

## بررسی اثر عصاره گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر رشد و رسیدگی اووسیت ها در ماهی ماده گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*)

طاهره ناجی<sup>(۱)\*</sup>، همایون حسین زاده صحافی<sup>(۲)</sup>، تینا سمائی<sup>(۱)</sup>، پریسا امانی نژاد<sup>(۳)</sup>

@gmail.com/naji\_t@iaups.ac.ir tnaji2002

۱- گروه علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران.

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران.

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۱

### چکیده

این مطالعه به منظور بررسی تاثیر عصاره گیاه رازیانه بر رشد و رسیدگی اووسیت ها در ماهی ماده گورامی سه خال، در بهار ۱۳۹۱ در آزمایشگاه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی انجام پذیرفت. بدین منظور، ۶۰ عدد ماهی نابالغ با میانگین وزنی ۲-۳ گرم در ۶ گروه که شامل چهار گروه تیمار برای رازیانه (مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن ماهی) و دو گروه شاهد (کنترل ۱ دریافت کننده ۲۰ میکرولیتر متانول و کنترل ۲ بدون تزریق) ، که هر گروه شامل ۱۰ تکرار بود مورد بررسی قرار گرفت. در روز بیستم پس از پایان دوره آزمایش ماهی ها بیهوش و تشریح شدند. ساختار بافت شناسی تخمدان و درصد شاخص گنادی ماهی های تحت تیمار، با گروه کنترل مقایسه گردید. نتایج بدست آمده در این بررسی در مورد شاخص رشد نشان داد، که اختلاف آماری معنی داری در تیمارهای تحت آزمایش و گروه کنترل وجود نداشت ( $P > 0/001$ ). از نظر GSI اختلاف آماری معنی داری در تیمارهای آزمایشی و گروه کنترل مشاهده شد ( $P < 0/001$ ). بررسی قطر و تعداد اووسیت ها نیز افزایش معنی داری را بین تیمارهای تحت آزمایش به ویژه تیمار ۶ در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ( $P < 0/001$ ). توجه به نتایج حاضر حاکی از تأثیر رازیانه بر رشد تخمدان و رسیدگی اووسیت ها می باشد.

**کلمات کلیدی:** گیاه رازیانه، اووسیت، گورامی سه خال، تخمدان.

## ۱. مقدمه

چالش‌های موجود در روند کشف داروهای جدید، توجه روزافزونی را به سوی منابع طبیعی به عنوان مخازنی مناسب جهت استخراج و معرفی ترکیبات مؤثره با فعالیت‌های بیولوژیک متنوع جلب نموده است (۲). در سال‌های اخیر کسب دانش در خصوص نوسانات طبیعی هورمون‌های دخیل در تولید مثل موجب شده است تا از تکثیر و پرورش آبزیان در رسیدن به کاربرد های هورمونی و کسب اطلاعات راجع به روند های تولید مثلی، از استروژن‌های آگروژن مانند فیتو استروژن‌ها که با تقلید از اثرات استروئید های جنسی آندروژن باعث رشد جنسی گنادها می گردند، استفاده شود (۹). یکی از این ترکیبات، گیاه رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare*، از خانواده چتریان *Umbrelliferae* با نام انگلیسی Fennel می باشد (۱). ترکیبات مهم موجود در رازیانه شامل ۵۰ تا ۶۰ درصد آنتول، فنشون، پینن، کامفن، ووفلاندرن می باشد. مواد موجود در رازیانه به عنوان جایگزین استروژن های مصنوعی در کنترل محور HPG به کار رفته اند (۳). فیتو استروژن‌ها دارای نقش مهمی در صنعت داروسازی و شیلات می باشند، و استفاده از آنها در رژیم غذایی آبزیان، می تواند اثراتی را بر رشد و تولید مثل آنها داشته باشد (۱۱). بدین منظور از ماهی گورامی سه خال، به دلیل مشابهت سیستم غدد درون ریز تولید مثل با پستانداران، دارا بودن محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - گناد ساده (۵) و همچنین دارا بودن مقاومت بالا در شرایط آزمایشگاهی استفاده گردید. در تحقیقی که توسط Malini در سال ۱۹۸۵ صورت گرفت، نشان داد تجویز خوراکی رازیانه به مدت ۱۰ روز در Rat ماده، در دوزهای کم باعث ایجاد سیکل قاعدگی، در دوزهای متوسط باعث افزایش وزن غدد جنسی و در دوزهای بالا، موجب رشد مجاری، اندومتريوم، سرویکس و واژن گردید (۱۰). در تحقیق دیگری که در سال ۱۹۹۴ توسط Degani و همکارانش صورت پذیرفت نشان داد، استروئیدها باعث رشد فولیکول‌ها و پیش برد مراحل تخمدانی می گردند (۶). هدف از

