فصلنامه علمی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۶۲، دوره ۱۶، شماره ۲، بهار ۱۴۰۲، صفحه ۲۶ تا ۳۹
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

مقایسه تاثیر داروی هالوپریدول و عصاره اتانولی برگ گیاه توت سفید (*Morus alba* L.) بر هورمون های استروئیدی و فراساختار بافت تخمدان در ماهی ماده گورامی سه خال بالغ (*Trichogaster tricopterus*)

ملیکا اورعی[۱]، **طاهره ناجی**[۲]، همایون حسین زاده صحافی[۳]

۱- دانشجوی 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/naji_t@iaups.ac.ir
۳- استاد، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۱۱/۰۵ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۸**

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه مقایسه تاثیر داروی هالوپریدول وعصاره برگ گیاه توت سفید بر هورمون های استروئیدی و فراساختار بافت تخمدان در ماهی ماده گورامی سه خال بالغ است.

مواد و روش ها: تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی ماده بالغ گورامی سه خال از کارگاه پرورش ماهیان زینتی در قزوین تهیه شدند و پس از آماده سازی آکواریوم ها در ۸ گروه شاهد و کنترل حلال و سه گروه دوزهای ۰/۰۵ mg/kg، ۰/۱، ۰/۲ داروی هالوپریدول و سه گروه دوزهای ۵۰ mg/kg، ۱۰۰، ۲۰۰ عصاره اتانولی برگ توت سفید تقسیم شدند. تزریق‌ها در ۱۰ نوبت و به صورت یک روز در میان در عضله بین باله پشتی انجام شد. در پایان ماهی‌ها یوتانازی و شاخص گنادوسوماتیک، هورمون های استروئیدی و فراساختار بافت تخمدان در گروه‌های تیمار و کنترل بررسی شد.

نتایج: داروی هالوپریدول در همه دوزها موجب کاهش معنی دار شاخص گنادوسوماتیک، هورمون های ۱۷ بتا استرادیول و ۱۷ هیدروکسی پروژسترون گردید($P<۰.۰۵$) و برهورمون تستوسترون تاثیر معنی داری نداشت($P>۰.۰۵$). در حالی که عصاره برگ توت سفید موجب افزایش شاخص گنادوسوماتیک و هورمون های استروئیدی شد($P<۰.۰۵$).

نتیجه گیری: با افزایش دوز هالوپریدول سطح شاخص گنادوسوماتیک و بتا استرادیول کاهش یافت ولی این اثرات وابسته به دوز نبود. عصاره اتانولی برگ توت سفید نسبت به هالوپریدول، تأثیر مخرب کمتری بر سطح هورمون‌های جنسی و شاخص گنادوسوماتیک نشان داد. به نظر می‌رسد دوز ۵۰-۲۰۰mg/kg دوز کافی و مناسبی برای مشاهده اثرات جنسی گیاه برگ توت نمی‌باشند وبا تجویز دوزهای بالاتر و افزایش غلظت فلاونوئیدها اثرات وابسته به دوز بهتر مشاهده شود.

کلمات کلیدی: هالوپریدول، برگ توت سفید، ناباروری، هورمون های استروئیدی، ماهی گورامی سه خال.

مقدمه

دوپامین یک ترکیب آلی از خانواده کاتکولامین‌ها و فنتیل‌آمینها است که نقش حیاتی در بدن و مغز دارد. دوپامین از پیش‌سازهایش در مغز و کلیه سنتز می‌شود، همچنین در بیشتر گیاهان و جانوران سنتز می‌شود. دوپامین در مغز نقش پیامرسان عصبی و در خون نقش هورمونی دارد، دوپامین به صورت عمده در وزیکول(ریزکیسه)های نورون(یاخته عصبی)های دوپامینرژیک و همچنین در غدد آدرنال ذخیره می‌شود.

در مغز چندین مسیر دوپامینی وجود دارد که مسیرهای دوپامینرژیک نامیده می‌شوند، دوپامین مهم‌ترین نقش را در ایجاد لذت و پاداش دارد، افزایش دوپامین در مناطق خاصی از مغز که به مرکز پاداش معروف‌اند در فرد ایجاد حس سرخوشی (پاداش) می‌کند به همین دلیل داروهای دوپامینرژیک به صورت عمده مورد سوء استفاده قرار می‌گیرند. دوپامین همچنین در کنترل دستگاه حرکتی نقش دارد به‌طوری که با از بین رفتن نورون‌های دوپامینرژیک علائم بیماری پارکینسون پدید می‌آیند. از کارکردهای دیگر دوپامین در مغز کنترل و تنظیم ترشح هورمون‌هاست. دوپامین از طریق تحریک گیرنده دو دوپامینی (D2) ترشح پرولاکتین را کاهش می‌دهد و از این طریق بر تولید شیر نیز اثرگذار است. در خارج از مغز و در بدن، دوپامین نقش هورمونی دارد، دوپامین در خون از آزادسازی نوراپی‌نفرین جلوگیری می‌کند و باعث تنگی عروق خونی می‌گردد، در کلیه دفع سدیم و حجم ادرار را افزایش می‌دهد. ترشح انسولین از پانکراس را کاهش و تحرک دستگاه گوارش را نیز کاهش می‌دهد.دربیماران مبتلا به سایکوز و اسکیزوفرنی با بالا رفتن سطح دوپامین در سیستم عصبی مرکزی، علائم بیماری شامل پرخاش، توهم، هذیان و گیجی بروز می یابد. مطالعات نشان میدهد در خصوص عوارض داروهای آنتی سایکوتیک نسل اول، داروی هالوپریدول به عنوان یک داروی مسدود کننده گیرنده دوپامینیD2 ،دارای عوارض سرکوب کننده توان جنسی و ایجاد کننده اختلال در سطح هورمون های جنسی و همچنین دارای اثر مخرب بر سلول های بافت تخمدان شناخته شده است. (۱).

به دلیل عوارض بی شمار ناشی از مصرف داروهای شیمیایی امروزه توجه زیادی به استفاده از داروهای گیاهی شده است. درخت توت سفید با نام علمی *Morus alba* L و متعلق به خانواده انجیران *Moraceae* است. این درخت بومی شمال چین و هند است و امروزه در بسیاری از نقاط جهان کشت می شود (۲، ۳). عصاره برگ توت سفید به عنوان یک داروی گیاهی اثر دوپامین بلاکری مشابه هالوپریدول دارد و اثر مهاری بر رفتار های استریوتایپی ناشی از تزریق آمفتامین در رت را نشان می دهد (۴، ۵). مطالعات همچنین اثرات آنتی دوپامینرژیک وابسته به دوز مربوط به فلاونویید های موجود در عصاره برگ توت سفید را در رت بررسی کرده و آن رابه عنوان یک کاندید مناسب جهت درمان کمکی و کنترل بیماری های سایکوز در بالین معرفی کرده اند (۶، ۷). نتایج تحقیقات انجام شده، حاکی از اثر افزاینده ی توان باروری توسط عصاره برگ توت سفید به دلیل افزایش تولید درون زای استروژن و پروژسترون با مکانیسم مهار آپتوز سلول های گرانولوزا رحمی در رت های یائسه می‌باشد (۸).

ماهی گورامی سه خال از دسته ماهیان تخم گذار با نام علمی *Trichogaster trichopterus* و متعلق به خانواده Anabantidae است. این ماهی همه چیز خوار بوده و

تشخیص ماهی نر و ماده از طریق باله ی پشتی آن امکان پذیر است. نگهداری و تکثیر آن نیز به سهولت انجام می شود (۹، ۱۰). این ماهی به دلیل شباهت هایی که در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و روند کلی تولید مثل با انسان ها دارد، به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی مناسب در مطالعات تولیدمثلی به کار می‌رود (۱۱).

