مقایسه عصاره گیاه خرفه با داروی لتروزول در مهار آنزیم آروماتاز و سطوح استروئیدهای جنسی و فراساختار اووسیت در ماهی گورامی سه خال

۱- طاهره ناجی* ۲- همایون حسین زاده صحافی ۳- سعید محمدی معتمد ۴- ساناز علایی شهمیرزادی ۵-زیبا کلوئی

۱- دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی.
۲- استاد موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۳-استادیار گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی.
۴-دکترا گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی.
۵-کارشناسی ارشد، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاداسلامی.

***Corresponding Author: Email: tnaji2002@gmail.com**
Email: h_hosseinzadeh@yahoo.com
Email:mohammadi@yahoo.com
Email:alaie@yahoo.com
Email: Kziba.1367@yahoo.com

چکیده

امروزه تنوع بیماری‌ها و محدودیت تعداد داروهای شیمیایی، عوارض جانبی، تحمل دارویی و هزینه‌های اقتصادی سنگین تهیه آن‌ها، ضرورت توجه به طب سنتی و گیاهان دارویی را دو چندان کرده است. از جمله گیاهانی که در طب سنتی و نوین مورد توجه قرار گرفته است، گیاه خرفه با نام علمی *Portulaca oleracea* می‌باشد. هدف از این مطالعه مقایسه اثر گیاه خرفه و داروی لتروزول در مهار آنزیم آروماتاز و سطوح استروئیدهای جنسی و تکوین اووسیت در ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال است. بدین منظور تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال با میانگین وزنی ۱±۳ گرم در ۸ تیمار با گروه‌های کنترل شامل کنترل ۱ (دست نخورده) و کنترل ۲ (تزریق با نرمال سالین) و تیمارهای دریافت کننده دوزهای ۱، ۰/۵، ۰/۱ میلی‌گرم برکیلوگرم از داروی لتروزول و ۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم از عصاره هیدروالکلی خرفه تقسیم شدند. همه تزریق‌ها در ۱۰ نوبت و به صورت یک روز در میان به مدت ۲۰ روز و به صورت تزریق به مقدار ۰/۰۲ میلی‌لیتر بین عضله باله پشتی و خط جانبی انجام گرفت. در پایان پس از بیهوش نمودن ماهیان، ساختار بافت شناسی تخمدان و هورمون‌های جنسی در گروه‌های تیمار و کنترل بررسی شد. نتایج آماری نشان داد بین سطوح سطح هورمون‌های جنسی در میان گروه‌های کنترل و تیمار اختلاف معناداری وجود داشت. همچنین اثر مهاری عصاره گیاه خرفه و داروی لتروزول را در بلوغ تخمک و سطوح استروئیدهای جنسی به صورت کاهش ۱۷β-استرادیول و افزایش تستوسترون در ماهی ماده نابالغ گورامی سه خال از خود نشان داد. بررسی یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره گیاه خرفه و لتروزول اثر وابسته به دوزی در کاهش بلوغ تخمک دارند.

کلمات کلیدی: گیاه خرفه، لتروزول، ماهی گورامی سه خال، هورمون‌های جنسی، بافت تخمدان.

۱. مقدمه

امروزه در پی گسترش بیماری‌ها استفاده از داروهای شیمیایی نیز افزایش یافته است، اما به علت عواملی مانند عدم رضایت بیماران از مصرف این داروها، بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف طولانی مدت و بیش از حد آن ها، وجود تحمل دارویی و ناکارآمدی آن‌ها با گذشت زمان، همچنین هزینه‌های تحمیلی بر بیماران، تمایل به درمان‌های جایگزین و سنتی بیشتر شده است. مصرف گیاهان دارویی علاوه بر کاهش هزینه‌های درمان در بسیاری جوامع رضایت بخش بوده است. خرفه گیاهی گلدار، علفی یکساله گوشتی است که از مقاوت خوبی به خشکی برخوردار است و دارای اثرات آنتی استروژنیک و آنتی آروماتازی است و می‌تواند غلظت استرادیول را کاهش دهد[۱]. لتروزول یک مهارکننده آروماتاز است که از تبدیل آندروژن‌ها به استرادیول جلوگیری می‌کند. می‌تواند سطح هورمون استروژن را در زنان یائسه کاهش داده و از رشد نوع خاصی از تومورهای پستان که نیاز به استروژن دارند پیشگیری کند. از لتروزول علاوه بر درمان سرطان سینه در مواردی برای درمان ناباروری هم استفاده می‌شود. در تمامی مهره‌داران از جمله ماهی‌ها محور هیپوفیز- هیپوتالاموس- گناد نقش مهمی را در تولید مثل ایفا می‌کند و با تأثیر در سطوح مختلف این محور می‌توان تخمک گذاری را تحت تأثیر قرار داد[۲]. ماهی گورامی سه خال از خانواده لابیرنت دار (Anabantidae) بوده که به علت شباهت بالای محور هیپوفیز- هیپوتالاموس- گناد به انسان، به عنوان یک مدل ایده آل در مطالعات تولیدمثلی استفاده می‌شود[۳].

۲.تئوری و پیشینه تحقیق

هورمون‌های گنادوتروپینی با تأثیر بر غدد جنسی، نقش بسزایی در کنترل روند سنتز هورمون‌های استروئیدی ایفا می‌کنند پس خوردهای مثبت و منفی استروئیدهای جنسی بر محور تولیدمثلی نیز در کنترل سنتز و ترشح هورمون‌های گنادوتروپینی موثر است. استروژن‌های سنتز شده در لایه‌های فولیکولی تخمدان ماهیان ماده، نقش مهمی در تنظیم سنتز زرده ایفا می‌کنند. β۱۷-استرادیول کنترل کننده زرده‌زایی در مراحل اول رسیدگی جنسی است. سلول‌های تکای فولیکولی در مرحله جذب زرده قادر به سنتز آندروژن‌های قابل آروماتیزه شدن به استروژن‌ها هستند. مهمترین آندروژن در ماهی‌های ماده، تستوسترون است که پس از آروماتیزه شدن به β۱۷-استرادیول تبدیل می‌شود. پروژسترون‌ها نقش مهمی در بلوغ نهایی تخمدان در ماهی‌ها دارند. تأثیر گنادوتروپین‌ها بر روی بلوغ نهایی اووسیت از طریق سنتز و ترشح استروئیدهایی نظیر α۱۷-هیدروکسی، β۲۰-دی هیدروکسی پروژسترون و α۱۷-هیدروکسی پروژسترون کنترل می‌شود. تأثیر هورمون GTH II یا LH بر روی سلول‌های تکای فولیکولی سبب سنتز α۱۷-هیدروکسی پروژسترون می‌شود که تحت تأثیر آنزیم β۲۰-دی هیدروکسی استروییید دهیدروژناز در سلول‌های گرانولوزا به α۱۷-هیدروکسی β۲۰-دی هیدروکسی پروژسترون تبدیل می‌شود. استروئیدهای جنسی می‌تواند از طریق فیدبک‌های مثبت و منفی، آزادسازی گنادوتروپین‌ها را کنترل کند. در مراحل اول زرده‌زدایی سطح استرادیول و هورمون‌های گنادوتروپین نسبتا پایین است. با افزایش سطح GTH I سطح استرادیول افزایش می‌یابد. با کاهش سطح β۱۷-استرادیول در مراحل نهایی زرده‌زدایی سطح تستوسترون ممکن است به دلیل کاهش فعالیت آروماتازی افزایش می‌یابد. در چنین شرایطی کاهش β۱۷-استرادیول به صورت فیدبک منفی بر روی هیپوتالاموس و هیپوفیز تأثیر می‌گذارد. در نتیجه سنتز GnRH و متعاقب آن GTH II افزایش می‌یابد، سنتز و ترشح 20b-HSDH به طور تصاعدی افزایش می‌یابد و با توقف کامل فعالیت آروماتیزی، سطح تستوسترون نیز کاهش می‌یابد. با کاهش فعالیت آنزیم C17C20 lyase سطح α۱۷-هیدروکسی پروژسترون همزمان با تولید α۱۷-هیدروکسی، β۲۰-دی‌هیدروکسی پروژسترون نیز افزایش می‌یابد. این کاهش به صورت یک فیدبک منفی و از طریق افزایش توان مهاری دوپامین و کاهش سطح تولید GABA سبب کاهش سطح آزادسازی و عملکرد GnRH می‌شود. وجود گیرنده‌های آندروژنی با استروژنی در سطح هیپوفیز و

