

مقایسه تأثیر عصاره گیاه گل ساعتی (*Passiflora incarnata* L.) و آلپرازولام بر سطح هورمون‌های جنسی و فراساختار بافت تخمدان در ماهی ماده بالغ گورامی سه خال

نیلوفر برزگری^۱، طاهره ناجی^{۱*}، همایون حسین‌زاده صفائی^۲

^۱گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، ^۲موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۱/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۸

چکیده

زمینه و هدف: در سراسر جهان، مصرف بنزودیازپین‌ها به عنوان داروهای خواب‌آور که اثرات آرام‌بخشی نیز دارند، رو به افزایش است. آلپرازولام و گل ساعتی (*Passiflora incarnata* L.) با اثر بر GABA که یکی از نورو ترنسمیترهای شناخته شده مغز است، اثرات آرام‌بخشی و خواب‌آوری ایجاد می‌کنند. شواهد مبنی بر وجود گیرنده‌های GABA در غدد درون‌ریز بدن از جمله تخمدان است. با توجه به شباهت محور هیپوتالاموس - هیپوفیزگنکاد در انسان و ماهیان و نیز مصرف زیاد داروهای خواب‌آور و عوارض جانبی آن و جایگزین نمودن آن با گیاهان دارویی، لذا هدف از این مطالعه تعیین و مقایسه تأثیر عصاره گیاه گل ساعتی (*Passiflora incarnata* L.) و آلپرازولام بر سطح هورمون‌های جنسی و فراساختار بافت تخمدان در ماهی ماده بالغ گورامی سه خال بود.

روش بررسی: این یک مطالعه بنیادی - تجربی از نوع پژوهش‌های آزمایشگاهی می‌باشد که در سال ۱۴۰۱ انجام شد. در این مطالعه ۱۲۰ قطعه ماهی گورامی سه خال ماده با میانگین وزنی 2 ± 0.5 گرم از کارگاه پرورش ماهیان زینتی همدان خریداری و به هشت گروه ۱۵ تایی شامل: گروه کنترل دست نخورده، کنترل حلال، سه گروه تیماری دریافت‌کننده آلپرازولام با دوز $10/5$ و 2 میلی‌گرم بر کیلوگرم و سه گروه تیماری دریافت‌کننده عصاره گل ساعتی با دوز 25 ، 50 و 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم، تقسیم شدند. تزریق داروها در هر نوبت 0.2 میلی‌لیتر یک روز در میان تا 10 تزریق، در مدت 20 روز به صورت عضلانی بین باله پشتی و خط جانبی انجام گرفت. پس از پایان دوره، ماهی‌ها یوتانازی و تشریح شدند. تخمدان ماهی جهت بررسی با میکروسکوپ نوری و الکترونی جدا شد و برای اندازه‌گیری هورمون‌های استروئیدی از مایعات بافتی به وسیله کیت الایزا استفاده گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج تحقیق نشان داد هورمون 17β -بتا استرادیول در همه دوزهای آلپرازولام و عصاره گل ساعتی نسبت به تیمارهای کنترل به ترتیب افزایش و کاهش یافتند ($p \leq 0.05$). سطح هورمون‌های تستوسترون و 17β -هیدروکسی پروژسترون در دوز 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم آلپرازولام به‌طور معنی‌داری افزایش داشت ($p \leq 0.05$). در ماهی‌های تحت تیمار در هر سه دوز آلپرازولام، اووسیت‌ها نسبت به گروه کنترل اغلب در فاز ویتلوژنی بودند، در حالی که در ماهی‌های تحت تیمار در هر سه دوز عصاره گل ساعتی اکثراً در مرحله پیش‌هستی قرار داشتند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده احتمالاً آلپرازولام حداکثر تا غلظت 100 میلی‌گرم بر کیلوگرم دارای اثرات تحریکی بر بلوغ تخمدان ماهی گورامی سه خال بوده و موجب افزایش هورمون‌های استروئیدی در آن‌ها گردید. از سوی دیگر عصاره گل ساعتی در دوزهای 100 - 25 میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر مهارتی بر تکامل تخمدان دارد.

واژه‌های کلیدی: آلپرازولام، تخمدان، گل ساعتی، ماهی گورامی سه خال، هورمون‌های استروئیدی

*نویسنده مسئول: طاهره ناجی، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، گروه علوم پایه
Email: tnaji2002@gmail.com

مقدمه

قرص‌های خواب‌آور داروهای هستند که در سراسر جهان برای مبارزه با اختلالات خواب و پیشگیری از علائم ناشی از ناسازگاری با شیفت کاری یا جت لگ استفاده می‌شوند. امروزه بنزودیازپین‌ها داروهای انتخابی اول هستند (۱). در بالینی، بنزودیازپین‌ها به‌عنوان ضد اضطراب، آرام‌بخش، ضد تشنج و شل‌کننده عضلانی استفاده می‌شوند و اثرات درمانی با قدرت آن‌ها در اتصال به گیرنده‌های بنزودیازپین مرکزی در سیستم عصبی مرکزی (CNS) مرتبط است. اثر بنزودیازپین‌ها در CNS به وسیله گیرنده‌های خاصی که با گیرنده‌های اسید آمینوبوتیریک (GABA) جفت می‌شوند، واسطه می‌شود (۲). علاوه بر گیرنده‌های مرکزی بنزودیازپین، نوع دیگری از گیرنده‌ها، گیرنده‌های بنزودیازپین محیطی، در چندین اندام غدد درون‌ریز، مانند جفت انسان، بیضه و تخمدان مشخص شده‌اند (۳-۵).

