

## اثرات LHRH-A<sub>2</sub>، 17 بتا استرادیول و عصاره‌ی سرشاخه هوایی مرزنجوش (*Origanum vulgare*) بر القاء باروری در ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*)

طاهره ناجی<sup>1\*</sup>، صدیقه باقری زیاری<sup>1</sup>، همایون حسین‌زاده صحافی<sup>2</sup>

۱- گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۹۴۱۹۳۳۱۱۱

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵۶۱۱۶

تاریخ پذیرش: ۲۸ مرداد ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۲۴ فروردین ۱۳۹۴

### چکیده

مرزنجوش (*Origanum vulgare*) گیاهی از خانواده‌ی نعنائیان می‌باشد که در طب سنتی به عنوان کاهنده مشکلات قاعدگی مورد استفاده بوده است. مطالعه حاضر به مقایسه‌ی اثرات LHRH-A<sub>2</sub>، 17 بتا استرادیول و عصاره‌ی هیدروالکلی سرشاخه‌ی هوایی مرزنجوش بر بافت تخمدان ماهی گورامی سه خال نابالغ پرداخته است. بدین منظور ۱۵۰ قطعه ماهی گورامی سه خال با میانگین وزنی ۱±۲ گرم مورد ارزیابی قرار گرفت. ۱۰ ماهی در هر گروه از ۱۲ گروه تجربی شامل ۴ دوز از مرزنجوش یا ۱۷ بتا استرادیول (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی) و ۴ دوز LHRH-A<sub>2</sub> (۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی) و ۳ تیمار شاهد شامل نرمال سالین، دارونما و اتانول مورد آزمایش قرار گرفتند. تزریقات به صورت عضلانی، یک‌روز در میان و در ۷ تکرار صورت پذیرفت. ساختار بافت‌شناسی تخمدان و میانگین درصد شاخص گنادی در سه نوع تیمار، اندازه‌گیری و با کنترل مقایسه شد. نتایج آماری میانگین شاخص گنادها، در سه تیمار کنترل با گروه‌های تجربی اختلاف معناداری نشان داد ( $P \geq 0/05$ ). بررسی‌ها در ۱۲ گروه تجربی نشان داد که در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، عصاره‌ی مرزنجوش بعد از ۱۷ بتا استرادیول سبب تسریع در رسیدگی اووسیت‌ها می‌گردد. نتایج بافتی و قطر اووسیت‌ها نیز تاییدی بر شاخص گنادوسوماتیک بود. یافته‌های این تحقیق نشان داد که عصاره‌ی مرزنجوش به صورت وابسته به دوز بلوغ اووسیت‌ها در ماهی گورامی سه خال را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

**کلمات کلیدی:** ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*)، مرزنجوش (*Origanum vulgare*)، LHRH-A<sub>2</sub>، 17 بتا استرادیول، باروری.

## مقدمه

بیوجانین، کوئرستین و لوتولین می‌باشد. این گیاه در طب سنتی ایران و پرو به عنوان کاهش دهنده درد دوران قاعدگی استفاده می‌شود (Bussmann et al., 2010). مطالعات نشان داد که حضور گیاه مرزنجوش در رژیم غذایی گاو، سبب افزایش شیر شده است (Tekippe et al., 2011). هم‌چنین عصاره‌ی این گیاه می‌تواند سرعت روند رشد جنین موش را افزایش دهد (Benavides et al., 2000). از آن‌جا که تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثر این گیاه در باروری ماهی گورامی سه‌خال صورت نگرفته است، لذا در این تحقیق، به مقایسه اثرات استروژنیک بین عصاره‌ی هیدروالکلی سرشاخه هوایی گیاه مرزنجوش، LHRH-A<sub>2</sub> و ۱۷ بتا استرادیول بر هورمون‌های محور هیپوفیز-هیپوتالاموس-گناد در القا باروری پرداخته شد.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق در شهریور ۱۳۹۲ به مدت یک ماه در آزمایشگاه گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی صورت گرفت. بدین منظور ۱۵۰ قطعه ماهی گورامی سه‌خال نابالغ با میانگین وزنی ۱±۰/۲ گرم و میانگین طولی ۱±۰/۵ سانتی‌متر از شرکت ماهیران تهیه گردید. فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب، شامل دما ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد، pH ۲±۰/۷ و درجه سختی ۲±۷۳ (میلی-گرم/لیتر کربنات کلسیم کربنات) تنظیم گردید. پس از کلرزایی آب آکواریوم‌ها، ماهیان در ۱۵ گروه مجزا، هر گروه شامل ۱۰ عدد ماهی، در آکواریوم‌ها رها سازی شدند. تزریقات به صورت درون عضلانی و طبق جدول (۱)، به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ماهی صورت گرفت (Ng et al., 1997).

