فصلنامه علمی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۶۰، دوره ۱۵، شماره ۴، پاییز۱۴۰۱، صفحه ۲۳ تا ۳۶
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

تاثیر تاموکسیفن و کوهوش سیاه (*Actaea racemosa*) برتغییرات سطوح هورمون های استروئیدی جنسی و بلوغ تخمک های ماهی ماده بالغ گورامی سه خال(*Trichogaster trichopterus*) از خانواده (*Osphronemidae*)

محسن باقری[۱]، **طاهره ناجی[۲]***، 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:
naji_t@iaups.ac.ir tnaji2002@gmail.com
۳- استاد موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور ، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی ، تهران ، ایران.

تاریخ دریافت ۱۴۰۱/۰۶/۲۳ **تاریخ پذیرش ۱۴۰۱/۰۷/۱۲**

چکیده

زمینه و هدف: یکی از سرطان های شایع در سنین یائسگی سرطان سینه می باشد . برای کنترل علائم یائسگی در زنان مبتلا به سرطان سینه با توجه اینکه هورمون تراپی منع مصرف دارد درمان های جایگزینی ازجمله فیتواسترژن تراپی می توان در نظر گرفت . کوهوش سیاه یک گیاه فیتواستروژن است که در کنترل علائم یائسگی کاربرد دارد . هدف از این مطالعه مقایسه تاثیر تاموکسیفن با گیاه کوهوش سیاه بر فراساختار بافت تخمدان و تغییرات هورمون های جنسی در ماهی ماده بالغ گورامی سه خال است .

مواد و روش ها: در این پژوهش تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی ماده بالغ گورامی سه خال در ۸ تیمار با گروه های کنترل شامل کنترل ۱ (دست نخورده) و کنترل ۲ (حلال،اتانول ۶۰ درصد) و تیمارهای دریافت کننده دوزهای ۱۰۰،۵۰،۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم از داروی تاموکسیفن و ۱۰۰، ۵۰، ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره هیدروالکلی کوهوش سیاه تقسیم شدند. کلیه تزریق ها در ۱۰ نوبت و به صورت یک روز در میان به مدت بیست روز و به صورت تزریق به مقدار ۰/۰۲ میلی لیتر بین عضله باله پشتی و خط جانبی انجام گرفت. در پایان پس از بیهوش نمودن ماهیان، ساختار بافت شناسی تخمدان و هورمون های جنسی در گروه های تیمار و کنترل بررسی شد.

نتایج : عصاره کوهوش سیاه موجب کاهش سطح هورمون های ۱۷-بتا استرادیول و تستسترون شد. تاموکسیفن باعث کاهش سطح هورمون های ۱۷-بتا استرادیول و تستسترون و پروژسترون شد . بررسی تصویر های میکروسکوپ نوری والکترونی نشان داد تاموکسیفن و کوهوش سیاه هر دو اثر برمهاری بر بلوغ تخمک داشتند .

نتیجه گیری: بررسی یافته های حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره گیاه کوهوش سیاه و تاموکسیفن موجب کاهش بلوغ تخمک می گردند.

واژگان کلیدی: بلوغ تخمدان،تاموکسیفن،گیاه کوهوش سیاه ، ماهی گورامی سه خال، هورمون های جنسی.

مقدمه

کوهوش سیاه (*Actaea racemosa*) یک گیاه فیتواستروژنی است که استفاده از آن برای کاهش علائم مربوط به یائسگی مطرح شده است(۱). این گیاه از خانواده آلاله گان (Ranunculaceae) و بومی‌آمریکا می‌باشد. از دیرباز در طب سنتی بومیان آمریکا از ریشه خشک گیاه جهت درمان مالاریا، روماتیسم، اختلالات کلیوی، بی‌نظمی دوران قاعدگی، گلودرد و آلرژی و به طور گسترده جهت تسکین دیسمنوره استفاده می‌شود (۲). ریزوم این گیاه دارای ترکیبات ایزوفلاون (فیتواستروژن) فورمونونتین، تری ترپن گلیکوزیدها حاوی ۲۷- دئوکسی اکتئین، اکتئین، راسموزید و سیمی سیفوگوزید و همچنین اسیدهای آروماتیک فرولیک اسید و ایزوفرولیک اسید می‌باشد (۳). در مطالعه ای که بر روی موش‌های رت فاقد تخمدان انجام شده است نشان داده شد درعصاره کوهوش سیاه خاصیت استروژنی وجود ندارد . همچنین در این مطالعه کوهوش سیاه میزان بیان ژن‌های $ER\alpha$ و $ER\beta$ در ناحیه پره اپتیک(Preoptic Area) کاهش داد. این ناحیه در هیپوتالاموس مرکز کنترل پالس‌های GNRH می‌باشد و به نظر میرسد مکانیسم کنترل علائم یائسگی توسط کوهوش سیاه به خاطر مکانیسم کاتکول آمینرژیک این گیاه در هیپوتالاموس باشد(۴). تاموکسیفن از گروه داروهای SERM می‌باشد این داروها در برخی بافت‌ها اثرات مشابه استروژن (آگونیستی) و در سایر بافت‌ها دارای اثرات مشابه نسبی یا جلوگیری از اثر استروژن (آنتاگونیستی) دارند. احتمال دارد تاموکسیفن با سایر فعال کننده‌ها و یا مهار کننده‌های بافت ارتباط برقرار کند و به گیرنده مختلف $ER\alpha$ و $ER\beta$ متصل شود و اثرات استروژنی وآنتی استروژنی ایجاد کند(۵). مطالعه دیگری نشان دادند که تاموکسیفن در موش‌های ماده نابالغ قبل از تخمک گذاری، با تغییر غلظت LH و FSH اوولاسیون را مهار نموده و تاموکسیفن نقش آنتی استروژنی در سطح محور هیپوتالاموس-هیپوفیزدارد (۶).

در مطالعه هیستوپاتولوژیک دیگر مشخص گردید که تاموکسیفن با افزایش سطح کاسپاز ۳ در کبد، رحم و تخمدان موش‌های سوئیسی آلبینو ، سطح متوسطی از آپوپتوز را ایجاد کرد و سطح استروژن وپروژسترون را نیز به میزان قابل توجهی کاهش داد (۷). عصاره های ایزوپروپانولیک کوهوش سیاه از تکثیر سلول های MCF7 ناشی از استروژن جلوگیری کرد و اثر مهاری تاموکسیفن بررشد سلول های سرطانی را افزایش داد (۸). به نظر میرسد که کوهوش سیاه جایگزین مناسبی به جای درمان به روش HRT[1] در زنان یائسه با سرطان سینه میباشد. کنترل تولید مثل توسط محورهیپوتالاموس- هیپوفیز– گنادوتروپین در ماهیان و پستانداران یکسان است (۹). از این رو در تحقیق حاضر با توجه به مرتبط بودن فرایند تخمک‌گذاری و باروری تخمک‌ها با گنادوتروپین های مترشحه از هیپوتالاموس، FSH و LH مترشحه ازهیپوفیز و استروژن‌ها و پروژسترون های مترشحه از

