Arc

مقاله پژوهشی *مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)*
جلد ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸

بررسی اثرات زولپیدم بر اووژنز و میزان FSH وLH موش بالغ نژاد NMRI

سمانه محمدیان .M.Sc، نسیم حیاتی رودباری .Ph.D*، کاظم پریور .Ph.D

- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: nasimhayati@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۲

چکیده

هدف: این مطالعه با هدف بررسی اثرات زولپیدم بر اووژنزو هورمون‌های جنسی FSH و LH موش ماده نژاد NMRI صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از ۳۰ موش بالغ نژاد NMRI با وزن تقریبی ۳۰±۲۶ گرم که توسط تهیه اسمیر واژنی در مرحله استروس از سیکل جنسی بودند انتخاب شدند و به گروه‌های تجربی، شاهد و کنترل تقسیم شدند. گروه‌های تجربی در ۳ دسته مختلف این دارو را به‌صورت تزریق درون صفاقی به‌میزان ۵، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش به‌مدت ۱۴ روز دریافت نمودند گروه سم ۰/۰۵ میلی‌لیتر آب مقطر و کنترل هیچ ماده‌ای دریافت نکرد در پایان روز چهاردهم اندازه‌گیری میزان سرم هورمون‌های FSH وLH توسط روش الیزا انجام شد و همچنین تخمدان از بدن حیوانات خارج شد ومقاطع بافتی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین تهیه شد و تحت مطالعات میکروسکوپی و هیستولوژیکی قرار گرفت و نتایج از طریق آزمون‌های (One-way ANOVA) و تست (Tukey) با معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) تجزیه وتحلیل آماری شد.

نتایج: تزریق داروی زولپیدم به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) باعث کاهش سرمی هورمون‌های FSH و LH در گروه‌های تجربی نسبت به سم و کنترل شد، در بررسی‌های بافتی ($p<۰/۰۵$) افزایش فولیکول‌های بدوی، کاهش فولیکول ثانویه، گراف، جسم زرد نسبت به گروه سم و کنترل مشاهده شد همچنین کاهش معنی‌دارای در قطر فولیکول های ثانویه، گراف، جسم زرد و افزایش معنی‌داری در قطر فولیکول‌های بدوی، فولیکول‌های آترتیک در گروه های تجربی نسبت به سم و کنترل شد.

نتیجه‌گیری: تزریق زولپیدم باعث تغییرات معنی‌داری در روند اووژنز و هورمون‌های FSH و LH می‌شود.

واژگان‌کلیدی: زولپیدم، اووژنز، LH و FSH

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اختلال‌هایی نظیر اضطراب، افسردگی و تنش‌های ذهنی و عاطفی، مشکل در روابط زناشویی و سوء مصرف الکل و یا کافیئن می‌تواند در بروز بی‌خوابی نقش داشته باشند. داروهایی که برای درمان این اختلال‌ها مصرف می‌شود بیشتر بر اساس تعدیل عملکرد ناقل‌های عصبی مغز به‌ویژه سروتونین، نوراپی‌نفرین، دوپامین ساخته می‌شوند (۱، ۲). معمولا افسردگی و اضطراب دلایل مشابهی دارند و در بیش‌تر موارد از داروهای مشابه برای درمان آن‌ها استفاده می‌شود (۱، ۳)، بنزودیازپین‌ها داروهایی هستند که به‌عنوان ضداضطراب استفاده می‌شوند ولی به‌علت عوارضی مانند اعتیاد، خواب‌آلودگی و اختلال در یادگیری، مصرف آن‌ها با محدودیت همراه است. زولپیدم دارویی غیر بنزویازپینی، نیمه عمر ۲ تا۳ ساعت دارد یک خواب‌آور عمومی است و دارای ویژگی‌های مسکن، ضد اضطراب و آرام‌بخش می‌باشد و مهم‌ترین بازدارنده انتقال دهنده‌ی عصبی در مغز پستانداران می‌باشد (۴)، جذب این دارو به خون سریع است و در مدت زمان ۱ الی ۳ ساعت به حداکثر غلظت خود در خون می‌رسد (۵) اثرات این دارو با فلومازنیل متوقف می‌شود (۶، ۷) و بر خلاف بنزودیازپین‌ها اثرات شل کنندگی عضله و ضد تشنج آن بسیار کم است (۷، ۸)، زولپیدم توسط کبد و از طریق اکسیداسیون و هیدروکسیلاسیون به‌سرعت به متابولیت‌های غیرفعال متابولیزه می‌شود (۱۰،۹). اگر چه کارایی زولپیدم در درمان اختلالات خواب مشابه بنزودیازپین‌های خواب‌آور است، اما برتری‌هایی از قبیل کاهش عوارض فراموشی و اختلالات سایکوموتور در روز بعد از مصرف دارد (۱۱). همچنین مصرف آن باعث خواب بدون وقفه سریع در طول شب شده و از نظر ایجاد وابستگی نسبت به داروهای بنزودیازپینی نظیر دیازپام ایمن‌تر بوده و عوارض ناشی از آن‌ها از جمله وابستگی، تحمل نسبت به دارو، تغییر ریتم خواب، تضعیف تنفس را به‌دنبال ندارد (۱۲، ۱۳). با این وجود، مصرف داروی زولپیدم در دوزهای بالا منجر به اختلال‌هایی از جمله منگی، سنگینی و عدم تعادل، افت فشار خون، گرفتگی عضلانی، اختلالات رفتاری نظیر بی‌قراری عصبی، کج خلقی و راه رفتن در خواب می شود (۱۴، ۱۵). اووژنز فرآیندی است که طی آن سلول‌های اووگونی به اووسیت‌های بالغ تمایز می یابند. در پستانداران فرآیند اووژنز در دوره‌ی جنینی با تشکیل سلول‌های زایای بدوی آغاز شده و پس از آن در دوره‌ی بلوغ جنسی ادامه می‌یابد (۱۶). عملکرد گنادی در مهره‌دارانی با هورمون‌های گنادوتروپیک آزاد شده از غده هیپوفیز تنظیم می‌شود این غدد خود تحت کنترل نوروهورمون‌های مغزی GnRH آزاد شده از هیپوتالاموس می‌باشند. هورمون‌های گنادوتروپیکی موثر بر روی تخمدان LH و FSH است. این دو هورمون که به‌صورت سینرژیک عمل می‌کند اووژنز رو تنظیم می‌کند و باعث رشد فولیکول می‌شود (۱۷). زولپیدم به‌عنوان گیرنده‌ی آگونیستی گابا نوع A اثر مهاری خود را بر سیستم عصبی مرکزی القا می‌کند (۱۸). زولپیدم می‌تواند باغث کاهش عملکرد محور هیپوفیز-گناد شد (۱۹). زولپیدم به‌سرعت از روده جذب می‌شود و محل اصلی آن کبد می‌باشد و به کبد و کلیه آسیب نیز می‌رساند (۲۰). زولپیدم از جفت عبور می‌کند و همچنین موجب ناهنجاری‌هایی در جنین نیز می شود (۲۱). زولپیدم می‌تواند التهاب گلو، برونشیت، التهاب ریه را ایجاد کند (۲۲). زولپیدم، از دسته داروهای غیر بنزودیازپینی، آگونیست گیرنده‌های گابا نوع A می‌باشد که استفاده از آن در درمان اختلالات عصبی اضطرابی اخیرا گسترش یافته (۲۳) مصرف زولپیدم در افراد بالغ به‌خصوص خانم‌ها به‌علت استرس‌های زندگی زیاد است و ممکن است با این حقیقت همراه باشد که بی‌خوابی در خانم‌ها متداول‌تر است (۴۲، ۵۲) یکی از عوامل ناباروری در مشکلات تخمدان می‌باشد و همچنین مشکلات هورمونی شایع‌ترین دلایل برای عدم تخمک‌گذاری و باروری هستند (۶۲، ۷۲). و از آن‌جاکه تاکنون مطالعه‌ای بر روی دستگاه تناسلی جنس ماده و بافت تخمدان موش