در تمام مهره‌داران از جمله ماهی‌ها محور هیپوفیز-هیپوتالاموس-گناد نقش مهمی را در تولید مثل ایفاء می‌کند و با تاثیر بر سطوح مختلف این محور، می‌توان تخمک‌گذاری را تحت تاثیر قرار داد (Okubo et al., 2008). ماهی گورامی سه‌خال از خانواده Anabantidae بوده که به علت شباهت بالای محور هیپوفیز-هیپوتالاموس-گناد به انسان، به عنوان یک مدل ایده‌آل در مطالعات تولید مثلی به کار می‌رود (Degani et al., 1995). بلوغ اووسیت در ماهیان شامل ۶ مرحله‌ی اووگونی، اووسیت اولیه با هسته کروماتینی، پیش‌هستیکی اولیه، کورتیکال آلئولار، ویتیلوژنز و اووسیت بالغ می‌باشد. عوامل متعددی می‌توانند بر روند بلوغ اووسیت در ماهیان اثرگذار باشند. در مطالعاتی که به منظور بررسی رشد اووسیت‌های ماهی گورامی سه‌خال انجام گرفت، نشان داده شد که روند بلوغ اووسیت‌ها تحت تاثیر ۱۷ بتا استرادیول و LHRH-A<sub>2</sub> متفاوت می‌باشد (Anathy et al., 2003).

فیتواستروژن‌ها، زینواستروژن‌های مشتق شده از گیاهان بوده که دارای ساختاری مشابه با ۱۷ بتا استرادیول (هورمون اولیه جنسی) می‌باشند و می‌توانند نقش این هورمون را به طور ضعیف‌تری ایفاء کنند (Yildiz, 2005).

درصد حضور فیتواستروژن‌ها در گیاهان مختلف متفاوت است. امروزه تحقیقات بر روی اثر فیتواستروژن‌ها در گیاهان و مقایسه اثرات آن‌ها با استروژن در باروری حیوانات روز به روز در حال افزایش است (Mindy et al., 1997). گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare*)، از جمله گیاهان خانواده‌ی نعنا، حاوی ۴ فیتواستروژن به نام‌های آپی ژنین،

جدول ۱: تیمارهای مورد بررسی و دوزهای تزریقی به هر تیمار در ماهی گورامی سه خال

گروه تیماری	ماده تزریقی	دوز تزریقی
۱	مرزنجوش	۱۰mg/kg
۲	مرزنجوش	۲۰mg/kg
۳	مرزنجوش	۳۰mg/kg
۴	مرزنجوش	۵۰mg/kg
۵	LHRH-A <sub>2</sub>	۰/۰۰۱ mg/kg
۶	LHRH-A <sub>2</sub>	۰/۰۰۲ mg/kg
۷	LHRH-A <sub>2</sub>	۰/۰۰۳ mg/kg
۸	LHRH-A <sub>2</sub>	۰/۰۰۵mg/kg
۹	۱۷ بتا استرادیول	۱۰mg/kg
۱۰	۱۷ بتا استرادیول	۲۰mg/kg
۱۱	۱۷ بتا استرادیول	۳۰mg/kg
۱۲	۱۷ بتا استرادیول	۵۰mg/kg
۱۳	کنترل ۱ (دست نخورده)	۰/۰۲ سی سی
۱۴	کنترل ۲ (نرمال سالین)	۰/۰۲ سی سی
۱۵	کنترل ۳ (اتانولی)	۰/۰۲ سی سی

سرشاخه‌ی هوایی گیاه، عصاره‌گیری با استفاده از روش پرکولاسیون با حلال اتانول ۹۶ درجه (Ahmed *et al.*, 2002) صورت گرفت. تزریقات با سرنگ BD نیم‌میکرولیترا (شرکت Pic) به مقدار ۰/۰۲ سی سی، یک روز در میان و با ۷ تکرار انجام شد (Ng *et al.*, 1997). بعد از پایان روز بیست و هفتم، نمونه‌ها با تعداد ۱۰ قطعه در هر تیمار، با استفاده از عصاره‌ی گل میخک بیهوش و با استفاده از ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۱ گرم) و خط‌کش بیومتری (طول استاندارد) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس جهت بررسی مطالعات بافت‌شناسی، نمونه‌ها کشته‌شده و بافت تخمدان آن‌ها خارج شد. پس از توزین تخمدان‌ها، تعدادی تخمدان

جهت انجام تزریقات، پودرهای LHRH-A<sub>2</sub> (شرکت Ningbo Sansheng) در محلول نمکی (0.7% NaCl) (Ahmadnezhad *et al.*, 2013) و ۱۷ بتا استرادیول (شرکت ابوریحان) در اتانول ۹۶ درجه (Nakari, 2003) به نسبت ۱ به ۱ حل شده و پس از رقت‌سازی مطابق جدول (۱) به ماهیان تزریق شدند. جهت آماده‌سازی عصاره‌ی مرزنجوش، سرشاخه هوایی گیاه خشک از مزارع کشت گیاه از گرگان در تیر ۱۳۹۲ جمع‌آوری شد. این گیاه توسط متخصصان مورد شناسایی قرار گرفته و با کد هرباریومی ۱۱۶۲AUPF در کتاب‌خانه هرباریومی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی موجود می‌باشد. پس از خشک‌شدن