[1] Hormone replacement therapy

گناد ، اثرات گیاه ذکر شده در مقایسه با داروی تاموکسیفن بر بافت تخمدان و تغییرات هورمون های جنسی در ماهی مادهی بالغ گورامی سه خال[1] از خانواده Osphronemidae مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق درآذر ماه سال ۱۴۰۰ صورت پذیرفت. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی گورامی سه خال جنس ماده از کارگاه پرورش زینتی واقع در قزوین با میانگین وزنی ۱±۵ خریداری شد. در ابتدا ۴۸ ساعت قبل از ورود ماهی ها تمام آکواریوم ها با ابعاد (۶۰×۴۰×۳۰cm) با کاغذ سمباده همراه نمک شست و شو داده و به منظور کلر زدایی پر شدند و سپس فیلتر های هوا وهیتر ها داخل آن قرار گرفتند . هدف از این کار کلر زدایی و بالا بردن سطح اکسیژن و درصورت کلی مساعد کردن خصوصیات آب برای داخل شدن ماهی ها بود . سپس ماهی ها به صورت تصادفی داخل آکواریم ها قرار گرفتند و به مدت ۲ شبانه روز به آنها مهلت داده شد تا با محیط آکواریوم و آزمایشگاه سازگار شوند. پس از انجام عملیات بیومتری، تمام ماهیان (اندازه گیری طول ماهی با خط کش و وزن با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم)، در هشت گروه مجزا و هر گروه شامل ۱۵ قطعه ماهی در آکواریوم های شیشه ای رهاسازی شدند. برای تمامی آکواریوم ها هر ۲۴ ساعت یک بار بررسی از لحاظ وضعیت سلامت ماهیان، دمای آب و pH محیط صورت گرفت.

آزمایش در هشت گروه مجزا شامل گروه کنترل که خود شامل :گروه کنترل ۱ (دست نخورده) و کنترل ۲ (حلال، اتانول ۶۰ درصد) و ۳ گروه تیمار با عصاره گیاه کوهوش سیاه با دوز های ۱۰ ، ۵۰ ، ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم و ۳ گروه تیمار با داروی تاموکسیفن با دوز های ۱۰ ، ۵۰ ، ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم صورت گرفت(۱۰.۱۱) . جهت آماده سازی کوهوش سیاه(بچ نامبر ۱۱۰۹۰۴۴۵) مقدار ده گرم از پودر کوهوش سیاه از شرکت باریج اسانس خریداری شد و پس از محاسبه وزن ماهیان و دوز تیمارها بر حسب میلی گرم بر کیلو گرم ،مقادیر دوز مورد نظر در هر تیمار با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شد،سپس پودر وزن شده جهت هر تیمار ، در اتانول ۶۰ درصد به عنوان حلال حل شد. در نهایت محلول آماده تزریق تیمارها در ظروف شیشه ای کوچک درب بسته و تیره رنگ جهت تزریق نگهداری شد . جهت آماده سازی داروی تاموکسیفن مقدار ۲ گرم از پودرخالص داروی تاموکسیفن با بچ نامبر SLBP003V تهیه شد و پس از محاسبه وزن ماهیان و دوز تیمارها بر حسب میلی گرم بر کیلو گرم ،مقادیر دوز مورد نظر در هر تیمار با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شد ،سپس پودر وزن شده جهت هر تیمار، در ۲ میلی لیتر اتانول ۶۰ درصد به عنوان حلال حل شد. در نهایت محلول آماده تزریق تیمارها، در ظروف شیشه ای کوچک درب بسته و تیره رنگ جهت تزریق نگهداری شد. برای دریافت دارو، تزریق به روش عضلانی (IM) صورت گرفت .در ابتدا مقدار مورد نیاز هر دارو به

[1] *Trichogaster trichopterus*

وسیله سرنگ BD با حجم (یک سی سی) برداشته شد و به میزان ۲۰ میکرولیتر دارو بین باله پشتی و خط جانبی درون عضله با زاویه سی درجه تزریق گردید. تزریقات به مدت ۲۰ روز ، در ۱۰ نوبت یک روز درمیان انجام شد. پس از پایان دوره‌ی تزریق به مدت ۱ روز هیچ فعالیتی بر روی ماهی ها صورت نگرفت و بعد از آن تشریح ماهی ها آغاز شد. در پایان روز بیست ویکم ، پس از بیهوش نمودن ماهیان با عصاره گل میخک، شاخص های بیومتری تعداد ۱۲۰ قطعه از هر تیمار (اندازه گیری 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 اندام های داخلی شامل کبد و تخمدان ها جدا گردیدند. پس از جدا نمودن ترشحات از اطراف تخمدان، هرکدام جداگانه با ترازوی دیجیتالی (با دقت۰/۰۰۱ گرم) وزن و تعدادی از هر تیمار جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری انتخاب شدند. به منظور آماده سازی نیز در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی، تعدادی از تخمدان ها در محلول گلوتارآلدهید ۲/۵درصد قرار داده شد و در نهایت جهت تهیه گرید در مراحل بعد، در یخچال نگهداری شده اند. جهت اندازه گیری سطوح هورمون های ۱۷- بتا استرادیول ، تستوسترون، پروژسترون روش هموژنایزر استفاده گردید.

جدول ۱- مقادیر سنجش هورمون ها به روش الایزا

گروه / متغییر	GSI(%)	17-Beta Estradiol (ng/g)	Progesterne (ng/g)	Testosterone (ng/g)
C1	۱۱۰±۴۷۰۰*	۶۱۲۳۳±۵۵۰*	۱۶۹۳۳±۴۰۴*	۴۵۰±۱۷۵۳۳*
C2	۳۰۵±۴۶۳۰*	۶۱۸۳۳±۳۰۵*	۱۶۷۳۳±۳۵۱*	۳۵۱±۱۷۴۶۶*
T1	۱۱۰±۴۰۲۰**	۵۰۲۶۶±۱۶۰۶**	۱۵۶۰۰±۳۶۰**	۲۰۸±۱۶۵۶۶**
T2	۱۰۰±۳۵۰۰***	۴۱۳۳۳±۱۱۵۴***	۱۳۸۳۳±۵۰۳***	۲۵۱±۱۶۵۶۶***
T3	۱۵۲±۳۰۶۶****	۳۰۳۳۳±۱۵۲۷****	۱۳۰۶۶±۶۴۲****	۵۱۳±۱۵۷۶۶***
B1	۱۰۶±۴۷۰۰*	۵۹۶۶۶±۱۵۲۷*	۱۶۸۰۰±۲۰۰*	۴۵۰±۱۷۵۶۶*
B2	۳۵۰±۴۵۵۰*	۵۸۶۶۶±۱۸۹۳*	۱۶۷۳۳±۲۰۸*	۳۵۱±۱۷۵۳۳*
B3	۲۰۰±۴۱۰۰**	۴۸۳۳۳±۱۵۲۷**	۱۶۳۳۳±۴۱۶*	۲۶۴±۱۶۶۰۰**

گروه C1 گروه کنترل دست نخورده ، C2 گروه کنترل حلال ، T3,T2,T1 به ترتیب دوز های mg/kg ۱۰۰،۵۰،۱۰ تاموکسیفن ، B3,B2,B1 به ترتیب دوزهای mg/kg ۱۰۰،۵۰،۱۰ کوهوش سیاه . تمامی اعداد میانگین سه بار تکرار گروه های آزمایشی می باشند . اعداد که در هر ردیف با تعداد ستاره های متفاوت هستند ، اختلاف معنی دار دارند