آلپرازولام یکی از رایج‌ترین داروی روان‌گردانی که اغلب برای مدیریت اختلالات ترس و اضطراب تجویز می‌شود. آلپرازولام به‌دسته بنزودیازپین‌ها تعلق دارد که هنگامی که به گیرنده $GABA_A$ متصل می‌شود، موجب اثرات آرام‌بخش یا مهارى بر روی سیستم عصبی می‌گردد (۶ و ۷). از سوی دیگر شواهد بالینی نشان می‌دهد که افزایش سطح GABA با اختلالات عصبی غدد درون‌ریز مانند تخمدان و تولیدمثل مرتبط است (۸). نتایج گزارش شده از تأثیر آلپرازولام بر تخمدان و هورمون‌های جنسی

متفاوت است. در مطالعه شادخواست و همکاران تأثیر آلپرازولام بر رشد و تکامل فولیکول‌های تخمدان در موش‌های صحرایی ماده بررسی و کاهش توانایی باروری گزارش شد (۹). در مطالعه لورنزی و همکاران در معرض قرار گرفتن گیرنده‌های محیطی با دوز کم آلپرازولام فاز تخمک‌گذاری را در نوعی ماهی بهبود بخشید (۱۰). کوروبوت و همکاران در مطالعه خود در بررسی آلپرازولام بر غلظت دهیدرواپی آندروسترون گزارش کردند که آلپرازولام موجب افزایش قابل توجهی در غلظت دهیدرواپی آندروسترون (DHEA) (۱۱) در مردان جوان و کاهش قابل توجهی در غلظت کورتیزول شد (۱۱).^۱

تستوسترون یکی از هورمون‌های استروئیدی که ساخت آن در سلول‌های غیرجنسی گنادها (سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های تکا) می‌باشد که باعث افزایش عملکردهای مرتبط با تولید مثل در جنس نر می‌باشد (۱۲). بین هورمون‌های جنسی که به وسیله محور گناد-هیپوتالاموس-هیپوفیز (HPG) تنظیم می‌شود و کورتیزول، هورمون استرس که تحت کنترل محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) است، تعامل وجود دارد (۱۳). محور گناد-هیپوفیز-هیپوتالاموس با ترشح هورمون‌های عصبی مناسب نظیر هورمون‌های رهاساز گنادوتروپین پروسه تکامل گنادی را شروع کرده که این هورمون عصبی در سلول‌های غیرجنسی

1-Dehydroepiandrosterone(DHEA)

شباهت محور هیپوتالاموس - هیپوفیز- گناد ماهیان و روند تولید مثل آنها با انسان، به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی مناسب در پژوهش‌های تولیدمثلی به کار می‌رود(۱۸).^۱

با توجه به شباهت محور هیپوتالاموس - هیپوفیز- گناد در انسان و ماهیان و نیز مصرف زیاد داروهای خواب‌آور و عوارض جانبی آن و جایگزین نمودن آن با گیاهان دارویی هدف از این مطالعه تعیین و مقایسه اثرات عصاره گل ساعتی و آلپرازولام بر بافت تخمدان و اندازه‌گیری سطوح هورمون‌های جنسی در ماهی گورامی سه‌خال بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی که در سال ۱۴۰۱ در آزمایشگاه آبیان دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی انجام شد، تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی گورامی سه‌خال ماده با میانگین وزنی 2 ± 0.5 گرم از کارگاه پرورش ماهیان زینتی در همدان خریداری شدند. ۴۸ ساعت قبل از ورود ماهی‌ها به آزمایشگاه، آبیگری آکواریوم‌ها با آب شهری و اتصال پمپ‌های هوا و کلرزدایی آب، آماده شدند. سپس ماهی‌ها به داخل آکواریوم‌های شیشه‌ای به ابعاد $30 \times 40 \times 60$ سانتیمتر انتقال داده شد و ۴۸ ساعت مهلت داده شد تا با محیط وفق یابند. ماهی‌ها در طول آزمایش با غذای مخصوص یک بار در روز تغذیه می‌شدند.

گناد باعث تولید هورمون تستوسترون می‌شوند. هورمون تستوسترون با تولید هورمون ۱۷-بتا استرادیول موجب روند تکامل گنادها می‌گردد(۱۴). تستوسترون پیش ماده لازم جهت بیوسنتز ۱۷ بتا استرادیول است(۱۵). به نظر می‌رسد تکامل گنادی دلیل افزایش تستوسترون در ماهی‌ها در دوز بالای آلپرازولام است.

فعالیت ضداضطراب داروهای گیاهی به‌طور گسترده در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند و در صورت مؤثر و بی‌خطر بودن می‌توانند گزینه‌ای برای درمان اضطراب باشند. گل ساعتی (*Passiflora incarnata* L.) گیاهی است چندساله و بومی آمریکای جنوبی، استرالیا و آسیای جنوب شرقی است و امروزه برای تهیه مواد خام برای مصارف دارویی کشت می‌شود(۱۶). لوویک و بون بیان کردند جنس *Passiflora* یکی از بهترین گونه‌ها با خواص درمانی است. اندام‌های هوایی گیاه، گل‌ها و میوه‌ها برای مصارف دارویی استفاده می‌شود(۱۴ و ۱۳). در پژوهش‌های مختلف از عصاره گل ساعتی برای کاهش اضطراب و بی‌خوابی بیماران استفاده شده است(۱۶ و ۱۵). گزارش شده است که اثرات دارویی متعدد گل ساعتی از طریق مدولاسیون سیستم GABA از جمله میل ترکیبی به گیرنده‌های $GABA_A$ و $GABA_B$ می‌باشد(۱۷).

ماهی گورامی سه‌خال از دسته ماهیان تخم‌گذار بانام علمی *Trichogaster trichopterus* و متعلق به خانواده انابانتیده^(۱) یا لابیرنت‌دار است. به دلیل