## نتایج

### شاخص گنادوسوماتیک

نتایج شاخص گنادوسوماتیک ۱۵ تیمار در جدول (۲) آورده شده است. نتایج نشان داد که بین گروه‌های کنترل ۱ (دست نخورده)، ۲ (نرمال سالین) و ۳ (اتانولی) اختلاف معناداری از لحاظ GSI وجود نداشت ( $P \geq 0/05$ ). در صورتی که بین تیمارهای ۱۷ بتا استرادیول، LHRH-A<sub>2</sub> و مرزنجوش اختلاف معناداری وجود داشت ( $P \leq 0/05$ ). در نتایج حاصل از مقایسه تیمارهای مرزنجوش و ۱۷ بتا استرادیول (دوزهای ۱۰ و ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم) با LHRH-A<sub>2</sub> (در دوزهای ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲ و ۰/۰۰۳ میلی گرم بر کیلوگرم) نشان داده شد که بین تیمارهای مرزنجوش و LHRH-A<sub>2</sub> از نظر GSI اختلاف معناداری وجود نداشت ( $P \geq 0/05$ )، اما بین تیمارهای ۱۷ بتا استرادیول با مرزنجوش در هر سه دوز اختلاف معناداری وجود داشت ( $P \leq 0/05$ ). هم‌چنین در نتایج GSI در حداکثر دوز سه تیمار اختلاف معناداری وجود داشت، به گونه‌ای که روند یلوغ اووسیت‌ها در ۱۷ بتا استرادیول بیش‌تر از مرزنجوش بوده و مرزنجوش از LHRH-A<sub>2</sub> بیش‌تر بود.

از هر تیمار در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شده و پس از انجام مراحل پاساژ بافت، برش‌گیری با میکروتوم (ضخامت ۱۰-۵ میکرومتر) و رنگ آمیزی به روش هماتوکسین-ائوزین، در زیر میکروسکوپ نوری نیکون (مدل Eclipse E100) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند.

شاخص گنادی (GSI) براساس فرمول زیر برای ماهیان هر تیمار محاسبه گردید (Htun-Han, 1979).

$$GSI = \frac{WG}{W} \times 100$$

که در آن WG وزن گناد (گرم) و W وزن بدن ماهی (گرم) است.

جهت اندازه‌گیری قطر تخمک‌ها در هر تیمار از نرم‌افزار AxioVision Rel استفاده شد. در هر مرحله از بلوغ ۲۰ فولیکول بزرگ و کوچک ماهی مورد بررسی قرار گرفت. سپس به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از شاخص گنادی، قطر اووسیت‌ها و بررسی معنی‌دار بودن اختلاف مشاهده شده در تیمارهای مختلف از نرم‌افزار SPSS، روش آماری آزمون واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه میانگین دانکن استفاده شد.

جدول ۲: میانگین رشد شاخص گنادی ماهی گورامی سه‌خال در تیمارهای مختلف

شماره	نام تیمار	میانگین شاخص گنادی %
۱	مرزنجوش با دوز ۱۰ mg/kg	۱/۱۰ <sup>B</sup>
۲	مرزنجوش با دوز ۲۰ mg/kg	۱/۳۹ <sup>B</sup>
۳	مرزنجوش با دوز ۳۰ mg/kg	۱/۴۶ <sup>B</sup>
۴	مرزنجوش با دوز ۵۰ mg/kg	۳/۴۸ <sup>a</sup>
۵	LHRH-A <sub>2</sub> با دوز ۰/۰۰۱ mg/kg	۰/۹۰ <sup>B</sup>
۶	LHRH-A <sub>2</sub> با دوز ۰/۰۰۲ mg/kg	۱/۲۳ <sup>B</sup>
۷	LHRH-A <sub>2</sub> با دوز ۰/۰۰۳ mg/kg	۱/۳۸ <sup>B</sup>
۸	LHRH-A <sub>2</sub> با دوز ۰/۰۰۵ mg/kg	۲/۵۸ <sup>a</sup>
۹	۱۷ بتا استرادیول با دوز ۱۰ mg/kg	۱/۲۱ <sup>B</sup>

شماره	نام تیمار	میانگین شاخص گنادی %
۱۰	۱۷ بتا استرادیول با دوز ۲۰ mg/kg	۲/۳۸ <sup>B</sup>
۱۱	۱۷ بتا استرادیول با دوز ۳۰ mg/kg	۲/۹۱ <sup>B</sup>
۱۲	۱۷ بتا استرادیول با دوز ۵۰ mg/kg	۴/۵۲ <sup>a</sup>
۱۳	کنترل ۱ (دست نخورده)	۰/۸۷ <sup>A</sup>
۱۴	کنترل ۲ (نرمال سالین)	۰/۹۷ <sup>A</sup>
۱۵	کنترل ۳ (اتانولی)	۰/۸۲ <sup>A</sup>

حروف کوچک اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) را در بین گروه های تحت تیمار و شاهد نشان می دهد.