کاهش قدرت باروری از دیر باز جزو مشکلات هر دو جنس نر و ماده بوده است که در جوامع امروزی تحت تاثیر عوامل متعددی رشد سریعی داشته است و بر اساس مواردی چون سلول های جنسی غیر عادی و کاهش سطح هورمون های جنسی قابل شناسایی است (۱، ۱۰). با توجه به اثرات اکسیداتیو مخربی که هالوپریدول بر بافت تخمدان دارد (۹) و در عین حال اثر آنتی اکسیدانی قوی عصاره ی برگ توت سفید (۴، ۵)،در صورت بکارگیری دوز مناسب از این گیاه یک گزینه مناسب جهت درمان ناباروری در بیماران سایکوز است. در این مطالعه اثر هالوپریدول و عصاره تام برگ گیاه توت سفید بطور جداگانه بر بافت تخمدان ماهی گورامی سه خال بررسی شده است.

مواد و روش ها

این مطالعه در اردیبهشت ماه سال ۱۴۰۱ در آزمایشگاه آبزیان دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی با دریافت کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1401.244 تصویب و اجرا شد. تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی گورامی سه خال با میانگین وزنی ۱±۳ گرم از کارگاه پرورش ماهیان زینتی واقع در قزوین تهیه شد. ۴۸ ساعت قبل از وارد کردن ماهیان، آکواریوم هایی با ابعاد60×50×۴۰ سانتی متر از آب شهری با هدف کلر زدایی، گرم شدن و بالا بردن سطح اکسیژن آب و به طور کلی سازگاری خصوصیات آب با دما و شرایط آزمایشگاه، پر شدند. ماهی ها پس از ورود به آکواریوم ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲± ۲۲ درجه سانتی گراد با محیط سازگار شدند.

ماهی‌ها به‌طور تصادفی در ۸ گروه شامل کنترل دست نخورده (بدون تزریق)، کنترل حلال (اتانول ۷۰ درصد)، سه گروه تیماری دریافت کننده هالوپریدول با دوز ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و سه گروه تیماری دریافت کننده عصاره برگ توت سفید با دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم‌بندی شدند. (۱۱،۲۰)

به منظور استخراج عصاره، ابتدا نمونه هرباریوم از درخت توت سفید تهیه شد و به بخش هرباریوم دانشکده علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران تحویل داده شد و با Voucher No:164_AuPF در هرباریوم دانشکده علوم دارویی ثبت گردید. عصاره اتانولی برگ توت سفید به روش خیساندن تهیه گردید. پس از تهیه و خشک کردن برگ های توت سفید، عصاره تغلیظ شده از ۵۰ گرم پودر برگ توت سفید در ۳۵۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد استخراج شد. داروی هالوپریدول به صورت پودر با Anal No: s_400488 نیز از شرکت داروسازی سبحان تهیه شد. با توجه به میانگین وزن ماهی ها در هر گروه، دوز تزریق تعیین و بر اساس آن وزن مورد نیاز از پودر مواد مؤثره دارویی به دست آمد و در اتانول ۷۰ درصد حل شد. در نهایت محلول های آماده تزریق در ظروف شیشه ای کوچک تیره رنگ درب بسته جهت جلوگیری از نور خورشید و از بین رفتن مواد موثره جهت تزریق نگهداری شدند.

قبل از تزریق هر ماهی به مدت تقریبی ۴۰-۳۰ ثانیه درون محلول رقیق شده عصاره میخک قرار گرفت تا به طور نسبی تعادل و هوشیاری خود را از دست دهد. تزریق به روش درون عضلانی و با سرنگ انسولین BD (با حجم ۱سی سی) انجام شد. پس از قراردادن پنبه مرطوب برروی آبشش های ماهی و مهار نمودن سر و دم، مقدار ۰/۰۲ سی سی بین باله پشتی و خط جانبی درون عضله با زاویه ۳۰ درجه تزریق شد. ماهی ها به مدت ۲۰ روز و به صورت یک روز در میان در ۱۰ نوبت مورد تزریق قرار گرفتند. پس از پایان دوره، به مدت ۲۴ ساعت هیچ مداخله ای بر روی ماهیان صورت نگرفت و پس از آن ماهی ها تشریح شدند.

جهت اندازه گیری سطح هورمون های ۱۷ بتا استرادیول، ۱۷هیدروکسی پروژسترون و تستوسترون به علت کوچک بودن اندازه ماهیان، امکان خونگیری فراهم نشد. لذا از بافت ماهیان و روش هموژنایز جهت این امر استفاده گردید. هورمون‌های استروئیدی توسط کیت‌های الایزای شرکت مونوبایند اندازه‌گیری شدند.

تخمدان ماهی های تشریح شده جهت تهیه لام برای میکروسکوپ نوری در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. سپس، طی مراحل پاساژ، قالب‌گیری، برش گیری و رنگ‌آمیزی بافتی، از گروه های مختلف لام تهیه شد و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت (۱۲). جهت ارزیابی با میکروسکوپ الکترونی، بافت تخمدان در گلوتارآلدئید ۲/۵٪، تتراکسید اسمیم ۱/۵٪ و بافر فسفات، فیکس شد. سپس نمونه‌ها در سری الکل صعودی (۵۰،۷۰ و ۹۵٪)، استون و مخلوط استون-رزین (۵۰/۵۰٪) آبگیری و در رزین پلیمریزه شد. سپس برش گیری انجام شد. برش‌ها روی شبکه مسی (گرید) مش ۲۰۰ قرار گرفت و رنگ‌آمیزی گردید. سپس، گریدها با میکروسکوپ الکترونی مدل PHILIPS EM 20as با ولتاژ ۷۰ کیلوولت مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

شاخص گنادوسوماتیک نیز از نسبت وزن گناد ماهی به وزن بدن ماهی بدست آمد. شاخص گنادوسوماتیک به‌طور وسیعی به‌عنوان ابزاری ساده در اندازه‌گیری ظرفیت تولیدمثل به کار برده می‌شود. این شاخص با معادله نسبت وزن گناد ماهی به وزن بدن ماهی به دست می‌آید که در آن WG وزن گناد (گرم) و W وزن بدن ماهی (گرم) است.

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

داده های بدست آمده با نرم افزار SPSS ورژن ۲۳ و آزمون های آماری آنالیز واریانس یکطرفه (One Way ANOVA) و آزمون دانکن در سطح معناداری P<۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفتند.