1-Anabantidae

ماهی‌ها به طور تصادفی در ۸ گروه شامل کنترل دست نخورده (بدون تزریق)، کنترل حلال (اتانول ۷۰ درصد)، سه گروه تیماری دریافت کننده آلپرازولام با دوز ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و سه گروه تیماری دریافت کننده عصاره گل ساعتی با دوز ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم‌بندی شدند. عصاره گیاه ساعتی به صورت آماده از شرکت دینه با شماره بچ ۲۱-۲۲۰ و داروی آلپرازولام از شرکت تهران دارو با شماره بچ ۲E۰۲۰۲۲۰۸۵۰ تهیه گردید. دوزهای تزریقی بر اساس میانگین وزنی ماهی‌ها در هر گروه انجام شد تا وزن مورد نیاز از پودر مواد مؤثره دارویی به دست آید. مقدار محاسبه شده توزین و در اتانول ۷۰ درجه حل گردید و داخل ظروف شیشه‌ای تیره نگهداری شد. در طول آزمایش ماهیان زخمی و بیمار از آکواریوم خارج می‌شدند. تزریق ماهی‌ها به صورت یک روز در میان و تا ۱۰ نوبت انجام شد. قبل از تزریق، هر ماهی در محلول عصاره میخک رقیق شده با آب مقطر قرار گرفت تا به طور نسبی تعادل و هوشیاری خود را از دست دهد (۱۹). تزریق به صورت عضلانی با سرنگ انسولین BD و پس از مهار نمودن سر و دم، بین باله پشتی و خط جانبی درون عضله با زاویه ۳۰ درجه انجام گرفت. در هر نوبت به اندازه دو خط کوچک معادل ۰/۲ میلی‌لیتر، تزریق انجام گردید. تزریقات با رعایت کامل موازین و ملاحظات اخلاقی انجام گرفت. پس از اتمام تزریق‌ها تا ۲۴ ساعت بعد، ماهی‌ها بدون هیچ تزریق یا مداخله‌ای، زنده نگهداشته

شدند و پس از آن، تشریح ماهی‌ها انجام گرفت. تخمدان ماهیان پس از تشریح، در فرمالین ۱۰ درصد جهت فیکس شدن قرار گرفت. سپس از هر گروه، طی مراحل پاساژ، قالب‌گیری، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی بافتی، لام تهیه شد و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت (۲۰). برای اندازه‌گیری سطوح هورمون‌های استروئیدی شامل ۱۷ بتا- استرادیول، تستوسترون و ۱۷ آلفا- هیدروکسی پروژسترون، از مایعات بافتی استفاده شد. هورمون‌های استروئیدی به وسیله کیت‌های الایزای شرکت مونوبایند اندازه‌گیری شد. جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی، بافت تخمدان در گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد، تتراکسید اسمیم ۱/۵ درصد و بافر فسفات، فیکس شد. سپس نمونه‌ها در سری الکل صعودی (۵۰، ۷۰ و ۹۵ درصد)، استون و مخلوط استون - رزین (۵۰/۵۰ درصد) آب‌گیری شد، در رزین پلیمریزه شد و بعد برش‌گیری انجام شد. برش‌ها روی شبکه مسی (گرد) مش ۳۰۰ قرار گرفت و رنگ‌آمیزی شد. سپس، گریدها با میکروسکوپ الکترونی عبوری (Nederland, Philips, EM208) در ولتاژ شتاب‌دهنده ۱۰۰ کیلوولت مورد بررسی قرار گرفت (۲۱).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج آزمون تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری را در هورمون ۱۷-بتا استرادیول، تستوسترون و هورمون ۱۷-هیدروکسی پروژسترون در گروه‌های تحت تیمار و گروه شاهد و حلال نشان داد ($p \leq 0/01$).

تزریق همه دوزهای آلپرازولام موجب افزایش معنی‌دار هورمون ۱۷-بتا استرادیول و همه دوزهای در عصاره گل ساعتی موجب کاهش معنی‌دار هورمون ۱۷-بتا استرادیول نسبت به گروه‌های شاهد و حلال گردید ($p \leq 0/05$) (شکل ۱). تزریق با بالاترین دوز آلپرازولام (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) موجب افزایش معنی‌دار هورمون تستوسترون و هورمون ۱۷-هیدروکسی پروژسترون در ماهی‌ها گردید ($p < 0/05$)، اما سایر گروه‌ها از جمله دوز کم و متوسط آلپرازولام و همه دوزهای عصاره گل ساعتی تفاوت معنی‌داری با گروه‌های شاهد و کنترل حلال نداشتند ($p \geq 0/05$) (شکل ۲ و ۳).

ارزیابی مقاطع بافت تخمدان ماهی‌ها در گروه شاهد و گروه کنترل حلال نشان داد که بیشتر اوسیت‌ها در مرحله کورتیکال آلئولار^(۱) و پیش‌هستی^(۲) بودند و همچنین تعدادی از اوسیت‌ها نیز در فاز ویتلوژنی^(۳) قرار داشتند (شکل ۴-الف، ب). مقایسه بافت تخمدان ماهی‌ها در همه دوزهای عصاره ساعتی نسبت به گروه‌های شاهد و کنترل حلال نشان‌دهنده کاهش رشد اوسیت‌ها بود و اغلب اوسیت‌ها در فاز پیش‌هستی و کورتیکال آلئولار بودند (شکل ۵-ج، د، ه). در بافت تخمدان ماهی‌های

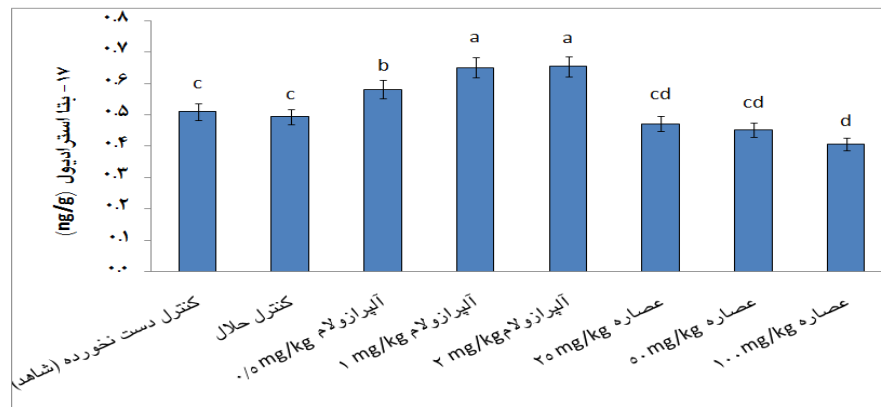
تحت تیمار با کمترین دوز عصاره گل ساعتی (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اغلب اوسیت‌ها در مرحله پیش‌هستی و کورتیکال آلئولار بودند (شکل ۵-ج). با افزایش دوز عصاره گل ساعتی به ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعداد اوسیت‌های فاز پیش‌هستی افزایش یافت (شکل ۵-د، ه). در ماهی‌های تیمار شده با آلپرازولام تعداد بیشتری از اوسیت‌ها در مقایسه با گروه‌های شاهد، کنترل حلال و عصاره گل ساعتی در مرحله ویتلوژن بودند و تعدادی از اوسیت نیز در مرحله ویکول زایا مشاهده شد (شکل ۵-و، ز، ح). در دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلپرازولام تعداد محدودی از اوسیت‌ها در مرحله پیش‌هستی و کورتیکال آلئولار در بافت تخمدان مشاهده شد (شکل ۵-و). با افزایش دوز آلپرازولام به ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعداد اوسیت‌ها در مرحله پیش‌هستی و کورتیکال آلئولار کاهش و تعداد اوسیت‌ها در مرحله ویتلوژنی و ویکول زایا افزایش یافتند (شکل ۵-ز، ح). همچنین در دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلپرازولام بیشترین میزان انتشار بافت چربی در بافت تخمدان ماهی‌ها مشاهده شد (شکل ۵-ح).^۱