### قطر تخمک

LHRH-A<sub>2</sub> در دوز ۰/۰۰۳ میلی گرم بر کیلوگرم اختلاف معناداری وجود ندارد، در حالی که بین تیمار مرزنجوش و ۱۷ بتا استرادیول در دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم اختلاف معناداری وجود دارد. علاوه بر این، آنالیز آماری میانگین قطر تخمک‌ها در تیمارهای مرزنجوش، ۱۷ بتا استرادیول و LHRH-A<sub>2</sub> در حداکثر دوز اختلاف معناداری را نشان می دهد. کم ترین میانگین قطر تخمک مربوط به مرحله‌ی اووگونی در تیمارهای کنترل و بیش ترین آن مربوط به مرحله‌ی تکوین جنسی در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم تیمار ۱۷ بتا استرادیول است.

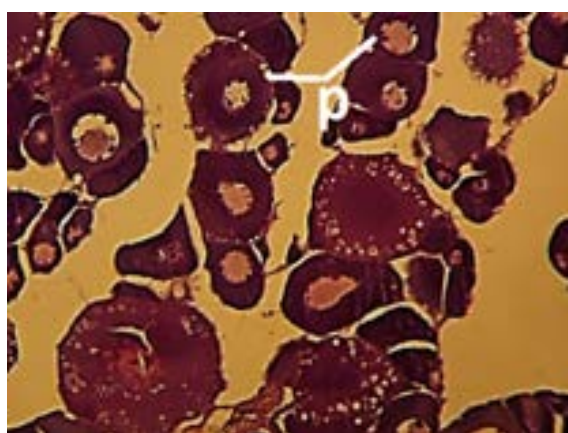
سایز تخمدان در مراحل مختلف جنسی تغییر می کند. به منظور بررسی روند بلوغ در اووسیت‌ها، قطر تخمک در تیمارهای مختلف با یکدیگر در شکل (۲) مقایسه شده است. آنالیز آماری میانگین قطر تخمک‌ها در کنترل‌های ۱، ۲ و ۳ در مرحله‌ی اووگونی اختلاف معناداری نشان نمی دهد. میانگین قطر تخمک‌ها بین تیمارهای مرزنجوش و ۱۷ بتا استرادیول (در دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم) با تیمارهای LHRH-A<sub>2</sub> (در دوزهای ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۲ میلی گرم بر کیلوگرم) اختلاف معناداری نشان نمی دهد. هم چنین بین تیمار مرزنجوش در دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم با تیمار

جدول ۳: میانگین قطر تخمک در ماهی گورامی سه خال بعد از تزریق

شماره	نام تیمار	میانگین قطر تخمک بعد از تزریق (μm)
۱	مرزنجوش با دوز ۱۰ mg/kg	۴۴/۳۷ <sup>B</sup>
۲	مرزنجوش با دوز ۲۰ mg/kg	۶۷/۵۰ <sup>B</sup>
۳	مرزنجوش با دوز ۳۰ mg/kg	۱۰۴/۹۷ <sup>B</sup>
۴	مرزنجوش با دوز ۵۰ mg/kg	۲۰۰/۲۳ <sup>a</sup>
۵	LHRH-A <sub>2</sub> با دوز ۰/۰۰۱ mg/kg	۴۸/۷۴ <sup>B</sup>
۶	LHRH-A <sub>2</sub> با دوز ۰/۰۰۲ mg/kg	۵۶/۳۱ <sup>B</sup>
۷	LHRH-A <sub>2</sub> با دوز ۰/۰۰۳ mg/kg	۹۵/۸۱ <sup>B</sup>
۸	LHRH-A <sub>2</sub> با دوز ۰/۰۰۵ mg/kg	۱۶۶/۱۵ <sup>a</sup>
۹	۱۷ بتا استرادیول با دوز ۱۰ mg/kg	۶۵/۳۷ <sup>B</sup>

شماره	نام تیمار	میانگین قطر تخمک بعد از تزریق ( $\mu\text{m}$ )
۱۰	۱۷ بتا استرادیول با دوز ۲۰ mg/kg	۸۹/۶ <sup>B</sup>
۱۱	۱۷ بتا استرادیول با دوز ۳۰ mg/kg	۱۷۵/۲۵ <sup>B</sup>
۱۲	۱۷ بتا استرادیول با دوز ۵۰ mg/kg	۲۶۸/۸۶ <sup>a</sup>
۱۳	کنترل ۱ (دست نخورده)	۳۸/۵۲ <sup>A</sup>
۱۴	کنترل ۲ (نرمال سالین)	۳۸/۴۶ <sup>A</sup>
۱۵	کنترل ۳ (اتانولی)	۳۸/۱۴ <sup>A</sup>

حروف کوچک اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) را در بین گروه های تحت تیمار و شاهد نشان می دهد.