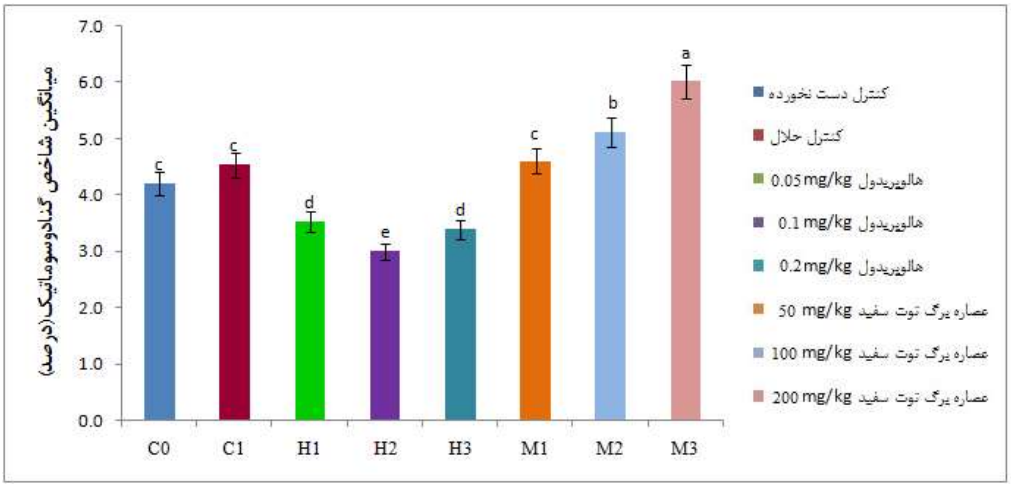
نتایج

شاخص گنادوسوماتیک

بررسی شاخص گنادوسوماتیک نشان داد تزریق عصاره هالوپریدول در همه دوزها موجب کاهش این شاخص و تزریق عصاره برگ توت سفید در همه دوزها موجب افزایش این شاخص گردید (P<۰/۰۵). کمترین و بیشترین شاخص گنادوسوماتیک به ترتیب با تزریق ۰/۱ mg/kg هالوپریدول و ۲۰۰ mg/kg عصاره برگ توت سفید تعیین شد (شکل ۱).

هورمون‌های استروئیدی

نتایج حاصل از آزمون تجزیه واریانس نشان داد ، هورمون ۱۷- بتا استرادیول، هورمون ۱۷- هیدروکسی پروژسترون و تستوسترون در گروه‌های تحت تیمار با گروه شاهد و حلال تفاوت معنی دار وجود دارد (P<۰/۰۵).

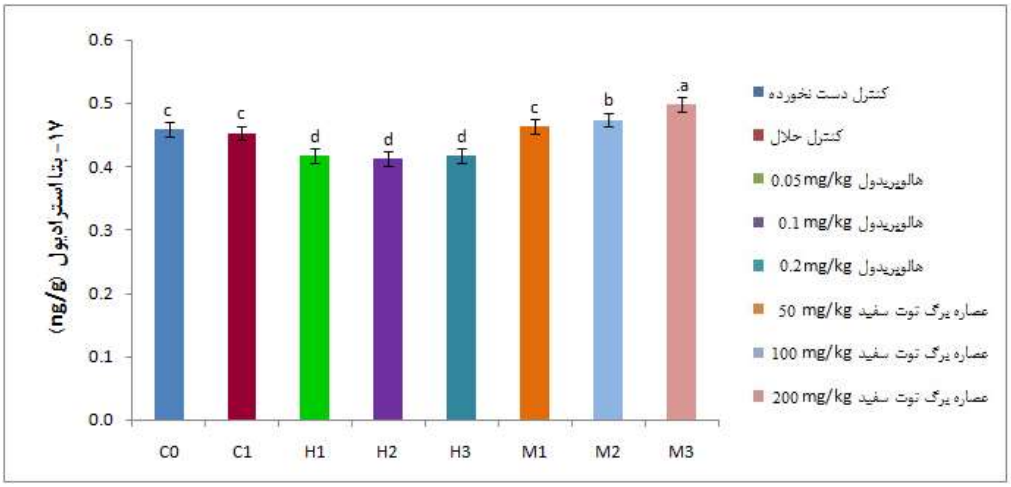


شکل ۱- مقایسه میانگین شاخص گنادوسوماتیک ماهی‌های گورامی سه خال در گروه‌های مختلف

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح p≤۰/۰۵ می‌باشد.

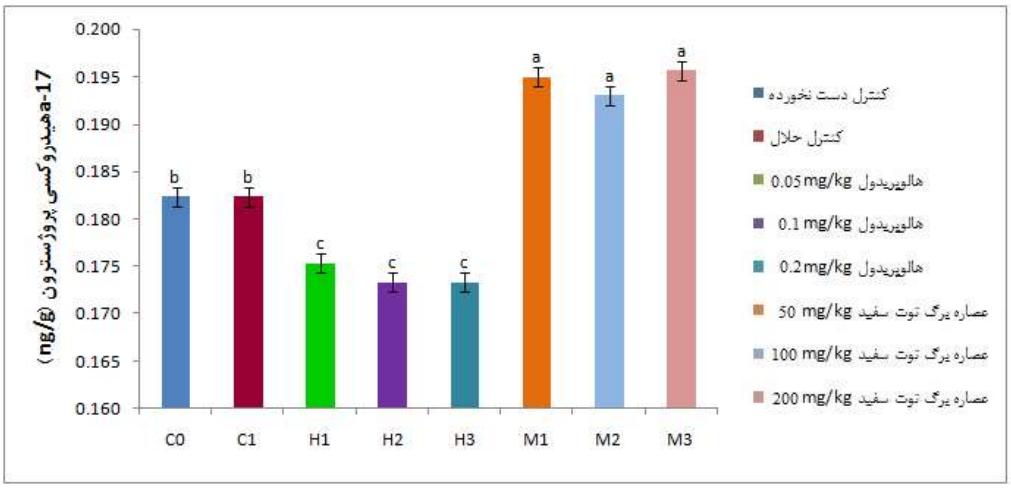
تزریق همه دوزهای هالوپریدول موجب کاهش معنی دار هورمون های ۱۷ بتا استرادیول و ۱۷ هیدروکسی پروژسترون در مقایسه با تیمارهای کنترل گردید (P<۰/۰۵) و این کاهش وابسته به دوز تزریق نبود. تزریق با عصاره برگ توت سفید هورمون های ۱۷ بتا استرادیول و ۱۷ هیدروکسی پروژسترون را در مقایسه با تیمارهای کنترل افزایش داد (P<۰/۰۵). بیشترین سطح هورمون ۱۷ بتا استرادیول در ماهی های تیمار شده با ۲۰۰ mg/kg عصاره برگ توت سفید اندازه گیری شد (شکل ۲ و ۳).

با توجه به شکل ۴، تزریق هالوپریدول در دوزهای کم تا زیاد تاثیری بر هورمون تستوسترون در مقایسه با تیمارهای کنترل نداشت (P<۰/۰۵) در حالی که در همه دوزهای عصاره برگ توت سفید افزایش هورمون تستوسترون در مقایسه با تیمارهای حلال مشاهده شد (P<۰/۰۵)

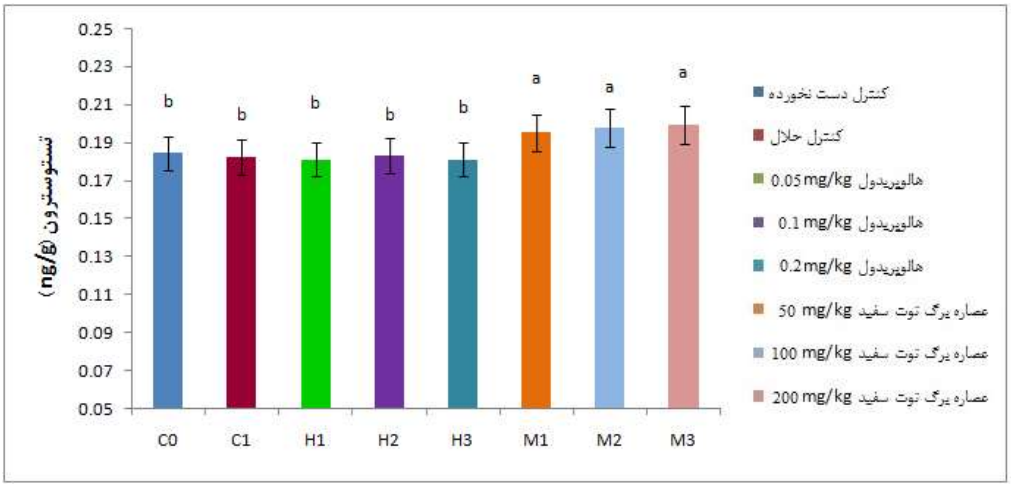


شکل ۲- مقایسه میانگین هورمون۱۷- بتا استرادیول ماهی‌های گورامی سه خال در گروه‌های مختلف

حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح p≤۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین هورمون۱۷- هیدروکسی پروژسترون ماهی‌های گورامی سه خال در گروه‌های مختلف
حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح $p\leq ۰/۰۵$ می‌باشد.