هیپوتالاموس نقش به سزایی در تنظیم عملکرد فیدبک‌های مثبت و منفی استروئیدهای جنسی در فعالیت تنظیم هورمونی در طی چرخه تولید مثلی دارد. با توجه به شناسایی گیرنده‌های استروژنی بر نورون‌های تولیدکننده دوپامین در برخی از ماهی‌ها چنین به نظر می‌رسد که پس‌خورد منفی استروئیدهای جنسی، اعم از استروژن‌ها با آندروژن‌های قابل آرومانیزه شدن بر کاهش ترشح گنادوتروپین‌ها به ویژه GTH II (LH) به طور مستقیم از طریق اتصال آن‌ها به گیرنده‌های استروژنی در نورون‌های محرک دوپامین در مغز ماهی‌ها تنظیم می‌شود. با این وجود نقش اصلی هیپوفیز در کنترل پس‌خوردهای استروئیدهای غدد جنسی در ماهی‌ها را نباید نادیده گرفت. امروزه، تحقیقات وسیع و گسترده‌ای در جهت کشف و مطالعه عوامل ضدبارداری با منشاء گیاهی انجام می‌گیرد. در مطالعه حسینی و همکاران، تأثیرات احتمالی عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه بر هورمون‌های گنادوتروپین، استرادیول، پروژسترون و پرولاکتین، بیانگر تأثیر وابسته به دوز عصاره گیاه خرفه در کاهش وزن بدن، طی مدت ۲۱ روز بود. همچنین این گیاه با دارا بودن ترکیبات آنتی استروژنیک و آنتی آروماتازی، غلظت استرادیول را در دوز بالا کاهش داد. بنابراین مصرف طولانی مدت آن می‌تواند باعث اختلالات هورمونی و کاهش قدرت باروری شود[۴]. در یک مطالعه دیگر با بررسی تأثیر گیاه خرفه بر میزان بارداری رت‌های ماده مشخص گردید عصاره اتانولی گیاه سبب کاهش۴۰-۵۰ درصدی لانه گزینی می‌شود که در نتیجه سقط جنین را در پی دارد. به نظر می‌رسد فعالیت استروژنیک گیاه خرفه می‌تواند با برهم زدن تعادل نسبت پروژسترون و استروژن باعث کاهش لانه‌گزینی و سقط جنین شود. همچنین این گیاه قادر است بیفنول A را که به عنوان یک ترکیب استروژنیک مختل کننده آندوکرین عمل می‌کند به سرعت از آب برداشت کند[۵]. گیاه خرفه دارای مواد بیولوژیکی فعالی مانند نورآدرنالین، ملاتونین و دوپامین است. ملاتونین یکی از مولکول‌های فعال و منحصر به فردی است که در عصاره گیاه خرفه به فراوانی باعث می‌شود و بخشی از خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره خرفه نیز به‌واسطه وجود این ماده است[۶]. عصاره گیاه خرفه حاوی ایزوفلاون‌ها و بیوفلاونوئید می‌باشد. ایزوفلاون‌ها آگونیست‌های بسیار ضعیف استروژن بوده که به گیرنده استروژن با تمایل کمتر از استرادیول باند می‌شوند. در مواقعی که میزان استرادیول در بدن برای رقابت در اتصال به گیرنده کاهش می‌یابد، خواص آگونیستی آن بیشتر می‌شود. از طرف دیگر خواص ضد استروژنی آن‌ها به غلظت‌های نسبی فیتواستروژن‌ها و استروژن داخلی بستگی داشته و زمانی که استروژن داخلی افزایش می‌یابد، فیتواستروژن‌ها استرادیول را از گیرنده‌اش جدا می‌کنند[۸]. یکی از ترکیبات ایزوفلاون‌ها، ژنیستئین است که می‌تواند باعث جابجایی باند شدن استروژن از پروتئین باندکننده استروئید جنسی انسانی شود. بنابراین، ژنیستئین بر روی میزان کلیرانس استروژن‌ها، همچنین در دسترس بودن هورمون‌ها در سلول‌های هدف تأثیرگذار است. از سوی دیگر، فلاونوئیدهای Quercetin و Kaempferol در هردو گیرنده آلفا و بتای استروژن در دوز حداکثر، اثرات ضداستروژنی دارند و در دوز حداقل، این دو ترکیب اثرات استروژنی ضعیفی از خود نشان می‌دهند. فلاونوئید Apigenin نیز در دوز حداکثر با تاثیر بر گیرنده استروژنی آلفا اثرات ضد استروژنی از خود نشان می‌دهد[۹]. همچنین کومارین‌های موجود در گیاه خرفه، فعالیت ضدآروماتازی از خود نشان می‌دهند که می‌تواند باعث کاهش سطح استروژن گردد[۱۰]. مطالعات نشان می‌دهد فیتواستروژن‌هایی مانند جنیستئین قادرند سطح پلاسمایی پرولاکتین را افزایش دهند. این افزایش می‌تواند ناشی از اثرات استروژنیک جنیستئین در هیپوتالاموس و هیپوفیز بوده که منجر به سنتز پرولاکتین از هیپوفیز قدامی می‌شود[۱۱]. به علاوه مطالعات اخیر نشان داده است بعد از تیمار با ملاتونین، دوپامین استریاتوم نیز کاهش می‌یابد[۱۲]. آروماتاز، آنزیمی است که در شبکه آندوپلاسمی قرار دارد و تبدیل تستوسترون به استرادیول‌های آروماتیک را کاتالیز می‌کند. مهارکننده‌های آروماتاز در درمان بیماری برای بیماران مبتلا به سرطان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. گزارش‌های موجود بر حجم مدارک پشتیبانی از مصرف این داروها افزوده است. استروژن‌ها پس از تولید توسط آندروژن‌ها به واسطه حضور آنزیم آروماتاز به گیرنده استروژن متصل می‌شوند و آن را ملزم به تقسیم سلول می‌کنند. و مهارکننده‌های آروماتاز در یک اتصال رقابتی مانع تولید استروژن

می‌شوند که در درمان هورمونی سرطان سینه بسیار کاربرد دارد. از جمله این مهارکننده‌ها لتروزول با نام تجاری فمارا می‌باشد. داروی لتروزول یک مهارکننده آروماتاز است که از تبدیل آندروژن‌ها به استرادیول جلوگیری می‌کند و از دسته داروهای هورمونی است. که حدود ۹۸ درصد از استروژن موجود در بدن را کاهش می‌دهد و موجب افزایش میزان ترشح LH و FSH می‌شود که همین امر به خودی خود منجر به افزایش تولید تستوسترون در بدن میشود که در درمان سرطان متاستاتیک پستان در زنان یائسه کاربرد بسیار دارد[۱۳]. سیستم کنترل غدد درون‌ریز تولید مثل در ماهیان استخوانی بر اساس محور هیپوتالاموس هیپوفیز گناد است که هیپوتالاموس باعث ترشح GnRH از هیپوفیز می‌شود و باعث ترشح استروژن از تخمدان‌ها و تولید اووسیت می‌شود. استفاده از داروی لتروزول منجر به دگرانولوسیون اووسیت‌ها در ماهیان شده و مانع از تکامل و رشد تخمدان‌ها و اووسیت‌ها می‌شود که باعث ناباروری تخمدان‌ها در ماهیان ماده بالغ و عدم تکامل بلوغ در ماهیان نابالغ میشود. کاربرد هورمون‌ها امروزه به عنوان ابزاری در جهت تکثیر و پرورش آبزیان به کار گرفته شده است. لذا کسب دانش در خصوص نوسانات طبیعی هورمون‌های مؤثر در روند تولید مثلی در محیط-های طبیعی زمینه فراهم آوردن اطلاعات اولیه در رابطه با استفاده از استروژن‌های اگزوژن مثل فیتواستروژن‌ها می‌باشد[۱۴]. لتروزول درمان هورمونی سرطان سینه متاستاتیک (پیشرفته) وابسته به هورمون در خانم‌های یائسه کاربرد دارد. این دارو همچنین در خانم-هایی که قبلا از سایر داروهای ضد سرطان از جمله تاموکسیفن استفاده می‌کردند نیز تجویز می‌شود. همچنین در درمان ناباروری با القاء تخمک گذاری و درمان سرطان اپیتلیال تخمدان کاربرد دارد. دارو به صورت کامل و سریعا از دستگاه گوارش جذب می‌شود. فراهم زیستی لتروزول ۹۹/۹ درصد است و تأثیر غذا بر جذب آن ناچیز است. توزیع دارو وسیع و سریع است. این دارو در حدود ۶۰ درصد به پروتئین‌های پلاسما متصل می‌شود. دفع آن عمدتاً ادراری بوده و نیمه عمر دفعی دارو حدود ۲ روز است. فرمول شیمیایی لتروزول $C_{17}H_{11}N_5$ می‌باشد. مکانیزم عملکرد لتروزول به این صورت است که در یک اتصال رقابتی به هم در سیتوکروم p450 مانع فعالیت آروماتاز و تولید استروژن می‌شود که این عمل بسیار اختصاصی است و تولید مینرال‌ها و کورتیکواستروئیدها تغییری ایجاد نمی‌کند. با توجه به یافته‌ها به نظر می‌رسد القاء تخمک گذاری با لتروزول در بیماران مقاوم به کلومیفن سیترات با میزان قابل توجهی از تخمک‌گذاری و بارداری همراه است. با توجه به کاهش احتمال چندقلوزایی و تحریک بیش از حد تخمدان در درمان با لتروزول، این دارو می‌تواند خط اول درمان در بیماران مقاوم به کلومیفن باشد[۱۵]. در این تحقیق تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه و مقایسه آن با داروی لتروزول که یک مهارکننده آنزیم آروماتاز می‌باشد بر سطوح استروییدهای جنسی و نیز تأثیر آن در ماهی گورامی سه خال ماده نابالغ بررسی خواهد شد. با توجه به ترکیبات موجود در گیاه خرفه تأثیرات آن بر تخمدان و محور هیپوفیز گناد و مهارکننده آروماتاز می‌تواند حائز اهمیت باشد و می‌توان راهکارهای مناسبی را جهت استفاده از این گیاه بجای داروی شیمیایی لتروزول در درمان سرطان متاستاتیک سینه در زنان یائسه در اختیار مراکز اندوکرینی و تولیدی قرار داد.