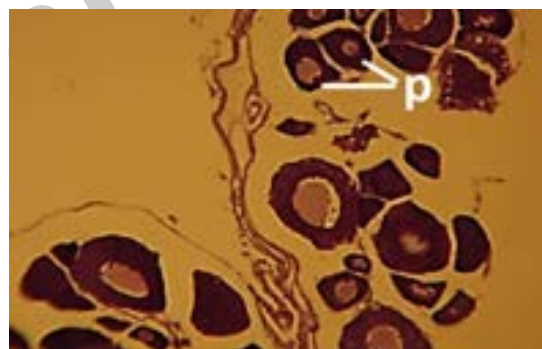


شکل ۳: مقطعی از بافت تخمدان ماهیان گروه اتانولی، فاز غالب اووسیت ها شامل مرحله پیش هستکی اولیه (P)، (H&E) بزرگنمایی ۱۰۰×.

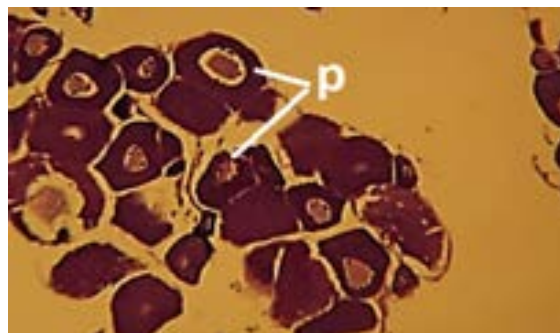
در مقاطع تخمدانی مرزنجوش (دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) (شکل ۴) و LHRH-A<sub>2</sub> (دوز ۰/۰۰۱ میلی گرم بر کیلوگرم) (شکل ۵) اغلب اووسیت ها در مرحله پیش هستکی و تعداد کمی در مرحله کورتیکوآلوئولار قرار داشتند، اما در تیمار ۱۷ بتا استرادیول (دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) (شکل ۶) تعداد اووسیت ها در مرحله کورتیکوآلوئولار تقریباً برابر با تعداد اووسیت ها در مرحله پیش هستکی اولیه است.

### بافت شناسی تخمدان با میکروسکوپ نوری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که هر سه تیمار کنترل، اغلب اووسیت ها نابالغ بوده و در مرحله پیش هستکی اولیه قرار دارند (شکل های ۱، ۲ و ۳).



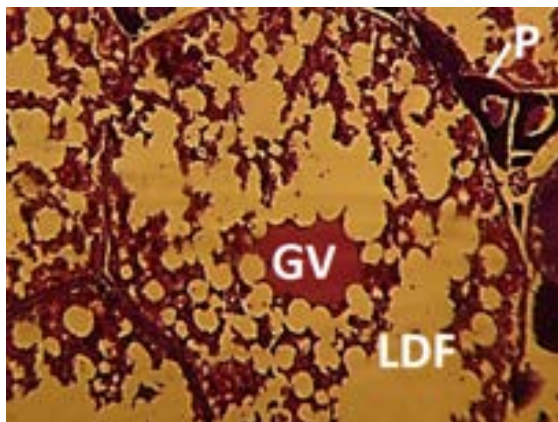
شکل ۱: مقطعی از بافت تخمدان ماهی کنترل دست نخورده، فاز غالب اووسیت ها شامل مرحله پیش هستکی اولیه (P)، (H&E) بزرگنمایی ۱۰۰×.



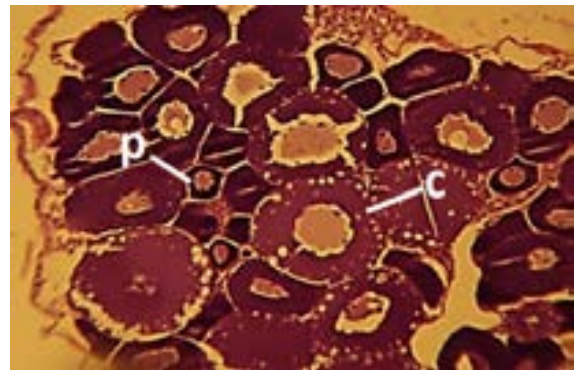
شکل ۲: مقطعی از بافت تخمدان ماهی گروه نرمال سالین، فاز غالب اووسیت ها شامل مرحله پیش هستکی اولیه (P)، (H&E) بزرگنمایی ۱۰۰×.