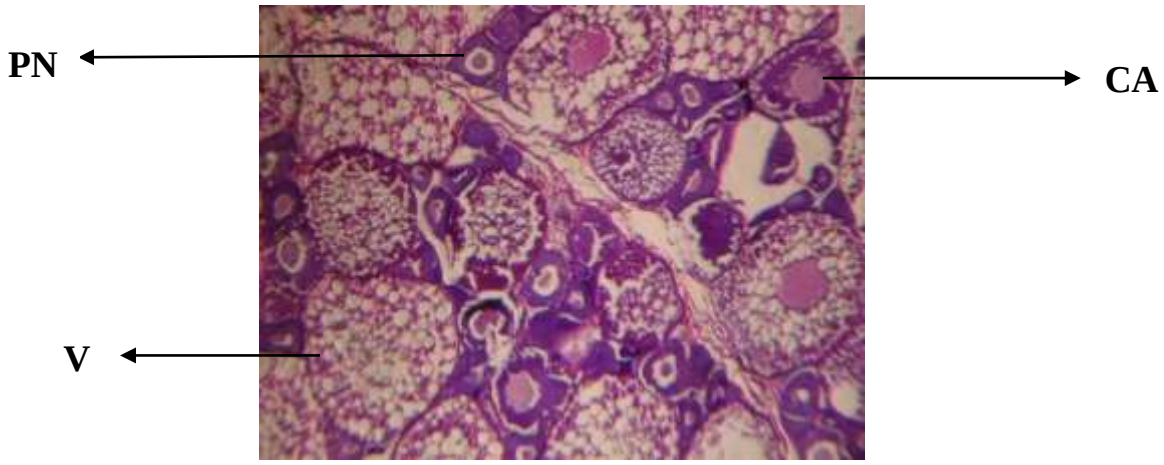


شکل ٤- مقایسه میانگین هورمون تستوسترون ماهی‌های گورامی سه خال در گروه‌های مختلف
حروف متفاوت نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح $p\leq ۰/۰۵$ می‌باشد.

مشاهده بافت تخمدان با میکروسکوپ نوری

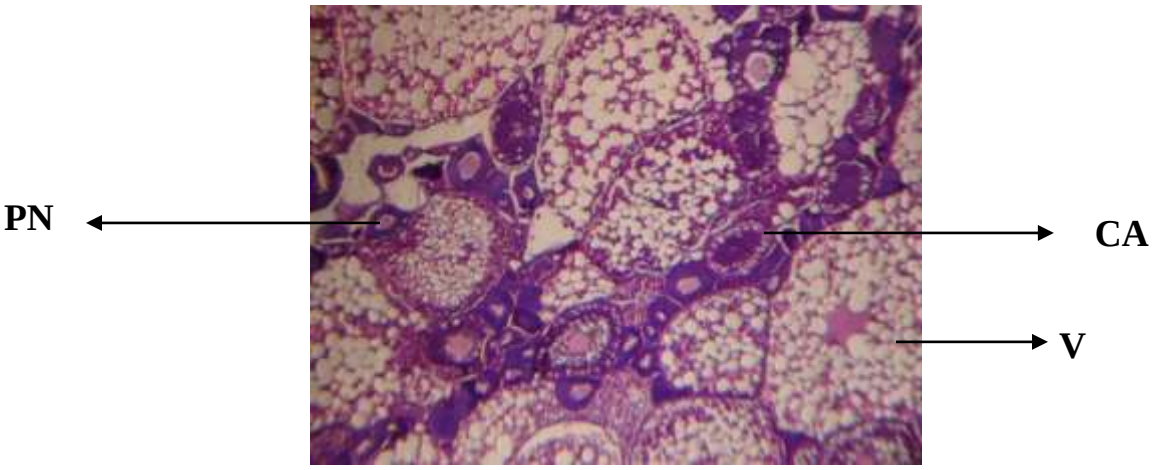
ارزیابی مقاطع بافت تخمدان ماهی‌ها در گروه های کنترل دست نخورده نشان داد که سلول ها بیشتر در مرحله پیش هستکی و کورتیکال آلوئولار قرار داشتند. تعدادی نیز در مرحله بلوغ و ویتلوژنی قرار داشتند. (شکل۵). ارزیابی مقاطع بافت تخمدان ماهی‌ها در گروه های کنترل حلال نشان داد که سلول ها بیشتر در مرحله پیش هستکی و کورتیکال آلوئولار و تعداد کمتری در مرحله ویتلوژنی قرار داشتند. (شکل ۶). در بافت تخمدان تیمار شده با دوز کم هالوپریدول تعداد سلول ها در مرحله پیش هستکی، به طور کلی نسبت به گروه کنترل افزایش یافته و سلول های بالغ کمتری به چشم

می خوردند تعدادی اووسیت در مرحله کورتیکال آلوئولار مشاهده شد. (شکل ۷).



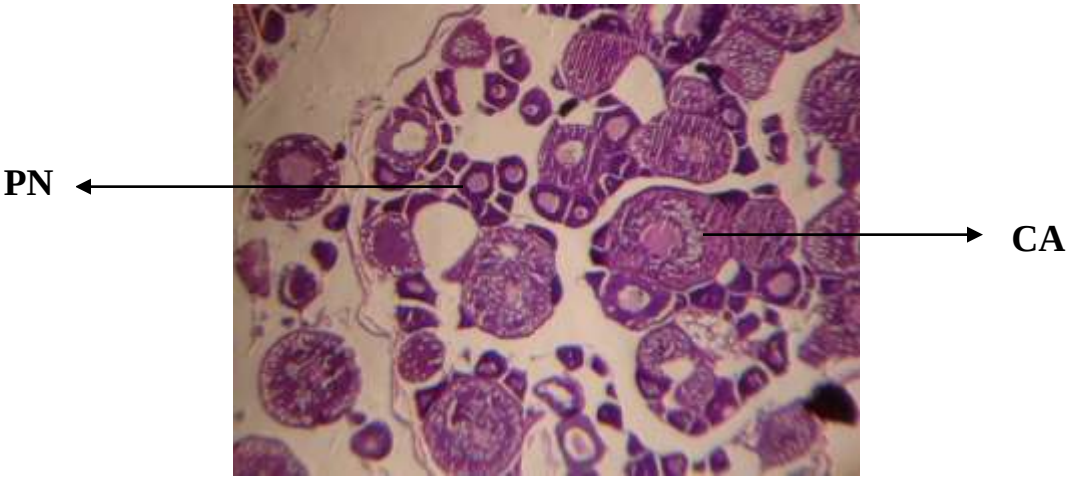
شکل ۵- مقطع بافت تخمدان. گروه کنترل دست نخورده

PN : مرحله پیش هستکی، CA: کورتیکال آلوئولار،V : مرحله ویتلوژنی، رنگ‌آمیزی H&E، با بزرگنمایی ۴۰×



