

بررسی تأثیر ملاتونین و مهارکننده انتخابی باز جذب سروتونین داروی سیتالوپرام بر فراساختار بافت کبد و آنزیم‌های کبدی در ماهی ماده بالغ گورامی سه خال

محمد رضا پورعوض^۱، دکتر طاهره ناجی^۲، دکتر همایون حسین زاده صحافی^۳

۱- دانشجوی دکتری داروسازی، گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. نویسنده مسئول:

tnaji2002@gmail.com

۳- استاد تمام، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: اکثر داروهای گوناگونی که به منظور درمان بیماری‌های مختلف به کار می‌روند، در کبد متابولیزه می‌شوند و می‌توانند موجب آسیب‌های حاد و مزمن به بافت کبد شوند. هدف مطالعه حاضر بررسی تأثیر ملاتونین و مهارکننده انتخابی باز جذب سروتونین داروی سیتالوپرام بر فراساختار بافت کبد و آنزیم‌های کبدی در ماهی ماده بالغ گورامی سه خال می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی گورامی سه خال ماده با میانگین وزنی $4/23 \pm 0/7$ گرم به هشت گروه ۱۵ تایی شامل گروه کنترل شاهد، کنترل حلال، سه گروه تیماری دریافت‌کننده داروی سیتالوپرام با دوز ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و سه گروه تیماری دریافت‌کننده داروی ملاتونین با دوز ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. تزریق داروها در هر نوبت ۰/۰۲ میلی‌لیتر یک روز در میان تا ۱۰ تزریق، در مدت ۲۰ روز به صورت عضلانی بین باله پشتی و خط جانبی انجام گرفت. پس از پایان دوره ماهی‌ها یوتانازی و تشریح شدند.

نتایج: نتایج نشان داد ملاتونین و سیتالوپرام بر سطح همه آنزیم‌های کبدی در مقایسه با گروه‌های کنترل تأثیر معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). بالاترین سطح آنزیم‌های ALT، AST و ALP با تزریق ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سیتالوپرام اندازه‌گیری شد ($P < 0/05$). در ماهی‌های تیمار شده با بالاترین غلظت ملاتونین و همه غلظت‌های سیتالوپرام از هم گسستگی بین هپاتوسیت‌ها و اتساع سینوزوئیدها رخ داد. در غلظت‌های بالای ملاتونین و سیتالوپرام واکوئل‌های چربی تشکیل شدند؛

نتیجه‌گیری: ملاتونین می‌تواند در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و سیتالوپرام در غلظت‌های بالاتر از ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر فراساختار بافت کبد و آنزیم‌های کبدی تأثیر سوء داشته باشد.

کلمات کلیدی: ملاتونین، سیتالوپرام، بافت کبد، آنزیم‌های کبدی، ماهی گورامی سه خال

مقدمه

کبد بزرگترین اندام با عملکردهای سنتز و ترشح است و از هپاتوسیت ها، کلاژیوسیت ها، سلول های کوپفر، سلول های اندوتلیال سینوسی، سلول های ستاره ای کبدی و سلول های دندریتیک و غیره تشکیل شده است (۳۵). بیماری کبد چرب غیرالکلی وضعیتی است که با تجمع بیش از حد چربی به شکل تری گلیسرید در کبد (بیش از ۵ درصد از سلول های کبدی از نظر هیستولوژی) تعریف می شود و اخیراً به عنوان یک بیماری اصلی کبد در سراسر جهان شناخته شده است (۲۴).

هدف اثرات نامطلوب بسیاری از داروها کبد است زیرا دارای بزرگترین منبع خون و آنزیم های متابولیزه کننده است (۱۴). آسیب کبدی ناشی از دارو چهارمین علت اصلی آسیب کبدی در کشورهای غربی، به دلیل افزایش در دسترس بودن و تجویز دارو است (۳۰). علیرغم شیوع کم آن در جمعیت عمومی، آسیب کبدی ناشی از دارو یکی از علل شایع نارسایی حاد کبدی است. به این ترتیب، امکان آسیب کبدی ناشی از دارو باید در تمام بیمارانی که با آسیب حاد کبدی، مستقل از هر بیماری شناخته شده قبلی کبدی مراجعه می کنند، در نظر گرفته شود (۱۷). آسیب کبدی ناشی از دارو را می توان به عنوان سلول های کبدی، کلاستاتیک یا مختلط طبقه بندی کرد. آسیب سلولی کبدی با تیتراهای غیرطبیعی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) سرم با افزایش اندک یا بدون افزایش در تیترا آلکالین فسفاتاز (ALP) مشخص می شود. آسیب کبدی کلاستاتیک با تیتراهای بالای ALP سرم همراه با سطح کمی بالاتر از سطح ALT طبیعی مشخص می شود. در موارد آسیب مختلط، هر دو سطح ALT و ALP به طور غیرطبیعی بالا هستند (۳۳).

ملاتونین که به عنوان N-استیل-۵-متوکسی تریپتامین نیز شناخته می شود، از غده پینه آل ترشح شده و در تنظیم عملکردهای فیزیولوژیکی از جمله ارتقای خواب

وریتیم هایشبانه روزی شرکت می کند (۳). علاوه بر این، ملاتونین اثرات تنظیمی مختلفی بر رفتار جنسی، عملکرد سیستم ایمنی، متابولیسم انرژی، سیستم قلبی عروقی، سیستم تولیدمثل و سیستم عصبی روانی نشان داده است (۲۶) و (۳۲). ملاتونین همچنین فعالیت های ضد سرطانی و ضد آرتروز دارد. علاوه بر این، ملاتونین دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی و خواص محافظتی در برابر استرس اکسیداتیو است (۸ و ۲۱). پیش ساز اولیه سنتز ملاتونین اسید آمینه، تریپتوفان می باشد که پس از ورود تریپتوفان به صورت فعال به سلول های پینه آل توسط آنزیم تریپتوفان هیدروکسیلاز به ۵-هیدروکسی تریپتوفان تبدیل شده و به وسیله آروماتیک آمینو اسید دکربوکسیلاز به ۵-هیدروکسی تریپتامین و سپس به وسیله N استیل ترانسفراز به سروتونین تبدیل می شود. سروتونین در طول روز تولید می شود و بعد از شروع تاریکی به دلیل آزاد شدن از سلول های پینه آل کاهش می یابد. سروتونین نیز از طریق هیدروکسی ایندول - متیل ترانسفراز به ملاتونین تبدیل می شود (۱۳). در سال های اخیر، مکمل های ملاتونین برای درمان انواع اختلالات خواب رایج شده اند و اکنون به عنوان یکی از محبوب ترین مکمل های رتبه بندی شده شناخته می شود. محبوبیت آن تا حدی ناشی از تصویر آن به عنوان یک جایگزین طبیعی برای داروهای خواب سنتی است. با این حال، این بدان معنا نیست که مکمل های ملاتونین بی ضرر هستند (۲۷). گرچه مطالعات انجام شده اثرات ملاتونین در دوزهای کمتر از ۱۰ را بر کبد بررسی کرده اند (۲، ۷، ۲۸ و ۳۶) اما مطالعات محدودی در بررسی دوزهای بالای ملاتونین در دسترس است.