این پژوهش بررسی تاثیر عصاره گیاه رازیانه و ۱۷ بتا استرادیول بر ساختار گنادی، مراحل تخمدانی و رشد و رسیدگی اووسیت‌ها در ماهی گورامی سه خال بود.

## ۲. مواد و روش‌ها

مراحل نمونه برداری این بررسی در آزمایشگاه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی در اردیبهشت و خرداد ماه ۱۳۹۱ انجام پذیرفت. ۶۰ عدد ماهی گورامی سه خال با میانگین وزنی ۲-۳ گرم از کارگاه تکثیر و پرورش ماهی تزئینی شیلان گستر سبز واقع در آستانه اشرفیه تهیه شد. ماهیان در ۶ گروه که شامل چهار گروه تحت تیمار عصاره رازیانه و دو گروه شاهد (گروه کنترل متانولی و گروه کنترل بدون تزریق)، که هر گروه شامل ۱۰ تکرار بود، در آب آکواریوم‌ها، رهاسازی شدند. جهت سازگاری ماهی‌ها، به مدت سه روز در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. ماهی‌ها روزی یک بار با غذای استاندارد ماهی تغذیه شدند و فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب اندازه گیری شد.

### جدول ۱: میزان فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب (۱۳۹۰)

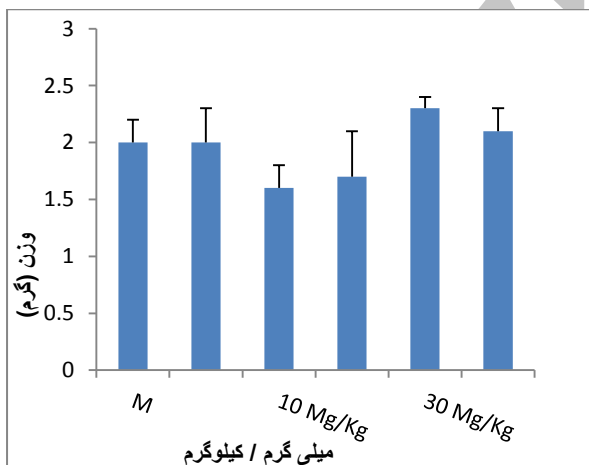
سختی (میلی گرم در لیتر کربنات کلسیم)	pH	دما (درجه سانتی گراد)
(CaCO <sub>3</sub> )		
۵۰-۱۰۰	۶/۸-۸	۲۲-۲۸

گیاه رازیانه پس از پودر شدن در آزمایشگاه فارماکوگنوزی در طی سه مرحله عصاره گیری (۷) به وسیله اتانول ۹۶ درجه که هر مرحله نیز به مدت سه روز به طول انجامید، عصاره الکلی به دست آمد و با دستگاه روتاری تغلیظ گردید. جهت آماده سازی دوزهای مورد نیاز، مقادیر مورد نیاز از عصاره آماده شده به ازای میانگین وزن ماهی‌ها به وسیله ترازوی با دقت ۰/۰۱ گرم وزن گردید. در روز بیستم جهت بیهوشی ماهی‌ها، از

جدول ۲: تغییرات رشد بر اساس شاخص وزن ماهی ها (Mean) ± SEM (۱۳۹۰)