www.SID.ir

Archive of SID

صورت نگرفته است لذا مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثرات داروی زولپیدم بر اووژنز و هورمون هایHL و FSH در موش‌های سوری ماده صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

تمامی آزمایشات در مجتمع آزمایشگاهی رازی و بر اساس دستور العمل کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام شد.

حیوانات آزمایشگاهی و گروه‌بندی: ابتدا موش‌های سفید آزمایشگاهی بالغ نژاد NMRI ماده با وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم را از انیستیتو پاستور تهران خریداری نموده و به اتاق نگه‌داری حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انتقال داده شدند. به‌منظور تطبیق موش‌ها با محیط جدید، پس از یک هفته آزمایشات انجام شد. جانوران در قفس‌های پلاستیکی با ابعاد مشخص و استاندارد که غذا و آب در دسترس آن‌ها قرار داشت نگه‌داری می‌شدند و از تراشه‌های چوب به‌عنوان بستر در قفس آن‌ها استفاده می‌شد. تغذیه این حیوانات از پلیت‌های آماده و مخصوص صورت می‌گرفت و آب مورد استفاده، آب لوله‌کشی شهری بود که توسط شیشه‌های مخصوصی در اختیار جانوران قرار می‌گرفت. میزان درجه حرارت اتاق پرورش حیوانات ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد بود. قفس موش‌ها هر هفته دو بار نظافت می‌شد. موش‌ها توسط تهیه اسمیر واژنی مورد ارزیابی قرار گرفته و در مرحله استروس از سیکل جنسی بودند، موش‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند: یک: گروه کنترل (بدون تاثیر زولپیدم)، دو: گروه شم (با تزریق ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر به‌عنوان حلال زولپیدم)، سه: گروه تجربی ۱ با تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر غلظت ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن موش از زولپیدم، چهار: گروه تجربی ۲ با ترزیق ۰/۵ میلی لیتر غلظت ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن موش از زولپیدم، پنج: گروه تجربی ۳ با تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر غلظت ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن موش از زولپیدم، دوز مورد استفاده از این دارو در انسان ۵ و ۱۰ میلی‌گرم می‌باشد که در موش بر اساس وزن آن‌ها محاسبه شد و تزریق شد (۲۸) هنگام کار با موش ها موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

مواد دارویی: زولپیدم به‌صورت قرص جامد با دوز ۵ و ۱۰ میلی‌گرم از شرکت داروسازی اکسیر تهیه شد.

نحوه آماده کردن محلول زولپیدم و تزریق به موش: موش‌های مورد نظر پیش از تزریق وزن شدند و میزان ماده‌ی تزریقی براساس وزن موش‌ها محاسبه شد. تزریق به‌صورت درون صفاقی بود، برای گروه کنترل هیچ تزریقی صورت نگرفت. برای گروه سم، آب مقطر و برای گروه‌های تجربی غلظت مورد نظر از زولپیدم، به‌مدت ۱۴ روز متوالی تزریق انجام شد (۲۹).

سنجش میزان سرم‌ها: همه‌ی گروه‌های مورد بررسی موش‌ها یک روز بعد از گذشت آخرین تزریق، توسط اتر بیهوش شدند خون‌گیری به‌طور مستقیم از بطن چپ صورت گرفت نمونه‌های خونی به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در آزمایشگاه ثابت نگه‌داری شدند و بعد به‌مدت ۵ دقیقه با ۳۶۰۰ دور در دقیقه (rpm) نمونه‌ها سانتریفوژ شد و سنجش میزان سرم هورمون‌های FSH و LH از طریق روش الیزا Kit Mouse انجام شد, براساس روش (ELISA و Enzyme Immuno assay0) و با استفاده از آنتی‌بادی مونوکونال می‌باشد به این منظور از پلت‌های ۹۶ خانه‌ای که به‌ترتیب با آنتی‌بادی‌های علیه LH و FSH پوشش داده شده‌اند استفاده شد پس از اضافه کردن نمونه (سرم موش NMRI) و مجاور شدن با آنتی‌بادی پوشش داده شده، آنتی‌بادی ثانویه ضد LH FSH,که متصل به آنزیم نشان‌دار هستند. -ESH Enzyme (onjugate) و (LH-Enzyme) اضافه می‌شد، بعد از انکوباسیون و شستشو محلول رنگ‌زا داخل چاهک‌ها ریخته شد که رنگ حاصله با کمپلکس ایمنی تشکیل شده با غلظت LH-FSH موجود در نمونه متناسب است غلظت نهایی با دستگاه الایزاریدر قرائت شد.