داروهای ضدافسردگی معمولاً در مدیریت افسردگی، اختلالات اضطرابی و سایر بیماری های روانپزشکی تجویز و استفاده می شوند. داروهای ضدافسردگی مورد استفاده در محدوده دوز درمانی با ایجاد چندین واکنش نامطلوب دارویی از جمله سمیت کبدی مرتبط هستند (۱۲).

دمای آکواریوم‌ها در محدوده ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد و pH آب نیز ۷/۵ اندازه‌گیری شد.

ماهی‌ها به‌طور تصادفی در ۸ گروه شامل کنترل شاهد، کنترل سیتالوپرام با دوز ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و سه گروه تیماری دریافت‌کننده سیتالوپرام با دوز ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم‌بندی شدند. داروی ملاتونین از شرکت تهران دارو با بیچ نامبر MeLA201.22 NH و داروی سیتالوپرام از شرکت داروسازی تهران شیمی با بیچ نامبر CTH0030997 تهیه شد. 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.

تزریق ماهی‌ها در ۱۰ نوبت و به‌صورت یک روز در میان به مدت ۲۰ روز انجام شد. قبل از تزریق، هر ماهی به مدت ۳۰ تا ۴۰ ثانیه در محلول عصاره میخک رقیق‌شده با آب مقطر قرار گرفت تا به‌طور نسبی تعادل و هوشیاری خود را از دست دهد. در هر نوبت ۰/۰۲ میلی‌لیتر دارو به‌صورت داخل عضله‌ای در محلی بین خط جانبی ماهی و عضله پشتی با سرنگ انسولین BD با زاویه ۳۰ درجه تزریق شد. پس از اتمام تزریق‌ها، به مدت ۲ روزهیج فعالیتی بر روی ماهی‌ها صورت نگرفت و پس از آن تشریح شدند. میزان تغییرات آنزیم‌های کبدی شامل ALP، ALT و AST با کیت مخصوص اندازه‌گیری شد. به‌منظور بررسی تغییرات بافت کبد با میکروسکوپ نوری و الکترونی بافت کبد تیمارهای مختلف به ترتیب در فیکساتیوهای فرمالین ۱۰٪ و گلو تارآلدهید ۲/۵٪ قرار داده شد. سپس مقاطع تهیه شده از بافت کبد توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی در آزمایشگاه بررسی شد. شاخص کبدی (هپاتوسوماتیک) از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

مهارکننده‌های انتخابی باز جذب سروتونین (SSRIs) به‌طور گسترده در درمان اختلالات افسردگی اساسی، مانند اختلالات وسواس فکری، اختلالات اضطرابی، اختلالات هراس و اختلال استرس پس از سانحه استفاده می‌شوند (۱۸). سیتالوپرام به‌عنوان داروهای خط اول در بیماران مسن یا دارای بیماری‌های مزمن به دلیل کمترین پتانسیل آن‌ها برای تداخلات دارویی انتخاب می‌شود. سیتالوپرام توسط آنزیم‌های CYP2C19، CYP2D6 و CYP3A4 به دسمتیل سیتالوپرام S/R در کبد متابولیزه می‌شود (۳۰).

درک آسیب کبدی ناشی از داروها و نظارت بر ایمنی دارو در بهینه‌سازی نتایج درمانی و تجویز داروی با عوارض جانبی کمتر ضروری است. در این مطالعه تأثیر ملاتونین و مهارکننده انتخابی باز جذب سروتونین داروی سیتالوپرام بر آسیب کبدی در ماهی ماده بالغ گورامی سه‌خال بررسی شد. برای این منظور، سطوح سرمی AST، ALT و ALP پس از تزریق ملاتونین و سیتالوپرام به مدت ۲۰ روز تعیین شد. علاوه بر این، بافت کبدی ماهی‌ها از نظر هیستوپاتولوژیکی به‌عنوان بیومارکر آسیب کبدی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش کار

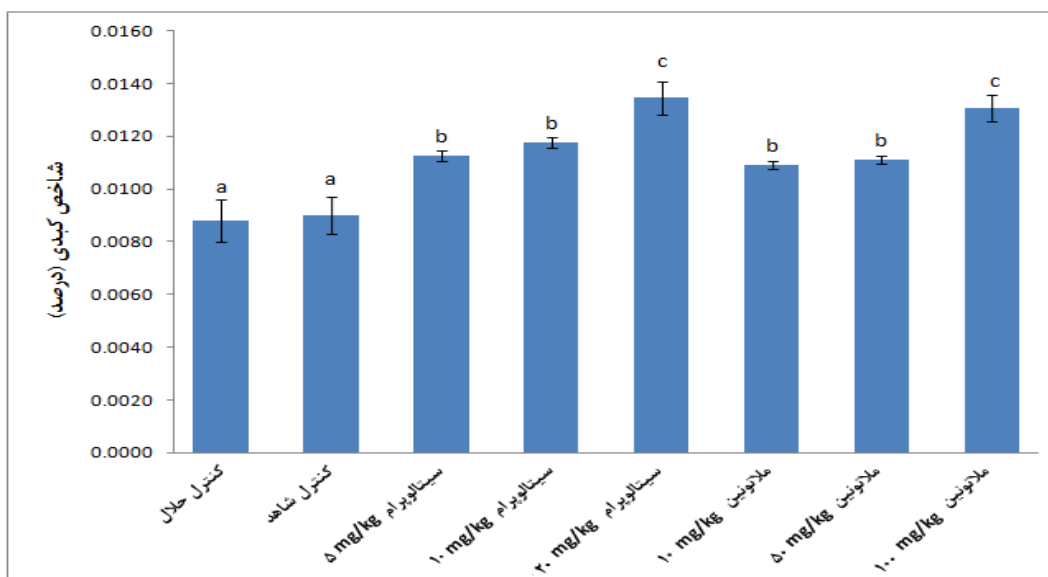
این مطالعه در شهریورماه ۱۴۰۰ در آزمایشگاه آبیان دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی انجام شد. مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1401.411 تصویب گردید. تعداد ۱۲۰ ماهی گورامی سه‌خال ماده با میانگین وزنی ۰/۷ \pm ۴/۲۳ گرم از یک کارگاه پرورش ماهی در قزوین خریداری شدند. تعداد دوازده آکواریوم با ابعاد ۶۰×۴۰×۳۰ سانتی‌متر مکعب تهیه و پس از آبگیری و قبل از رهاسازی ماهیان، کلرزدایی و اتصال پمپ‌های هوا آماده‌سازی گردید. پس از ورود ماهیان به آکواریوم‌ها ۴۸ ساعت در شرایط ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد به آن‌ها مهلت داده شد تا با محیط سازگار شوند. ماهیان یک روز در میان با غذای استاندارد تغذیه شدند.