تعداد تیمار	تیمارهای آزمایشی	میانگین وزن ماهی	میانگین وزن ماهی ها قبل از تزریق	توزیع (گرم)
۱	کنترل ۱ متانول (۲۰ میکرولیتر)	۱/۵±۰/۲	۲/۱۵±۰/۱۱	
۲	کنترل ۲ شاهد، بدون تزریق	۱/۳±۰/۲	۲/۱۵±۰/۱	
۳	رازیانه (۱۰ mg/kg)	۱/۳±۰/۲	۱/۶۷±۰/۰۹	
۴	رازیانه (۲۰ mg/kg)	۱/۵±۰/۲	۱/۷۵±۰/۰۹	
۵	رازیانه (۳۰ mg/kg)	۱/۷۶±۰/۲	۲/۸±۰/۱	
۶	رازیانه (۵۰ mg/kg)	۱/۶۸±۰/۲	۲/۱۵±۰/۱۲	

نتایج بدست آمده در این بررسی نشان داد، که میانگین وزن ماهی های تیمار ۶ در مقایسه با ماهی های گروه کنترل ۱ و ۲، افزایش معنی داری ( $P > ۰/۰۰۱$ ) ندارد.



شکل ۱: مقایسه ی میانگین وزن ماهی ها بعد از تزریق رازیانه در گروه های تحت تیمار شاهد (۱۳۹۰)

ماده ی بیهوشی PI222 استفاده شد و سپس تزریق دارو از طریق درون عضلانی<sup>۱</sup> صورت گرفت. تزریق دارو به مدت ۲۰ روز و هر یک روز در میان در ۱۰ نوبت و به مقدار ۲۰ میکرولیتر صورت گرفت. پس از پایان دوره ی تزریق به مدت سه روز هیچ فعالیتی بر روی ماهی ها صورت نگرفت. سپس تشریح ماهی ها انجام پذیرفت. درصد شاخص گنادی GSI بر اساس  $GSI = WG/W \times 100$  برای هر ماهی محاسبه شد. در این فرمول WG وزن گناد به گرم و W وزن کل بدن ماهی به گرم می باشد. جهت تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی معنی دار بودن اختلافات مشاهده شده در تیمار ها از نظر تعداد اووسیت ها، قطر اووسیت ها، شاخص گنادی GSI، از نرم افزار SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و نیز جهت مقایسه میانگین از آزمون دانکن استفاده شد (۱۲). جهت ترسیم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

### ۳. نتایج

نتایج حاصل از سنجش شاخص رشد در دوره ی ۲۰ روز آزمایش به صورت میانگین در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که میانگین وزن ماهی ها قبل از تزریق در نمونه های شاهد ۱ با مقدار ۱/۵ گرم در کیلوگرم و میانگین وزن آنها بعد از تزریق با مقدار ۲/۱۵ گرم در کیلوگرم بود و اختلاف آماری معنی داری در نمونه های شاهد ۲ که بدون تزریق بودند، در مقایسه با گروه کنترل ۱ مشاهده نشد. بیشترین میزان رشد در تیمار ها در تیمار ۶ با مقدار ۲/۱۵ گرم در کیلوگرم و کمترین میزان آن در تیمار ۳ با مقدار ۱/۶۷ گرم در کیلوگرم مشاهده شد.

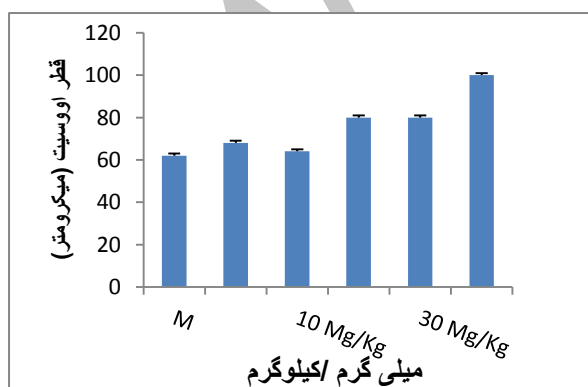
نتایج حاصل از سنجش قطر اووسیت ها در دوره ی ۲۰ روز آزمایش به صورت میانگین در جدول ۴ آورده شده است. نتایج نشان داد که میانگین قطر اووسیت ها در تیمار های آزمایشی اختلاف آماری معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل دارد.