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز بافت شناسی بافت تخمدان: پس از خون‌گیری از قلب، تخمدان‌ها جهت بررسی‌های هیستولوژیکی خارج شد سپس به ظرف حاوی بوئن منتقل شدند، پس از گذشت ۴ ساعت، تخمدان‌ها داخل الکل (الکل ۷۰ درصد) گذاشته شدند. پس از مراحل آب‌گیری و قالب‌گیری از هر گروه ۱۲ لام با برش‌های سریالی ۵ تا ۷ میکرومتری با میکروتوم تهیه و به‌وسیله‌ی هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شدند ضخامت قطر بافت تخمدان با استفاده از عدسی چشمی مدرج اندازه‌گیری شد همچنین تعداد و ضخامت قطر فولیکول‌های بدوی، فولیکول‌های اولیه، فولیکول‌های درحال رشد، فولیکول‌های ثانویه، فولیکول‌های گراف، فولیکول غیر طبیعی و جسم زرد، خونی در ۵ مقطع از مقاطع بافتی از گروه‌های مختلف مورد بررسی‌های میکروسکوپی قرار گرفت میانگین اعداد در ۵ مرتبه تکرار شمارش فولیکولی ملاک نتایج تحقیق قرار گرفته است.

آنالیز آماری

تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار $Spss_{20}$ در $p<۰/۰۵$، $p<۰/۰۰۱$، $p<۰/۱$، با درنظر گرفتن انحراف معیار (SE) با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و تست (Tukey) توکی انجام شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار Excel هیستوگرام‌ها ترسیم شدند.

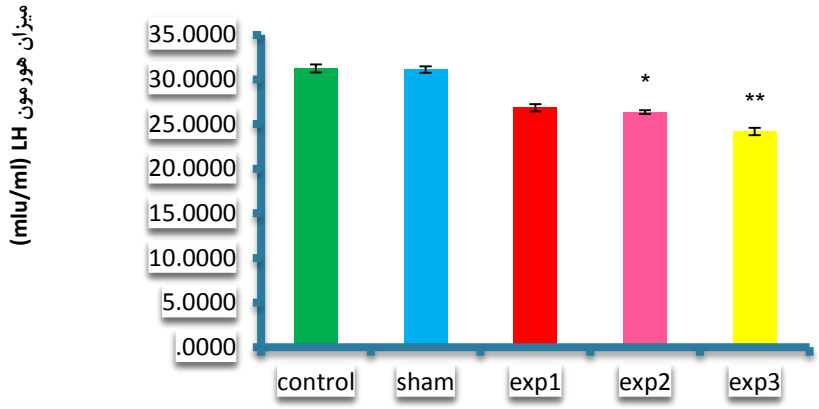
نتایج

نتایج حاصل از پنج گروه بررسی شده نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری در اندازه‌گیری وزن جانوران، وزن تخمدان‌ها، ضخامت قطر بافت تخمدان، تعداد فولیکول‌های اولیه و تعداد فولیکول‌های غیر طبیعی بین گروه‌های تجربی و کنترل و شاهد مشاهده نشد.

بررسی‌های میکروسکوپی بیانگر افزایش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌های بدوی و اتریک در گروه های تجربی ۱، ۲، ۳ نسبت به گروه کنترل و شاهد بود. همچنین کاهش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌های در حال رشد، فولیکول‌های ثانویه، فولیکول‌های گراف و تعداد جسم‌های زرد در گروه‌های تجربی ۲، ۳ نسبت به گروه کنترل و شاهد مشاهده شد. افزایش معنی‌داری در تعداد رگ‌های خونی در گروه تجربی ۳ نسبت به گروه کنترل و شاهد مشاهده شد. همچنین نتایج نشانگر این بود که اختلاف معنی‌داری در قطر فولیکول‌های بدوی، ثانویه، قطر رگ‌های خونی تخمدان و قطر فولیکول های غیر طبیعی بین گروه‌های تجربی و کنترل و شاهد مشاهده نشد. افزایش معنی‌داری در قطر فولیکول‌های اولیه و اتریک و کاهش معنی‌داری در قطر فولیکول‌های در حال رشد، گراف و قطر جسم زرد در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ نسبت به گروه کنترل و شاهد مشاهده شد. سنجش هورمونی FSH از سرم خون گروه‌های تجربی و کنترل و شاهد اندازه‌گیری شد و در نمودار ۲ دیده می‌شود و بیان‌گر کاهش معنی‌داری میزان FSH سرم خون در گروه‌های تجربی ۳,۲,۱ نسبت به گروه کنترل و شاهد می‌باشد که این کاهش در گروه تجربی ۱ در سطح $p<۰/۰۵$ و گروه تجربی ۲، $p<۰/۰۵$ و گروه تجربی ۳، $p<۰/۰۱$ می‌باشد(mlu/ml). سنجش هورمونی LH از سرم خون گروه‌های تجربی و کنترل و شاهد اندازه‌گیری شد و در نمودار ۱ دیده می‌شود و بیان‌گر کاهش معنی‌داری میزان LH سرم خون در گروه‌های تجربی ۳,۲ نسبت به گروه کنترل و شاهد می‌باشد که این کاهش در گروه تجربی ۲ در سطح $p<۰/۰۵$ و گروه تجربی ۳، $p<۰/۰۱$ می‌باشد (mlu/mL).

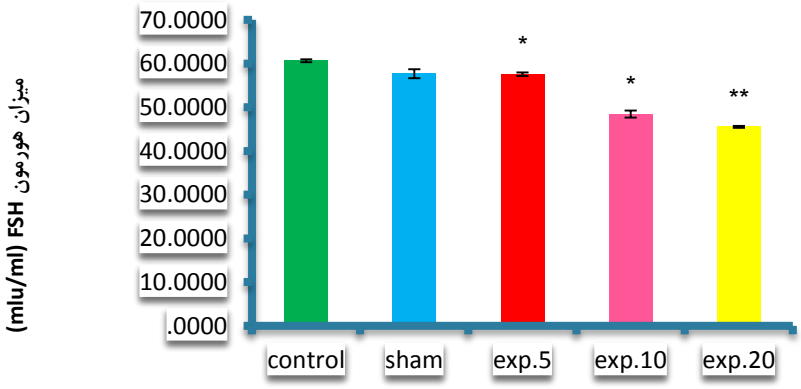
www.SID.ir

Archive of SID



میانگین میزان هورمون LH

نمودار ۱: نتایج تحلیل مقایسه‌ی میزان هورمون LH در گروه‌های کنترل، سم، تجربی ۱، ۲، ۳ کاهش معنی‌داری میزان LH سرم خون در گروه‌های تجربی ۳،۲ نسبت به گروه کنترل و شاهد (* p<0.05,** p<0.01, ***p<0.001) ($\bar{x}$ ± SE).