$$HSI(\%) = \frac{\text{وزن کبد}}{\text{وزن بدن}} \times 100$$

بررسی شاخص هیپاتوسوماتیک: نتایج شکل ۱ نشان دهنده تفاوت معنی دار در شاخص کبدی در گروه‌های تحت تیمار نسبت به تیمارهای کنترل می‌باشد ($P < 0.0001$). تفاوت معنی داری در تزریق دوز کم و متوسط سیتالوپرام با همه دوزهای ملاتونین مشاهده نشد ($P > 0.05$) و دوز بالای سیتالوپرام بالاترین شاخص کبدی را داشت.

تمام آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۲ تجزیه و تحلیل شدند. از آنالیز تجزیه واریانس یک‌طرفه (OneWayANOVA) و آزمون توکی برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. در همه آزمون‌ها $p \leq 0.05$ معنی دار تلقی گردید.

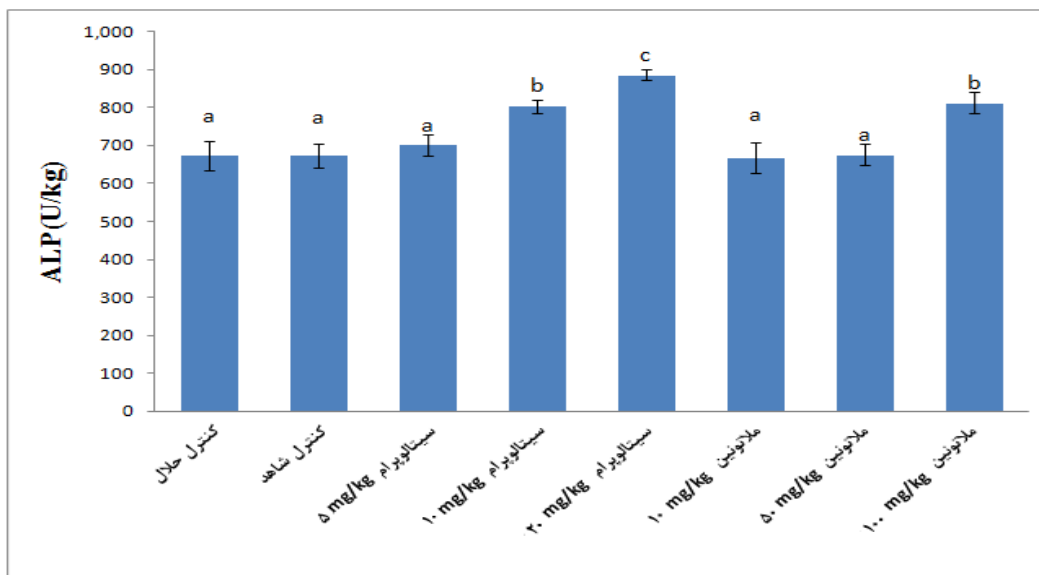
یافته‌ها



شکل ۱- مقایسه شاخص کبدی در گروه‌های تحت تیمار و کنترل حروف متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف در سطح $P \leq 0.05$ می‌باشد.

معنی دار آنزیم ALP نسبت به تیمار کنترل دیده شد ($P < 0.05$). تزریق دوز متوسط سیتالوپرام و دوز بالای ملاتونین بر تغییر آنزیم ALP تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0.05$) و بالاترین ALP در دوز ۲۰ میلی‌گرم سیتالوپرام دیده شد ($P < 0.05$).

بررسی شاخص آنزیم ALP: تفاوت معنی دار در آنزیم ALP میان گروه‌های تحت تیمار و کنترل مشاهده شد ($P < 0.05$). تزریق دوزهای کم و متوسط ملاتونین در مقایسه با تیمارهای کنترل تفاوت معنی داری نداشتند اما در همه دوزهای سیتالوپرام و بالاترین دوز ملاتونین افزایش

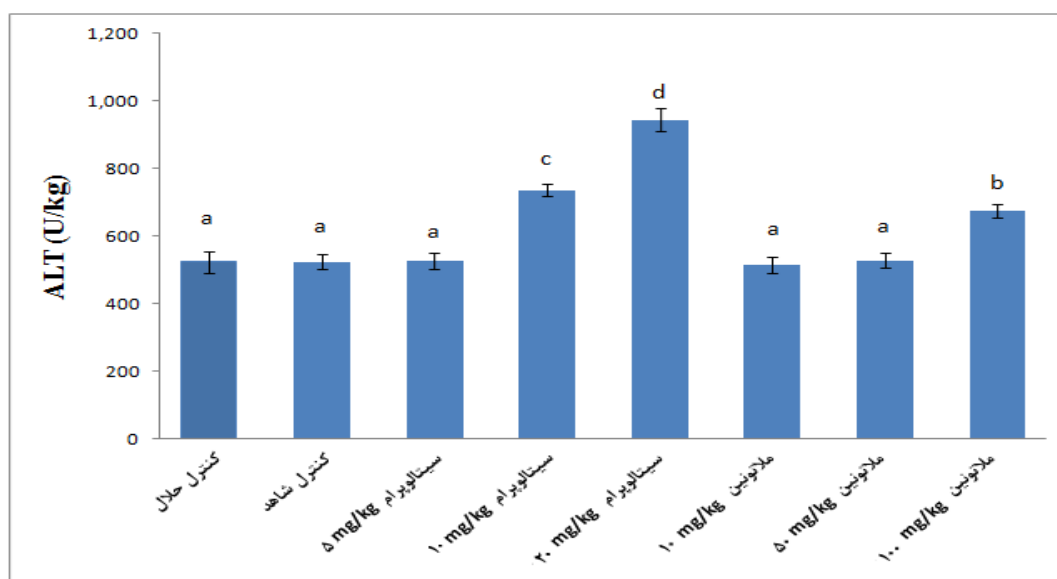


شکل ۲- مقایسه آنزیم ALP در گروه‌های تحت تیمار و کنترل

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح $P \leq 0.05$ می‌باشد.

نداشت ($P > 0.05$) اما در دوزهای متوسط و بالای سیتالوپرام و دوز بالای ملاتونین افزایش معنی‌دار آنزیم ALT نسبت به تیمار کنترل مشاهده شد ($P < 0.05$). بالاترین سطح آنزیم ALT در دوز ۲۰ میلی‌گرم سیتالوپرام دیده شد (شکل ۳).