۳.مواد و روش‌ها

روش آماده سازی آکواریوم‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه Fish lab دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی صورت پذیرفت. ابتدا آکواریوم ها با کاغذ سمباده و نمک در آب شهری کاملاً شستشو داده شده اند و با آب شهری پر شدند. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی گورامی سه خال خریداری شد. ۲۴ ساعت پیش از وارد کردن ماهیان آکواریوم ها از آب شهری پر شدند و فیلتر در آکواریوم‌ها قرار گرفت. هدف از این کار کلرزدایی از آب شهری و بالابردن سطح اکسیژن موجود در آن و به‌طورکلی سازگاری خصوصیات آب، با دما و شرایط آزمایشگاه بود. پس از این کار ماهی‌ها به صورت رندوم در آکواریوم قرار داده شدند و به آن‌ها ۴۸ ساعت مهلت داده شد تا با محیط سازگار شوند. پس از انجام عملیات بیومتری تمام ماهیان (اندازه گیری طول ماهی و وزن با در ۸ گروه مجزا شامل: کنترل ۱ (دست نخورده) و کنترل ۲ (تزریق

با نرمال سالین) و ۳ گروه تیمار (گیاه خرفه) و ۳ گروه تیمار با (لتروزول)، هر گروه شامل ۱۵ قطعه ماهی در آکواریوم‌ها رهاسازی شده‌اند. فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل دما، سختی و pH پیش از آزمایش در طول دوره و پس از پایان کار اندازه‌گیری شدند. برای تمامی آکواریوم‌ها هر ۲۴ ساعت یک بار بررسی از لحاظ وضعیت سلامت ماهیان، دمای آب و pH محیط صورت می‌گرفت. ماهیان به صورت یک روز در میان به میزان کافی از غذای استاندارد ماهی گورامی تغذیه شده و همچنین فیلترهای آب آکواریوم‌ها یک روز در میان تمیز می‌شدند.

روش آماده سازی عصاره گیاه تازه و جوان خرفه

گیاه خرفه از مزارع استان سمنان جمع‌آوری شد. سپس به میزان کافی از قسمت های هوایی گیاه شامل ساقه و برگ پس از پاک شدن، در سایه خشک شد و توسط آسیاب برقی پودر گردید. به ازای هر صد گرم پودر یک لیتر آب و اتانول به نسبت ۳ به ۷ به ترتیب اضافه گردید و مخلوط به مدت ۷۲ ساعت خیس خورد. به منظور استفاده از روش خیساندن، قیف دکانتور ابتدا با آتانول ۹۶ درجه (حلال مورد استفاده تهیه شده از شرکت MERC) شستشو داده شد و سپس یک تکه پنبه کوچک را با چند قطره آب مقطر نمناک نموده و توسط یک میله شیشه‌ای به انتهای دکانتور هدایت شد. در مرحله بعد پودر گیاه به همراه آب و اتانول ۹۸ درصد درون دکانتور ریخته شده و به مدت ۷۲ ساعت، بی حرکت قرار داده شد.

روش آماده سازی داروی لتروزول

مقدار ۲ گرم از پودر داروی لتروزول خالص از شرکت دارویی توفیق دارو خریداری شد. پس از محاسبه وزن ماهیان و محاسبه دوز تیمارها بر حسب میلی‌گرم بر کیلوگرم، مقادیر دوز مورد نظر در هر تیمار با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شد سپس پودر وزن شده جهت هر تیمار، در ۲ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درجه به عنوان حلال حل شده و پس از تهیه در دوزهای (۱ mg/kg، ۰/۵ و ۰/۱) در بالن ژوژه ۵ میلی لیتری به حجم رسانیده شد. در نهایت محلول آماده تزریق تیمارها در ظروف شیشه‌ای کوچک درب بسته و تیره رنگ (جهت جلوگیری از نور خورشید و از بین رفتن مواد مؤثره) جهت تزریق نگهداری شد.

روش بیهوش کردن، تزریق و تشریح ماهیان

ابتدا به میزان ۵۰ گرم از گل میخک خشک شده خریداری و توسط آسیاب برقی پودر شد. سپس میزان تقریبی ۱ گرم از آن در بشر ۱ لیتری که با آب مقطر پر شده بود ریخته و با همزن شیشه‌ای ترکیب شد. پس از گذشت چند دقیقه محلول طی چند مرحله از کاغذ صافی عبور داده شد. به این ترتیب تمامی ترکیب صاف شده در بطری‌های پلاستیکی ۰/۵ لیتری و در بسته نگهداری شد. سپس برای هربار تزریق، به میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر از ترکیب حاصل را درون بشر ریخته و به میزان ۴۰۰ میلی‌لیتر آب شهری به آن جهت تزریق عصاره اضافه گردید. در مرحله بعد هر ماهی به مدت تقریبی ۴۰-۳۰ ثانیه درون این محلول قرار گرفته تا به طور نسبی تعادل و هوشیاری خود را از دست دهد. به دنبال این مرحله تزریق انجام گرفت. برای دریافت دارو، تزریق از روش درون عضلانی (IM) صورت گرفت. در ابتدا دارو از تیمارهای مورد نظر به وسیله سرنگ انسولین BD با حجم (۰/۵سی‌سی) برداشته شد و ۰/۰۲ سی‌سی پس از قرار دادن پنبه مرطوب بر روی آبشش های ماهی و مهار نمودن سر و دم به آرامی، دارو بین باله پشتی و خط جانبی درون عضله با زاویه سی درجه تزریق گردید. الکل ۷۰ درجه از پیش تهیه شده، توسط پنبه استریل، قبل و بعد از تزریق به ناحیه فوق الذکر آغشته شد. پس از تزریق، ماهیان در آبی که از روز قبل کلرزدایی و تعادل با دمای اتاق در آن صورت گرفته بود قرار داده شدند. سپس توسط شیلنگ اکسیژن عملیات احیا صورت گرفته و همه ماهیان به آکواریوم منتقل شدند. هرکدام از گروه‌های تیمار و کنترل، به مدت ۲۰ روز و به صورت یک روز در میان در ۱۰ نوبت مورد تزریق قرار گرفتند. پس از پایان دوره به مدت ۲۴ ساعت هیچ فعالیتی بر روی ماهیان صورت نگرفت و پس از آن تشریح ماهیان آغاز شد. در پایان روز بیستم، پس از بیهوش نمودن ماهیان با

عصاره گل میخک، شاخص‌های بیومتری تعداد ۱۲ قطعه از هر تیمار (اندازه‌گیری طول با استفاده از خط کش و وزن ماهی با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم) انجام شد. سپس ماهیان روی سینی تشریح از ناحیه سر و دم ثابت شده و به وسیله قیچی از سمت دهان به طرف شکم در امتداد خط میانی برش طولی تا زیر سر پوش آبششی ایجاد شد. سپس دو برش عرضی یکی در ابتدا در مجاورت سر، و دیگری در امتداد برش تا بالای خط جانبی بر خط اول عمود کرده و بعد دو برش عرضی در بالای خط جانبی به هم وصل شدند. سپس با احتیاط بخش برآمده با قیچی جدا شده و اندام‌های داخلی تخلیه و تخمدان‌ها جدا گردیدند. پس از جدا نمودن ترشحات از اطراف تخمدان، هرکدام جداگانه با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۱) وزن و تعدادی از هر تیمار جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری انتخاب شدند. به منظور آماده‌سازی نیز در محلول فرمالین ۱۰ درصد که از پیش تعیین شده بود قرار داده شدند. همچنین جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی، تعدادی از تخمدان‌ها در محلول گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد قرار داده شد. در نهایت جهت تعیین مقادیر مجهول هورمونی ۵۰µL از محلول آماده شده با دستگاه الایزا در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرار داده شد و خوانش مقادیر هورمونی صورت گرفت. در پایان داده‌های حاصل از میزان هورمون‌های جنسی، از طریق نرم افزار SPSS (ورژن ۲۳) آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن (جهت مقایسه میان گروه‌ها) در سطح معناداری ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفتند. جهت رسم نمودارها نیز نرم افزار EXCEL 2013 مورد استفاده قرار گرفت.