بافت تخمدان به ترتیب در گروه‌های شاهد، کنترل، عصاره گل ساعتی و آلپرازولام در شکل ۶ نشان داده شده است. سلول تخمک در گروه‌های

1-Cortical Alveoli
2-Prenuclear
3-Vitellogenic

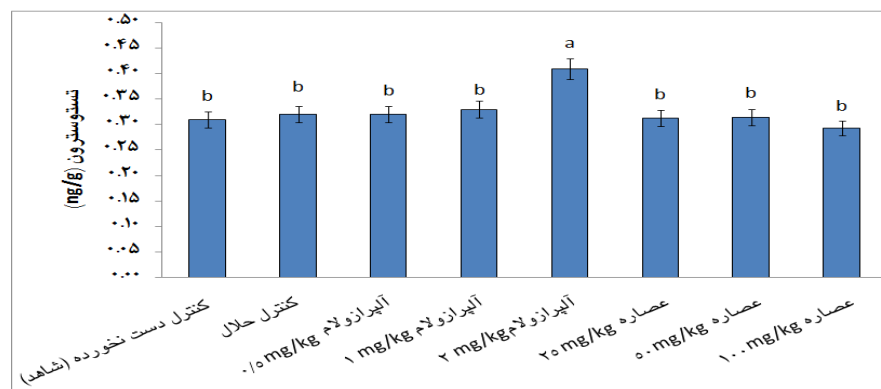
در درون سیتوپلاسم، منطقه‌ای همگن و دانه‌دار دیده شد که نشان دهنده مرحله کورتیکال آئوئولار بود (شکل ۶-ب). در ماهی‌های تیمار شده با آلپرازولام^(۴) و زیکول زایا^(۵) در اووپلاسم به‌وضوح مشاهده شد و ذرات درشت چربی تشکیل شده بودند (شکل ۶-ج).

شاهد و کنترل حلال، لایه گرانولوزا^(۱) و تکا^(۲) تشکیل شده بودند. فولیکول‌ها در حال تغذیه شدن بوده و مسیر معمول بالغ شدن را طی می‌کردند و میزان بلوغ فولیکول‌ها نسبت به تیمار عصاره گل ساعتی بیشتر بود (شکل ۶-الف). در سلول تخمک ماهی‌های تحت تیمار با عصاره گل ساعتی لایه گرانولوزا و تکا تازه تشکیل شده بود و زونارادیاتا^(۳) قابل مشاهده نبود، اما



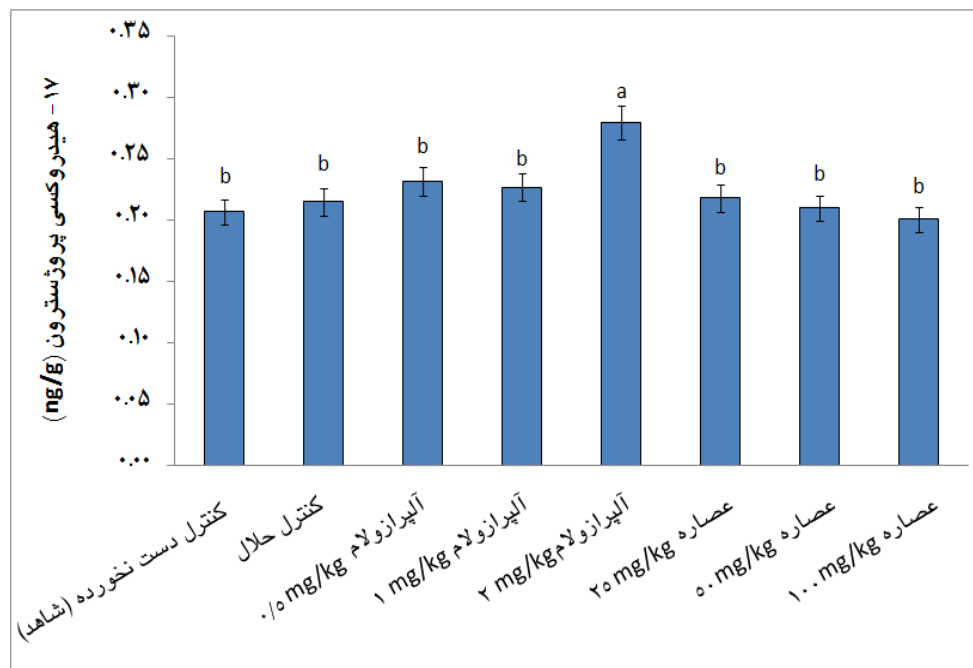
شکل ۱: مقایسه میانگین هورمون ۱۷-بتا استرادیول ماهی‌های گورامی سه خال در گروه‌های مختلف.

.۱

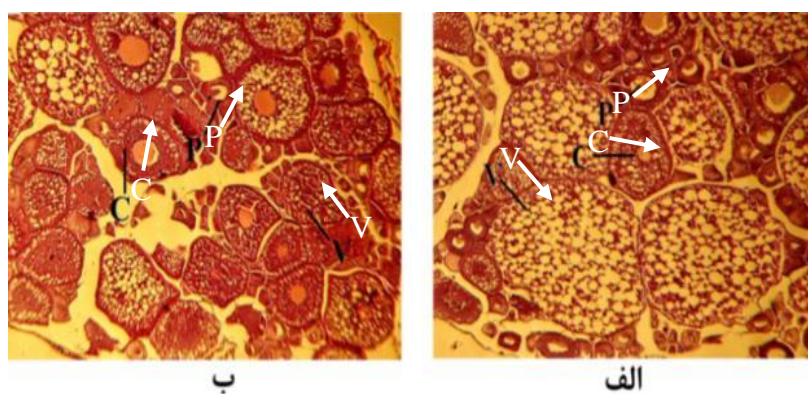


شکل ۲: مقایسه میانگین هورمون تستوسترون ماهی‌های گورامی سه خال در گروه‌های مختلف.