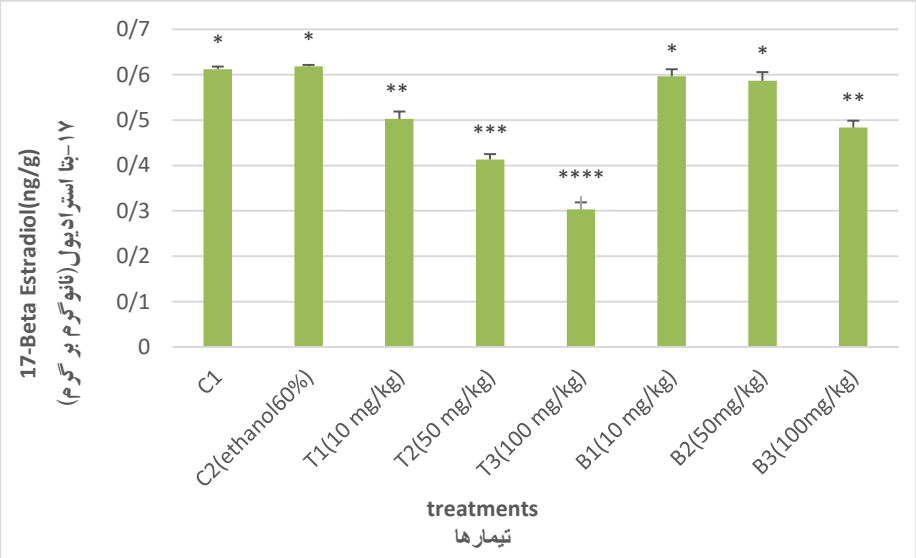
*اعداد این گروه با ضریب 10^{-5}محاسبه شده اند

در طول کار سعی شد تا به دور از حرارت و نور و در کمترین زمان عملیات صورت گیرد تا دمای محیط موجب تخریب آنزیم ها و پروتئین های بافتی نگردد. سپس لوله های آزمایش توسط دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار با دور RPM ۳۰۰ و به مدت ۵ دقیقه جداسازی گردید

جهت سنجش هورمون ها از روش ELISA استفاده شد. در پایان داده های حاصل از میزان هورمون های جنسی، از طریق نرم افزار SPSS ورژن (۲۳) آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون دانکن (جهت مقایسه میان گروه ها)در سطح معناداری۰/۰۵مورد بررسی قرار گرفتند. جهت رسم نمودارها نیز نرم افزار ۲۰۱۳ EXCEL مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به آن که در این آزمایش فاز مطالعات حیوانی وجود داشت مطالعات مورد نظر در کمیته اخلاق مورد بررسی قرار گرفت و پس از موافقت ، شناسه اخلاق به شماره IR.IAU.PS.REC.1400.474 دریافت شد.

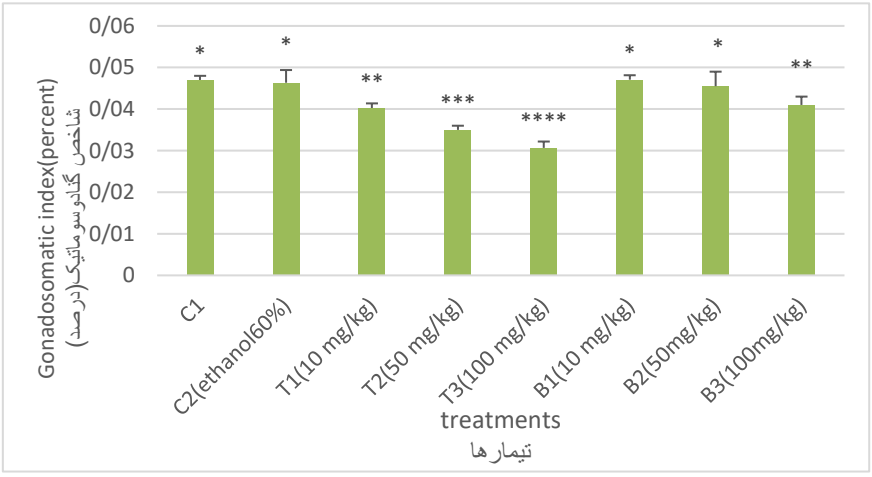
نتایج

نتایج حاصل از سطح شاخص GSI در میان گروه کنترل و تیمار بیانگر وجود اختلاف معناداربود (P<۰/۰۵) در گروه کنترل میان تیمار دست نخورده و تیمار اتانول اختلاف معنا دار وجود نداشت (P>۰/۰۵). در تیمارتاموکسیفن هر کدام از دوزها با یکدیگر و همچنین با گروه تیمار کنترل اختلاف معنا دار وجود داشت (P<۰/۰۵). در تیمار تاموکسیفن با دوز۵۰ و۱۰۰گرم بر کیلوگرم در مقایسه با تمام تیمارهای کوهوش سیاه اختلاف معناداری وجود داشت (P<۰/۰۵). در تیمار کوهوش سیاه با دوز ۱۰و۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با تیمار کنترل اختلاف معناداری وجود نداشت (P>۰/۰۵). در تیمار کوهوش سیاه با دوز ۱۰۰ در مقایسه با تیمار کنترل و تیمارکوهوش سیاه با دوز۱۰و۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معنا داری وجود داشت (P<۰/۰۵).(شکل۱)



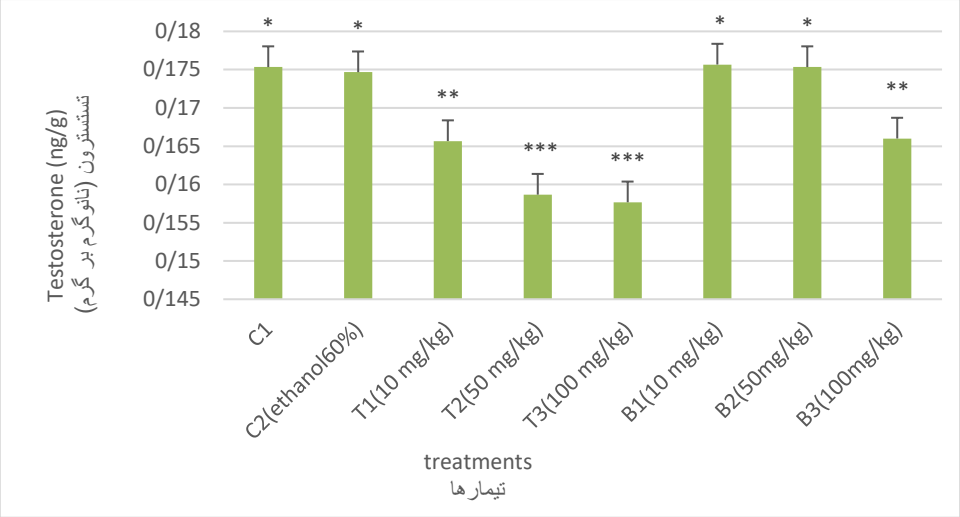
شکل۱- نمودار شاخص گنادوسوماتیک ، گروه کنترل(C)، تیمارتاموکسیفن(T)، تیمار کوهوش سیاه (B)(تعداد ستاره مشابه به معنای عدم وجود اختلاف در سطح معنا داری ۰/۰۵می‌باشد)