بررسی شاخص آنزیم ALT: تزریق سیتالوپرام و ملاتونین موجب تغییر معنی‌دار در آنزیم ALT ماهی‌ها گردید ($P < 0.05$). تفاوت معنی‌داری در تزریق دوزهای کم و متوسط ملاتونین و دوز کم سیتالوپرام با تیمارهای کنترل وجود

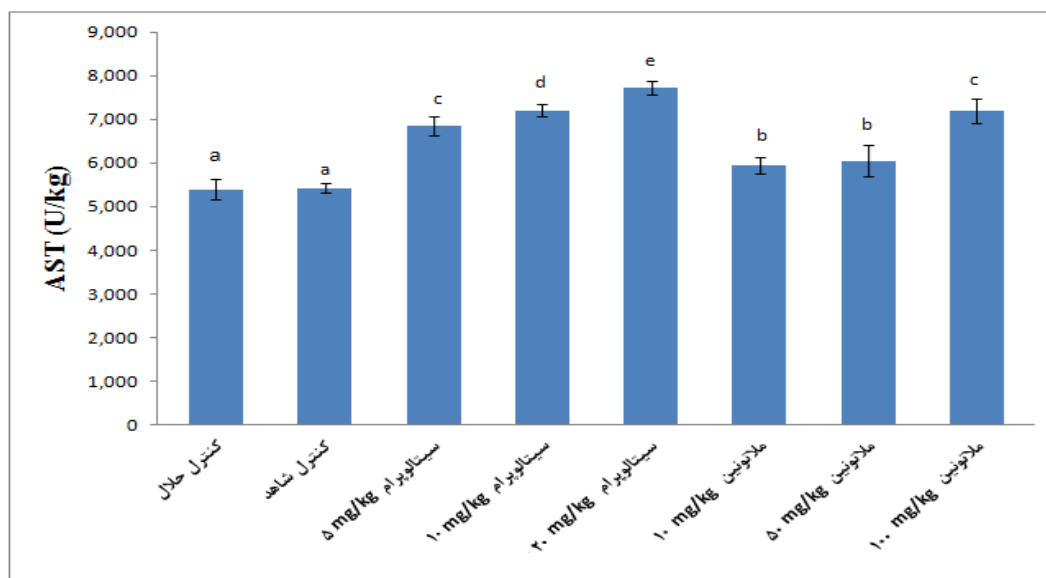


شکل ۳- مقایسه آنزیم ALT در گروه‌های تحت تیمار و کنترل

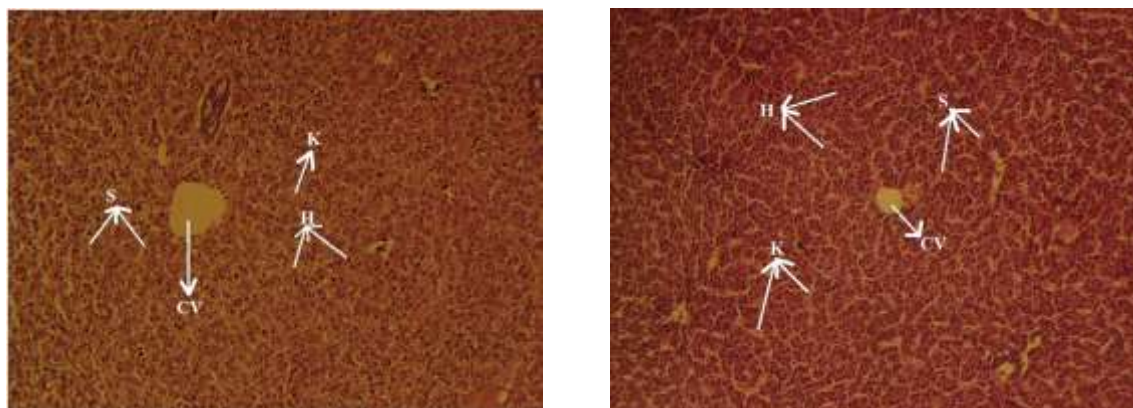
حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح $P \leq 0.05$ می‌باشد.

AST بیشتر از ملاتونین بود و در دوز بالای سیتالوپرام بالاترین سطح آنزیم AST اندازه‌گیری شد (شکل ۴).

بررسی شاخص آنزیم ALT: مقایسه آنزیم AST میان گروه‌های تحت تیمار و کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$). تأثیر داروی سیتالوپرام در افزایش آنزیم کبدی



شکل ۴- مقایسه آنزیم AST در گروه‌های تحت تیمار و کنترل حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح $P \leq 0.05$ می‌باشد.



ب

الف

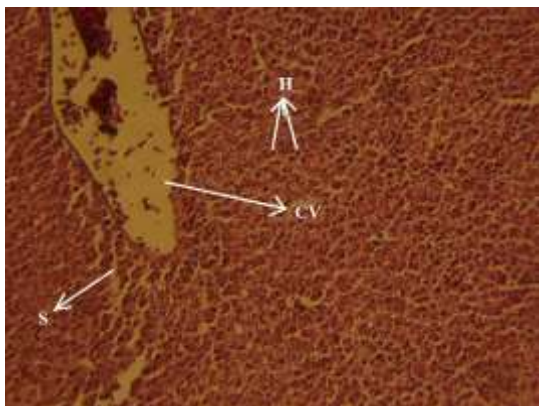
شکل ۵- مقطع کبد ماهی الف: گروه کنترل شاهد، ب: گروه کنترل حلال
 H^۱: هپاتوسیت، S^۲: سینوزوئید، K^۳: سلول کوپفر، CV^۴: ورید مرکزی
 رنگ آمیزی H&E با بزرگنمایی ۴۰×