میانگین میزان هورمون FSH

نمودار ۲: نتایج تحلیل مقایسه‌ی میزان هورمون FSH در گروه‌های کنترل، سم، تجربی ۱، ۲، ۳ کاهش معنی‌داری میزان FSH سرم خون در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ نسبت به گروه کنترل و شاهد (* p<0.05,**p<0.01, ***p<0.001) ($\bar{x}$ ± SE).

www.SID.ir

Archive of SID

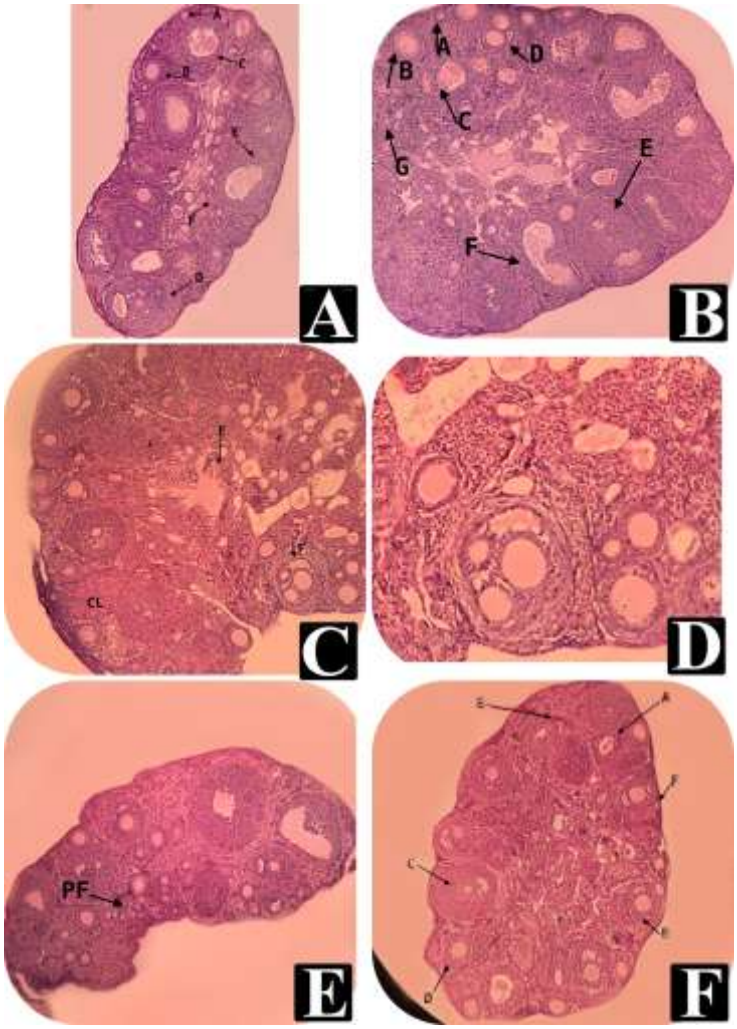
جدول ۱: نتایج تحلیل آماری تاثیر زولپیدم بر روی قسمت‌های مختلف قطر بافت تخمدان، تعداد فولیکول در گروه‌های کنترل، سم، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳ ($\bar{x} \pm SE$). *نشانه‌ی معنی‌داری گروه‌های تجربی با گروه‌های کنترل و سم می‌باشد.

فاکتور اندازه گیری	کنترل	سم	تجربی ۱	تجربی ۲	تجربی ۳
وزن جانور	34/50 ± 0/99	33/50 ± 0/56	32 ± 0/57	29/50 ± 0/80	26 ± 0/57
وزن تخمدان	13/40 ± 0/53	12/31 ± 0/25	11/30± 0/25	9/91 ± 0/29	8/91 ± 0/30
قطر تخمدان (µm)	131/66 ± 3	134/58 ± 3/25	110/41± 3/84	104/16 ± 2/63	101/25 ± 1/25
تعداد فولیکول بدوی	4/50± 0/22	4/66 ± 0/21	7 ± 0/25	**8/66 ± 0/21	**10/33± 0/33
تعداد فولیکول اولیه	3/16 ± 0/16	3/33± 0/21	4/16 ± 0/16	5/33 ± 0/21	4/43 ± 0/16
تعدادفولیکول درحال رشد	2/33 ± 0/42	3 ± 0/36	2/83 ± 0/40	**4 ± 0/25	**4 ± 0/25
تعداد فولیکول گراآف	5/50 ± 0/22	4/50± 0/22	2 ± 0/36	**1/33 ± 0/21	***1/33± 0/21
تعداد فولیکول اترتیک	0	0/33 ± 0/21	*2/66 ± 0/21	***4 ± 0/36	***5/33± 0/21
تعداد جسم زرد	3/66 ± 0/21	3/50 ± 0/42	*2/16 ± 0/30	***2 ± 0	***1/33± 0/21
تعداد رگ خونی	8/83 ± 0/16	12/66 ± 1/05	11/16 ± 0/87	13/50 ± 0/67	**13/66± 0/45
تعداد فولیکول غیر طبیعی(۲ و۳ووسیت در فولیکول)	0	0	1 ± 0	1/25 ± 0/25	1/50 ± 0/28
قطر فولیکول بدوی (µm)	4/50 ± 0/22	4 ± 0	3/66 ± 0/33	3/33 ± 0/21	3/88 ± 0/36
قطر فولیکول اولیه(µm)	7/83 ±0/16	8/66 ± 0/33	10/33 ± 0/33	9/66 ±0/21	*10/33 ± 0/55
قطر فولیکول در حال رشد(µm)	22/50 ± 1/11	20/83 ± 0/54	15/83 ± 0/83	15 ± 0	***12/50± 1/70
قطرفولیکول ثانویه(µm)	19/16 ± 0/83	18/50 ± 0/34	14/50 ± 0/84	13/50±0/22	12 ± 0/81
قطرفولیکول گراآف(µm)	39/16 ±0/83	37/50 ± 1/11	30/50± 1/7	*26/83 ± 1/35	**25 ± 1/09
قطر فولیکول اترتیک(µm)	5/83 ± 3/74	13/33 ± 1/66	15 ± 1/12	*16/83 ± 1/53	*18/50 ± 0/76
قطر جسم زرد(µm)	36/66 ± 1/66	32/50 ± 1/11	29/66 ± 1/11	*24/16 ± 0/83	**24/83± 1/60
قطر رگ خونی(µm)	5 ± 0	5/83 ± 0/54	5/66 ± 0/33	6/16 ± 0/40	6/16 ± 0/47
قطر فولیکول غیر طبیعی(µm)	0	0	12 ± 0/70	13/75 ± 1/25	13/75 ± 2/39