نتایج حاصل از سطح هورمون ۱۷-بتا استرادیول در میان گروه کنترل و تیمار بیانگر وجود اختلاف معناداربود (P<۰/۰۵). در گروه کنترل میان تیمار دست نخورده و تیمار اتانول اختلاف معنا دار وجود نداشت (P>۰/۰۵). در تیمارتاموکسیفن هر کدام از دوزها با یکدیگر و همچنین با گروه تیمار کنترل اختلاف معنا دار وجود داشت (P<۰/۰۵). در تیمار تاموکسیفن با دوز۵۰ و۱۰۰گرم بر کیلوگرم در مقایسه با تمام تیمارهای کوهوش سیاه اختلاف معناداری وجود داشت (P<۰/۰۵). در تیمار کوهوش سیاه با دوز ۱۰و۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با تیمار کنترل اختلاف معناداری وجود نداشت (P>۰/۰۵). در تیمار کوهوش سیاه با دوز ۱۰۰ در مقایسه با تیمار کنترل و تیمارکوهوش سیاه با دوز۱۰و۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اختلاف معنا داری وجود داشت (P<۰/۰۵). در مقایسه میان تیمار تاموکسیفن و کوهوش سیاه بیانگر آن بود که نسبت به گروه کنترل، تیمارتاموکسیفن سطح هورمون ۱۷-بتا استرادیول را به‌طور محسوس تری تحت تاثیر قرار می‌دهد.(شکل۲)



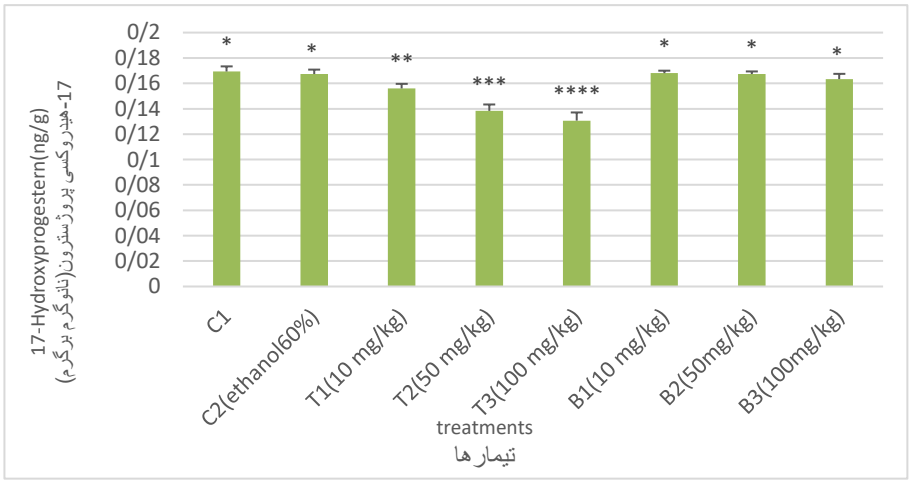
شکل۲- نمودار هورمون ۱۷بتا استرادیول گروه کنترل(C)، تیمارتاموکسیفن(T)، تیمار کوهوش سیاه (B) (تعداد ستاره مشابه به معنای عدم وجود اختلاف در سطح معنا داری ۰/۰۵میباشد)

نتایج حاصل از هورمون تستسترون در تیمار کنترل و تیمار کوهوش سیاه با دوز ۱۰ و ۵۰ میلی بر کیلوگرم اختلاف معنادار نشان نداد (P>۰/۰۵). میان تیمارکنترل دست نخورده و تیمار اتانول اختلاف معنادار وجود نداشت (P>۰/۰۵). میان تیمار کوهوش سیاه با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم با گروه کنترل اختلاف معنا دار مشاهده شد(P<۰/۰۵) . میان تیمار تاموکسیفن در مقایسه با تیمار کوهوش سیاه و تیمار کنترل اختلاف معناداروجود داشت (P<۰/۰۵). میان تیمار تاموکسیفن با دوز۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به تاموکسیفن با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم و همچنین گروه های کنترل اختلاف معنا دار وجود داشت (P<۰/۰۵). میان تیمارتاموکسیفن بادوز ۱۰۰ و ۵۰ میلی گرم برکیلوگرم اختلاف معنا وجود نداشت(P>۰/۰۵).میان تاموکسیفن بادوز ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم نسبت به گروه کنترل اختلاف معنادار وجود داشت(P<۰/۰۵).(شکل۳)



شکل۳- نمودار هورمون تستسترون، گروه کنترل(C)، تیمارتاموکسیفن(T)، تیمار کوهوش سیاه (B) (تعداد ستاره مشابه به معنای عدم وجود اختلاف در سطح معنا داری ۰/۰۵میباشد)

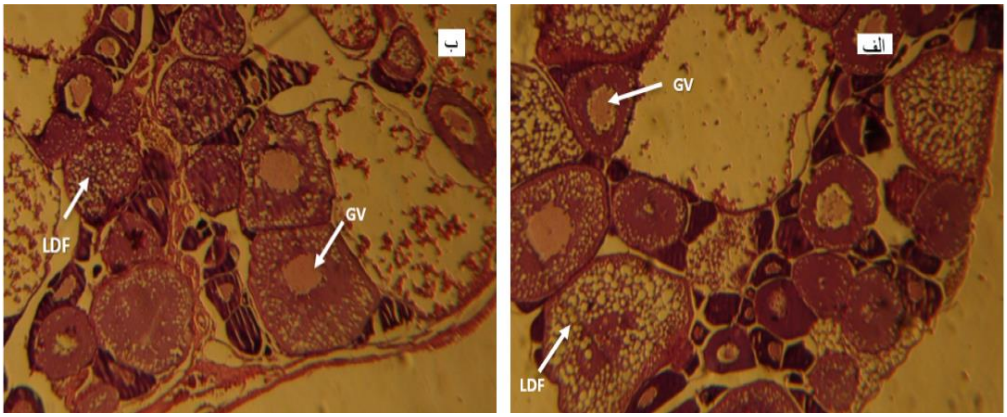
نتایج حاصل از هورمون پروژسترون درتیمارهای کنترل و تیمارهای کوهوش سیاه اختلاف معنادار نشان نداد (P>۰/۰۵). میان تیمارکنترل دست نخورده و تیمار اتانول اختلاف معنادار وجود نداشت (P>۰/۰۵). میان تیمار تاموکسیفن در مقایسه با تیمار کوهوش سیاه و تیمار کنترل اختلاف معناداروجود داشت (P<۰/۰۵). میان تیمار تاموکسیفن با دوزهای مختلف با گروه‌های قبلی و همچنین در مقایسه با یک دیگر اختلاف معنادار وجود داشت (P<۰/۰۵) (شکل۴).