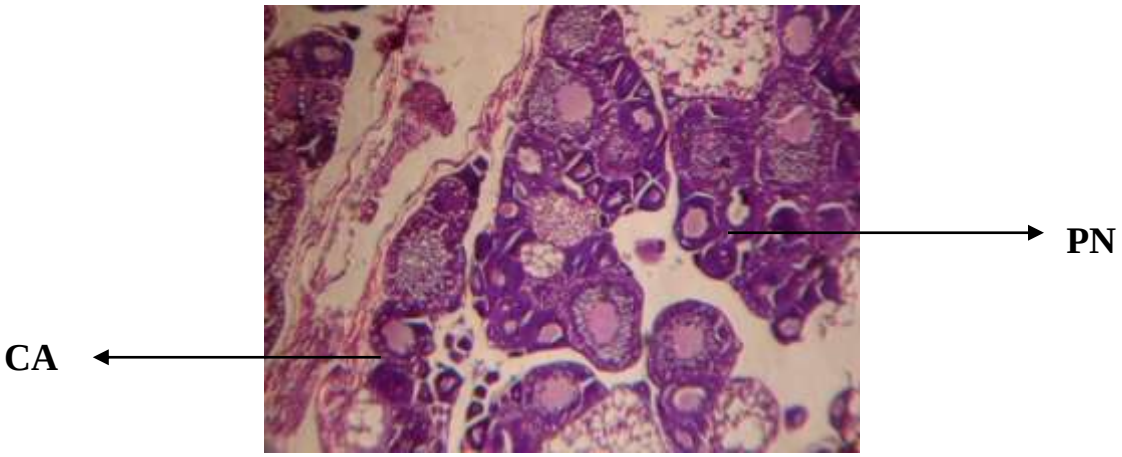
شکل ٦- مقطع بافت تخمدان. گروه کنترل حلال.

PN : مرحله پیش هستکی، CA: کورتیکال آلوئولار، V: مرحله ویتلوژنی، رنگ‌آمیزی H&E، با بزرگنمایی ۴۰×



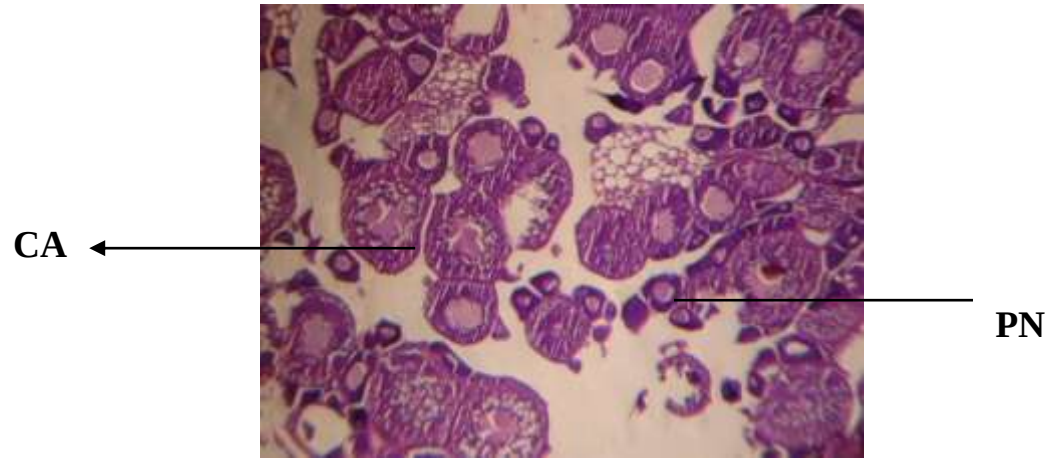
شکل ۷- مقطع بافت تخمدان. گروه۰/05 mg/kg هالوپریدول،

PN : مرحله پیش هستکی. CA: کورتیکال آلوئولار، رنگ‌آمیزی H&E، با بزرگنمایی ۴۰×



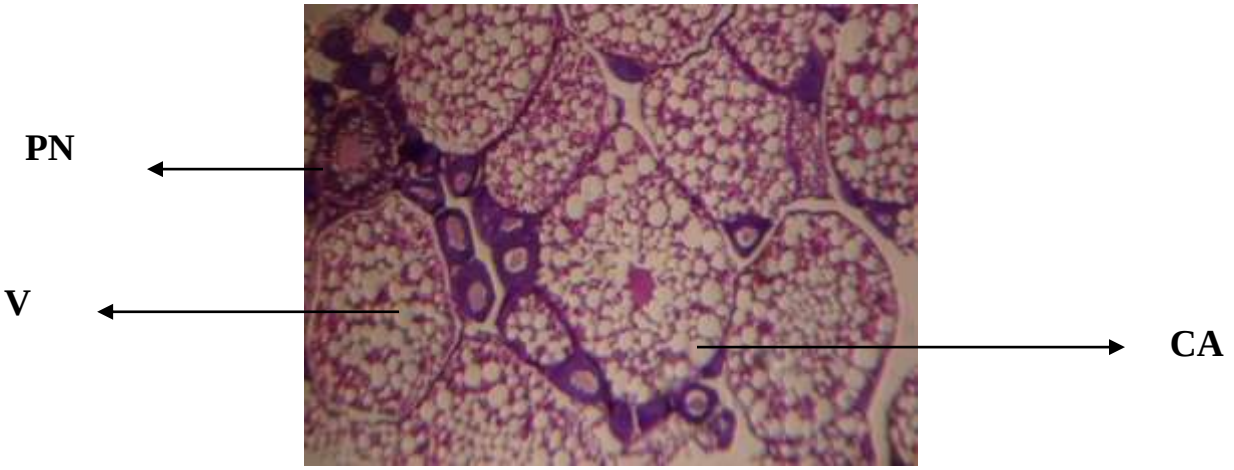
شکل ۸- مقطع بافت تخمدان. گروه mg/kg ۰/۱ هالوپریدول،
PN : مرحله پیش هستکی، CA : کورتیکال آلوئولار. رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی ٤٠×

در بافت تخمدان تیمار شده با دوز متوسط هالوپریدول تعداد سلول ها در مرحله پیش هستکی، به طور کلی نسبت به گروه کنترل افزایش یافته و سلول های بالغ کمتری به چشم خورد. تعدادی اووسیت در مرحله کورتیکال آلوئولار مشاهده شد. (شکل ۸). در بافت تخمدان تیمار شده با دوز زیاد هالوپریدول تعداد سلول ها بیشتر در مرحله پیش هستکی و تعدادی در مرحله کورتیکال قرار داشتند. شواهد در تمامی تیمار های هالوپریدول نشان دهنده (شکل ۹).



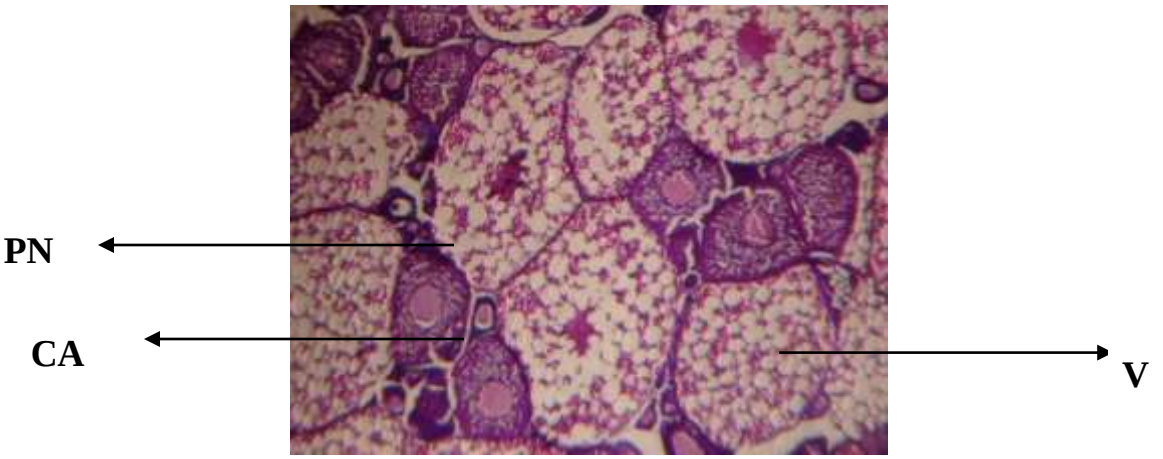
شکل ۹- مقطع بافت تخمدان. گروه mg/kg ۰/2 هالوپریدول،
PN : مرحله پیش هستکی، CA : کورتیکال آلوئولار ، رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی ٤٠×