هستکی اولیه (P)، حضور اووسیت‌هایی در مرحله کورتیکال (C)،  
(H&E)، بزرگنمایی ۱۰۰ ×

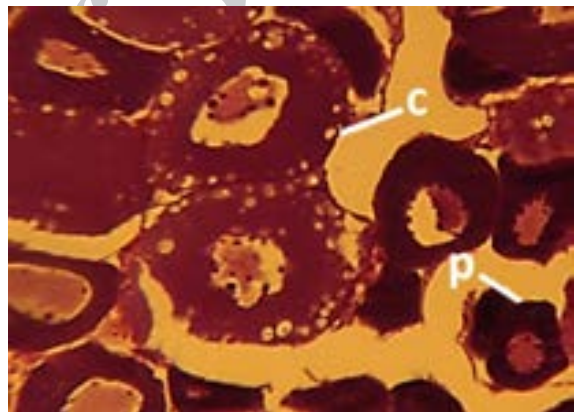
در تیمار مرزنجوش در دوز ۳۰ میلی گرم، حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری و اتصال ذرات چربی به یک‌دیگر و گاهی حضور اووسیت‌هایی در مرحله‌ی پیش‌هستکی اولیه به چشم می‌خورد (شکل ۷) اما در دوز ۰/۰۰۳ میلی گرم بر کیلوگرم تیمار LHRH- A<sub>2</sub> همه اووسیت‌ها در مرحله پایانی کورتیکوآلوئولار به سر می‌برند (شکل ۸). در تیمار ۱۷ بتا استرادیول با دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم شروع حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری و اتصال ذرات چربی به یک‌دیگر نشان داده شده است (شکل ۹).



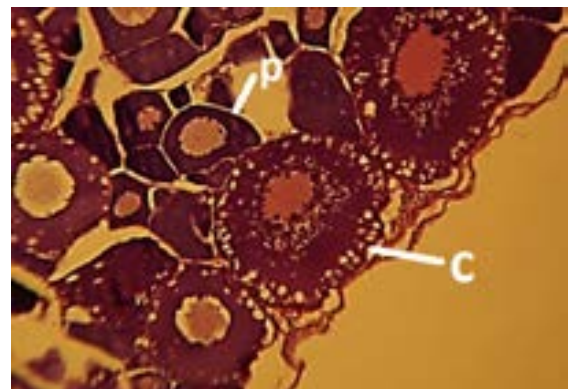
شکل ۷: مقطعی از بافت تخمدان ماهی مرزنجوش با دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم، شروع حرکت وزیکول زایا (GV) به سمت قطب جانوری، اتصال ذرات چربی به یک‌دیگر (LDF)، حضور اووسیت‌هایی در مرحله پیش‌هستکی اولیه (P)، (H&E)، بزرگنمایی ۱۰۰ ×



شکل ۴: مقطعی از بافت تخمدان ماهی گورامی سه خال. مقطعی از بافت تخمدان ماهی مرزنجوش با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم، فاز غالب اووسیت‌ها شامل مرحله پیش‌هستکی اولیه (P)، حضور اووسیت‌هایی در مرحله کورتیکال (C)، (H&E)، بزرگنمایی ۱۰۰ ×

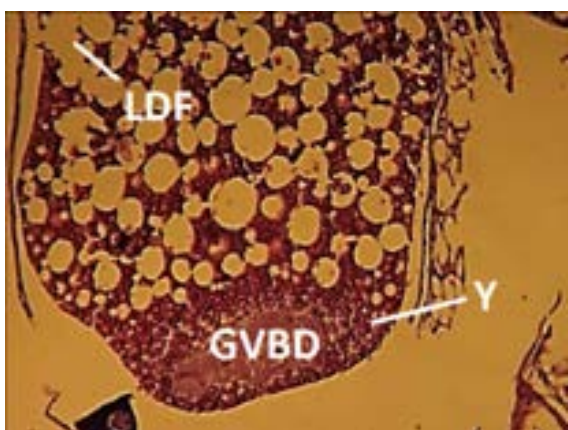


شکل ۵: مقطعی از بافت تخمدان ماهی LHRH-A<sub>2</sub> با دوز ۰/۰۰۱ میلی گرم بر کیلوگرم، فاز غالب اووسیت‌ها شامل مرحله پیش-هستکی اولیه (P)، حضور اووسیت‌هایی در مرحله کورتیکال (C)، (H&E)، بزرگنمایی ۱۰۰ ×