شکل٤- نمودار هورمون پروژسترون، گروه کنترل(C)، تیمارتاموکسیفن(T)، تیمار کوهوش سیاه (B) (تعداد ستاره مشابه به معنای عدم وجود اختلاف در سطح معنا داری ۰/۰۵میباشد)

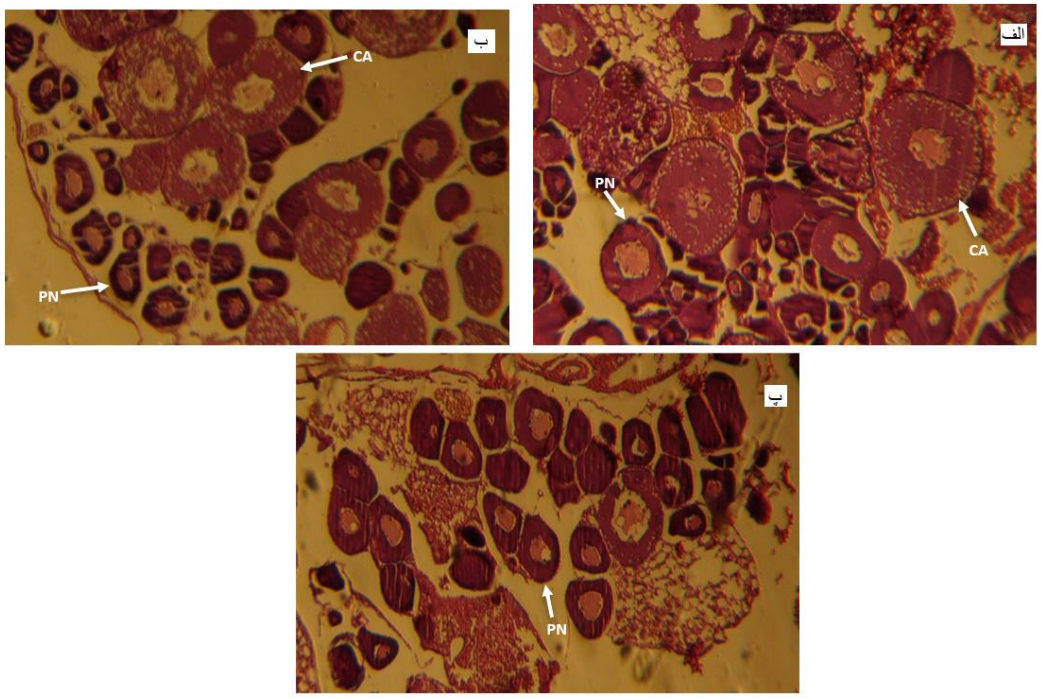
نتایج حاصل از میکروسکوپ نوری بافت

تخمدان: نتایج حاصل از میکروسکوپ نوری نشان داد که در هردو گروه کنترل، اغلب اووسیتها در مرحله کورتیکال آلوئولار و ویتلوژنز قرارداشتند. همچنین اتصال ذرات چربی به یک دیگر و شروع حرکت ویزیکول زایا به قطب جانوری نشان داده شد(شکل ۵)



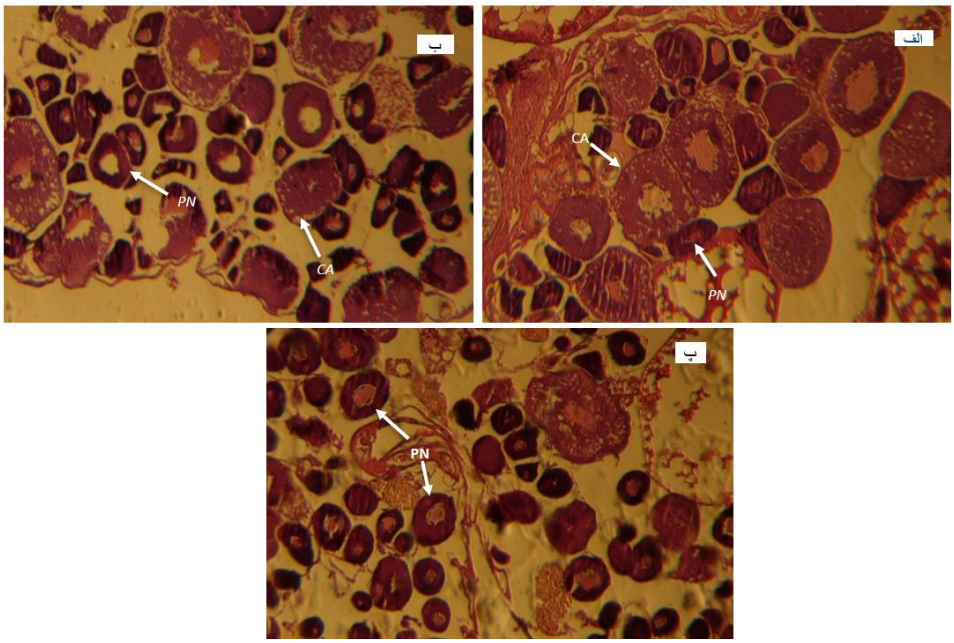
شکل ٥ – الف) مقطعی از بافت تخمدان ماهی گروه کنترل دست نخورد ب)مقطعی از بافت تخمدان ماهی گروه کنترل حلال،اتصال ذرات چربی به یک دیگر و تشکیل ذرات چربی (Lipid Drop Fusion)LDF، شروع حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری GV(Germinal Vesicle)، رنگ آمیزی (H&E) ، بزرگ نمایی X40

نتایج حاصل از تیمار کوهوش سیاه با دوز ١٠ میلی گرم بر کیلو گرم نشان داد که علی رغم اینکه سلول ها در مرحله کورتیکال و ویتلوژنز می باشد ولی به طور کلی تعداد سلول های بالغ کمتری نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید(شکل ۶ – الف) .در تیمار کوهوش سیاه با دوز ٥٠ میلی گرم بر میلی لیتر تعداد سلول ها در مرحله پیش هستکی نسبت به مرحله کورتیکال آلوئولار افزایش یافت(شکل۶ – ب) . در تیمار کوهوش سیاه دوز ١٠٠ میلی گرم بر کیلو گرم تقریبا بیشتر سلول ها در مرحله پیش هستکی قرار گرفته بودند و به ندرت سلول هایی که در مرحله کورتیکال قرار داشتند مشاهد شد (شکل ۶–پ) .



شکل ٦– الف) مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار کوهوش سیاه با دوز ١٠میلی گرم بر کیلو گرم ب) مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار کوهوش سیاه با دوز ٥٠ میلی گرم بر کیلو گرم پ) مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار کوهوش سیاه دوز ١٠٠ میلی گرم بر کیلوگرم، مرحله پیش هستکی (Prenucleus) PN، مرحله کورتیکال آلوئولار(Cortical Alveolar) CA ،رنگ امیزی (H&E) ، بزرگ نمایی X40

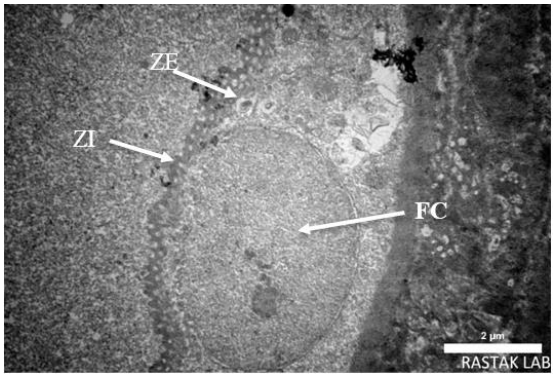
نتایج حاصل از تیمار تاموکسیفن با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم نشان داد که علی رغم اینکه سلول ها در مرحله کورتیکال می باشند ولی به طور کلی تعداد سلول های بالغ کمتری نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید(شکل۷-الف).در تیمار تاموکسیفن با دوز ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر تعداد سلول ها در مرحله پیش هستکی افزایش یافت(شکل ۷-ب) . در تیمارتاموکسیفن دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم تقریبا تمام سلول ها در مرحله پیش هستکی قرار گرفته بودند(شکل ۷ – پ).