در مقاطع تخمدانی با دوز کم، اووسیت ها در مرحله بالغ و ویتلوژنی و تعدادی نیز در مرحله کورتیکال قرار داشتند. تعداد اندکی از سلول ها نیز در مرحله پیش هستکی قرار داشتند (شکل ۱۰). در تیمار برگ توت متوسط غالبا در مرحله ویتلوژنی و تعدادی در مرحله کورتیکال قرار داشتند. نتایج حاصل از تیمار برگ توت نشان داد که علی رغم حضور سلول هایی در مرحله کورتیکال و پیش هستکی، در کل تعداد سلول های بالغ بیشتری نسبت به گروه کنترل به چشم می خورد(شکل ۱۱).



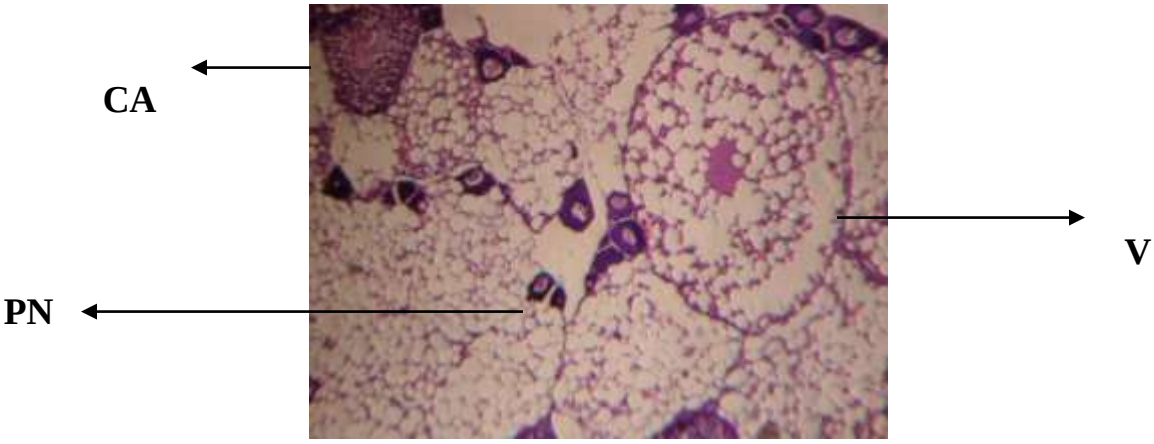
شکل ۱۰- مقطع بافت تخمدان. گروه ۵۰ mg/kg عصاره برگ توت سفید.

CA : کورتیکال آلوئولار، V : مرحله ویتلوژنی، PN : مرحله پیش هستکی . رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی ۴۰×



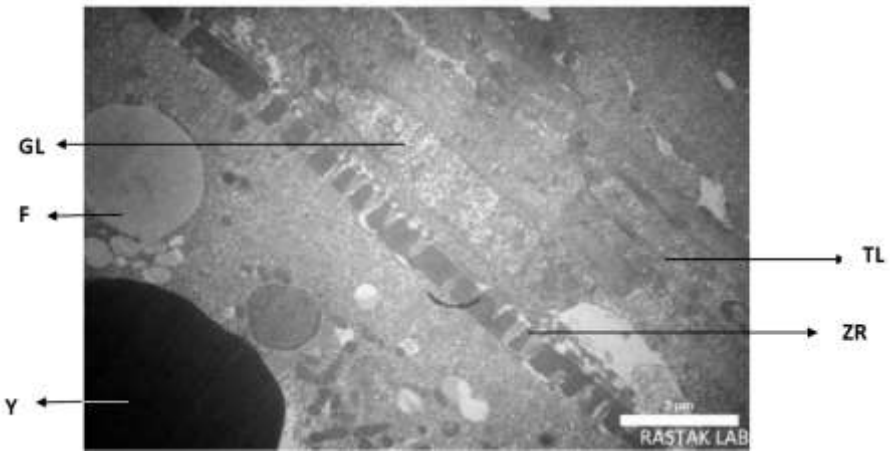
شکل ۱۱- مقطع بافت تخمدان. گروه 100 mg/kg عصاره برگ توت سفید.

CA : کورتیکال آلوئولار، V : مرحله ویتلوژنی، PN : مرحله پیش هستکی. رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی ۴۰×

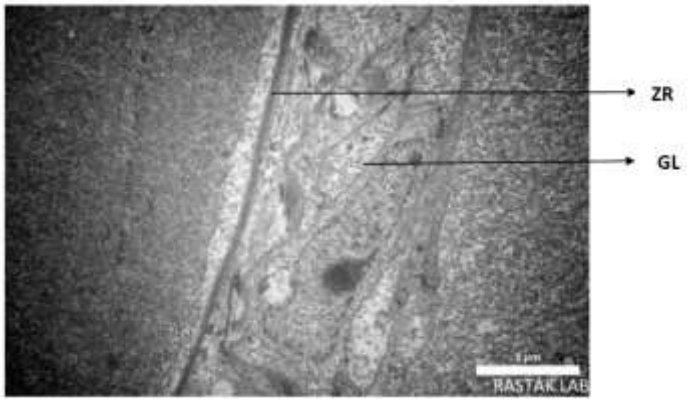


شکل ۱۲- مقطع بافت تخمدان. گروه 200 mg/kg عصاره برگ توت سفید.

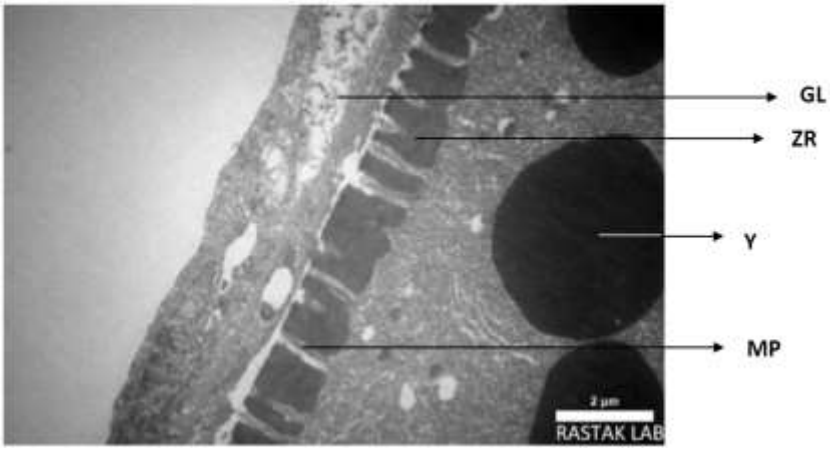
CA : کورتیکال آلوئولار، V : مرحله ویتلوژنی، PN : مرحله پیش هستکی، رنگ‌آمیزی H&E با بزرگنمایی ۴۰×