www.SID.ir

Archive of SID

از مقاطع نمونه‌های تخمدان گروه‌های تجربی و کنترل و شاهد فتومیکروگراف تهیه شد که با افزایش دوز ماده‌ی مصرفی، در بافت‌های تخمدان کاهش قطر جسم زرد (شکل۱، A) افزایش فولیکول آترتیک همچنین وجود فولیکول غیرطبیعی (وجود دو اووسیت در یک فولیکول) (شکل۱، B)، کاهش قطر فولیکول گراف وجود فولیکول غیرطبیعی (سه اووسیت در یک فولیکول)، به‌هم‌ریختگی لایه تک و به‌هم‌ریختگی استرومای تخمدان نسبت به گروه کنترل و شاهد (شکل۱، C و D) افزایش فولیکول بدوی (شکل ۱، E) افزایش فولیکول درحال رشد و کاهش قطر فولیکول درحال رشد، کاهش جسم زرد، و بی‌نظمی سلول‌های جسم زرد در گروه تجربی نسبت به کنترل (شکل ۱، F) مشاهده شد.



شکل ۱: بافت تخمدان گروه تجربی دوم با تزریق ۱۰ میلی‌گرم زولپیدم بر کیلوگرم وزن موش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین 400X به افزایش فولیکول آترتیک و تخریب فولیکول‌ها توجه شود. A: فولیکول بدوی، B: فولیکول اولیه، C: فولیکول آترتیک، D: فولیکول در حال رشد، E: فولیکول گراف، F: رگ خونی. شکل(B): بافت تخمدان گروه تجربی دوم با تزریق ۱۰ میلی گرم زولپیدم بر کیلوگرم وزن موش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین400X به کاهش جسم زرد و افزایش فولیکول آترتیک و تحلیل اووسیت فولیکول گرااف توجه شود. A: فولکول بدویB: فولیکول اولیه،C: فولیکول آترتیک، D: فولیکول غیر طبیعی وجود ۲ اووسیت در یک فولیکول، E: فولیکول در حال رشد، F: فولیکول گراف، G: رگ خونی. شکل (C): بافت تخمدان گروه تجربی سوم با تزریق ۲۰ میلی گرم زولپیدم بر کیلوگرم وزن موش، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین 400X به (E) استرومای نامنظم وجود سه اووسیت در فولیکول(F) کاهش تعداد و اندازه جسم زرد (CL) توجه شود. شکل(D): بزرگنمایی بخشی از بافت تخمدان گروه تجربی سوم، سه اووسیت در یک فولیکول از نمای نزدیک. شکل(E): قسمتی ازبافت تخمدان گروه تجربی دوم افزایش تعداد فویکول‌های بدوی (PF) رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین ۴۰۰X. شکل (F): بافت تخمدان گروه تجربی به کاهش تعداد جسم زرد و افزایش فولیکول در حال رشد توجه شود A: فولیکول آترتیک B: فولیکول در حال رشد، C:فولیکول ثانویه، D : فولیکول اولیه E: رگ خونی، -F: فولیکول بدوی رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین 400X.

www.SID.ir

Archive of SID

این بررسی نشان داد که در گروه‌های تجربی بیشترسلول‌های فولیکول‌ها روند تخریب را طی می‌کنند و تعداد جسم زرد در گروه تجربی نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری داشته است. در مقایسه سلول‌های گرانوزای لوتئینی در گروه کنترل بزرگ، چند وجهی، هسته بزرگ ریوکروماتین، هستک مشخص و ساختار سلول‌های سنتزکننده هورمون استروژن و پروژسترون را نشان دادند. همین سلول‌ها در گروه تجربی دارای هسته نامنظم می‌باشد. در دوزهای بالا در بافت تخمدان، کاهش فولیکول‌های گراف و ثانویه افزایش فولیکول‌های اولیه وبدوی به‌هم‌ریختگی در لایه سلول‌های گرانولوزا جداشدگی لایه‌ی تاج شعاعی از اوسیت، تحلیل اووسیت فولیکول گراف کاهش قطر فولیکول گراف، افزایش رگ خونی وجود دو و سه اووسیت در یک فولیکول و به‌هم‌ریختگی استرومای تخمدان دیده شد.