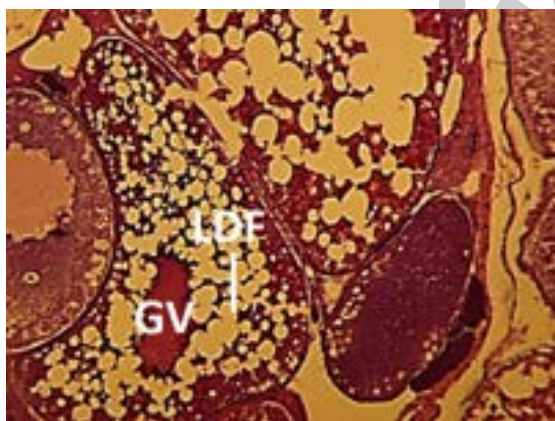


شکل ۶: مقطعی از بافت تخمدان ماهی ۱۷ بتا استرادیول با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم، فاز غالب اووسیت‌ها شامل مرحله پیش-

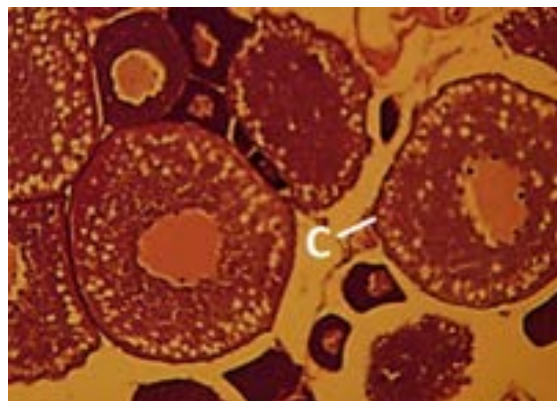
نرسیده (شکل ۱۱) و در تیمار LHRH-A<sub>2</sub> حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری و اتصال ذرات چربی به یکدیگر به چشم می خورد (شکل ۱۲).



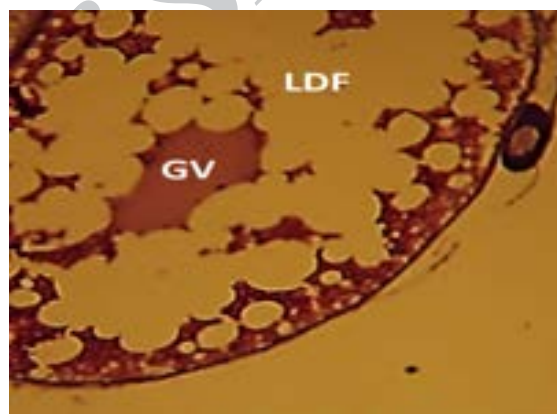
**شکل ۱۰:** مقطعی از بافت تخمدان ماهی ۱۷ بتا استرادیول با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم، حرکت وزیکول زایا (GVBD) به سمت قطب جانوری، اتصال ذرات چربی به یکدیگر (LDF)، ذرات زرده (Y)، (H&E)، بزرگنمایی ۱۰۰ ×



**شکل ۱۱:** مقطعی از بافت تخمدان ماهی گورامی سه خال. مقطعی از بافت تخمدان ماهی مرزنجوش با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم، اتمام حرکت وزیکول زایا به سمت قطب جانوری، (H&E)، بزرگنمایی ۱۰۰ ×



**شکل ۸:** مقطعی از بافت تخمدان ماهی LHRH-A<sub>2</sub> با دوز ۰/۰۰۳ میلی گرم بر کیلوگرم، حضور غالب اووسیت هایی در مرحله کورتیکال (c)، (H&E)، بزرگنمایی ۱۰۰ ×



**شکل ۹:** مقطعی از بافت تخمدان ماهی ۱۷ بتا استرادیول با دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم، شروع حرکت وزیکول زایا (GV) به سمت قطب جانوری، اتصال ذرات چربی به یکدیگر (LDF)، (H&E)، بزرگنمایی ۱۰۰ ×

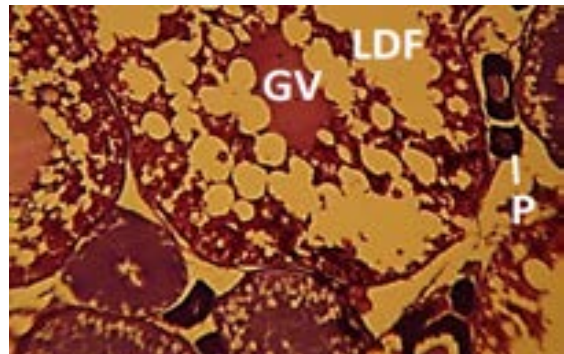
مقایسه‌ی مقاطع بافتی تخمدان مرزنجوش، ۱۷ بتا استرادیول (دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و LHRH-A<sub>2</sub> (دوز ۰/۰۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم) نشان می دهد که اووسیت در تیمار ۱۷ بتا استرادیول به حداکثر رشد خود رسیده و هسته‌ی سلول کاملاً به طرف سیتوپلاسم مهاجرت کرده است و شکست وزیکول ژرمینال (GVBD) ظاهر شده است (شکل ۱۰)، درحالی که در تیمار مرزنجوش مهاجرت هسته به دیواره‌ی سلولی