مراحل تهیه مقاطع بافتی جهت میکروسکوپ نوری

جهت بررسی سلول بافت از روش‌های متعددی می‌توان استفاده نمود از جمله: روش تجزیه، روش تهیه گسترده، تهیه قطعات ضخیم (که در مواردی که فوریتی در کار باشد از آن استفاده می‌گردد)، روش رنگ آمیزی حیاتی که رنگ در داخل سلول قابل مشاهده است و روش‌های برش بافتی، که بهترین روش است در این روش بافت را در محیط مخصوص قرار می‌دهند که هم بریدن بافت آسان گردد و هم اندکس انکساری بافت را بالا ببرد. متد پارافین شایع‌ترین است ولی سلوئیدین و ژلالینی هم مورد استفاده قرار می‌گیرد. لام‌های تهیه شده پس از ۷۲ ساعت کاملاً خشک شده و سپس زیر میکروسکوپ نوری مدل (NIKON) با بزرگ نمایی ۴۰ مورد مطالعه قرار گرفتند[۱۶].

مراحل تهیه گرید میکروسکوپ الکترونی

ابتدا نمونه‌های تخمدان با استفاده از پنس و اسکالپل جدا گردید و در زیر هود در محلولی از گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد از ابعاد کوچکتر از ۰/۵ برش زده شد. سپس مراحل زیر جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی بر روی هر یک از نمونه‌ها صورت گرفت. پس از آماده شدن گرید نمونه‌های تخمدان جهت رنگ آمیزی برای بالا بردن کنتراست، هرکدام را جداگانه در چاهک‌های مخصوص اورانیل استات به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق غوطه ور کرده و سپس آن‌ها را با پنس گرفته و با آب مقطر شستشو داده شدند در انتها نیز گریدها با میکروسکوپ الکترونی مدل EM208S PHILIPS با ولتاژ ۷۰ کیلو ولت و با مش مسی ۲۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند[۱۷].

تعیین شاخص گنادوسوماتیک

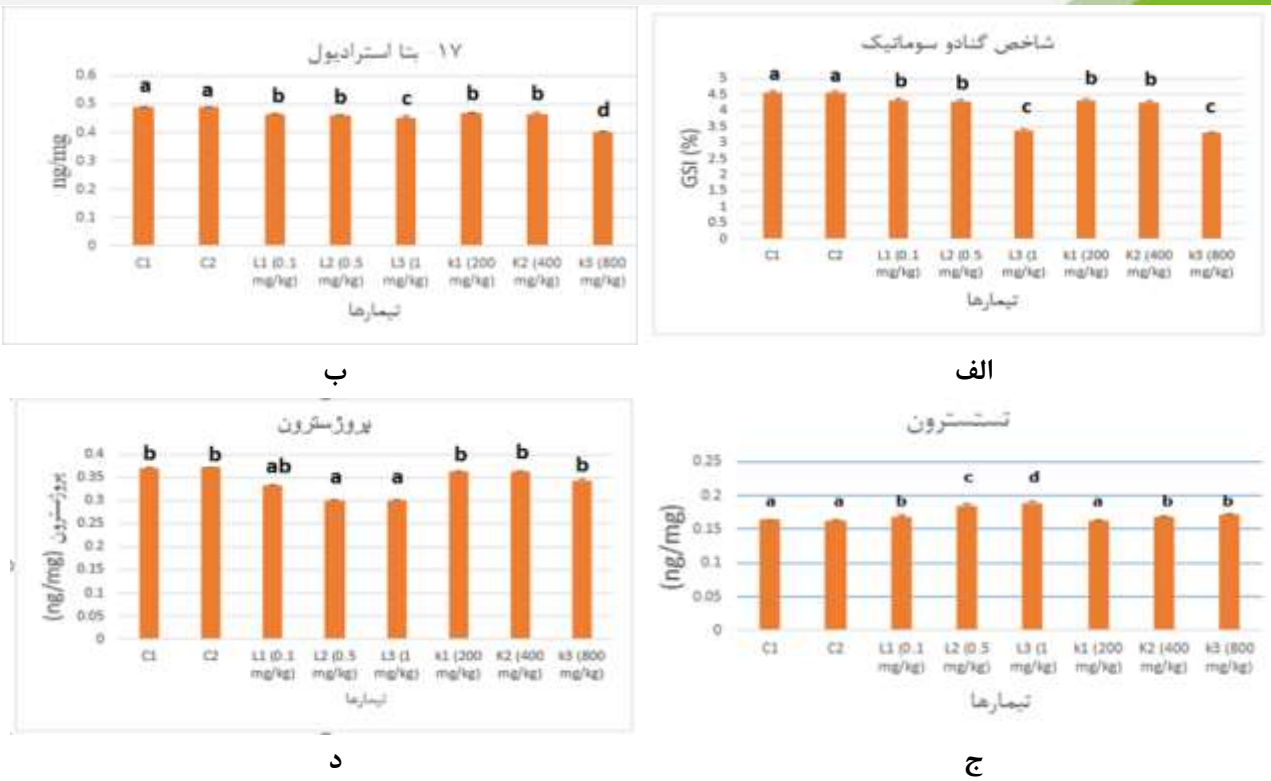
شاخص گنادوسوماتیک به طور وسیعی به عنوان ابزاری ساده در اندازه‌گیری ظرفیت تولید مثل به کار برده می‌شود. این شاخص با معادله نسبت وزن گناد ماهی به وزن بدن ماهی به دست می‌آید که در آن Wg وزن گناد (گرم) و W وزن بدن ماهی (گرم) است[۱۸].

$$GSI = \frac{WG}{W} * 100$$

۴. نتایج

هورمون‌های جنسی

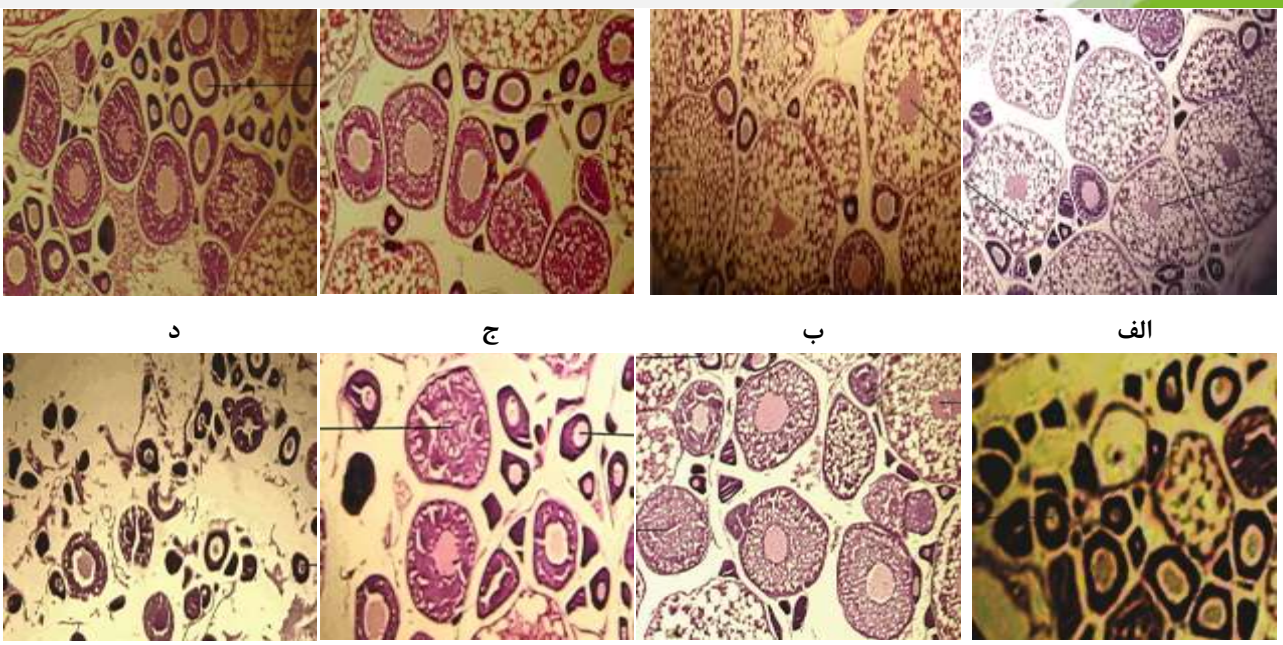
نتایج حاصل از شاخص گنادوسوماتیک حاکی از وجود اختلاف معنادار میان گروه‌های تیمار و کنترل بود($P\leq ۰/۰۵$). در گروه کنترل میان کنترل ۱ (دست نخورده) و کنترل ۲ (تزریق با نرمال سالین) اختلاف معناداری از لحاظ شاخص وجود نداشت($P\geq ۰/۰۵$). نتایج حاصل در تیمار لتروزول بیانگر کاهش شاخص بود و در بالاترین دوز کاهش شاخص بیشتر مشاهده شد و اختلاف معنادار با دوزهای ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم برکیلوگرم نشان داد($P\leq ۰/۰۵$). نتایج حاصل از تیمار خرفه در مقایسه با گروه کنترل بیانگر کاهش شاخص و اختلاف معنادار بود. مقایسه نتایج میان تیمارهای خرفه و لتروزول در بالاترین دوز بیانگر اختلاف معنادار بود($P\leq ۰/۰۵$). در این مطالعه سطح هورمون‌های جنسی جهت بررسی میزان تکامل مورد ارزیابی قرار گرفت. نمودارهای مربوط به این مقادیر هورمونی در ادامه آمده است. نتایج حاصل از سطح هورمون ۱۷β–استرادیول در میان گروه‌های کنترل و تیمار بیانگر وجود اختلافی معنادار بود($P\leq ۰/۰۵$). در گروه کنترل میان کنترل دست نخورده و نرمال سالین اختلاف معنادار وجود نداشت($P\geq ۰/۰۵$). در گروه تیمار با لتروزول با دوز ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم اختلاف معنادار با گروه کنترل وجود داشت($P\leq ۰/۰۵$). در تیمار لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم برکیلوگرم اختلاف معنادار با گروه کنترل و گروه های قبل وجود داشت($P\leq ۰/۰۵$). در تیمار با خرفه در دوز ۸۰۰ میلی گرم برکیلوگرم مقایسه با گروه کنترل اختلاف معناداری وجود داشت. در تیمار خرفه با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم اختلاف معنادار با گروه شاهد وجود داشت و در دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم نیز اختلاف معناداری با گروه‌های قبلی دیده شد($P\leq ۰/۰۵$). نتایج حاصل از تستسترون در گروه‌های کنترل و خرفه با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم اختلاف معنادار نشان نداد($P\geq ۰/۰۵$). ولی در سایر تیمارها اختلاف معنادار با گروه کنترل مشاهده شد($P\leq ۰/۰۵$). میان گروه‌های کنترل دست نخورده و تزریق نرمال سالین اختلاف معناداری رؤیت نشد($P\geq ۰/۰۵$). در مقایسه میان گروه کنترل و تیمار با لتروزول اختلاف معنادار مشاهده شد($P\leq ۰/۰۵$). در مقایسه میان تیمار لتروزول و خرفه بیانگر آن بود که نسبت به گروه کنترل، تیمار با لتروزول سطح هورمون تستوسترون را به طور محسوس‌تری تحت تأثیر قرار می‌دهد. نتایج حاصل از هورمون پروژسترون نشانگر وجود اختلاف معنادار میان گروه‌های کنترل و تیمار نبود($P\geq ۰/۰۵$).