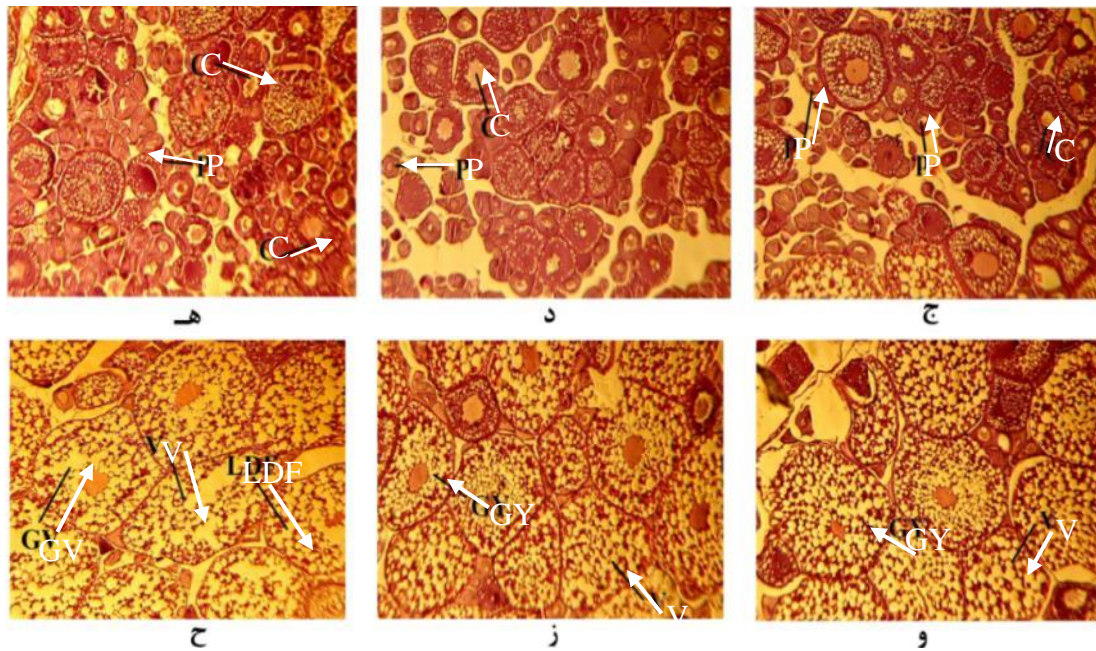
- 1-Granulosa layer
- 2-Theca Layer
- 3-Zona Radiata
- 4-Alprazolam
- 5-Germinal Vesicle



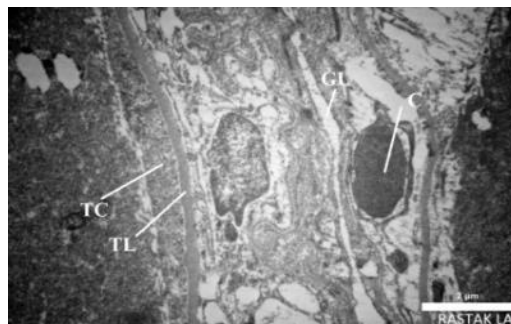
شکل ۳: مقایسه میانگین هورمون ۱۷-هیدروکسی پروژسترون ماهی‌های گورامی سه خال در گروه‌های مختلف



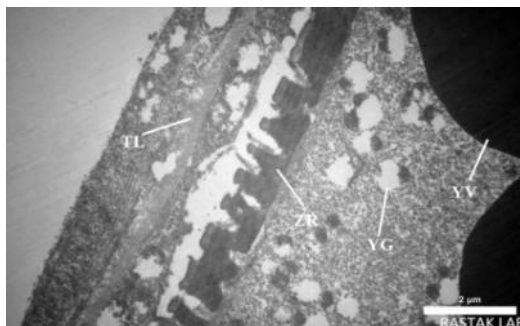
شکل ۴: مقطع بافت تخمدان. الف: گروه کنترل دست نخورده (شاهد)، ب: گروه کنترل حلال. P: پیش‌هستی، C: کورتیکال آلوتولار، V: ویتلوژنی، GV: وزیکول زایا، LDF: چربی، رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی $\times 40$



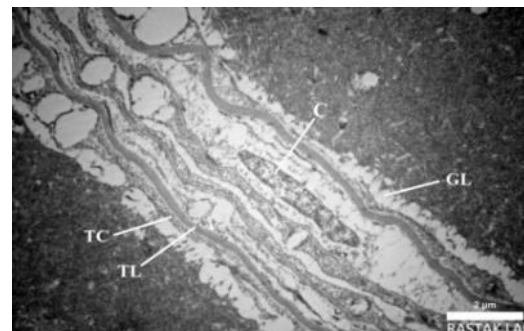
شکل ۵: مقطع بافت تخمدان. ج: گروه ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گل ساعتی، د: گروه ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گل ساعتی، ه: گروه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره گل ساعتی و: گروه ۰/۵ میلی‌گرم آلپرازولام، ز: گروه ۱ میلی‌گرم آلپرازولام، ح: گروه ۲ میلی‌گرم آلپرازولام. P: پیش‌هستی، C: کورتیکال آلوئولار، V: ویتلوژنی، GV: وزیکول زایا، LDF: چربی، رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی ۴۰×



الف



ج



ب

شکل ۶: مقطع سلول تخمک در الف: گروه شاهد، ب: گروه عصاره گل ساعتی، ج: گروه آلپرازولام، ZR: زونارادیاتا، TL: لایه تکا، TC سلول‌های تشکیل‌دهنده آن، GL: لایه گرانولوزا، YG: گرانول زرده، YV: وزیکول زرده و C: هسته

بحث

آلپرازولام یکی از رایج‌ترین داروی روان‌گردان است که اغلب برای مدیریت اختلالات ترس و اضطراب تجویز می‌شود (۶). همچنین عصاره گل ساعتی برای کاهش اضطراب و بی‌خوابی بیماران می‌شود (۱۵). لذا هدف از این مطالعه تعیین و مقایسه تأثیر عصاره گیاه گل ساعتی (*Passiflora incarnata L.*) و آلپرازولام بر سطح هورمون‌های جنسی و فراساختار بافت تخمدان در ماهی ماده بالغ گورامی سه خال بود.