شکل ۷ - الف) مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار تاموکسیفن با دوز ۱۰میلی گرم بر کیلو گرم ب) مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار تاموکسیفن با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم پ) مقطعی از بافت تخمدان ماهی تیمار تاموکسیفن دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، مرحله پیش هستکی PN (Prenucleus)، مرحله کورتیکال آلوئولار(Cortical Alveolar) CA ،رنگ امیزی (H&E) ، بزرگ نمایی X40

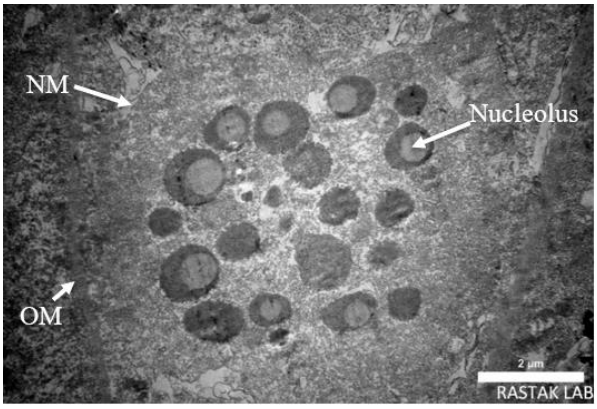
نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی بافت تخمدان

در بافت تخمدان گروه شاهد غشائ سلولی به صورت نرمال مشاهد گردید . لایه زونارادیاتا به دو بخش خارجی وداخلی تبدیل شده و قطر غشا گسترش پیدا کرده است. ذرات زرده‌ای ریز از طریق میکرو پینوسیتوزهای غشا وارد سیتوپلاسم سلول گردید و سلول در ابتدای مرحله زرده سازی قرار داشت(شکل ۸).



شکل۸ - تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطعی از بافت تخمدان گروه کنترل دست نخورده، در گروه کنترل دست نخورده در بافت تخمدان ،لایه زونارادیاتا خارجی با (Zona radiata External)ZE و لایه زونارادیاتا داخلی با (Zona radiata Internal)ZI وسلول های فولیکولار با (Follicualr Cell)FC مشخص شده است

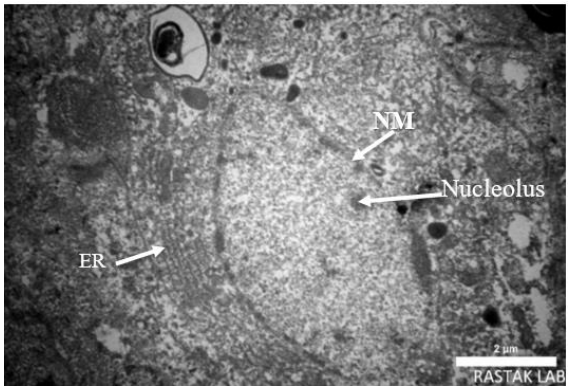
غشا سلول نازک و اووسیت با محدودیت رشد مواجه بود. ورود ذرات زرده‌ای به درون اووسیت مشاهده نشد. سلول دارای یک هسته بزرگ با هستک های که به صورت غیر یک نواخت در هسته پخش شدند مشاهد شد و سلول در مرحله پیش هستکی (Prenucleus) قرار داشت(شکل۹).



شکل۹ - تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطعی از بافت تخمدان گروه کنترل دست نخورده، در گروه کنترل دست نخورده در بافت تخمدان ،لایه زونارادیاتا خارجی با (Zona radiata External)ZE و لایه زونارادیاتا داخلی با (Zona radiata Internal)ZI وسلول های فولیکولار با (Follicualr Cell)FC مشخص شده است Scale bar 2µm

یک اووسیت کامل مشاهده گردید. غشای اووسیت به صورت نازک و غیر فعال دیده شد .

در سیتوپلاسم سلول شبکه آندوپلاسمی مشاهده ولی ذرات زرده ای یا چربی مشاهده نگردید . غشای هسته سلول کاملا مشخص که در آن هستک ها به صورت یکنواخت پراکنده بودند و سلول در مرحله پس هستکی (Postnucleus) قرار داشت(شکل ۱۰).



شکل۱۰- تصویر میکروسکوپ الکترونی از مقطعی از بافت تخمدان گروه تیمارکوهوش سیاه با دوز۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در بافت تخمدان گروه تیمار تاموکسیفن با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ، غشای اووسیت با (Oocyte membrane)OM و غشای هسته با (Nuclear membrane)NM در شکل مشخص شده است

بحث

تاموکسیفن یک آنتی استروژن غیر استروئیدی می‌باشد با اثر گذاری در محور هیپوتالاموس و هیپوفیز، غلظت استرادیول را کاهش داده و با توجه به این که استرادیول سبب تحریک سنتز و ترشح ویتلوژنز در کبد و تجمع آن در اووسیت و تسریع در رشد ورسیدگی اووسیت در ماهی می‌شود،در مطالعه حاضر میزان شاخص با افزایش دوز تاموکسیفن به‌طور محسوسی کاهش یافت. در مطالعه‌ای مشابه که برروی سلول‌های ماهی قزل آلا انجام شد نشان دادند که میزان ویتلوژنزدر

سلول‌های کبدی ماهی اثر مستقیم با میزان غلظت ۱۷بتا-استرادیول دارد. در مطالعه صورت گرفته از۱۷بتا- استرادیول و همچنین ترکیبات فیتو استروژنی و ترکیبات با خاصیت آندوژنی استفاده شد که در تمام موارد میزان ویتلوژنز افزایش یافت، اما زمانی که تاموکسیفن به تمام گروه‌ها اضافه شد میزان ویتلوژنز در تمام گروه‌ها کاهش محسوسی یافت(۱۲). درمطالعه حاضر در تیمار کوهوش سیاه در دوز ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش شاخص گنادوسوماتیک مشاهده شد. در این مطالعه با توجه به شکل ۲ کوهوش سیاه در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر مهاری بروی استرادیول نشان داد و به همین سبب در این دوز می‌تواند باعث کاهش شاخص گنادوسوماتیک گردد. درمورد مکانیسم عمل گیاه کوهوش سیاه مطالعات متعددی صورت گرفته و فرضیه های مختلفی وجود دارد یکی از این فرضیه ها داشتن خاصیت SERM است (۱۳)، ممکن است کوهوش سیاه با توجه به خاصیت مدولاتوری گیرنده استروژن بر محور هیپوتلاموس-هیپوفیز اثر گذاشته و موجب کاهش استروژن شده باشد. یکی دیگر ازاین فرضیه وجود خاصیت تقلید کنندگی عصبی کوهوش سیاه می باشد که درآن اثرات دوپامینرژیک ،نورآدرنرژیک ،سرتونرژیک و گابارژیک مشاهد شد، که با توجه بر این خاصیت میتواند اثر مهاری خود بروی ویتلوژنز وسطح استروژنی ماهی القا کرده باشد(۱). در مطالعه ای که برروی ماهی تیلاپیا انجام شد نشان داد که تاموکسیفن به‌صورت وابسته به دوز موجب کاهش غلظت استرادیول گناد می شود (۱۴). درمطالعه حاضر در تیمار کوهوش سیاه با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم میزان سطح هورمون ۱۷-بتا استرادیول مقداری کاهش یافت(شکل۲) .در مقایسه میان تیمار تاموکسیفن و کوهوش سیاه بیانگر آن بود که نسبت به گروه کنترل، تیمارتاموکسیفن سطح هورمون ۱۷-بتا استرادیول را به‌طور محسوس تری تحت تاثیر قرار می‌دهد. در مطالعه که بر روی سلول سرطانی حساس به استروژن (MCF-7) انجام دادند نشان داده شد که عصاره‌ای کوهوش سیاه خاصیت آنتی استروژنی دارد.(۱۵). در مطالعه ای که بر روی موش های رت فاقد تخمدان انجام شد مشاهد گردید که عصاره کوهوش سیاه خاصیت استروژنی و آنتی استروژنی در این مدل موش ندارد وهمچنین این مطالعه نشان داد که کوهوش سیاه به برخی گیرنده‌های سرتونین متصل شده و به نظر می رسد که کوهوش سیاه از طریق خاصیت سرتونرژیک علائم یائسگی را بهبود بخشد (۱۶). سروتونین عملکرد تولیدمثلی ماهی را از طریق مسیرهای متعدد از جمله از طریق فعالیت‌های مرکزی (اثر بر محور HPG) و محیطی (گناد) تعدیل می‌کند(۱۷). درمطالعه ای که بر روی ماهی گورامی سه خال صورت گرفت داروی فلوکستین به عنوان یک مهار کننده باز جذب سرتونین باعث کاهش سطح هورمون های ۱۷- بتا استرادیول شد(۱۶). ممکن است گیاه کوهوش سیاه از طریق خاصیت سرتونینی اثر مهاری بر روی استرادیول را القا کرده باشد .در عصاره کوهوش سیاه ترکیبات استروژنی وجود دارد، که دارای فعالیت‌های تعدیل کنندگی گیرنده استروژنی (SERM) با اثرات بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز و استخوان اما بدون اثرات نامطلوب در رحم است در