نمودار ۱: الف: نمودار شاخص گنادوسوماتیک. ب: نمودار هورمون β۱۷-استرادیول. ج: نمودار هورمون تستسترون. د: نمودار هورمون پروژسترون (حروف مشابه به معنای عدم وجود اختلاف در سطح معناداری ۰/۰۵ می باشد).

بافت شناسی تخمدان با میکروسکوپ نوری

مراحل تکامل تخمک را می‌توان در ۶ مرحله طبقه‌بندی نمود. ۱- اووگونی ۲- اووسیت اولیه با هستک کروماتینی ۳- پیش‌هستکی اولیه ۴- کورتیکال آلوئولار ۵- ویتلوژنز ۶- بلوغ نهایی. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که گروه کنترل (شاهد) اغلب اووسیت ها در مرحله ویتلوژنز (زردەزایی) به سر می‌بردند. شروع حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری نشان داده شده است. درگروه کنترل (نرمال سالین) هم همانند گروه کنترل دست‌نخورده اغلب اووسیت‌ها در مرحله ویتلوژنز به سر می‌بردند. شروع حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری نشان داده شده است و اتصال ذرات چربی به یکدیگر در اووپلاست قابل مشاهده است. نتایج حاصل از تصاویر تیمار لتروزول در این مطالعه نشان داد که تعداد سلول‌ها در مرحله پیش‌هستکی، به‌طورکلی نسبت به گروه کنترل افزایش یافته و سلول‌های بالغ کمتری به چشم می‌خوردند. در تیمار با دوز ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعدادی اووسیت در مرحله کورتیکال و تعدادی در مرحله پیش‌هستکی مشاهده شد. در تیمار با دوز ۰/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم غالب اووسیت‌ها در مرحله پیش‌هستکی می‌باشند. در تیمار لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم برکیلوگرم، تعداد اووسیت‌ها در مرحله پیش‌هستکی افزایش یافت و در این مرحله نیز تعدادی سلول در مرحله کورتیکال و تعدادی در مرحله پیش‌هستکی قرار داشتند. نتایج حاصل از تیمار خرفه با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم نشان داد که علی‌رغم حضور سلول‌هایی در مرحله کورتیکال و ویتلوژنز، به‌طورکلی تعداد سلول‌های بالغ کمتری نسبت به گروه کنترل به چشم می‌خورد. در تیمار خرفه با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم غالباً در مرحله پیش‌هستکی و تعدادی در مرحله کورتیکال قرار داشتند. در تیمار با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم، تقریباً تمامی اووسیت‌ها در مرحله پیش‌هستکی بودند و تعداد آن‌ها نسبت به دوزهای پایین-تر و گروه کنترل، افزایش یافت.



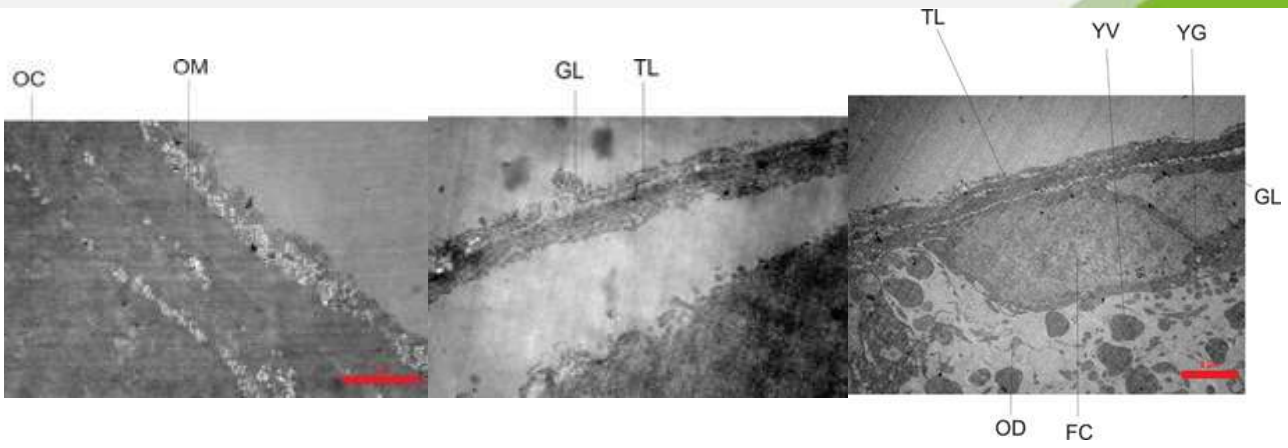
الف ب ج د

ه و ل م

شکل ۱. بافت هیستولوژیکی تخمدان ماهی گورامی سه خال. الف: مقطعی از بافت تخمدان ماهی کنترل دست نخورده، مرحله غالب ویتلوژنز(V)، **شروع حرکت وزیکول زایا** (Germinal Vesicle) GV **به سمت قطب جانوری اتصال ذرات چربی به یکدیگر در اووپلاست** LDF(Lipid Droplet Fussion). **ب: مقطعی از بافت تخمدان ماهی کنترل نرمال سالین، مرحله غالب ویتلوژنز**(V)، **شروع حرکت وزیکول زایا** (GV) **به سمت قطب جانوری اتصال ذرات چربی به یکدیگر در اووپلاست** (LDF)، **ج: مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار لتروزول با دوز ۰/۱ میلی گرم بر کیلو گرم، حضور اووسیت ها در مرحله کورتیکال آلوئولار** (Cortical Alveolar) CA **و پیش هستکی** (Prenucleus) Pn. **د: مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار لتروزول با دوز ۰/۵ میلی گرم بر کیلو گرم حضور اووسیت ها در مرحله پیش هستکی** (Prenucleus) Pn. **ه: مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار لتروزول با دوز ۱ میلی گرم بر کیلو گرم فاز غالب اووسیت ها مرحله پیش هستکی** (Prenucleus) Pn . **و: مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار خرفه با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم، حضور اووسیت ها در مرحله کورتیکال** (Cortical Alveolar) CA **و پیش هستک ها** (Prenucleus) Pn. **ل: مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار خرفه با دوز ۴۰۰میلی گرم بر کیلو گرم، حضور اووسیت ها در مرحله پیش هستکی** (Prenucleus) Pn **و کورتیکال** CA (Cortical Alveolar). **م: مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار خرفه با دوز ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، فاز غالب اووسیت ها پیش هستکی** Pn (Prenucleus) (H&E) **با بزرگ نمایی**400×.