بحث

بسیاری از این مطالعات تاثیرات مختلف زولپیدم بر اندام‌های مورد نظر را گزارش دادند. با این وجود در زمینه‌ی اثرات احتمالی این دارو بر باروری، مطالعاتی صورت نگرفته است، اثر این داروی پرمصرف بر دستگاه تناسلی ماده تخمدان‌ها، رشد تخمک‌ها، هورمون‌های جنسی بررسی شد. در سه گروه تجربی که داروی زولپیدم را دریافت کرده‌اند کاهش وزن نسبت به گروه‌های کنترل و مشاهده دیده می‌شود. با این حال با توجه به‌این‌که این میزان کمتر از حد معنی‌دار بوده و می‌توان گفت داروی زولپیدم در دوزهای مورد بررسی بر کاهش وزن موش‌های ماده‌ی بالغ بی‌تاثیر بوده است. وزن نسبی تخمدان‌ها، در موش‌های ماده‌ی بالغ که زولپیدم را دریافت کرده‌اند نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد کاهش پیدا کرده است. کاهش در دوز ۱۰ و ۲۰ بیشتر مشاهده شده و کمتر از حد معنی‌دار بوده و مبنی بر عدم تاثیر زولپیدم بر نسبت وزن تخمدان به وزن بدن موش، در دوزهای مورد بررسی می‌باشد. قطر تخمدان‌ها نیز همانند وزن آن‌ها در گروه-های تجربی؛ نسبت به گروه‌های کنترل و سم کاهش پیدا کرده و کمتر از حد معنی‌دار می‌باشد. بنابراین می‌توان این‌گونه پیش‌بینی کرد که درصورت افزایش دوز مصرفی به میزان بیشتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، کاهش در وزن و اندازه‌ی تخمدان‌ها دیده می‌شود. Paik Greschenson و همکاران (۳۰) نشان دادند که استفاده از داروی خواب آور بر فولیکول‌های بالغ بیشتر از فولیکول‌های ابتدایی اثر می‌گذارد که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد ،Chakrabrty و همکاران (۳۱) در بررسی اثرات زوپیکلون بر روی دستگاه تناسلی موش ماده رت، در موش‌هایی که تحت تیمار با داروی زوپیکلون به‌مدت ۲۸ روز به‌صورت خوراکی قرار گرفتند. نشان دادند که سلول‌ها روند تخریبی داشته و فولیکول‌ها در حالت آتروفی هستند ، در مطالعه‌ی حاضر تعداد فولیکول‌های آترتیک افزایش یافته است. Clark و همکاران (۳۲) در بررسی‌های میکروسکوپی نشان دادند که ریتالین موجب می‌شود سلول‌های لوتئینی جسم زرد، دارای هسته‌ی نامنظم و تغییرات در این سلول‌ها شود ، در تحقیق حاضر تغییرات و بی‌نظمی‌هایی در سلول‌های جسم زرد نیز مشاهده شد. در مطالعه‌ای که توسط Ayolan و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت نشان دادند که داروی آرام بخش منجر به کاهش هورمون FSH و LH می‌شود (۳۳). در مطالعه‌ی حاضر کاهش میزان هورمون LH مشاهده شد. احتمالا زولپیدم از طریق مهار ترشح دوپامین به‌عنوان عامل مهار کننده ترشح پرولاکتین باعث افزایش ترشح پرولاکتین و در نتیجه کاهش ترشح TRH و به‌دنبال آن کاهش سطح سرمی هورمون‌های TSH,T_4 می‌شود (۱۹) مطالعاتی که بر روی داروهای ضدافسردگی (زولپیدم) با اثرات مرکزی و تاثیر بر روی محور هورمونی هیپوتالاموس-هیپوفیز-

www.SID.ir

Archive of SID

تیروئید باعث کاهش سطح سرمی هورمون‌های این محور هورمونی و به‌ویژه T4 همراه است (۳۴). در تحقیق حاضر از آن‌جایی‌که در میزان هورمون FSH و LH کاهش ایجاد شد می‌توان نتیجه گرفت که سبب اختلال در هورمون‌های جنسی می‌شود. افزایش آترزی در فولیکولهای تخمدان در گروه‌های تحت درمان نشان از تاثیر زولپیدم بر تخمدان دارد و از طرفی کاهش معنی‌دار جسم زرد در گروه‌های دریافت کننده‌ی دارو مشخص کننده‌ی این واقعیت است که تعداد اندکی فولیکول‌ها توانسته‌اند به مرحله بلوغ نهایی رسیده تا بتوانند تبدیل به جسم زرد شوند. به‌عبارتی کاهش میزان LH که نسبت گروه کنترل به‌شدت معنی‌دار است موجب می‌شود که تعداد بیشتری از فولیکول‌ها در تخمدان باقی مانده و به جسم زرد تبدیل نشوند. همچنین وجود سلول‌های در حال تخریب در جسم زرد و تغییر در ساختار این سلول‌ها که می‌تواند به‌دلیل تاثیر زولپیدم بر محور و مغز، هیپوفیز- تخمدان باشد که منجر به کاهش هورمون باشد. در تعداد فولیکول‌های بدوی و فولیکول‌های اولیه گروه‌های تجربی نسبت به کنترل و شاهد افزایش وابسته به دوز دیده می‌شود که این افزایش در دوزهای ۱۰ و۲۰ معنی‌دار بوده است. برخلاف فولیکول‌های بدوی و اولیه، تعداد فولیکول‌های ثانویه و فولیکول‌های گراف کاهش وابسته به دوز نشان داده است که این کاهش در دوز ۱۰ و۲۰ از نظر آماری، معنی‌دار بوده است. دراین دوزها، فولیکول‌ها در مراحل ابتدایی رشدشان باقی مانده‌اند و از تکوین آن‌ها نیز ممانعت به‌عمل آمده است جلوگیری از تکوین سلولی در مطالعات پیشین در دیگر بافت‌ها گزارش شده است (۳۵). تعداد فولیکول‌های آترتیک در گروه‌های تجربی، افزایش وابسته به‌دوز و از نظر آماری بسیار معنی‌دار را داشته است. افزایش مرگ سلولی در سلول‌های فولیکولی احاطه کننده‌ی اووسیت در فولیکول‌های آترتیک دیده شده در مطالعات گذشته مرگ سلولی گزارش شده است (۶۳). با توجه به اینکه این دارو اثر خود را از طریق سیستم‌های گاباارژیک اعمال می‌کند و سیستم گابا ارژیک برای تکوین متناسب و تخصیص‌یابی سلول‌ها اهمیت دارند (۳۷) بنابراین احتمالا اثر آگونیستی دارو باعث اختلال در عملکرد طبیعی سلول‌ها شود. این اختلالات منجر به بروز ناهنجاری‌های در تکامل طبیعی سلول‌ها شود. تعداد جسم‌های زرد در گروه‌های تجربی، کاهش وابسته به دوز نشان داده است. که این کاهش در دوز ۵، ۱۰، ۲۰ معنی‌دار بوده است. جسم زرد، نتایج حاصل از شمارش رگ‌های خونی تخمدان، افزایش وابسته به دوز را نشان داده است. که این افزایش در دوزهای ۲۰ معنی‌دار بود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول فولیکول‌های بدوی، افزایش که از نظر آماری معنی‌دار باشد را نشان نداد. نتایج به‌دست آمده حاکی از افزایش طول فولیکول اولیه به‌صورت وابسته به‌دوز است که در دوزهای ۲۰ این میزان از نظر آماری معنی‌دار بوده است. این فولیکول‌ها تنها بزرگ شده‌اند لایه‌ی سلول‌های فولیکولی آن‌ها هیچ تغییری نکرده و چند لایه نشده است و به‌نظر می‌رسد این تکثیر سلول‌های فولیکولی ناشی از جذب آب می‌باشد. افزایش اندازه بدون تکثیر و تمایز نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول فولیکول‌های گراف، حاکی از کاهش قطر فولیکول‌گراف و فولیکول درحال رشد به‌صورت وابسته به‌دوز است که در دوز ۱۰ و۲۰ این میزان از نظر آماری معنی‌دار بوده است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول جسم زرد، حاکی از کاهش قطر جسم زرد به‌صورت وابسته به‌دوز است که در دوز ۵، ، ۲۰ این میزان از نظر آماری معنی‌دار بوده است. افزایش قطر و معنی‌داری از نظر آماری در قطر فولیکول‌های در حال رشد، و آترتیک در گروه‌های تجربی نسبت به کنترل و شاهد دیده شد که نشان‌دهنده‌ی تاثیر زولپیدم براندازه‌ی فولیکول‌ها می‌باشد. نتایج نشان دهنده‌ی کاهش میزان هورمون HSF در گروه‌های تجربی، دوز ۱۰ و ۲۰ معنی‌دار بوده در بررسی‌ها کاهش معنی‌داری فولیکول‌های گراف و به‌هم‌ریختگی سلول‌های آن و تحلیل اووسیت فولیکول کاهش میزان هورمون HSF را تایید می‌کند. و میزان هورمون HL در گروه‌های تجربی ۱۰ و ۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