جدول ۴: مقایسه میانگین قطر اووسیت ها در گروه های تحت

شماره تیمار	تیمار	میانگین قطر اووسیت (μ)
۱	(کنترل ۱ متانول ۲۰ میکرولیتر)	۶۶/۶±۵
۲	(کنترل ۲ شاهد، بدون تزریق)	۷۰/۴۹±۶/۲
۳	(رازیانه ۱۰ mg/kg)	۷۰/۶۲±۵/۸
۴	(رازیانه ۲۰ mg/kg)	۸۳/۲۳±۷/۵
۵	(رازیانه ۳۰ mg/kg)	۸۲/۹۱±۷
۶	(رازیانه ۵۰ mg/kg)	۱۰۳/۷۲±۹/۲

تیمار وشاهد (Mean ± SEM) (۱۳۹۰)

نتایج این بررسی نشان داد، که میانگین قطر اووسیت ها در ماهی های تیمار ۶ با مقدار ۱۰۳/۷۲ میکرومتر در مقایسه با ماهی های گروه کنترل ۱ با مقدار ۶۶/۶ میکرومتر افزایش معنی داری (p < ۰/۰۰۱) دارد. به طوری که بیشترین میزان متعلق به تیمار ۶ و کمترین آن متعلق به تیمار ۴ بود.



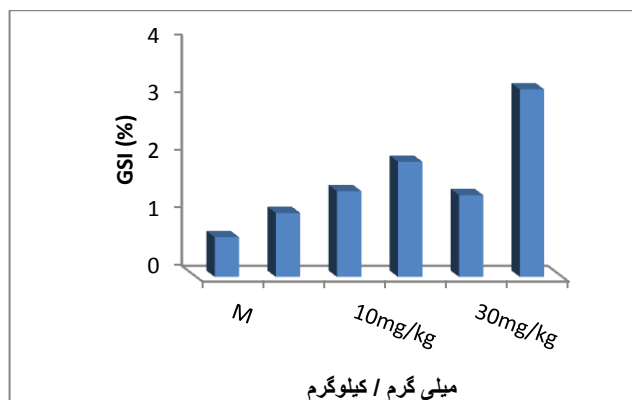
شکل ۴: مقایسه میانگین قطر اووسیت ها در گروه های تحت تیمار وشاهد (۱۳۹۰)

نتایج حاصل از بررسی شاخص گنادی (GSI) در دوره ی ۲۰ روز آزمایش به صورت میانگین در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد، میانگین شاخص گنادی در ماهی های گروه کنترل ۱ و ۲ در مقایسه با تیمار های تحت آزمایش اختلاف آماری معنی داری (p < ۰/۰۰۱) دارد.

جدول ۳: میانگین درصد شاخص گنادی (GSI) در گروه های تحت تیمار وشاهد (Mean ± SEM) (۱۳۹۰)

تعداد تیمار	تیمارهای آزمایشی	میانگین درصد شاخص گنادی (GSI)
۱	(کنترل ۱ متانول ۲۰ میکرولیتر)	۰/۶۹
۲	(کنترل ۲ شاهد، بدون تزریق)	۱/۱۱
۳	(رازیانه ۱۰ mg/kg)	۱/۴۹
۴	(رازیانه ۲۰ mg/kg)	۲
۵	(رازیانه ۳۰ mg/kg)	۱/۴۲
۶	(رازیانه ۵۰ mg/kg)	۳/۲۵