مطالعه حاضر ممکن است گیاه با خاصیت SERM برروی محور هیپوتلاموس_ هیپوفیز اثر گذاشته باشد و موجب مهارگنادوتروپین و در نهایت کاهش استرادیول شده باشد (۱۳). باتوجه به آن که کوهوش سیاه یک گیاه با ترکیبات مختلفی بوده و همچنین به دلیل نبود یه دوز واحد در مطالعات، در مطالعات مختلف نتایج متفاوتی دیده شد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر را می توان با توجه به خاصیت SERM بودن این گیاه و یا سروتونرژیک بودن آن توجیه کرد . مطالعات دیگر که بر روی گناد موش های رت انجام گرفت نشان داد که به دنبال تعدیل در غلظت LH، ترشح تستسترون نیز تحت تاثیر قرار میگیرد (۱۹). به نظر می رسد در مطالعه حاضر نیز تاموکسیفن به صورت وابسته به دوز با اثرات آنتی استروژنی که برمحور هیپوتلاموس-هیپوفیز دارد، موجب کاهش غلظت LH شد و به دنبال کاهش غلظت LHکاهش در غلظت تستسترون مشاهده شد. تاموکسیفن در هیپوتلاموس با اثرات ضداستروژنی خود باعث کاهش میزان LH شد(۲۰). در تیمار کوهوش سیاه با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم کاهش سطح تستسترون مشاهد شد. در مطالعه مشابه که بر روی موش های ماده انجام شد نشان داد که در مواجهه حاد با کوهوش سیاه میزان سرمی LHکاهش یافت(۱۳). با توجه به این که مطالعه حاضر نیز ماهی به صورت حاد در مواجهه با کوهوش سیاه قرار گرفت به نظر میرسد که کوهوش سیاه در دوز بالا با اثر مهاری خود بر LH باعث کاهش سطح تستسترون شده است.. در این مطالعه با افزایش دوز تاموکسیفن میزان هورمون پروژسترون کاهش یافت ،در مطالعه ای که بر روی موش‌های رت ماده بالغ انجام شد نشان داد که تاموکسیفن از پیک هورمون‌های LH و FSH و پروژسترون قبل از تخم گذاری جلوگیری کرد. این دارو، ترشح استرادیول و اندروژنها را نیز کاهش داد، به نظر میرسد که تاموکسیفن فیدبک مثبت محور هیپوفیز-تخمدان در موش‌های ماده مهار می‌کند و با اثر مهاری خود بر روی پروژسترون باعث جلوگیری از تخمک گذاری شد(۲۱). با توجه به شکل۴ در تیمار کوهوش سیاه با افزایش دوز تغییرات بر غلظت پروژسترون ایجاد نشد . در مطالعه که بر روی موش‌های رت فاقد تخمدان انجام شد نشان داد عصاره کوهوش سیاه تغییری بر میزان هورمون‌های پروژسترون نداشت که مشابه مطالعه صورت گرفته بود (۴). لایه‌های پوششی تخمک (از خارج به داخل) به ترتیب شامل لایه تکا، لایه گرانولوزا، لایه زونارادیاتا و غشا سیتوپلاسمی تخمک می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر و بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که در گروه کنترل دست نخورده سلول‌ها در مرحله ویتلوژنز بودند ولایه زونارادیاتا در تصویر مشاهد شد. نفوذ ذرات زرده‌ای به درون سیتوپلاسم از طریق میکروپینوسیتوزهای(Micropinocytos) لایه زونارادیاتا مشاهده شد(شکل ۸). نمایان شدن لایه زوناتارادیاتا در مراحل اولیه زرده سازی اتفاق می‌افتد(۲۲). در تیمار تاموکسیفن با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غشا تک لایه مشاهد شد . اووسیت دارای سیتوپلاسم کاملا فشرده‌ای بود که در آن ارگانل‌های به‌طور غیر واضح دیده شدند(شکل ۱۱). در مطالعه ای که بر روی موش سوری انجام شد از داروی تاموکسیفن

استفاده شد که با بررسی یافته‌های میکروسکوپ الکترونی مشاهده گردید که در گروه کنترل، تخمک‌ها از یک دیگر جداشـــده و در مرحله فولیکول اولیه قرار داشـتند اما در گروهی که به موش‌ها تاموکسـیفن تزریق شـده بود، تخمک‌ها به‌صـورت خوشـه‌ای و تمایز نیافته بودند (۲۳)

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از سطوح هورمونی، تصاویر حاصله از میکروسکوپ نوری و الکترونی به نظر میرسد که کوهوش سیاه اثر مهاری بر تخمک گذاری و سطح استروژنی گورامی سه خال دارد. با توجه به اثر مهاری کوهوش سیاه برروی استرادیول و همچنین مطالعات منتشر شده از خواص ضد تکثیری ، سرطانی و همچنین بهبود علائم یائسگی توسط کوهوش سیاه، به نظرمی رسد که میتوان کوهوش سیاه را در رژیم غذایی افراد یائسه مبتلا به سرطان سینه قرار داد . همچنین با توجه به تصاویر میکروسکوپ نوری و الکترونی و داده های هورمونی تاموکسیفن بر روی هومورن های جنسی ماهی اثر مهاری گذاشته و موجب مهار بلوغ تخمک در ماهیان شد . اثر مهاری تاموکسیفن با توجه به داده ها بیشتر و محسوس تر از اثر مهاری کوهوش سیاه می باشد.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

1. Wuttke W, and Seidlová-Wuttke D. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) is a non-estrogenic alternative to hormone replacement therapy, Clinical Phytoscience. 2015;1(1):1-13.

2. Nadaoka I, Yasue M, Sami M, Kitagawa Y. Oral administration of *Cimicifuga racemosa* extract affects immobilization stress-induced changes in murine cerebral monoamine metabolism. Biomedical Research. 2012; 33(2):133-7.