شکل٤-١٥ : مقطع سلول تخمک در گروه کنترل دست نخورده، ZR[4]: زونارادیاتا، TL[5]: لایه تکا، F[6] چربی، GL[7]: لایه گرانولوزا، Y[8] : زرده، Scale bar=3 µm



شکل ٤-١٦ : مقطع سلول تخمک در گروه هالوپریدول ۰/۱ mg/kg ، ZR : زونارادیاتا، GL : لایه گرانولوزا، Scale bar=3 µm



شکل ٤-١٧ : مقطع سلول تخمک در گروه 200 mg/kg عصاره برگ توت سفید.ZR : زونارادیاتا، GL : لایه گرانولوزا، MP[9] : میکروپینوسیتوز، Y : زرده Scale bar=3 µm

[4] Zona Radiata
[5] Theca Layer
[6] Fat
[7] Granulosa Layer
[8] Yolk
[9] Micropinocytosis

در تیمار با دوز بالا، تقریبا تمامی اووسیت ها در مرحله ویتلوژنی بودند و تعداد آنها نسبت به دوزهای پایین تر و گروه کنترل، افزایش یافت و این افزایش وابسته به دوز بود (شکل ۱۲). تصاویر در گروه کنترل دست نخورده ناحیه زونا رادیاتا را نشان داد که دارای چین خوردگی اندک در بین دو سلول مجاور تخمک بود. وزیکول های چربی بدون پیوستگی مشاهده شدند. میزان گستردگی ناحیه گرانولوزا و لایه تکا نشان از آن بود که سلول در حال رشد بود (شکل ۴-۱۵). در بررسی عکس های الکترونی تیمار هالوپریدول با دوز متوسط غشای تخمک به صورت نازکی به چشم خورد، و همچنین گرانولهای زرده و چربی مشاهده نشد.

بحث

نتایج ارزیابی شاخص گنادوسوماتیک نشان داد هالوپریدول در همه دوزها موجب کاهش و عصاره برگ توت سفید در همه دوزها موجب افزایش این شاخص در مقایسه با تیمارهای کنترل در ماهی های ماده گورامی سه خال بالغ گردید (نمودار ۱). در مطالعه ای که در سال ۲۰۲۲ انجام شد، مصرف عصاره پودری برگ توت موجب افزایش باروری در میش های سوری سالم غیر آبستن شد (۱۴). نتایج حاصل از این مطالعه همسو با نتیجه کلی مطالعه حاضر بود. (نمودار۲ و ۳) در مطالعه ای دیگر که توسط حاجی بگلو و همکاران (۱۳۹۵) صورت گرفت، پروبیوتیک پریمالاک در ماهی دم شمشیری موجب افزایش شاخص گنادوسوماتیک و عملکرد تولید مثلی در ماهیان دم شمشیری گردید (۱۵). مقایسه این پژوهش ها با مطالعه حاضر نشان از تغییرات همسو شاخص گنادوسوماتیک با سطح هورمون های استرویدی به دلیل وجود فلاونویید های استرویدی در عصاره برگ توت سفید است. (نمودار ۱)

بررسی هورمون های استروئیدی نشان داد که تزریق هالوپریدول در همه سطوح موجب کاهش معنی دار هورمون های ۱۷ بتا استرادیول و ۱۷ هیدروکسی پروژسترون نسبت به گروه های کنترل (شکل ۲ و ۳) همچنین این سلول دارای هسته بزرگ و فاقد چین خوردگی دیواره بود. لایه گرانولوزا و زونارادیاتا گستردگی کمی داشتند که نشان دهنده فعالیت کم سلول تخمک بود(شکل۴-۱۶).

در نتایج بافت شناسی تیمار عصاره برگ توت با دوز زیاد، غشای اووسیت به صورتی که ویتلوژنین توسط میکروپینوسیتوز در حال ورود به سلول بود مشاهده شد و داخل سیتوپلاسم اووسیت مملو از وزیکولهای زرده و چربی حاصل از به هم پیوستن قطرات چربی کوچک بود که نشان دهنده این بود که اووسیت در مرحله ویتلوژنز قرار داشتند (شکل ۴-۱۷).

گردید و بر هورمون تستوسترون (شکل ۴) تاثیر معنی داری نداشت. از سوی دیگر عصاره برگ توت سفید موجب افزایش هورمون های استروئیدی مورد بررسی (نمودار۲، ۳، ۴) گردید. در راستای نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه ای که تاثیر برگ توت را در آپوپتوز سلول های گرانولوزا تخمدان رت های منوپوز مسن بررسی کرد گزارش شد که گروه های تیمار برگ توت نسبت به گروه های کنترل افزایش معناداری را در سطح هورمون پروژسترون داشته اند (۸). تستوسترون در پلاسمای ماهیان استخوانی جنس ماده پیش ساز ۱۷- بتا استرادیول می باشد. مطالعات داده اند که به دنبال تعدیل در غلظت LH ترشح تستوسترون نیز تحت تاثیر قرار می گیرد. غلظت تستوسترن با شروع تقسیم میوز در ماهیان نر و رشد تخمک در ماهیان ماده افزایش می یابد و در طول بلوغ گناد، در مقادیر بالا باقی می ماند (۱۶). در مطالعه انجام شده توسط رحمان و همکاران انجام شد، اثر عصاره میوه توت سفید روی باروری و چندقلوزایی رت انجام شد و نشان داد سطوح هورمون های استروییدی جنسی به طور قابل توجهی در گروه های دریافت کننده عصاره میوه توت افزایش یافت (۱۷). این نتایج نیز همسو با مطالعه حاضر است.

(نمودار ۲و۳و۴). در مطالعه انجام شده توسط Cheng و همکاران نتایج حاصل نشان داد در پی کاهش هورمون های جنسی ناشی از یائسگی در خرگوش های ماده تجویز عصاره برگ توت در این خرگوش ها، موجب افزایش تولید هورمون های استرویيدی جنسی شد.(۱۸) که این نتایج همسو با مطالعه انجام شده است. (نمودار ۲و۳و۴) مطالعه ای که به بررسی اثرات اولانزاپین و پیموزاید بر هورمون های غدد درون ریز ماهی گورامی طلایی انجام شد اثرات مهاری آنتاگونیست های دوپامین بر هورمون های غدد درون ریز و آنزیم آروماتاز که باعث کاهش سطح تستوسترون و استرادیول می گردد، مشاهده شد (۱۹). این نتایج نیز در تایید نتایج مطالعه انجام شده است. (نمودار۲و۳و۴)

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد هالوپریدول در دوزهای mg/kg ۰/۲ - ۰/۰۵ موجب کاهش هورمون های استروئیدی و شاخص گنادوسوماتیک می گردد در حالی که عصاره برگ توت سفید در دوزهای mg ۲۰۰-۵۰ موجب افزایش آن ها شد. با این وجود به نظر می‌رسد حداکثر دوز ۲۰۰mg/kg عصاره برگ توت سفید برای مشاهده اثرات جنسی گیاه برگ توت کافی نمی باشد نمی‌باشند و بهتر است دوزهای بالاتر تجویز شوند تا با افزایش غلظت فلاونوئیدها اثر حفاظتی و آنتی اکسیدانی بهتر مشاهده گردد و اثرات سمی بالقوه‌ی موجود در عصاره را متعادل نماید. به نظر می‌رسد که با توجه به وجه تشابه هالوپریدول و عصاره برگ توت سفید در اثرات آنتی دوپامینرژیکی، استفاده از عصاره عوارض جانبی کمتری به دنبال خواهد داشت.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله از همه افرادی که در به ثمر رسیدن این تحقیق کمک شایانی نموده اند، تشکر و قدردانی می نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

فهرست منابع

1. Yadav AV, Nade VS. Anti-dopaminergic effect of the methanolic extract of *Morus alba* L. leaves. Indian journal of pharmacology. 2008 Oct;40(5):221-226.