بافت شناسی تخمدان با میکروسکوپ الکترونی

در تخمدان شاهد از یک روند نرمال در غشاء سلولی برخوردار است. اووسیت در حال رشد است. ذرات زرده‌ای به درون نفوذ کرده‌اند. ذرات زرده‌ای ریز تجمع پیدا کرده‌اند و ذرات زرده‌ای درشت را به‌وجود آورده‌اند. برخی سلول‌های تکا در غشاء دیده می‌شوند(سلول-های فولیکولی). ذرات چربی هم درون سلول مشاهده می‌شوند. در خرفه در دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم قطر غشاء نسبت به گروه کنترل کمتر شده و اووسیت آن با محدودیت رشد مواجه است. غشاء سلولی به گستردگی شاهد نیست و تکامل پیدا نکرده است ورود ذرات زرده‌ای به درون اووسیت مشاهده می‌شود. اما میزان جریان نفوذ ذرات زرده‌ای به درون اووسیت کاهش پیدا کرده است. در حالیکه لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم برکیلوگرم غشاء اووسیت در جذب و به درون آوردن ذرات زرده‌ای فعال نیست. اووسیت دارای سیتوپلاسم کاملاً فشرده‌ای است. شبکه آندوپلاسمیک داخل اووسیت مشاهده شد ولی وزیکول‌های زرده‌ای مشاهده نشد و غشاء اووسیت در مرحله اولیه تکوین (پیش‌هستکی) مشاهده می‌شود.



ج ب الف

الف: تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطعی از سلول تخمک در کنترل دست نخورده در این تصویر گرانول‌های زرده YG (Yolk Granules) وزیکول زرده YV (Yolk Vesicle) گرانول چربی OD (Oil Droplet) سلول فولیکولی FC (Follicular cell) لایه‌های زوناراديانا ZE) و گرانولوزا GL) مشخص شده اند (Scale Bar 5 µm). ب: تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطعی از سلول تخمک در تیمار خرفه با دوز ۸۰۰ میلی گرم برکیلوگرم در این تصویر لایه تک(TL)ا و گرانولوزا(GL) مشخص شده‌اند(Scale Bar 5 µm).ج: تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطعی از سلول تخمک در تیمار لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم برکیلوگرم در این تصویر غشاء اووسیت OM (Oocyte Membrane) و سیتوپلاسم اووسیت OC (Oocyte Cytoplasm) مشخص شده است. (Scale Bar 1 µm).

۵. بحث و نتیجه‌گیری

بررسی نتایج شاخص گنادوسوماتیک

GSI به عنوان یکی از شاخص‌های مهم ماکروسکوپی در مطالعات روند تکامل ماهیان استفاده می‌شود. مقایسه آماری گروه‌های کنترل دست نخورده و نرمال سالین اختلاف معناداری از نظر شاخص گنادی نشان نداد. بررسی نتایج حاصل در مقایسه میان گروه-های کنترل و تیمار نشان داد که میان آنان اختلاف معناداری وجود داشت($P\leq ۰/۰۵$). در تیمار لتروزول و خرفه با افزایش دوز کاهش شاخص مشاهده شد. از آنجا که خرفه به دلیل دارا بودن ترکیبات آنتی استروژنیک و آنتی آروماتازی غلظت استرادیول را در دوز بالا کاهش می‌دهد و با توجه به این که استرادیول سبب تحریک سنتز و ترشح ویتلوژنین در کبد و تجمع آن در اووسیت و تسریع در رشد و رسیدگی اووسیت در ماهی می‌شود، در این تحقیق با افزایش دوز عصاره خرفه، غلظت استرادیول کاهش و به تبع آن میزان GSI هم کاهش یافت. مطالعات چاران و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که لتروزول در دوزهای بالا موجب کاهش ۲۰ تا ۲۹ درصد GSI می‌شود. همچنین بیان داشتند که لتروزول در کاهش شاخص گنادوسوماتیک و سطح استرادیول، اثر وابسته به دوز دارد[۱۹].

هورمون۱۷β-استرادیول

در بررسی نتایج حاصل از هورمون ۱۷β-استرادیول میان گروه کنترل دست‌نخورده و نرمال سالین اختلاف معناداری مشاهده نشد($P\geq ۰/۰۵$). میان گروه‌های تیمار و کنترل اختلاف معنادار وجود داشت($P\leq ۰/۰۵$). در بررسی نتایج حاصل از تیمار لتروزول در دوز ۱ میلی‌گرم برکیلوگرم اختلاف معنادار با دوزهای قبل مشاهده شد($P\leq ۰/۰۵$). درتیمار خرفه نیز در دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم اختلاف معنادار با دوزها قبل مشاهده شد($P\leq ۰/۰۵$). داروی لتروزول که یک مهارکننده آروماتاز است با مهار تولید استروژن در زنان مبتلا به سرطان پستان در سنین منوپوز تأیید شده است. در مطالعه حسینی و همکاران در سال ۱۳۹۱ تأثیرات احتمالی عصاره

هیدروالکلی گیاه خرفه بر هورمون‌های گنادوتروپین، استرادیول، پروژسترون و پرولاکتین بیانگر این موضوع است که گیاه با دارا بودن ترکیبات آنتی استروژنیک و آنتی آروماتازی غلظت استرادیول را در دوز بالا کاهش می‌دهد. بنابراین مصرف طولانی مدت آن می‌تواند باعث اختلالات هورمونی و کاهش قدرت باروری شود[۲۰]. در تحقیق دیگری با بررسی تأثیر عصاره گیاه خرفه بر بارداری رت‌های ماده مشخص گردید عصاره اتانولی گیاه سبب کاهش ۵۰-۴۰ درصد لانه گزینی می‌شود که در نتیجه سقط جنین را در پی دارد[۲۱]. به نظر می‌رسد فعالیت استروژنیک گیاه خرفه می‌تواند با برهم زدن تعادل نسبت پروژسترون و استروژن باعث کاهش لانه گزینی و سقط جنین شود. عصاره گیاه خرفه حاوی ایزوفلاون‌ها و بیوفلاونوئید می‌باشد. ایزوفلاون‌ها آگونیست‌های بسیار ضعیف استروژن بوده که به گیرنده استروژن با تمایل کمتر از استرادیول باند می‌گردد. در مواقعی که میزان استرادیول در بدن برای رقابت در اتصال به گیرنده کم است، خواص آگونیستی را بیشتر ارائه می‌نمایند. از طرف دیگر خواص ضد استروژنی آن‌ها به غلظت‌های نسبی فیتواستروژن‌ها و استروژن داخلی بستگی دارد و ممکن است وقتی که استروژن داخلی فراوان است، فیتواستروژن‌ها استرادیول را از گیرنده‌اش جدا کنند[۲۲]. یکی از این ترکیبات ایزوفلاون‌ها ژنیستئین است که می‌تواند بر روی میزان کلیرانس استروژن‌ها و بنابراین در دسترس بودن هورمون‌ها در سلول‌های هدف تأثیر بگذارد. از سوی دیگر فلاونوئیدهای Quercetin و Kaempferol در هر دو گیرنده آلفا و بتا استروژن در دوز حداکثر اثرات ضد استروژنی دارند و در دوز حداقل این دو ترکیب اثرات استروژنی ضعیف از خود نشان می‌دهد[۲۳]. فلاونوئید Apigenin نیز در دوز حداکثر با تأثیر بر گیرنده استروژنی آلفا اثرات ضد استروژنی از خود نشان می دهند. همچنین کومارین‌های موجود در گیاه خرفه فعالیت ضد آروماتازی از خود نشان می‌دهند که می‌توانند باعث کاهش سطح استروژن گردد[۲۴].

هورمون تستوسترون

تستوسترون در پلاسمای ماهیان استخوانی جنس ماده پیش‌ساز β۱۷-استرادیول می‌باشد. مطالعات قلیچی و همکاران در سال ۱۳۹۱ نشان داد که به دنبال تعدیل در غلظت LH ترشح تستوسترون نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد[۲۵]. غلظت تستوسترون با رشد تخمک در ماهیان ماده افزایش پیدا می‌کند. بررسی نتایج حاصل از هورمون تستوسترون بیانگر آن بود که میان گروه کنترل دست‌نخورده و تزریق با نرمال سالین اختلاف معناداری وجود نداشت. از سویی مقایسه میان گروه تیمار لتروزول و کنترل اختلاف معناداری را نشان داد. بررسی نتایج حاصل از تیمار خرفه با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم در مقایسه با شاهد و نرمال سالین بیانگر وجود اختلاف معنادار نبود($P\leq ۰/۰۵$). به‌طورکلی خرفه میزان هورمون تستوسترون را نسبت به لتروزول کمتر افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد فیتواستروژن ها مانند فلاونوئیدها و کومارین‌ها با مهار آنزیم 17-β HSD5 باعث کاهش آندروژن‌ها و در نهایت کاهش سطح استروژن می‌شوند. در تحقیقاتی که توسط رامجی و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر نوعی ماهی دریاهای گرمسیری به نام Protogynous صورت گرفت تأثیر مهارکننده آروماتاز را در تغییر جنسیت این ماهی بررسی کردند و مشاهده کردند که سطح سرمی هورمون جنسی β۱۷-استرادیول کاهش یافته و سطوح تستوسترون و ۱۱کتوتستوسترون در بخش‌های تخمدانی ماهی ماده افزایش یافته و باعث تغییر جنسی کامل ماهی شده است[۲۶]. افتیمیا و همکاران در سال ۲۰۰۶ در تحقیقات خود اثر مهارکنندگی آروماتاز را بر بلوغ جنسی در ماهی آزاد اقیانوس اطلس *(Salar Salmo)* بررسی کردند. در این تحقیق مهارکننده آروماتاز را در داخل کپسول‌هایی قرار داده و کپسول‌ها را در بدن بچه ماهیان جای دادند که باعث تغییر وزنی تخمدان ماهیان ماده و افزایش نسبی ماهیان نر گردید و از سویی سطوح استروئیدی ماهیان ماده را تغییر داد که به صورت کاهش استرادیول و افزایش تستوسترون نمایان گردید[۲۷]. برادی در سال ۱۹۹۳ در تحقیقی بیان کرد که لتروزول از تبدیل آندروژن‌ها به استروژن از طریق مهار سیستم آنزیمی آروماتاز عمل می‌کند و با کاهش سطح استروژن منجر به کاهش توده تومور سرطانی در زنان می‌شود[۲۸]. در بررسی مشابه که بر روی لتروزول انجام شد لتروزول

مورد تأیید FDA قرار گرفت و برای درمان منطقه‌ای سرطان سینه که متاستاز ایجاد شده بود مهم دانسته و بیان کرده که با کاهش استروژن از طریق یک اتصال رقابتی به هم در سیتوکروم P450 مانع فعالیت آروماتاز شده و می‌تواند از پیشرفت بافت توموری به خصوص در زنان یائسه جلوگیری کند.