¹ Hepatocyte

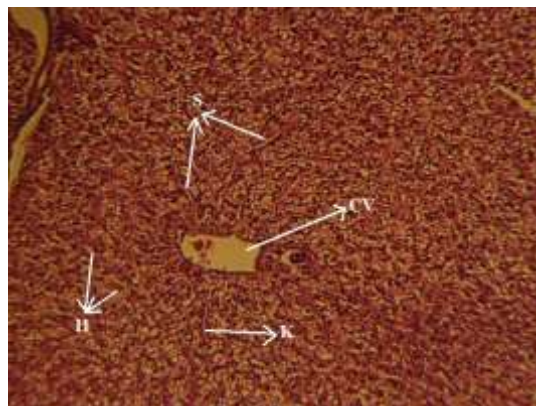
² Sinusoid

³ kupffer cell

⁴ Central vein



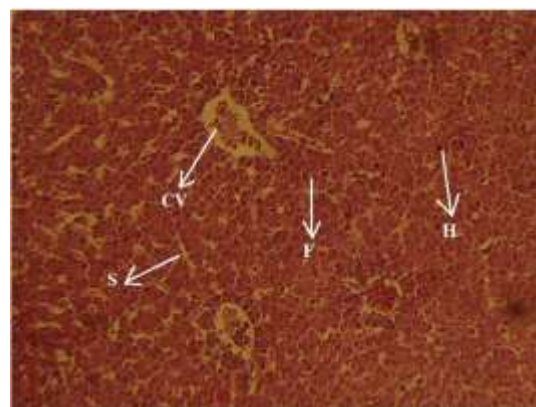
د



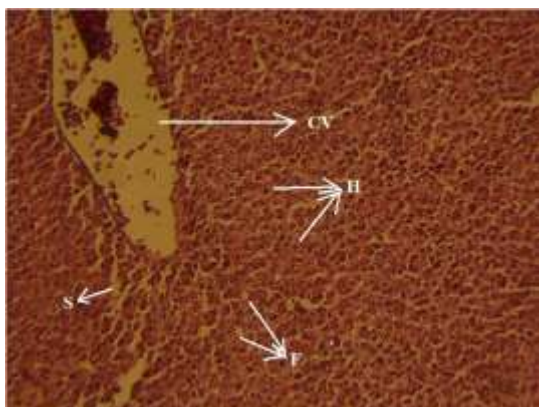
ج



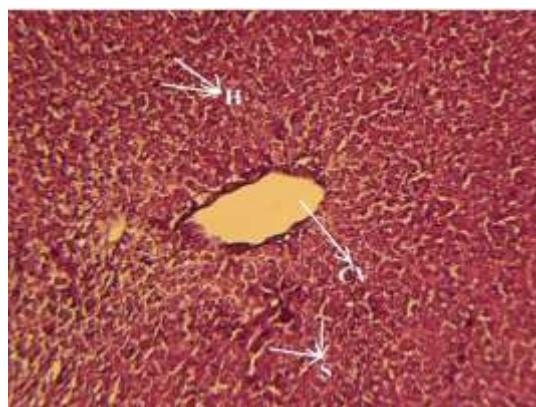
و



هـ



ح



ز

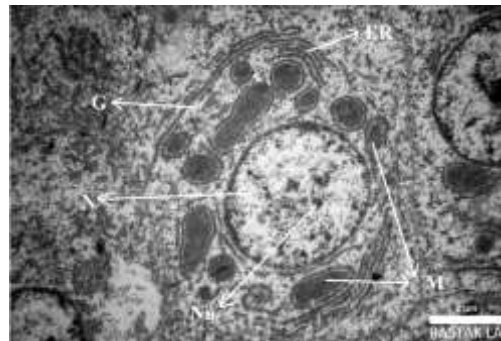
شکل ۶- مقطع کبد ماهی. ج) تیمار سیتالوپرام ۵ mg/kg، د) تیمار سیتالوپرام ۱۰ mg/kg و هـ) تیمار سیتالوپرام ۲۰ mg/kg (و) تیمار ملاتونین ۱۰ mg/kg، ز) تیمار ملاتونین ۵۰ mg/kg و ح) تیمار ملاتونین ۱۰۰ mg/kg
 H: هپاتوسیت، S: سینوزوئید، K: سلول کوپفر، CV: ورید مرکزی، F^۱: سلول چربی
 رنگ آمیزی H&E با بزرگنمایی ۴۰×

^۱Fat cell

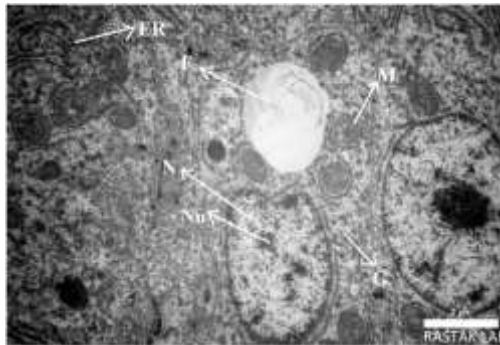
بافت‌شناسی کبد با میکروسکوپ نوری:

در گروه کنترل شاهد و گروه کنترل حلال (شکل ۵، الف)، هپاتوسیت‌ها دارای هسته مرکزی و سیتوپلاسم مشخص بوده و شکل نرمالی داشتند. در این تیمارها هیچ توده چربی دیده نشد و کبد دارای نمای طبیعی بود. تغییرات در بافت کبد وابسته به دوز تزریق سیتالوپرام بود. در تیمار با تزریق 5mg/kg سیتالوپرام، سلول‌ها همانند گروه‌های کنترل دارای ظرفیت کبدی نرمال بودند (شکل ۶، ج). در دوز 10mg/kg سیتالوپرام گسستگی بین هپاتوسیت‌ها و اتساع سینوزئیدها مشاهده شد اما بافت چربی دیده نشد (شکل ۶، د). بررسی بافت کبد در دوز 20mg/kg سیتالوپرام گسستگی بین

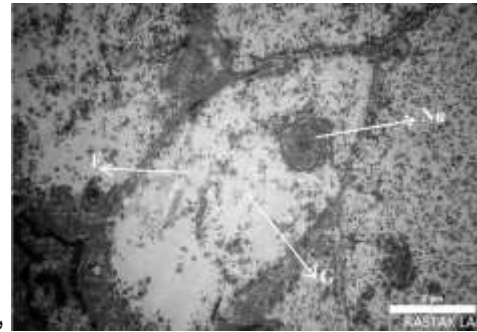
هپاتوسیت‌ها را نشان داد. همچنین فاصله گسترده بین سلول‌ها و اتساع سینوزئیدها افزایش یافته بود و گشادی و تغییرات در ورید مرکزی قابل مشاهده بود (شکل ۶، ه). بررسی تصاویر میکروسکوپ نوری در تیمارهای ملاتونین نشان داد در دوز 10mg/kg ملاتونین و دوز 50mg/kg ملاتونین سلول‌ها همانند گروه کنترل بودند و حدود سلولی مشخص و از یک ظرفیت کبدی نرمال برخوردار بودند (شکل ۶، و، ز). در دوز 100mg/kg از هم گسستگی بین هپاتوسیت‌ها رخ داد و اتساع سینوزئیدها دیده شد. علاوه بر گسستگی‌های متعدد سینوزئیدها، واکوئل‌های چربی دیده شد و گشادی و تغییر ورید مرکزی قابل مشاهده بود.