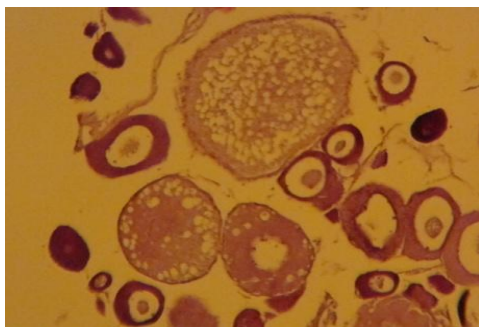
نتایج این بررسی نشان داد، که میانگین شاخص گنادی در ماهی های تیمار ۶ با مقدار ۳/۲۵ درصد در مقایسه با ماهی های گروه کنترل ۱ و ۲، با مقدار به ترتیب ۰/۶۹ و ۱/۱۱ درصد افزایش معنی داری (p < ۰/۰۰۱) دارد. بیشترین میزان شاخص گنادی، متعلق به تیمار ۶ و پس از آن تیمار ۴ بود.



شکل ۳: میانگین درصد شاخص گنادی (GSI) در گروه های تحت تیمار وشاهد (۱۳۹۰)

## بررسی نتایج بافت شناسی تخمدان

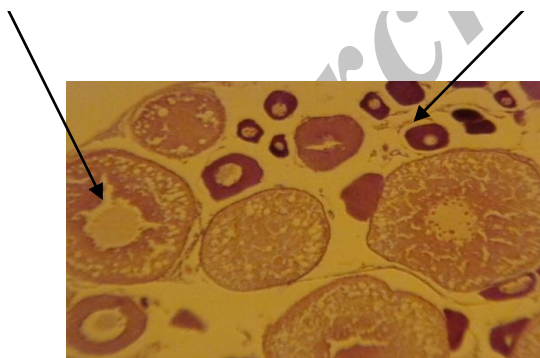
اشکال حاکی از آن بود که اووسیت ها در گروه شاهد و شاهد متانولی در فاز اول یعنی مرحله ی پیش هستکی می باشند . اووسیت ها در گروه تیمار های اول و دوم و سوم رازیانه (۱۰ و ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی ) نیز در مراحل پیش هستکی و شروع ویتلوژنز هستند . حال آن که در دوز بالای رازیانه ، مرحله ی شروع حرکت GV به سمت قطب جانوری و تشکیل ذرات چربی مشاهده شد .



شکل ۵: مقطعی از بافت تخمدان ماهی های گروه شاهد ، اغلب اووسیت ها در مرحله شروع ویتلوژنز ( $\times 1000$ ) (H&E،

اووسیت در مرحله شروع ویتلوژنز

اووسیت در مرحله پیش هستکی



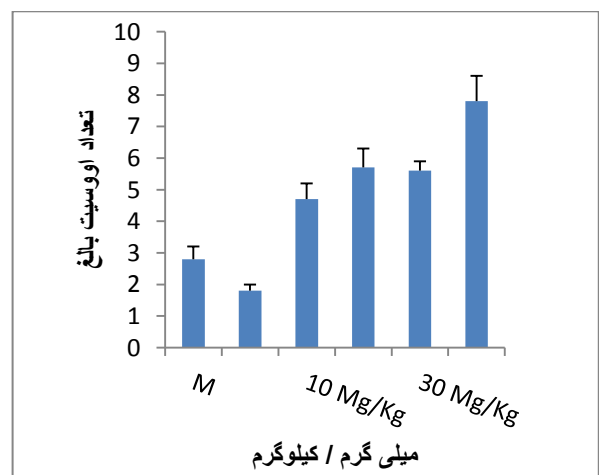
شکل ۶: مقطعی از بافت تخمدان ماهی های گروه کنترل متانولی ، اغلب اووسیت ها در مرحله پیش هستکی و شروع ویتلوژنز ( $\times 1000$ ) (H&E،

نتایج حاصل از سنجش تعداد اووسیت ها در دوره ی ۲۰ روز آزمایش به صورت میانگین در جدول ۵ آورده شده است . نتایج نشان داد که میانگین تعداد اووسیت ها در تیمار های آزمایشی اختلاف آماری معنی داری را در مقایسه با گروه کنترل دارد.