هورمون پروژسترون

بررسی سطح سرمی پروژسترون در گروه‌های کنترل و تیمار نشان‌دهنده کاهش میزان پروژسترون در گروه‌های خرفه و لتروزول بود. اما اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. در مطالعه‌ای که توسط مالیک و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی موش صورت گرفت سطح سرمی تستوسترون، استرادیول و پروژسترون در ۲ گروه کنترل و تیمار با لتروزول اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که سطح پروژسترون و استرادیول کاهش، در حالی که سطح سرمی تستوسترون افزایش یافت. همچنین افزایش وزن در تیمارهای لتروزول مشاهده شد [۲۹]. در مطالعه‌ای که توسط آهنگرپور و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی موش‌های ماده انجام شد، اثر عصاره اتانولی خرفه را بر سیستم تولیدمثلی موش بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که سطح سرمی LH و FSH افزایش پیدا کرد در حالی که سطح استروژن و پروژسترون در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت[۳۰].

بررسی نتایج بافت شناسی تخمدان با میکروسکوپ نوری

بررسی مقاطع تخمدان در گروه‌های کنترل نشان داد که سلول‌ها در مراحل ویتلوژنز و بلوغ به سر می‌بردند و حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری نشان دهنده آغاز مرحله بلوغ می‌باشد. ذرات چربی با اتصال به یکدیگر تشکیل قطرات چربی را می‌دهند به دنبال آن غشاء هسته باز شده و در نتیجه محتویات آن درون سیتوپلاسم پراکنده می‌گردند و تجمع این ذرات در سیتوپلاسم سبب مهاجرت هسته به حاشیه سیتوپلاسم گشته و در این مرحله لایه زونا رادیاتا کامل می‌شود. بررسی تصاویر تیمار لتروزول نشان داد که با افزایش دوز علی‌رغم حضور سلول‌هایی در فاز کورتیکال تعداد سلول‌ها در فاز پیش‌هستکی افزایش یافت. بررسی مقاطع تخمدانی در تیمار خرفه نیز در شکل نشان داد که با افزایش دوز تعداد سلول‌ها در مرحله پیش‌هستکی در مقایسه با گروه کنترل، افزایش یافت. در تیمار با بالاترین دوز از خرفه تقریباً اکثر سلول‌ها در مرحله پیش‌هستکی قرار داشتند. در مرحله ۱ جنسی، تخمک‌ها بسیار کوچک و به لحاظ نمو کمتر تخمدان GSI پایین است. در این مرحله هسته هر تخمک که در سراسر آن یک یا چند شبکه کروماتینی هستک‌ها توزیع شده‌اند بیشترین بخش سلول را اشغال می‌کنند و درون یک لایه نازک سیتوپلاسمی قرار دارند که مرحله پیش-هستکی نام دارد. چاران و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که استفاده از آروماتاز اینهیبیتور مثل لتروزول باعث به تأخیر انداختن فرآیند بلوغ گنادها در ماهی می‌شود. بافت‌شناسی تخمدان در اثر تزریق لتروزول نشان داد که لتروزول باعث حضور اووسیت‌ها در مراحل ابتدایی تکامل می‌شود و با افزایش دوز، تعداد اووسیت‌های اولیه افزایش و تعداد اووسیت‌ها در مرحله ویتلوژنز کاهش می‌یابد که به دلیل کاهش در سطح سرمی استرادیول می‌باشد. مقادیر بالای استرادیول در گروه کنترل به مقادیر پایین آن در گروه‌های تیمار تحت تزریق با لتروزول سنجش شد و این نشان دهنده این موضوع بود که لتروزول سنتز استرادیول را با مهار آنزیم آروماتاز تحت تأثیر قرار می‌دهد[۳۱]. کیت و همکاران در سال ۲۰۰۹ تأثیر داروی لتروزول به عنوان یک مهارکننده آروماتاز را بررسی کردند و اثرات آن را در درمان نازایی در زنان مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که لتروزول با تحریک تخمک‌گذاری می‌تواند راهی برای درمان نازایی باشد و همچنین خطر نارسایی در تولد را کاهش می‌دهد به گونه‌ای که لتروزول می‌تواند نقص‌های مادرزادی در عضوهای اصلی و ناهنجاری‌های کروموزومی در موارد القای تخمک‌گذاری را کاهش دهد[۳۲]. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط لوئی و همکاران بر روی ماهی ژاپنی Medaka انجام دادند از داروی لتروزول به عنوان مهارکننده آروماتاز استفاده کردند و مشاهده کردند در ماهیانی که در معرض لتروزول قرار گرفتند رشد تخمک‌ها کاهش یافت. در ماهیانی که دوز بالای لتروزول را

دریافت کرده بودند تخم‌ریزی متوقف شد. از سویی زمان خروج از تخم ماهیان بررسی گردید و به این نتیجه رسیدند که زمان خروج از تخم ماهیان افزایش یافته، اما هیچ ناهنجاری مورفولوژیکی مشاهده نشد[۳۳].

بررسی نتایج بافت شناسی تخمدان با میکروسکوپ الکترونی

لایه‌های پوششی تخمک (از خارج به داخل) به ترتیب شامل لایه تکا، لایه اپی تلیوم فولیکولی (لایه گرانولوزا) لایه زونارادیانا و غشاء سیتوپلاسمی تخمک می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که در گروه کنترل دست نخورده سلول‌ها در مرحله ویتلوژنز به سر می‌برند. لایه‌های فولیکولی تکا و گرانولوزا رؤیت شد. نفوذ ذرات زرده‌ای به درون فضای سیتوپلاسم مشاهده شد که درون سیتوپلاسم به هم پیوسته و گرانول‌های زرده را تشکیل دادند که نشان‌دهنده این بود که سلول در مرحله ویتلوژنز به سر می‌برد. ذرات چربی نیز به هم پیوسته و تشکیل واکوئول های چربی را دادند. غشاء سلولی یک روند نرمال داشت. در مرحله ویتلوژنز فضاهای خالی میان لایه زونارادیاتا (ناحیه شفاف) یافت می‌شود. در طی رشد تخمک، زونارادیاتا دارای کانال‌هایی می‌شود که توانایی تبادل مواد بین تخمک و سلول‌های فولیکولی را به تخمک در حال رشد می‌دهد[۳۴]. در ارتباط با لایه زونارادیاتا باید گفت که ظهور آن در مرحله اولیه زرده‌سازی اتفاق می‌افتد[۳۵]. همچنین در مطالعات هملت و همکاران در سال ۱۹۹۹ و تصاویر میکروسکوپ الکترونی، نشان داد که سلول های فولیکولی در تولید پروتئین‌ها و لیپیدهای موثر بر تکامل و ساخت غشای ویتلینی نقش دارند[۳۶]. در مطالعات کاردناس و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی ماهی*Chirostoma humboldtianum* نیز نشان دادکه در مرحله ویتلوژنز به دلیل ورود مواد از خارج سلول و تجمع وزیکول های زرده، اندازه تخمک افزایش می‌یابد[۳۷]. در تیمار لتروزول با دوز ۱ میلی‌گرم برکیلوگرم غشاء تخمک مشاهده شده ولی در جذب و به درون آوردن ذرات زرده‌ای فعال نیست و ضخامت غشاء تخمک کاهش پیدا کرده اووسیت دارای سیتوپلاسم کاملا فشرده‌ای است ذرات زرده ای مشاهده نمی‌شود و شبکه اندوپلاسمیک داخل اووسیت مشاهده می‌شود. در تیمار خرفه با دوز ۸۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم قطر غشاء کمتر شده و غشاء سلولی به گستردگی شاهد نیست و تکامل پیدا نکرده است. بنابراین میزان جریان نفوذ ذرات زرده‌ای به درون کاهش یافته است. غشاء اووسیت در مرحله اولیه تکوین (پیش هستکی) مشاهده می‌شود.