2. Butt MS, Nazir A, Sultan MT, Schroën K. *Morus alba* L. nature's functional tonic. Trends in food science & technology. 2008 Oct 1;19(10):505-512.

3. Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. Food chemistry. 2007 Jan 1;103(4):1380-1384.

4. Riaz A, Rasul A, Hussain G, Zahoor MK, Jabeen F, Subhani Z, Younis T, Ali M, Sarfraz I, Selamoglu Z. Astragalin: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. Advances in pharmacological sciences. 2018 Oct: 1-14.

5. Choi J, Kang HJ, Kim SZ, Kwon TO, Jeong SI, Jang SI. Antioxidant effect of astragalin isolated from the leaves of *Morus alba* L. against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells. Archives of pharmacal research. 2013 Jul;36(7):912-917.

6. Devi B, Sharma N, Kumar D, Jeet K. *Morus alba* Linn: A phytopharmacological review. Int J Pharm Pharm Sci. 2013;5(2):14-18.

7. Rayam S, Kudagi BL, Buchineni M, Pathapati RM, Immidisetty MR. Assessment of *Morus alba* (mulberry) leaves extract for anti-psychotic effect in rats. Int. J. Basic Clin. Pharmacol. 2019 Sep;8:2130-2133.

8. Wei M, Mahady GB, Liu D, Zheng ZS, Lu Y. Astragalin, a flavonoid from *Morus alba* (mulberry) increases endogenous estrogen and progesterone by inhibiting ovarian granulosa cell apoptosis in an aged rat model of menopause. Molecules. 2016 May 21;21(5):675.

9. Khalaf HA, Elmorsy E, Mahmoud EH, Aggour AM, Amer SA. The role of oxidative stress in ovarian toxicity induced by haloperidol and clozapine a histological and biochemical study in albino rats. Cell and tissue research. 2019 Nov;378(2):371-383.

10. Hussain F, Rana Z, Shafique H, Malik A, Hussain Z. Phytopharmacological potential of different species of *Morus alba* and their bioactive phytochemicals: A review. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2017 Oct 1;7(10):950-956.

11. Degani G, Jackson K, Marmelstein G. *Trichogaster Trichopterus* (*Anabantidae*, Pallas, 1770). J Aquacult Trop 1995: 297- 307: 297- 307.

12. Tyler CR, Sumpter JP. Oocyte growth and development in teleosts. Reviews in fish biology and fisheries. 1996 Sep;6(3):287-318.

13. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. The Journal of cell biology. 1963 Apr 4;17(1):208-212.

14. Khafaji SS. Fecundity profiles and physiological traits of Iraqi Awassi ewes supplemented mulberry leaves powder extract. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 2022 Jun 1 (Vol. 977, No. 1, p. 012141). IOP Publishing.

15. Hajibeglo AA. The effect of Primalac on Gonadosomatic index and relative fecundity in sword tail fish (*Xiphophorous helleri*). Journal of Ornamental Aquatics. 2016 Oct 10;3(3):9-13.

16. Fernald RD. The effect of testosterone on the behavior and coloration of adult male cichlid fish (*Haplochromis burtoni*, Günther). Hormones. 1976;7(3):172-178.

17. Rahman HS, Muhammad KS, Sattar FA, Abdullah R, Othman HH, Yeap SK, Chartrand MS, Amin K. The effectiveness of super ovulation and multiple pregnancies in sprague dawley rat using Morus alba Linn. fruit. International Journal of Medical Research & Health Sciences. 2018;7(1):17-26.

18. Cheng J, Lu W, Chen X, Wang M, Tian T. The therapeutic effect of *Morus alba* leaf extract and the underlying mechanism on a rabbit model of dry eye. FARMACIA. 2021 Mar 1;69(2):341-6.

19. Kalantari P, Naji T, Hoseinzadeh H, Mousavi Z. Comparison of the effect of olanzapine and pimozide on development and changes of oocytes, endocrine marker and aromatase enzyme in *Trichogaster trichoptrus*. International Journal of Aquatic Research. 2020 Nov 10;1(1):37-47.

20. Mukherjee J, Christian BT, Narayanan TK, Shi B, Mantil J. Evaluation of dopamine D-2 receptor occupancy by clozapine, risperidone, and haloperidol in vivo in the rodent and nonhuman primate brain using 18F-fallypride. Neuropsychopharmacology. 2001 Oct;25(4):476-88.

Journal of Animal Physiology and Development
Volume 16, Issue 2, Number 62, Pages 26-39
Qjaphd.sinaweb.net **ISSN: 9880-1735**

Comparison of the effect of *Morus alba* L. leaves ethanolic extract and Haloperidol on changes of the ovarian tissue ultrastructure and the level of the sex steroid hormones in *Trichogaster trichopterus*

Melika Oraie [1], **Tahereh Naji.** [2], Homayoun Hosseinzadeh sahafi [3]

1.Pharmacy student, Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical sciences, Tehran Medical science Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2.Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical sciences, Tehran Medical science Islamic Azad University, Tehran, Iran. Corresponding author : tnaji2002@gmail.com/naji_t@iaups.ac.ir
3.Full Professor, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural research, education and Promotion organization, Tehran, Iran.

Received:2023.01. 25 **Accepted: 2023.02.27**

Abstract

Introduction & Objective: Studies suggest that haloperidol has anti-psychotic effects through the inhibition of dopamine receptors in the nervous system. *Morus alba* L. leaf extract is also known as an herbal medicine with dopamine blocking effect similar to haloperidol. The aim of this study is to compare the effect of haloperidol and *Morus alba* L. leaf extract on steroid hormones and ovarian tissue ultrastructure in adult *Trichogaster trichopterus* fish.

Materials and methods: 120 pieces of *Trichogaster trichopterus* adult female fish were obtained from the ornamental fish breeding workshop in Qazvin, and after preparing the aquariums, they were divided into 8 intact control groups and solvent control groups, and three groups of doses of 0.05, 0.1, and 2. 0 mg/kg of haloperidol drug and three groups of doses of 50, 100, 200 mg/kg of *Morus alba* L. leaf ethanol extract. Injections were done 10 times and every other day in a period of 20 days in the amount of 0.02 ml in the muscle between the dorsal fin and the lateral line of the fish. At the end of euthanasia of the fish, gonadosomatic index, steroid hormones and the ultrastructure of ovarian tissue were investigated in the treatment and control groups.

Results: Haloperidol drug in all doses caused a significant decrease in gonadosomatic index, 17-beta estradiol and 17-hydroxyprogesterone hormones ($P<0.05$) and had no significant effect on testosterone hormone ($P>0.05$). While white mulberry leaf extract increased gonadosomatic index and steroid hormones ($P<0.05$).

Conclusion: By increasing the dose of haloperidol, the level of gonadosomatic index and beta-estradiol decreased, but these effects were not dose-dependent. Also, the administration of , *Morus alba* L leaf ethanolic extract showed a less harmful effect on the level of sex hormones and gonadosomatic index than haloperidol. Nevertheless, it seems that the dose of 50-200 mg/kg is not sufficient and appropriate dose to observe the sexual effects of mulberry leaf plant and it is better to prescribe higher doses so that the dose-dependent effects can be observed better by increasing the concentration of flavonoids.

Key words: haloperidol, *Morus alba*, ovary, steroid hormones, *Trichogaster trichopterus*.