جدول ۵: مقایسه تعداد اووسیت های بالغ در گروه های تحت تیمار و شاهد (Mean  $\pm$  SEM) (۱۳۹۰)

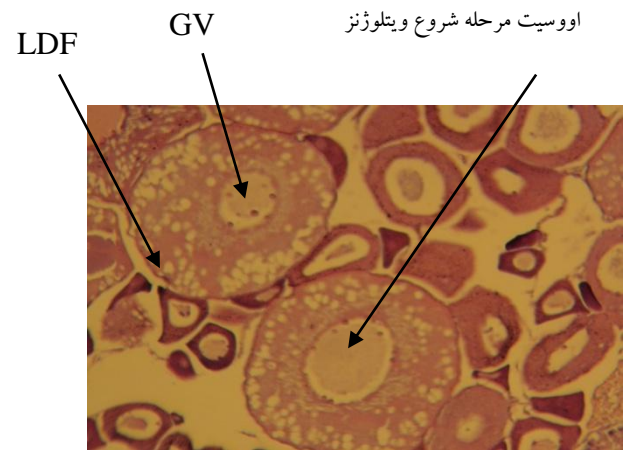
شماره تیمار	نام تیمار	درصد تعداد اووسیت های بالغ (%)
۱	کنترل ۱ متانول ۲۰ میکرولیتر)	۱۳/۶۳
۲	کنترل ۲ شاهد ، بدون تزریق)	۹/۰۹
۳	رازیانه (۱۰ mg/kg)	۱۸/۵
۴	رازیانه (۲۰ mg/kg)	۲۱/۴۲
۵	رازیانه (۳۰ mg/kg)	۲۸/۰۸
۶	رازیانه (۵۰ mg/kg)	۳۲

نتایج این بررسی ، بیشترین درصد تعداد اووسیت های بالغ را در تیمار ۶ با ۳۲ درصد و کمترین تعداد آن را در تیمار ۳ با ۱۸/۵ نشان داد.



شکل ۴: مقایسه تعداد اووسیت ها در گروه های تحت تیمار و شاهد (۱۳۹۰)

Degani و همکارانش صورت پذیرفت نشان داد ، استروئیدها باعث رشد فولیکول ها و پیش برد مراحل تخمدانی می گردند (۶). نتایج بدست آمده در این تحقیق در رابطه با افزایش شاخص گنادی با مطالعه حاضر منطبق می باشد. نتایج حاصل از اندازه گیری قطر اووسیت ها نشان داد ، افزایش مقدار در تیمار های رازیانه ، موجب افزایش قطر اووسیت ها می شود. تفاوت بین قطر اووسیت ها با افزایش مقادیر عصاره رازیانه ، ویژه در خصوص مقادیر بالای آن (مقدار ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم) اختلاف معنی دار مشاهده گردید. مطالعه ای که در سال ۲۰۱۱ توسط خزایی و همکارانش بر روی موش انجام شد ، نشان داد، دریافت مقادیر ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره ی الکلی رازیانه در ۶ روز باعث افزایش تعداد فولیکول ها می گردد (۸)، که این امر نیز موید مطالعه حاضر می باشد. نتایج این بررسی در مورد شاخص درصد تعداد اووسیت ها نشان داد که اختلاف معناداری از نظر میانگین تعداد اووسیت ها بین تیمار رازیانه با تیمار های شاهد وجود دارد. همچنین با افزایش غلظت های رازیانه تعداد اووسیت ها رو به افزایش گذاشت ، لکن به جز تیمار ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم برای رازیانه بقیه غلظت ها معنی دار نبود. در مطالعه ای که توسط Belew در سال ۱۹۹۹ انجام گرفت نشان داد گیاهی همچون رازیانه ایجاد بلوغ در اووسیت ها می نماید (۹) که این امر نیز مطالعه ما را تأیید می کند (۴). به طوری کلی می توان نتیجه گرفت که استفاده از رازیانه با مقادیر ۱۰-۲۰-۳۰-۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن ماهی می تواند سبب رشد و رسیدگی اووسیت ها در ماهی گورامی سه خال شود، که این تاثیر در مقدار ۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم بارزتر بود. با توجه به اینکه گیاهان حاوی فیتواستروژن فاقد اثرات منفی استروژن های مصنوعی می باشند انتظار می رود که می توانند جایگزین مناسبی برای آنها باشند.