۶. پیشنهادات

۱- بررسی اثرات داروی لتروزول بر بافت هیپوفیز و رسپتورهای استروژنی در ماهی ماده گورامی سه خال.

۲- بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه بر بافت هیپوفیز و رسپتورهای استروژنی در ماهی ماده گورامی سه خال.

۳- بررسی اثرات داروی لتروزول بر سلول های جنسی نر در ماهی گورامی سه خال.

۴- بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه بر سلول های جنسی نر در ماهی گورامی سه خال.

۷.قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از پرسنل آزمایشگاه علوم پایه دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی تشکر و قدردانی می نمایند.

۸.منابع

۱ *Mohamed AL, Hussein AS. Chemical composition of purslane (portulaca oleracea). Plant Foods Hum Nutr. 1994 Jan; 45(1):1-9.*

۲. *Okubo K, Nagahama Y. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. – Acta Physiologica. 2008; 193: 3-15.*

۳. *Degani G, Boker R. Vitellogenesis level and induction of maturation in the ovary of the blue gourami Trichogaster trichopterus (Anabantidae, Pallas, 1770). Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology. 1992;263(3):330-7.*

۴. *Hoseini E, Forouzandfar M, Payedar A. The effect of Hydroalcoholic extract of purslane (portulaca oleracea L) on serum concentration of esterogen, progesterone, Prolactin and gonadotropins in mature female rats. J Shahrekord Univ Med Sci 2013;15(5):12-21.*

۵. *Londonkar R, Nayaka HB. Evaluation of antiimplantation and abortificiaent Properties of Portulaca oleracea L. in albino rats. Int J Pharm Bio SCi 2011;2(4):5018.*

۶. *Simopoulos AP, Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ. Purslane: A plant source of omega-3 fatty acids and melatonin. J Pineal Res 2005;39(3):331-2.*

۷. *Chuffa LG, Seiva FR, Favaro WJ, Teixeira GR, Amorim JP, Mendes LO, et al. Melatonin reduces LH, 17beta-stradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation. Reprod Biol Endocrinol 2011;9(1):108.*

۸. *Davis SR, Mukies AL, Wilcox G. Phytoestrogens in clinical practice. Integr Med 1998;1(1):27-34.*

۹. *Long X, Fan M, Bigsby RM, Nephew KP. Apigenin inhibits antiestrogen-resistant breast cancer cell growth through estrogen receptor-alpha-dependent and estrogen receptor-alphaindependent mechanisms. Mol Cancer Ther 2008;7(7):2096-108.*

۱۰. *Chen S, Cho M, Karlsberg K, Zhou D, Yuan YC. Biochemical and biological characterization of a novel anti-aromatase coumarin derivative. JBiol Chem 2004;279(46):48071-8.*

۱۱. *Santell RC, Chang YC, Nair MG, Helferich WG. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. J Nutr 1997;127(2):263-9.*

۱۲. *Sumaya IC, Byers DM, Irwin LN, Del Val S, Moss DE. Circadian-dependent effect of melatonin on dopaminergic D2 antagonist-induced hypokinesia and agonist-induced stereotypies in rats. Pharmacol Biochem Behav 2004;78(4):727-33.*

۱۳. *Trunet P F. et al. Letrozol (cgs 20267), a new oral aromatase inhibitor for the treatment of advanced breast cancer in postmenopausal patients. Acta oncologica 35.s5 1996:15-18.*

۱۴. حسین زاده صحافی، همایون. بیولوژِی تولید مثل ماهی با تأکید بر ماهی‌های ایران. تهران: موسسه نشر جهاد وابسته به جهاد دانشگاهی واحد تهران، ۱۳۸۰. ص.۲.

۱۵. *Geisier J, et al. Influence of letrozole and anasttrozoie on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. Journal of clinical oncology 2002;20(3):751-757.*

۱۶. ناجی، طاهره. بافت شناسی علمی. تهران: سازمان چاپ و انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی (با همکاری واحد علوم پزشکی تهران)، ۱۳۹۴. صص. ۲۹-۴۰.

۱۷. *Yiwang H, Fengweng C, Chungtu M.& Cheles. Synchronization of plasma sexual steroid concentration & goadal cycle in the sleeper , Eleotris acanthosoma. Zoological studies. 2001; 40(1):14-20.*

۱۸. *Yoneda M, Kitano H, Selvaraj S, Matsuyama M, Shimizu A. Dynamics of gonadosomatic index of fish with indeterminate fecundity between subsequent egg batches: application to Japanese anchovy Engraulis Japonicus under captive conditions. Marine biology. 2013;160(10):2733-41.*

۱۹. *Charan R, Babu P P S, Venugopal G, Ghadha N K, Sreeramamurty K B. Effect of aromatase inhibitors on the ovarian development of stunted yearlings of rohu (Labeo rohita):a preliminary study.Aquacult Int 2014;22:689-697.*

۲۰. *Hoseini E, Forouzandfar M, Payedar A. The effect of Hydroalcoholic extract of purslane (portulaca oleracea L) on serum concentration of esterogen, progesterone, Prolactin and gonadotropins in mature female rats. J Shahrekord Univ Med Sci 2013;15(5):12-21.*

۲۱. *Londonkar R, Nayaka HB. Evaluation of antiimplantation and abortificiaent Properties of Portulaca oleracea L. in albino rats. Int J Pharm Bio SCi 2011;2(4):5018.*

۲۲. *Davis SR, Mukies AL, Wilcox G. Phytoestrogens in clinical practice. Integr Med 1998;1(1):27-34.*

۲۳. *Harris DM, Besselink E, Henning SM, Go VL, Heber D. Phytoestrogens induce differential estrogen receptor alpha-orbeta-mediated responses in transfected breast cancer cells. Exp Biol Med (Maywood) 2005;230(8):558-68.*

۲۴. *Long X, Fan M, Bigsby RM, Nephew KP. Apigenin inhibits antiestrogen-resistant breast cancer cell growth through estrogen receptor-alpha-dependent and estrogen receptor-alphaindependent mechanisms. Mol Cancer Ther 2008;7(7):2096-108.*

۲۵. قلیچی، افشین. جرجانی، سارا. اکرمی، رضا. مخدومی، نورمحمد. کاظمی، رضوان. نوسانات استروئیدهای جنسی سنین مختلف فیل ماهیان پرورشی کارگاه شهید مرجانی گرگان. دوره ۲۱، شماره ۲، ۱۳۹۱: ۷۷-۸۸.

۲۶. *Ramji K.B, Mikihiko, Shigeo N, Masaru N. Physiology Biochemistry. Molecular Reproduction and Development. 2004;67:303-307.*

۲۷. *Efthimia A, Lan M, Lngemar B, Bertil B. Fish Phusiology and Biochemistry. 2006;14:15-24.*

۲۸. *Brodie ,A.M. Aromatasea ,its inhibitors and their use in breast cancer treatment. Pharmacol, Ther,1993;p.60,501.*

۲۹. *Maliqueo M, et al. Continuous administration of a P450 aromatase inhibitor induces polycystic ovary syndrome with a metabolic and endocrine and phenotype in female rats at adult age. Endocrinology. 2013;154(1):343-45.*

۳۰. *Ahangarpour A, Lamoochi A, Moghadam F H, Mansouri T SM. Effects of portulaca oleracea ethanolic extract on reproductive system of aging female mice. Int J Reprod Biomed. 2016;14(3): 205-212.*

۳۱. *Charan R, Babu P P S, Venugopal G, Ghadha N K, Sreeramamurty K B. Effect of aromatase inhibitors on the ovarian development of stunted yearlings of rohu (Labeo rohita):a preliminary study.Aquacult Int 2014;22:689-697.*

۳۲. *Keith j, Ethan D.G, Kirk C.use of the aromatase inhibitor letrozole to treat male infertility Genevieve. 2009;92:829.*

۳۳. *Liwei S, Jinmiao Z, Philip ,Spear, Zijian W.State key laboratory of Enviromental Aquatic Chemistry. Research center for Eco_Environmental sciences.chinese Academy of sciences; 2006.P.15*

۳۴. میرناطق، باهره. مطالعه بافتی ساختار Zona radiate در اووسیت guppy (Poecilia reticulate). پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته شیلات، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، ۱۳۸۹. صص. ۱-۸.

۳۵. *Ravaglia MA, Maggese MC. Oogenesis in the swamp eel Synbranchus marmoratus (Bloch,1795) (Teleostei;synbranchidae). Ovarian anatomy, stages of oocyte development and micropyle structure. Biocell. 2002;26(3):325-37.*

۳۶. *Hamlett WC, Jezior M, Spieler R. Ultrastructural analysis of folliculogenesis in the ovary of the yellow spotted stingray, Urolophus jamaicensis. Annuals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger 1999;181(2):159-72.*

۳۷. *Cardenas R, Chavez M, Gonzalez JL, Aley P, Espinosa J, Jimenez-Garcia LF. Oocyte structure and ultrastructure in the Mexican silverside fish Chirostoma humboldtianum (Atheriniformes: Atherinopsidae). Revista de biologia tropical. 2008;56(4):1825-35.*