بررسی هورمون‌های استروئیدی در این مطالعه نشان داد که تزریق آلپرازولام به‌ویژه در سطوح بالا موجب افزایش معنی‌دار هورمون‌های ۱۷-بتا استرادیول، تستوسترون و ۱۷-هیدروکسی پروژسترون ماهی‌ها نسبت به گروه شاهد و کنترل حلال گردید. در مطالعه بارنه آ و همکاران نیز اثر تحریکی بنزودیازپین در افزایش هورمون ۱۷-بتا استرادیول نشان داده شد و گزارش گردید لیگاندهایی که به بنزودیازپین متصل می‌شوند، تأثیر قابل‌توجهی در ترشح استروئید جفتی دارند (۲۲). آنهولت و همکاران نشان دادند که بنزودیازپین‌ها در غشای خارجی میتوکندری قرار دارد (۲۳). علاوه بر این، در مطالعه جکها و همکاران بیان گردید آنزیم‌های استروئیدوژن که مونوکسیژنازهای وابسته به P-450 هستند نیز در میتوکندری قرار دارند (۲۴)، بنابراین نزدیکی محل اتصال به عامل می‌تواند مبنای عمل بنزودیازپین بر استروئیدزایی باشد. از سوی دیگر،

بنزودیازپین‌ها در بدن اثرات خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های GABA اعمال می‌کنند. وی و همکاران نشان دادند که القای GABA بر سلول‌های گرانولوزای خرگوش موجب افزایش استروژن گردید (۲۵). آلپرازولام سبب اتصال GABA به گیرنده $GABA_A$ شده و به‌عنوان یک آگونیست غیرمستقیم GABA در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر این فارس و همکاران نشان دادند گنادوتروپین‌ها و استروژن که به‌عنوان القاکننده بلوغ فولیکولی شناخته می‌شوند، تراکم گیرنده‌های محیطی بنزودیازپین تخمدان را در موش‌ها افزایش دادند (۲۶) و آلپرازولام از جمله بنزودیازپین‌هایی می‌باشند که به گیرنده‌های محیطی بنزودیازپین متصل می‌شوند، بنابراین افزایش سطح هورمون‌های استروئیدی ماهی‌ها در این مطالعه در گروه آلپرازولام و به‌ویژه بالاترین دوز می‌تواند مرتبط با گیرنده $GABA_A$ و گیرنده‌های محیطی بنزودیازپین در تخمدان ماهی‌ها باشد.

افزایش ترشح هورمون ۱۷-آلفا هیدروکسی پروژسترون تنها در مراحل بلوغ نهایی اووسیت و در حضور ماهی نر رخ می‌دهد و در زمان عدم حضور ماهی نر (مشابه مطالعه حاضر) اکثر اووسیت‌ها تا مرحله ویتلوژنی رشد می‌کنند. با تزریق دوز بالای آلپرازولام به ماهی‌ها، اکثر اووسیت‌ها در مرحله ویتلوژنی قرار گرفته و دوز بالای آلپرازولام سطح هورمون ۱۷-آلفا هیدروکسی پروژسترون را افزایش داد.

یافته دیگر مطالعه حاضر تأثیر عصاره گل ساعتی در دوزهای ۱۰۰-۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر کاهش هورمون ۱۷-بتا استرادیول در ماهی‌ها در مقایسه با گروه‌های شاهد و کنترل حلال بود. رمیلز و همکاران ترکیبات ویتکسین، ایزو-ویتکسین و اورنتین رو به‌عنوان ترکیبات ضد آروماتاز در گل ساعتی شناسایی کردند (۲۷). نتایج مطالعه داوان و گوینگ نشان داد ترکیب شناخته شده دیگری به‌عنوان BZF^(۱) از عصاره متانولی گل ساعتی استخراج می‌شود که دارای یک فعالیت ضد آروماتاز قوی است (۲۸ و ۲۹). ریباس و همکاران و تیلر و همکاران بیان کردند آروماتاز آنزیم کلیدی در رشد و بلوغ تخمدان در ماهی بوده و در بیوسنتز استرادیول تخمدان نقش دارد (۳۱ و ۳۰)، بنابراین به نظر می‌رسد فعالیت ضد آروماتاز عصاره گل ساعتی مانع افزایش هورمون‌های استروئیدی در تخمدان ماهی‌ها گردید.

در تیمارهای عصاره گل ساعتی در مقایسه با گروه‌های شاهد و کنترل بیشتر اوسیت‌ها در مرحله پیش‌هستی و کورتیکال آلونولار و تحت تأثیر دوز عصاره بودند. با توجه به نتایج هورمون‌های استروئیدی و اثر احتمالی ضد آروماتاز (۳۳ و ۳۲، ۹) عصاره گل ساعتی مانع رشد اوسیت‌ها گردید، همان‌طور که بررسی سلول تخمک ماهی‌های تیمار شده با عصاره گل ساعتی در میکروسکوپ الکترونی نیز نشان دهنده آغاز تشکیل لایه گرانولوزا و تکا بودند.

