ajdzanovic, V., Filipovic, B., Trifunovic, S., Jaric, I., Ristic, N., and Milosevic, V., 2016. Functional morphology of pituitary-thyroid and-adrenocortical axes in middle-aged male rats treated with *Vitex agnus castus* essential oil. *Acta histochemical*, 118(7), PP: 736-45.
- 31- Tandon, V., and Gupta, R., 2004. Histomorphological changes induced by *Vitex negundo* in albino rats. *Indian journal of pharmacology*, 36(3), 176 p.
- 32- Uphouse, L., Hensler, J. G., Sarkar, J., and Grossie, B., 2006. Fluoxetine disrupts food intake and estrous cyclicity in Fischer female rats. *Brain research*, 1072(1), PP: 79-90.
- 33- Wallace, R. A., 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In *Oogenesis*, Springer US, PP: 127-177.
- 34- Webb, M. A., Allert, J. A., Kappenman, K. M., Marcos, J., Feist, G. W., Schreck, C. B., and Shackleton, C. H., 2007. Identification of plasma glucocorticoids in pallid sturgeon in

- response to stress. *General and Comparative Endocrinology*, 154(1), PP: 98-104.
- 35- Webster, D. E., Lu, J., Chen, S. N., Farnsworth, N. R., and Wang, Z. J., 2006. Activation of the μ -opiate receptor by *Vitex agnus-castus* methanol extracts: Implication for its use in PMS. *Journal of ethnopharmacology*, 106(2), PP: 216-221.

Investigation of the level of steroid hormones and mature female three spot Gourami's (*Trichogaster trichopterus*) Oocytes maturation in facing alcoholic extract of (*Vitex agnus castus*) and Fluoxetine

Bathae M.¹, Naji T.¹ and Hosseinzadeh Sahafi H.²

¹ Dept. of Basic Science, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

² Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research and Education Organization, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Reduction in fertility has long been one of the problems of both males and females. The (*Vitex agnus castus*) is a plant from the family of (*Verbenaceae*) which is used in traditional medicine for reducing menstrual problems. Fluoxetine is an antidepressant from the family of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). The aim of this study was to evaluate the effect of *Vitex agnus castus*'s alcoholic extract and fluoxetine on steroid hormones and ovary tissues in mature female three spot Gourami. For this purpose, 120 fetal fish specimens of *Trichogaster trichopterus* with average weight of (3-4) grams in 10 groups were divided into control groups, control1(intact), control2 (ethanol injection) and treatment groups receiving 10, 20, 30, 50 mg / kg alcoholic extract of *Vitex agnus castus*'s fruites and 1, 3, 5, 7.5 mg/kg of fluoxetine. All the prescriptions were administered 10 times in 3 replicates one day in between in the form of an intramuscular (IM) injection within 20 days. After anaesthetizing the fishes, ovary tissue and the level of steroid hormones were studied. The statistical results of the level of steroid hormones showed significant differences between control groups and treatments ($P < 0.05$). Also the results showed the inhibitory effect of *vitex agnus castus* extract and fluoxetine on oocyte maturation. The studies of the results in this research showed that *Vitex agnus castus* extract and Fluoxetine with the increase in dosage, decreased the level of sex hormones in mature female three spot Gourami.

Key words: *Trichogaster trichopterus*, *Vitex agnus castus*, Fluoxetine, steroid