شکل ۷: مقطعی از بافت تخمدان ماهی های تیمار چهارم رازیانه (H&E، ×۱۰۰۰)

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این بررسی در مورد شاخص رشد نشان داد، که اختلاف آماری معنی داری در تیمارهای تحت آزمایش و گروه کنترل وجود نداشت ( $P > 0/001$ ). از نظر GSI اختلاف آماری معنی داری در تیمارهای آزمایشی و گروه کنترل مشاهده شد ( $P < 0/001$ ). بررسی قطر و تعداد اووسیت ها نیز اختلاف آماری معنی داری را بین تیمارهای تحت آزمایش به ویژه تیمار ۶ در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ( $P < 0/001$ ). توجه به نتایج حاضر نشان دهنده تأثیر رازیانه بر رشد تخمدان و رسیدگی اووسیت ها می باشد. در تحقیقی که توسط Malini در سال ۱۹۸۵ بر روی موش ماده صورت گرفت ، نشان داد تجویز خوراکی رازیانه به مدت ۱۰ روز در مقادیر کم باعث ایجاد سیکل قاعدگی ، در مقادیر متوسط باعث افزایش وزن غدد جنسی و در مقادیر بالا، موجب رشد مجاری، اندومتریموم ، و واژن گردید (۱۰) در حالیکه در تحقیق حاضر اثرات واضحی دیده نشد که این امر میتواند به دلیل مقدار پایین رازیانه تزریقی باشد، زیرا اطلاعات بدست آمده حاکی از آن است که گیاه رازیانه می تواند از طریق اثر بر رسپتور های استروژنی در میزان رشد موثر باشد (۱۰). در تحقیقی که در سال ۱۹۹۴ توسط

## تشریح و قدردانی

بدین وسیله از آقای پویا سمائی که در انجام این طرح تحقیقاتی ما را یاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

## منابع

7. Farooq, A, A., Mahmood, L., Abdollah, S., Mahmood, 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare Mill.*) seeds from Pakistan. Research Article. 170-176.
8. Khazaei, M, A., Montaseri, MR., Khazaei, M., Khanahmadi, 2011. Study of *Foeniculum vulgare* Effect on Folliculogenesis in Female Mice. 5(3): 122-127.
9. Mack, G, H., Segner, 2003. Morphological development of the gonads in zebra fish. j. fish biology; 4: 895-906.
10. Malini, T, 1985. Effects of *Foeniculum vulgare* mill seed extracts on the genital organs of male and female rat. Indian j. physiol pharmacol. 29(1):21-26.
11. Turner, JV., S, Agotonovic-Kustrin and BD, Glass, 1987. Molecular aspects of Phytoestrogen selective binding at estrogen receptors. j. pharm sci. 1879; 96(8).
12. Zar, J., H, 1999. Biostatistical Analysis. Prentice Hall. (4<sup>th</sup> Edition) New Jersey. pp:663.
- 1- زرگری، ع. ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. تهران، جلد دوم، ص. ۱۱۳.
- ۲- گایتون، آ.، هال، ج. ۱۳۸۴. فیزیولوژی پزشکی گایتون. تهران، جلد دوم، ص. ۷۹.
3. Albert, P., 1980. Fennel and anise as estrogenic agents. j. ethnopharmacol; 2(4): 337-344.
4. Belew, C., 1999. Herbs and the childbearing woman. j. Nurse-Midwifery. 44: 231-252.
5. Clatfelter, E.D, A.C., Rodriguez, 2006. Behavioral changes in fish exposed to Phytoestrogens. Environmental pollution. 144: 833-839.
6. Degani, G, E, J., Gal, Vaya, 1994. In vitro biosynthesis of steroids in ovary of asynchronic *Tricogaster tricopterus*. Biochem physiol. ; 109: 715-723. Morphological development of the gonads in zebra fish. j. fish biology; 4: 895-906.