الف



ج



ب

شکل ۷- مقطع سلول کبد در الف: گروه کنترل، ب: گروه سیتالوپرام 20mg/kg ، ج: گروه ملاتونین 100mg/kg .
Scale Bare: $2\ \mu\text{m}$ چربی F^1 ، واکوئل چربی F^1 ، شبکه آندوپلاسمی، ER^2 ، گلیکوژن، G^3 ، میتوکندری، M^4 ، هستک، Nu^2 ، هسته، (N^1)

- ¹ Nucleus Cell
- ² Nucleolus
- ³ Mitochondrion
- ⁴ Glycogen
- ⁵ Endoplasmic Reticulum
- ⁶ Fat

بافت‌شناسی کبد با میکروسکوپ الکترونی:

سلول کبد به ترتیب در گروه‌های کنترل، دوز بالای سیتالوپرام و دوز بالای ملاتونین در شکل ۷ نشان داده شده است. در (شکل ۷، الف) که مربوط به تیمار کنترل می‌باشد، حالت نرمال سلول قابل مشاهده است. هپاتوسیت‌ها دارای هسته گرد و غشا پیوسته و سالم می‌باشند. میتوکندری‌ها و اندامک‌های سلولی قابل مشاهده بودند. در (شکل ۷، ب) که مربوط به تیمار سیتالوپرام می‌باشد، اختلال قابل توجهی در هپاتوسیت‌ها دیده می‌شود. سلول تحت تأثیر قرار گرفته و ظاهر خود را از دست داده است. دستگاه گلژی مشاهده نمی‌شود. ذرات گلیکوژن و سیتوپلاسم پراکنده شده و تعداد میتوکندری‌ها کاهش یافته و کاملاً آشفته‌گی در اندامک‌های سلول دیده می‌شود. ضایعات چربی در سلول مشاهده می‌شود. در (شکل ۷، ج) آثار تخریب سلول ناشی از تزریق ملاتونین قابل مشاهده است. هسته و غشا سلولی از حالت نرمال خارج شده است. گرچه ذرات گلیکوژن مشاهده می‌شوند اما میتوکندری‌ها تضعیف شده‌اند و شبکه آندوپلاسمی انسجام خود را از دست داده است. واکوئل‌های چربی در سلول شکل گرفته‌اند.

بحث

در این مطالعه اثرات داروی سیتالوپرام و ملاتونین بر کبد ماهی گورامی سه‌خال مقایسه گردید. نتایج نشان داد در تیمارهای سیتالوپرام و ملاتونین افزایش معنی‌دار شاخص کبدی در مقایسه با تیمارهای کنترل دیده شد و بیشترین شاخص کبدی در بالاترین دوز سیتالوپرام (۲۰ mg/kg) تعیین گردید. تغییرات نسبت وزن هر یک از ارگان‌ها به بدن ممکن است نشانه‌ای از انقباض یا التهاب سلولی باشد. انقباض در آن ارگان می‌تواند به علت از دست دادن مایع بافتی یا سلولی رخ

دهد؛ در حالی که افزایش وزن هر ارگان به بدن می‌تواند نشان دهنده التهاب باشد (۴)؛ بنابراین افزایش شاخص کبدی در ماهی‌های تیمار شده و به‌ویژه سیتالوپرام، نشان دهنده التهاب سلول‌های کبدی است.

در مطالعه حاضر تأثیر داروهای ملاتونین و سیتالوپرام بر آسیب کبدی با تغییر آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP نشان داده شد. به‌طور کلی تزریق سیتالوپرام در افزایش آنزیم‌های کبدی مؤثرتر از ملاتونین بود. اثرات تخریبی تزریق داروها به‌ویژه سیتالوپرام بر کبد وابسته به دوز بود، به‌طوری‌که تزریق سیتالوپرام در بالاترین دوز (۲۰ mg/kg) به‌طور معنی‌داری آنزیم‌های ALT، AST و ALP را در کبد ماهی افزایش داد. سطوح کم و متوسط ملاتونین (۱۰ mg/kg و ۵۰ mg/kg) کمترین تأثیر را بر آنزیم‌های کبدی ALP و ALT داشتند.

اگرچه سیتالوپرام عنوان مهارکننده انتخابی باز جذب سروتونین (SSRI) به‌طور گسترده در حل اختلالات افسردگی اساسی و مشکلات اضطرابی استفاده می‌شود اما مطالعه حاضر نشان داد سیتالوپرام دارای سمیت کبدی است و نتایج مشابه با مطالعه حاضر توسط سایر محققان نیز گزارش شده است. Ahmadian و همکاران (۲۰۱۷) با سنجش عملکرد آنزیم‌های کبدی (ALT، AST و GGTP) در کبد موش صحرائی آسیب ناشی از سیتالوپرام (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را تأیید کردند (۵). در یک مطالعه انسانی با تجویز ۲۰ mg/kg سیتالوپرام در روز برای درمان افسردگی، بعد از ۸ هفته تغییر در سطح آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP دیده شد (۱۹). سمیت کبدی سیتالوپرام در مطالعه حاضر ممکن است ناشی از خطر اکسیداتیو باشد که منجر به ارتباط سمی میتوکندری/لیزوزومی و اختلالات در نشانگرهای

تخریب سلول‌های کبد افزایش یافت و واکوئل‌های چربی دیده شد که نشان دهنده شروع کبد چرب بود. این تغییرات در تصاویر میکروسکوپ الکترونی به‌وضوح دیده شد به‌طوری‌که در دوزهای بالای سیتالوپرام و ملاتونین سلول ظاهر خود را از دست داد و کاملاً آشفته‌گی در اندامک‌های سلول دیده شد. غشای سلولی تخریب شد و تعداد میتوکندری‌ها کاهش و واکوئل‌های چربی افزایش یافت. سایر محققان نیز، مشابه با مطالعه حاضر در ارزیابی بافت کبد تحت تأثیر سیتالوپرام، تخریب سلولی را گزارش کردند. Mohammadi و همکاران (۲۰۱۳) نیز تغییرات بافت‌شناسی کبد شامل افزایش تعداد سلول‌های کوپفر و لنفوسیت‌ها را در جنین‌های موش‌های آلبینو و یستار در گروه دریافت‌کننده دوز بالای سیتالوپرام (۲۰ mg/kg) در دوران بارداری مشاهده کردند (۲۲). Ahmadian و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی آزمایشگاهی نشان دادند قرار گرفتن در معرض سیتالوپرام (۵۰۰ میکرومولار) مرگ سلولی، فروپاشی پتانسیل میتوکندری، نشی غشای لیزوزومی، کاهش گلوکوتایون (GSH) و پراکسیداسیون لیپیدی را به دنبال دارد (۵).

تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS^1) که با افزایش خطر آسیب بافتی و اختلال عملکرد اندام همراه است، نقش مهمی در سمیت سلولی ناشی از داروها دارد (۱۵). علاوه بر این، تولید ROS یک رویداد اولیه است که مسیرهای مختلف سیگنال دهی پایین دستی را فعال می‌کند که به پروتئین‌های سلولی و آسیب DNA و همچنین اندامک‌های درون‌سلولی مانند شبکه آندوپلاسمی، میتوکندری و لیزوزوم کمک می‌کند (۶ و ۹). میتوکندری، به‌عنوان نیروگاه سلولی، نقش تعیین‌کننده‌ای در تولید منابع انرژی، آغاز آپوپتوز و تداخل با

بیوشیمیایی می‌گردد که توسط مطالعات هیستومورفولوژیکی پشتیبانی می‌شود (۱۹).

مطالعه‌ای توسط کریمی محمدی و همکاران (۱۳۹۴) انجام شد دریافت گاوژ ۱۰ mg/kg ملاتونین در موش‌های نر نژاد ویستار منجر به تغییر AST و ALT گردید اما ملاتونین اثرات مخرب دیابت را بر آنزیم‌های کبدی موش‌های دیابتی بهبود بخشید (۱۶). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد سطوح ALP، AST و ALT در تجویز ۲ mg/kg ملاتونین در موش‌های نر نژاد BALB در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشته و مانع از افزایش آسیب کبدی ناشی از امواج رادیو فرکانسی گردید (۲۳). Sharma و همکارانش (۲۰۱۳) با تزریق عضلانی ملاتونین ۰/۲۵ ml در موش‌های صحرایی نر و ماده سه ماهه ویستار افزایش آنزیم ای ALT، AST و ALP را در ارزیابی‌های ۱۵ روزه و ۳ روزه مشاهده کردند (۳۱). مطالعات فوق نشان می‌دهد ملاتونین در دوزهای پایین اثرات مخربی بر کبد نداشته و به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند. در مطالعه حاضر کمترین دوز مورد بررسی ۱۰ mg/kg بود و نیز اثر ملاتونین بر آنزیم‌های کبدی وابسته به دوز بود به‌طوری‌که بیشترین میزان تخریب در دوز بالا اندازه‌گیری شد؛ بنابراین اثرات سوء ملاتونین در کبد دارای آستانه‌ای می‌باشد که بیش از آن موجب تخریب بافت کبد می‌گردد.

نتایج میکروسکوپ نوری و الکترونی بافت کبد، هم‌راستا با تغییرات آنزیم‌های کبدی در ماهی‌های گورامی بود. بافت کبد در دوز ۵ mg/kg سیتالوپرام و دوزهای ۱۰ mg/kg و ۵۰ mg/kg ملاتونین همانند گروه‌های کنترل دارای ظرفیت کبدی نرمال بودند اما با افزایش دوز تغییرات بافتی به‌وضوح قابل مشاهده بود. در بالاترین دوز سیتالوپرام و ملاتونین شدت

¹ Elevated reactive oxygen species

باز یافت طیف گسترده‌ای از ماکرومولکول‌ها و آنزیم‌ها از جمله نوکلئازها، پروتئازها و لیپازها را در برمی‌گیرند که در صورت آزادسازی می‌توانند محتویات سلولی را هضم کرده و اثرات مضر از خود نشان دهند (۲۰). استرس اکسیداتیو نقش اساسی در افزایش نفوذپذیری غشای لیزوزومی (LMP) دارد که در نهایت منجر به نکرز سلولی یا آپوپتوز می‌شود (۱۰). داروها از طریق آسیب رساندن به غشای لیزوزومی از طریق تولید گونه‌های فعال و مرگ سلولی نقش دارند (۲۵).

فهرست منابع

1. Abdel-Razaq W, Kendall DA, Bates TE. 2011. The effects of antidepressants on mitochondrial function in a model cell system and isolated mitochondria. *Neurochemical research*. 36:327-338.
2. Abdi S, Abbasinazari M, Ataei S, Khanzadeh-Moghaddam N, Keshvari N. 2021. Benefits and Risks of Melatonin in Hepatic and Pancreatic Disorders; A Review of Clinical Evidences. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*. 20(3):102-109.
3. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ. 2014. Extra pineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and molecular life sciences*. 71: 2997-3025.
4. Adebayo JO, Yakubu MT, Egwim EC, Owoyele VB, Enaibe BU. 2003. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. *Journal of Ethnopharmacology*. 88(1):69-72.
5. Ahmadian E, Eftekhari A, Fard JK, Babaei H, Nayebi AM, Mohammad nejad D, Eghbal MA. 2017. In vitro and in vivo evaluation of the mechanisms of citalopram-

مسیرهای سیگنال دهی درون سلولی ایفا می‌کند. علاوه بر این، میتوکندری‌ها از جمله اهداف احتمالی برای آسیب‌های ناشی از دارو هستند که یکی از آنها افزایش تولید رادیکال‌های آزاد است (۱۱). در نتیجه، اختلال یا ناهنجاری عملکرد میتوکندری ممکن است به اختلال عملکرد یا مرگ سلول ختم شود. اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از داروهای ضدافسردگی در تعدادی از مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است (۱ و ۳۴). لیزوزوم‌ها در عملکرد نرمال خود، تجزیه و

induced hepatotoxicity. *Archives of pharmacal research*. 40:1296-1313.

6. Ahmadian E, Jafari S, Yari Khosroushahi A. 2015. Role of angiotensin II in stem cell therapy of cardiac disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 16(4):702-711.
7. Bahrami M, Cheraghpour M, Jafarirad S, Alavinejad P, Asadi F, Hekmatdoost A, Mohammadi M, Yari Z. 2020. The effect of melatonin on treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized double blind clinical trial. *Complementary therapies in medicine*. 52:1-10.
8. Bali İ, Bilir B, Emir S, Turan F, Yılmaz A, Gökkuş T, Aydın M. 2016. The effects of melatonin on liver functions in arsenic-induced liver damage. *Turkish Journal of Surgery/Ulusal Cerrahi Dergisi*. 32(4):233-237.
9. Bayır H, Kagan VE. 2008. Bench-to bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis—there is nothing more practical than a good theory. *Critical care*. 12(1):1-11.
10. Boya P, Kroemer G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*. 27(50):6434-51.
11. Eftekhari A, Azarmi Y, Parvizpur A, Eghbal MA. 2016. Involvement of oxidative

stress and mitochondrial/lysosomal cross-talk in olanzapine cytotoxicity in freshly isolated rat hepatocytes. *Xenobiotica*. 46(4):369-78.

12. H Park S, Ishino R. 2013. Liver injury associated with antidepressants. *Current drug safety*. 8(3):207-23.

13. Hu C, Zhao L, Tao J, Li L. 2019. Protective role of melatonin in early-stage and end-stage liver cirrhosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 23(11):7151-62.

14. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological sciences*. 65(2):166-76.

15. Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. 2012. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews*. 44(1):88-106.

16. Karimi Mohammadi M, Vaezi G.M, Zarei H. 2014. Investigating the effect of oral melatonin on SGOT and SGPT levels of liver enzymes in healthy and diabetic rats treated with streptozotocin. *Congress of Physiology and Pharmacology of Iran*.

17. Licata A. 2016. Adverse drug reactions and organ damage: the liver. *European journal of internal medicine*. 28:9-16.

18. Locher C, Koechlin H, Zion SR, Werner C, Pine DS, Kirsch I, Kessler RC, Kossowsky J. 2017. Efficacy and safety of selective serotonin reuptake inhibitors, serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors, and placebo for common psychiatric disorders among children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *JAMA psychiatry*. 74(10):1011-20.

19. Lopez-Torres E, Lucena MI, Seoane J, Verge C, Andrade RJ. 2004. Hepatotoxicity related to citalopram. *American Journal of Psychiatry*. 161(5):923-a.

20. Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 8(8):622-632.

21. Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, Andersen LP, Zhou Z, Galano A, Vriend J, Tan DX, Reiter RJ. 2015. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *Journal of pineal research*. 59(4):403-19.

22. Mohammadi Z, Azarnia M, Mirabolghasemi G, Shiravi A, Mohammadi Z. 2013. Histological changes in the liver of fetuses of pregnant rats following citalopram administration. *Indian Journal of Pharmacology*. 45(5):517.

23. Muradpour R, Shokri M, Talebpour Amiri F, Elahwardi A. 2018. Melatonin reduces liver damage caused by mobile phone radiofrequency waves in an experimental mouse model. *Journal of paramedical sciences and military health*. 12(4):1-8.

24. Pakravan H, Ahmadian M, Fani A, Aghaee D, Brumanad S, Pakzad B. 2017. The effects of melatonin in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Advanced biomedical research*. 6: 1-5.

25. Pourahmad J, Eskandari MR, Kaghazi A, Shaki F, Shahraki J, Fard JK. 2012. A new approach on valproic acid induced hepatotoxicity: involvement of lysosomal membrane leakiness and cellular proteolysis. *Toxicology in Vitro*. 26(4): 545-551.

26. Ren W, Liu G, Chen S, Yin J, Wang J, Tan B, Wu G, Bazer FW, Peng Y, Li T, Reiter RJ. 2017. Melatonin signaling in T cells: Functions and applications. *Journal of pineal research*. 62(3): 1-15.

27. Roberts JR. 2022. InFocus: Melatonin Overdoses Rising Among Children. *Emergency Medicine News*. 44(8):8-9.

28. Sadeghi A, Abbasinazari M, Aghdaei HA, Abdi S, Hatami B, Rasoolinezhad M, Jamshidzadeh S, Saadati S. 2019. Does melatonin addition to indomethacin decrease post endoscopic retrograde cholangio pancreatography pancreatitis? A randomized double-blind controlled trial. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 31(11):1350-1355.

29. Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. 2011. Pharm GKB summary: citalopram pharmacokinetics pathway. *Pharmacogenetics and genomics*. 21(11):769-772.

30. Schuster D, Laggner C, Langer T. 2005. Why drugs fail-a study on side effects in new chemical entities. *Current pharmaceutical design*. 11(27):3545-359.

31. Sharma S, Rana SV. 2013. Melatonin improves liver function in benzene-treated rats. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 64(2):219-226.

32. Sun H, Huang FF, Qu S. 2015. Melatonin: a potential intervention for hepatic steatosis. *Lipids in Health and Disease*. 14:1-6.

33. Voican CS, Corruble E, Naveau S, Perlemuter G. 2014. Antidepressant-induced liver injury: a review for clinicians. *American Journal of Psychiatry*. 171(4):404-415.

34. Xia Z, Lundgren B, Bergstrand A, DePierre JW, Nässberger L. 1999. Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-XL. *Biochemical pharmacology*. 57(10):1199-1208.

35. Yang X, He C, Zhu L, Zhao W, Li S, Xia C, Xu C. 2019. Comparative analysis of regulatory role of Notch signaling pathway in 8 types liver cell during liver regeneration. *Biochemical genetics*. 57:1-9.

36. Zhang JJ, Meng X, Li Y, Zhou Y, Xu DP, Li S, Li HB. 2017. Effects of melatonin on liver injuries and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(4):1-27.



Comparison the effect of melatonin and the selective inhibitor of serotonin reuptake citalopram drug on the ultrastructure of liver tissue and hepatic enzymes in Adult Female three-spotted gourami Fish (*Trichogaster trichopterus*)

Mohamad Reza Pouravaz, ¹, Tahereh Naji, ², Homayon HosseinzadehSahafi³

1- Pharmacy student, Faculty of pharmacy and pharmaceutical science, Tehran Medical science, Islamic Azad university, Tehran, Iran.

2- Associate Professor, Department of basic sciences, Faculty of pharmacy and pharmaceutical science, Tehran Medical science, Islamic Azad university, Tehran, Iran. Corresponding Author : tnaji2002@gmail.com

3- Professor, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural research, education and promotion organization, Tehran, Iran.

Received:2022.05. 10

Accepted: 2022.08.07

Abstract

Background & Aims: Most of the various drugs that are used to treat various diseases are metabolized in the liver. The purpose of this study is to investigate the effect of melatonin and selective serotonin reuptake inhibitor drug citalopram on liver tissue ultrastructure and liver enzymes in adult female *Trichogaster*.

Materials & Methods: For this purpose, 120 pieces of *Trichogaster* with an average weight of 4.23 ± 0.70 g divided into eight groups of 15, which included the control groups, solvent intact, three groups which received citalopram with a dose of 5, 10 and 20 mg/kg and three treatment groups receiving melatonin with doses of 10, 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. Then, the fish were euthanized and dissected.

Results: The results showed that melatonin and citalopram had a significant effect on the level of all liver enzymes compared to the control groups ($P < 0.05$). The highest levels of ALT, AST and ALP were measured after the injection of 20 mg/kg citalopram ($P < 0.05$). In fish treated with the highest concentration of melatonin and all concentrations of citalopram, dissociation between hepatocytes and expansion of sinusoids occurred. Fat vacuoles were formed in high concentrations of melatonin and citalopram.

Conclusion: Therefore, melatonin at a concentration of 100 mg/kg and citalopram at a concentration higher than 5 mg/kg have a negative effect on the ultrastructure of liver tissue and liver enzymes.

Key words: melatonin, citalopram, liver tissue, liver enzymes, *Trichogaster trichopterus*