معنی‌دار می‌باشد در بررسی‌ها کاهش معنی‌داری جسم زرد را در گروه‌های تجربی را مشاهده کردیم که کاهش میزان هورمون LH را تایید می‌کند. نتایج کلی این تحقیق نشان داد که داروی زولپیدم دارای اثرات منفی وابسته به‌دوز بر اوژنز بوده و در دوزهای بالا، همچنین موجب کاهش سرعت اوژنز، افزایش فولیکول‌های آترتیک، کاهش میزان هورمون‌های جنسی منجر به بیماری‌های از قبیل ناباروری نیز می‌شود. با این حال در دوز پایین‌تر این تاثیر کمتر بوده و تاثیر قابل توجه زیادی در استفاده از این مواد در دوز پایین مشاهده نشد. این موضوع نشان می‌دهد که تاثیرات منفی داروی زولپیدم وابسته به‌دوز مصرفی می‌باشد. درنتیجه مطالعه‌ی اخیر پیشنهاد می‌کند که با اینکه این دارو در دوزهای بالا مضر می‌باشد، می‌توان با مصرف کنترل شده و در دوز ایمن، مانع از ظهور اثرات منفی آن بر باروری جنس ماده شد.

نتیجه‌گیری

داروی زولپیدم (Ambien)، در دوزهای بالا دارای تاثیر منفی بر اووژنزو هورمون‌های جنسی بوده که می‌تواند موجب کاهش باروری شود. با این‌حال در دوز پایین‌تر این تأثیر کمتر بوده و تاثیر قابل توجه زیادی در استفاده از این مواد در دوز پایین مشاهده نشد. این موضوع نشان می‌دهد که تاثیرات منفی داروی زولپیدم وابسته به دوز مصرفی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند که از حمایت اجرایی مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات صمیمانه تقدیر و تشکر کنند.

منابع

1. Benke D, Zemoura K, Maier PJ. Modulation of cell surface GABA(B) receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation. World J BiolChem. 2012; 3(4): 61-72.
2. Nutt DJ, Stahl SM. Searching for perfect sleep:the continuing evolution of GABA A receptor modulators ashypnotic. J Psychopharmacol. 2012; 24(11): 1601-1612.
3.Du B,Shan A, Zhang Y, Zhong X, et al. Zolpidem Arouses Patient in Vegetative State After Brain Injury. AJMS. 2014; 347(3): 178-82.
4. Bachleda p, Vrzal R, Pivnicka J, Cvek B, et al. Examination of zolpidem effects on ahR-andPXR-dependent expression of drug-metabolizinng cytochromes P450 in primary cultures of human hepatocytes.Toxicol. 2009; 191(1): 74-78.
5. Du B, ShanA, ZhangY, ZhongX, et al. Zolpidem Arouses Patient in Vegetative State After Brain Injury.The American Journal of the Medical Sciences. 2014; (3): 178-82.
6. Macdonald RL, Botzolakise J. Chapter14-GABA A receptor channels. In:Alvarez-leefmansFJ, DelpireE, editors. physiology and pathology of chloride transporters and channels in the nervous system. 2010; 257-82.
7. Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL.GABA A receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. Neuron. 2011; 70(3): 385-409.
8. Rudolph U, Mohler H. GABAA receptor subtypes: Therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism. Annu Rev Pharmacol Toxicol. (2014); 54: 483-507.
9. Drover DR. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of short-acting hypnosedatives: zaleplon, zolpidem and zopiclone. Clin Pharmacokinet. 2004; 43(4): 227-38.
10. Licatta SC, Lowen SB, Trksak GH, Maclean RR, et al. Zolpidem reduces the blood oxygen level dependent signal during visual system stimulation. Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry. 2011; 35(7): 1645-1652.