بالاترین نرخ اوسیت‌ها و بهبود رشد و مراحل ویتلوژنز و وزیکول زایا مربوط به تخمدان ماهی‌های تیمار شده با آلپرازولام بود و در بررسی فراساختاری سلول تخمک نیز وزیکول زرده در اوپلاسم مشاهده شد که نشان دهنده اثرات تحریکی آلپرازولام بر رشد اوسیت‌ها بود. آلپرازولام با افزایش هورمون‌های استروئیدی موجب تحریک تخمدان و تکامل مرحله ویتلوژنی شد. در مطالعه لورنزی و همکاران گزارش گردید دوز پایین آلپرازولام موجب بهبود فاز فعال تخم‌گذاری در ماهی‌ها می‌شود (۱۰). هورمون‌های استروئیدی گناد نقش مهمی در کنترل بلوغ دارند (۳۱ و ۳۰). گنادوتروپین‌ها لایه سلولی تکا را برای تولید هورمون تستوسترون تحریک کرده و در ادامه لایه گرانولوزا تولید دیگر هورمون‌های استروئیدی از قبیل ۱۷-بتا استرادیول را بر عهده خواهد داشت که این هورمون استروئیدی به وسیله رگ‌های خونی وارد کبد شده و کبد را برای ویتلوژنز تحریک می‌کند (۳۶-۳۴). هورمون ۱۷-بتا استرادیول بر افزایش غلظت گنادوتروپین سرم و تخمک‌گذاری مؤثر هستند (۳۸ و ۳۷).^۱

با توجه به محدودیت زمانی و مالی، لذا پیشنهاد می‌شود تأثیر آلپرازولام و گیاه گل ساعتی قبل و بعد از لقاح تخمک در ماهی گورامی سه‌خال، مقایسه و بررسی شود.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد آلپرازولام حداکثر تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دارای اثرات تحریکی بر بلوغ تخمدان ماهی گورامی سه خال بوده و موجب افزایش هورمون‌های استروئیدی در آن‌ها گردید. از سوی دیگر عصاره گل ساعتی در دوزهای ۱۰۰-۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر مهاری بر تکامل تخمدان دارد. باتوجه به شباهت محور گنادی در ماهی گورامی سه خال با انسان‌ها، نتایج این مطالعه می‌تواند در مطالعات انسانی مدنظر قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر گرفته از پایان نامه مقطع دکترای حرفه‌ای رشته داروسازی با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1400.449 از دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد، بدین وسیله نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از همه افرادی که در به ثمر رسیدن این تحقیق همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی نمایند.

REFERENCES

1. Lemmer B. The sleep-wake cycle and sleeping pills. *Physiol. Behav* 2007; 90(2-3): 285-93.
2. Bar-Ami S, Fares F, Gavish M. Altered peripheral benzodiazepine receptor density in human granulosa-lutein cells in relation to follicular maturity. *Mol. Cell. Endocrinol* 1991; 82(2-3): 285-91.
3. Fares F, Gavish M. *Biochem. Pharmacol* 1986; 35, 227-230.
4. Souza EB, Anholt RR, Murphy KM, Snyder SH, Kuhar MJ. Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, and testis. *J Endocrinol* 1985; 116(2): 567-73.
5. Fares F, Bar-Ami S, Brandes JM, Gavish M. Gonadotropin-and estrogen-induced increase of peripheral-type benzodiazepine binding sites in the hypophyseal-genital axis of rats. *European J Pharm* 1987; 133(1): 97-102.
6. Yondea Y, Kuriyama K. GABA and endocrine regulation: Relation to neurologic-psychiatric disorders. *J APA* 1984; 6(1): 23-6.
7. Yi SS, Hwang E, Baek HK, Kim TH, Lee HH, Jun HS, Kim SJ. Application of bioactive natural materials-based products on five women's diseases. *J Menopausal Med* 2015; 21(3): 121-5.
8. Silva MS, Desrozier E, Hessler S, Prescott M, Coyle C, Herbison AE, Campbell RE. Activation of arcuate nucleus GABA neurons promotes luteinizing hormone secretion and reproductive dysfunction: Implications for polycystic ovary syndrome. *E Bio Medicine* 2019; 44: 582-96.
9. Shadkhast M, Habibian S, Azadmanesh M. Effects of alprazolam on the follicular development of rat ovaries. *J IJOGI* 2018; 21(3): 15-21.
10. Lorenzi V, Choe R, Schlenk D. Effects of environmental exposure to diazepam on the reproductive behavior of fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environ Toxicol* 2016; 31(5): 561-8.
11. Kroboth PD, Salek FS, Stone RA, Bertz RJ, Kroboth FJ. Alprazolam increases dehydroepiandrosterone concentrations. *J Clin Psychopharmacol* 1999; 19(2): 114-24.
12. Cabrita E, Robles V, Herráez P. *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*. Florida, Boca Raton. CRC press; 2008; 25.
13. Lovick TA, Zangrossi Jr H. Effect of estrous cycle on behavior of females in rodent tests of anxiety. *J Front Psychiatry* 2021; 12: 1-20.
14. Bone Q, Moore R. *Biology of fishes*. Taylor & Francis: London; 2008: 278-80.
15. Gazola R, Borella MI. Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male *Pacu Piaractus mesopotamicus* (Cypriniforms, Characidae). *Braz J Med Biol* 1997; 30: 1485-7.
16. Patel SS, Saleem TM, Ravi V, Shrestha B, Verma NK, Gauthaman K. *Passiflora incarnata* Linn: A phytopharmacological review. *Int J Green Pharm* 2009; 3(4): 277-80.
17. Fonseca LR, Rodrigues RD, Ramos AD, da Cruz JD, Ferreira JL, Silva JR, et al. Herbal medicinal products from *Passiflora incarnata* for anxiety: An unexploited potential. *The Sci World J* 2020; 1-18.
18. Janda K, Wojtkowska K, Jakubczyk K, Antoniewicz J, Skonieczna-Żydecka K. *Passiflora incarnata* in neuropsychiatric disorders—A Systematic Review. *J Nutr* 2020; 12(12): 3894.
19. Miyasaka LS, Atallah AN, Soares B. *Passiflora incarnata* for anxiety disorder. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007; 1: CD004518.
20. Guerrero FA, Medina GM. Effect of a medicinal plant (*Passiflora incarnata* L) on sleep. *J Sleep Sci.* 2017; 10(3): 96.
21. Appel K, Rose T, Fiebich B, Kammler T, Hoffmann C, Weiss G. Modulation of the γ -aminobutyric acid (GABA) system by *Passiflora incarnata* L. *J Phytother Res* 2011; 25(6): 838-43.
22. Barnea ER, Fares F, Gavish M. Modulatory action of benzodiazepines on human term placental steroidogenesis in vitro. *J Mol Cell Endocrinol* 1989; 64(2): 155-9.
23. Anholt RR, Aebi U, Pedersen PL, Snyder SH. Solubilization and reconstitution of the mitochondrial benzodiazepine receptor. *J Biochem* 1986; 25(8): 2120-5.