3. Mayo JL.Black cohosh and chasteberry.herbs valued by women for centuries. Target. 1998;19:22-6.

4. Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D. *Cimicifuga racemosa* extract for the treatment of climacteric complaints. Journal of Endocrinology and Reproduction. 2006;10(2):106-110.

5. Casper RF. Phytoestrogens, clomiphene, and the uterus. Journal of the Society for Gynecologic Investigation. 2004;11(5):261-2.

6. Gao X, Petroff BK, Oluola O, Georg G, Terranova PF, Rozman KK. Endocrine disruption by indole-3-carbinol and tamoxifen: blockage of ovulation. Toxicology andapplied pharmacology. 2002 Sep;183(3):179-188.

7. Al-Anazy IA, Al-Dahmash B, El-Nagar DM, Ibrahim KE, Al-Tamimi J, Rady AM, Khan MF. Hyper-ovulation, endometriosis, and hyperplasia associated with tamoxifen exposure in Swiss albino mice. Journal of King Saud University-Science. 2020 Oct;32(7):3026-31.

8. Bodinet C, Freudenstein J. Influence of Cimicifuga racemosa on the proliferation of estrogen receptor-positive human breast cancer cells. Breast cancer research and treatment. 2002 Nov;76(1):1-10.

9. DeganiG, Jakson k, Marmelstein G. *Trichogaster Trichopterus* (Anabantidae , Pallas, 1770). Journal of Aquaculture in the Tropics.1995 Nov ;10:297-307.

10. Mercado-Feliciano M, Cora MC, Witt KL, Granville CA, Hejtmancik MR, Fomby L, Knostman KA, Ryan MJ, Newbold R, Smith C, Foster PM. An ethanolic extract of black cohosh causes hematological changes but not estrogenic effects in female rodents. Toxicology and applied pharmacology. 2012 Sep 1;263(2):138-47.

11. Wang Y, Zhao Z, Yang W, Li L, Zhu F, Pei G, Yang J, Zhu H, Xu H, Wang M, Yang Q. Evaluation of the safety and tolerability of tamoxifen for ischemia-incited renal injury in mice. American journal of translational research. 2018;10(7):2184.

12. Pelissero C, Flouriot G, Foucher JL, Bennetau B, Dunogues JF, Le Gac F, *et al*. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an in vitro test for the estrogenic potency of chemicals. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 1993 Mar;44(3):263-272.

13. Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T.*et al*. Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. European Journal of Endocrinology .2003;149(4):351.

14. Singh AK. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex population of fishes. General and Comparative Endocrinology. 2103 Jan;181:146-155.

15. Zierau O, Bodinet C, Kolba S, Wulf M, Vollmer G.Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2002 Jan;80(1):125-130.

16. Burdette JE, Liu J, Chen SN, Fabricant DS, Piersen CE, Barker EL, Pezzuto JM, et al. Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. Journal of Agricultural and Food Chemistry.2003 Sep;51(19):5661-5670.

17. Prasad P, Ogawa S, Parhar S.Role of serotonin in fish reproduction. Frontiers in neuroscience. 2015;9:195.

18. Bathaee M, Naji T, Hosseinzadeh Sahafi H. Investigation of the level of steroid hormones and mature female three spot Gourami's (*Trichogaster trichopterus*) Oocytes maturation in facing alcoholic extract of (*Vitex agnus castus*) and Fluoxetine. Journal of Animal Research (Iranian Journal of Biology). 2019;32(2):155-165.

19. Yu M, Wang J, Liu W, Qin J, Zhou Q, Wang Y. Effects of tamoxifen on the sex determination gene and the activation of sex reversal in the developing gonad of mice. Toxicology. 2014 Jul;321:89-95.

20. Aquino NS, Araujo-Lopes R, Batista IA, Henriques PC, Poletini MO, Franci CR.*et al*. Hypothalamic effects of tamoxifen on oestrogen regulation of luteinising hormone and prolactin secretion in female rats. Journal of Neuroendocrinology. 2016;28(1).

21. Donath J, Nishino Y. Effects of partial versus pure antiestrogens on ovulation and the pituitary–ovarian axis in the rat. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 1998 Aug;66(4):247-254.

22. Ravaglia MA, Maggese MC. Oogenesis in the swamp eel Synbranchus marmoratus (Bloch, 1795)(Teleostei; synbranchidae). Ovarian anatomy, stages of oocyte development and micropyle structure. SciELO - Scientific Electronic Library Online . 2002;26(3):325-337.

23. Roshangar L, Rad JS, Afsordeh K. Maternal tamoxifen treatment alters oocyte differentiation in the neonatal mice: Inhibition of oocyte development and decreased folliculogenesis. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 2010 Apr;36(2): 224-231.

Journal of Animal Physiology and Development
Volume 15, Issue 4, Number 60, Pages 23-36
Qjaphd.sinaweb.net **ISSN: 9880-1735**

The Effect of Tamoxifen and Black Cohosh (*Actaea racemosa*) On The Changes In The Levels Of Sex Steroid Hormones And Oocytes Maturation Of Adult Female Gourami fish (*Trichogaster trichopterus)* from family *(*Osphronemidae*)*

Mohsen Bagheri[1], **Tahereh Naji[2]**, Homayoun Hosseinzade sahafi[3]

1- pharmacy student, Department of Basic Sciences, Faculty of pharmacy and pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of pharmacy and pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Corresponding author: tnaji2002@gmail.com & naji_t@iaups.ac.ir
3- Professor, Iranian Fisheries science Research Institute, Agricultural Research, Education and Promotion Organization, Theran, Iran.

Received:2022.09. 14 **Accepted: 2022.10.03**

Abstract

Introduction & Objective: One of the most common cancers in the menopausal age is breast cancer. To control menopause symptoms in women with breast cancer, given that hormone therapy is not recommended, alternative treatments such as phytoestrogen therapy can be considered. Black cohosh is a phytoestrogen plant that is used to control menopause symptoms. The aim of this study was to compare the effect of tamoxifen with black cohosh plant on ovarian tissue ultrastructure and measurement of sex hormones in adult female three-spot gourami fish.

Materials & Methods: For this purpose, the number of 120 pieces of three-spot gourami adult female fish with an average weight of 5±1 grams in 8 treatments with control groups including control 1 (intact) and control 2 (solvent, Ethanol 60 %) and treatments receiving doses of 10, 50, 100 mg/kg of tamoxifen drug and 10, 50, 100 mg/kg of black cohosh hydroalcoholic extract were divided. All the injections were done in 10 times and every other day for twenty days and in the amount of 0.02 ml between the dorsal fin muscle and the lateral line. Then, after anesthetizing the fish, the ovary was examined by light and electron microscope. For measuring the levels of steroid hormones, the fish tissue was homogenizaed by hemogenaizer.

Results: Black cohosh extract decreased the level of 17-beta estradiol and testosterone hormones. Tamoxifen decreased the level of 17-beta estradiol, testosterone and progesterone hormones. Examining the light and electron microscope images showed that both tamoxifen and black cohosh had an inhibitory effect on oocyet maturation.

Conclusion The results of this study showed that black cohosh plant extract and tamoxifen reduce oocyte maturation.

Key words: Black cohosh, Ovarian maturation, Sex hormones, Tamoxifen, *Trichogaster trichopterus*