www.SID.ir

Archive of SID

11. Lu E, Wang bW, Guimond C, Synnes A,Sadovnick,k,a.D.,Dahlgren,L.,Traboulse e,A.Tremlett,H. Safety of disease-modifying drugs for multiple sclerosis in pregnancy:current challenges and future considerations for effective pharmacovigilance. Expert Rev Neurother. 2013; 13(3):251-60.
12. Froestl W. An historical perspective on GABAergic drugs. Future Med Chem. 2011; 3(2): 163-75.
13. Najjar M. Zolpidem and Amnestic Sleep Related Eating Disorder. J Clin Sleep Med. 2007; 3(6): 637-638.
14. Huang CY, Cho FH, Huang YS. The association between zolpidem and infection in patient with sleep disturbance. J Psychatr Res. 2014; 54; 116-120.
15. Ahmed OM, El-Gareib AW, El-Bakry AM, Abd El-Tawab SM, et al. Thyroid hormones states and brain development interactions.Int J Dev Neurosci. 2008; 26(2): 147-209.
16. Saler Tw. Langmanembriologiamedica 011.ed.Rio de janerio: Guanabara Koogan,2010.230 p.
17. Sgado P, Dunleavy M, Genovesi S, Provenzano G, et al. The role of GABAergic system in neurodevelopmental disorders: a focus on autism and epilepsy. Int J Physiol Pathophysiol Pharmaco. 2011; 3(3): 223–235.
18. Drover D, Lemmens H, Naidu S, Cevallos W, et al. pharmacokinetics,Pharmacodynamic,and relative pharmacokinetic, Pharmacodynamic profiles of zaleplone and zolpidem. J Clinical Therapeutics. 2000; 22(12): 1443-61.
19. Hosseini E, Khatamsaz S, Goodarzi A. The effect of zolpidem medicine on thyroid plasmic hormones of T3,T4 and TSH in mail mature rats. J *Jahrom Univ* Med Sci. 2011; 9(1): 1-6.
20. Joya FL, Kripke DF, Loving RT. Meta analyses of hypnotics and infections: eszopiclone,rameltcon,zaleplone,and zolpidem. J Cline Sleep Med. 2009; 5(4): 377-383.
21. Juric S, Newport DJ, Ritchie JC, Galanti M, et al. Zolpidem Ambien in pregnancy;placental passage and outcome. Archive of Womans Mental Health. 2009; 2(6): 441-6.
22. Joya FL, KripkeDF, Loving RT. Meta –analyses of hypnotics and infections: eszopiclone,rameltcon,zaleplone,andzolpidem. J Cline Sleep Med. 2009; 5(4):377-383.
23. Sharma A, sayeed N, Khess CR, Akhtar S. high dose zolpidem induced fetal neural tube defects.Current drug safety. 2011; 6(2):128-129.
24. . Greenblatt DJ, Roth T. Zolpidem for insomnia. Expert Opin Pharma cother. 2012; 13(6): 879-893.
25. Roth T, Krystal A, Steinberg FJ. Novel subling low-dose zolpidem tablet reduces latency to sleep onset following spontaneous middle-of-the night awakening in insomnia in a randomized,double-blind,placebo-controlled. Out patient study sleep. 2013; 36(2): 189-196.
26. . Smith S, Pfeifer SM, Collins JA .Diagnosis and management of female infertility.290,no. 2003; 290(13): 1767-70.
27. Wang L, Lin H, Lin C, Chen Y. Increaased risk of adverse pregnancy outcomes in women receiving zolpidem during pregnancy. Clin Pharmacol Ther. 2010; 88(3): 369-374.
28. Mohler H, Monti JM, Pandi-Perumal SR. Physiology and pharmacology of the GABA system: focus on GABA receptors. In: GABA and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects. 2010; 3-23.
29. Najjar M. Zolpidem and amnestic sleep related aetingdisorder. JClin. 5Sleep,ed,American Academy of Sleep Medicine. 2007; 3(6): 637-638.
30. Greschenson M, Paik CY, Gaukler EL, Diwan BA, et al. Cisplatin exposure induces mitochondrial toxicity in pregnant rats and their fetuses. Report Toxicol 2001; 15(5): 525-531.
31. Chatterjee-Chakrabarty S, Miller BT, Collins TJ, Nagamani M. Adverse effects

www.SID.ir

of methylphenidate on the reproductiveaxis of adolescent female rats. FertilSteril 2005; 84: 1131-1138.
32. Clark AS, 5Kelton MC, Whitney AC. Chronic administration of anabolic steroids disrupts pubertal onset and estrous cyclicity in rats. Bio Reprod. 2003;68: 465-471.
33. Ayolan D, Nir I, Cordova T, Bauminger S, et al. Acute effects of delta1-tetrahydrocannabinol on the hypothalamo-pituitary-ovarian axis in the rats. Neuroendocrinology. 2014; 42: 23-31.
34. Zhang L, Blomgren K, Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM. Effects of postnatal thyroid hormone deficiency on neurogenesis in the juvenile and adult rat. Neurobiol Dis. 2009; 34(2):366-74.
35. Liu XF, Chang HS, Chmiesing RJ, Wesolowski SS, et al. Developing dual functional allosteric modulators of GABA A receptors. Bioorg *Med Chem*. 2010; 18(23): 8374-8382.
36. McGavin MD, Carlton WW, Zachary JF. Thomson's Special veterinary pathology. firstindian ed. delhi: published by s.kjain for cbs publishers and distrusters. 2000; 229-268.
37. Saler Tw. Langmanembriologiamedica 011.ed.Rio de janerio: Guanabara Koogan . 2010.230 p.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2019; 10(2)

Original Article

The Effect of Zolpidem on Oogenesis and LH,FSH of Adult NMRI Mouse Strain

Mohammadiyan S, M.Sc., Hayati Roodbari N, Ph.D.*, Parivar K, Ph.D.

. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Email corresponding author: nasimhayati@yahoo.com

Received:18 May. 2019 Accepted: 3 Dec. 2019

Abstract

Aim: The aim of this study was the effect of zolpidem on oogenesis and FSH, LH hormones of female adult NMRI mouse.

Material and Methods: In this experimental study thirty adult female mice NMRI strain at a mean weight of 30±26 grams were divided into five groups Zolpidem solution was prepared in distilled water at 5, 10, and 20 (mg/kg of body weight) doses, and 0.5 cc injections were doneintraperitoneally every day for 14 days The control group received no injection. The sham group received distilled water and treatment groups of 1, 2, and 3 received doses of 5, 10, and 20 mg/kg The treatment groups were sacrificed one day after the last injection The concentrations of the hormones were measured by the ELISA test The ovary tissue was separated and examined as well as Hematoxylin and eosin painting and the results were evaluated via the tukey-test,(One-way ANOVA) by SPSS program.

Results: The results showed a significant decrease in the mean serum FSH, LH levels in the experimental groups compared to the sham and control ($P<0.05$) Also histological studies of sections showed the mean number of graffian, secondary and corpus luteum reduced and the mean number of primordial, growing, atretic and abnormal follicles increased. In addition, a significant reduction in the diameter of secondary, graffian follicles and corpus luteum and a significant increased in the diameter of primary, atretic follicles were observed in the experimental groups, compared to the sham and control groups.

Conclusion: Injection of zolpidem significantly is effective on , oogenesis and concentration of LH,FSH hormones.

Keywords: Zolpidem, Oogenesis, LH and FSH

www.SID.ir