24. Juchau MR, Namkung MJ, Rettie AE. P-450 cytochromes in the human placenta: oxidations of xenobiotics and endogenous steroids. JBCPP 1987; 235-63.
25. Wei Z, Jiang N, Longqing C, Hui Z, Jinghua W, Limin Z. Effect of inhibitory and excitatory amino acid on the production of estrogen and progesterone by granulosa cells of Rabbits in vitro. JBMSC 1999; 19(6): 49-52.
26. Fares F, Bar-Ami S, Brandes JM, Gavish M. Gonadotropin-and estrogen-induced increase of peripheral-type benzodiazepine binding sites in the hypophyseal-genital axis of rats. Eur J Pharmacol 1987; 133(1): 97-102.
27. Ramírez E, López-Cardiel J, Lezama C, García-Márquez L, Borja-Gómez I, Tintos-Gómez A. Effect of *Passiflora incarnata* (L) extract on gonadal maturation in young tilapia (*Oreochromis sp.*). Lat Am J Aquat Res 2017; 45(5): 908-14.
28. Dhawan K, Sharma A. Restoration of chronic- Δ 9-THC-induced decline in sexuality in male rats by a novel benzoflavone moiety from *Passiflora incarnata* Linn. Br J Pharmacol 2003; 138(1): 117-20.
29. Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang CF. Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. Gen Comp Endocrinol 2010; 165(3): 352-66.
30. Ribas L, Flos R, Reig L, MacKenzie S, Barton BA, Tort L. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: stress responses and final product quality. J Aquac 2007; 269(1-4): 250-8.
31. Tyler CR, Sumpter JP. Oocyte growth and development in teleosts. J Rev Fish Biol Fish 1996; 6(3): 287-318.
32. Gazola R, Borella MI. Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). Braz J Med Biol 1997; 30: 1485-7.
33. Ramírez E, López-Cardiel J, Lezama C, García-Márquez L, Borja-Gómez I, Tintos-Gómez A. Effect of *Passiflora incarnata* (L) extract on gonadal maturation in young tilapia (*Oreochromis sp.*). Lat Am J Aquat Res 2017; 45(5): 908-14.
34. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 1963; 17(1): 208.
35. George TT, Tripp J. Alprazolam. In: Stat Pearls. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2022; 2.
36. Giordano R, Berardelli R, Karamouzisl, D'Angelo V, Picu A, Zichi C, Fussotto B, et al. Acute administration of alprazolam, abenzodiazepine activating GABA receptors, inhibits cortisol secretion in patients with subclinical but not overt Cushing's syndrome. Pituitary 2013; 16(3): 363-9.
37. Noaksson E, Gustavsson B, Linderöth M, Zebühr Y, Broman D, Balk L. Gonad development and plasma steroid profiles by HRGC/HRMS during one reproductive cycle in reference and leachate-exposed female perch (*Perca fluviatilis*). Toxicol Appl Pharmacol 2004; 195(2): 247-61.
38. Khodadoust A, Imanpoor MR, Zadeh VT, Khara H, Rahbar M, Rasta M. Study on levels of sex steroid hormones of pike (*Esox lucius* Linnaeus, 1758) in Anzali wetland. Glob Vet 2013; 10(3): 354-9.

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*)

Barzegari N¹, Naji T^{1*}, Hosseinzadeh Sahafi H²

¹Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran, ²Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural research, Education and Promotion Organization, Tehran, Iran.

Received: 20 Sep 2022 Accepted: 28 Jan 2023

Abstract

Background & aim: Worldwide, the use of benzodiazepines as hypnotics and sedatives is on the rise. Alprazolam and passion flower (*Passiflora incarnata* L.) produce calming and sleep-inducing by affecting GABA, which is one of the known neurotransmitters of the brain. There are findings indicating that GABA has been found in the body's endocrine glands, including the ovary. In this research, due to the similarity of the endocrine reproductive control system of fish to humans and having the hypothalamus-pituitary-gonadal axis the comparison of the effects of the gabanergic drug alprazolam and the passion flower on the ovarian tissue of three-spotted gourami fish was chosen as the target.

Methods: In the present basic-experimental study carried out in 2022, 120 pieces of *Trichogaster trichopterus* with an average weight of 3 ± 0.5 g were purchased from ornamental fish farm in Hamedan, Iran. The pieces were divided into eight groups of 15, which included the intact control group, the solvent control group, three treatment groups which received Alprazolam with a dose of 0.5, 1 and 2 mg/kg and three treatment groups receiving *Passiflora incarnata* extract with doses of 25, 50, and 100 mg/kg. A dose of 0.02 ml of the drug was injected intramuscularly between the dorsal fin and the lateral line every other day for 10 times, over a period of 20 days. Finally, the fish were euthanized and dissected. The ovaries of the fish were isolated and examined with optical and electron microscope, and ELIZA kit was used to measure steroid hormones from tissue fluids. The data were analyzed using SPSS²² software and statistical methods of one-way ANOVA and Duncan at the level of $p \leq 0.05$.

Findings: According to the obtained results, alprazolam up to a maximum concentration of 100 mg/kg had stimulating effects on the maturation of the ovaries of *Trichogaster trichopterus* and caused an increase in steroid hormones in them. On the other hand, evening primrose extract has an inhibitory effect on ovarian development in doses of 25-100 mg/kg.

Conclusion: According to the results, alprazolam was probably a stimulant of gonadal development, while extract of *Passiflora incarnata* inhibited it.

Key words: Alprazolam, Ovary, *Passiflora incarnata*, Steroid hormones, *Trichogaster trichopterus*.

*Corresponding author: Naji T, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email: tnaji2002@gmail.com

Please cite this article as follows: Barzegari N, Naji T, Hosseinzadeh Sahafi H. 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*). Armaghane-danesh 2022; 28(2): 157-170.