را در بلوغ اووسیت‌ها در ماهی گورامی سه خال بازی می‌کند (Degani *et al.*, 2004). در مقایسه‌ی نتایج بین مرزنجوش و LHRH-A<sub>2</sub> در حداکثر دوز مشخص شد که مرزنجوش تاثیر قابل توجهی در رشد و بلوغ اووسیت‌ها داشته است ( $P \leq 0/05$ ). در مطالعاتی که بر روی ماهی قزل آلا‌ی رنگین کمان (Van Der Kraak *et al.*, 1984) و ماهی گورامی سه خال (Degani *et al.*, 1995) انجام گرفت، نشان داده شد که LHRH-A<sub>2</sub> می‌تواند با تاثیر بر سلول‌های گنادوتروف در هیپوفیز، بلوغ اووسیت‌ها را تحت تاثیر قرار دهد. در طی بلوغ تخمک، قطر اووسیت‌های هر مرحله نسبت به مرحله‌ی قبل افزایش می‌یابد (Anathy *et al.*, 2003). اووسیت‌های بالغ تحت درمان با ۱۷ بتا استرادیول دارای قطر ۲۶۸/۸۶ میکرومتر و اووسیت‌های تحت درمان با LHRH-A<sub>2</sub> که در مرحله‌ی ویتلوژنز به سر می‌برند، دارای قطر ۱۶۶/۱۵ میکرومتر بودند. این در حالی است که اووسیت‌های تحت درمان با مرزنجوش، در مرحله‌ی بین ویتلوژنز و بلوغ نهایی، دارای قطر ۲۰۰/۲۳ میکرومتر بودند.

### بافت‌شناسی تخمدان

مراحل بلوغ اووسیت‌ها در ماهی گورامی سه خال مشابه با سایر مهره‌داران است (Degani *et al.*, 1992). بلوغ نهایی اووسیت با GVBD مشخص می‌شود (Patino *et al.*, 1990a, b). نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که در گروه‌های کنترل، اووسیت‌ها در مرحله‌ی پیش‌هستکی اولیه به سر می‌برند. در اووسیت ماهیان تحت تیمار با LHRH-A<sub>2</sub> در دوز ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم برخی از اووسیت‌ها در مرحله ویتلوژنز به سر می‌برند اما هنوز تعدادی از آن‌ها در



**شکل ۱۲:** مقطعی از بافت تخمدان ماهی LHRH-A<sub>2</sub> با دوز ۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، حرکت وزیکول زایا (GV) به سمت قطب جانوری، اتصال ذرات چربی به یکدیگر (LDF)، حضور اووسیت‌هایی در مرحله پیش‌هستکی اولیه (P)، (H&E)، بزرگنمایی ۱۰۰×

### بحث

#### شاخص گنادوسوماتیک و قطر اووسیت‌ها

از مشخصه‌های بلوغ تخمک GSI است. در مقایسه‌ی نتایج حاصل از GSI، بین گروه‌های کنترل ۱ (دست نخورده)، کنترل ۲ (نرمال سالین) و کنترل ۳ از لحاظ آماری اختلاف معناداری وجود ندارد ( $P \geq 0/05$ ). در حقیقت نرمال سالین و اتانول بلوغ اووسیت‌ها را تحت تاثیر قرار نمی‌دهند (Ahmadnezhad *et al.*, 2013). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که GSI در ۱۲ گروه تجربی بالاتر از گروه‌های کنترل قرار دارد ( $P \leq 0/05$ ). علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد که در تیمارهای مرزنجوش، ۱۷ بتا استرادیول و LHRH-A<sub>2</sub> با افزایش دوز، رشد و بلوغ اووسیت‌ها افزایش می‌یابد. آنالیز آماری نتایج GSI بین تیمارهای ۱۷ بتا استرادیول و مرزنجوش (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و LHRH-A<sub>2</sub> (۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اختلاف معناداری را نشان می‌دهد ( $P \leq 0/05$ ). بیش‌ترین رشد و بلوغ اووسیت‌ها در تیمار ۱۷ بتا استرادیول مشاهده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که ۱۷ بتا استرادیول نقش مهمی

### سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

### منابع

1. Ahmadnezhad, M., Oryan, S.H., Hosseinzadeh Sahafi, H., Khara, H., 2013. Effect of Synthetic Luteinizing Hormone – Releasing Hormone (LHRH-A<sub>2</sub>) Plus Pimozide and Chlorpromazine on Ovarian Development and Levels of Gonad Steroid Hormones in Female Kutum *Rutilus frisii kutum*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, Vol. 13, pp. 95-100.
2. Ahmed, B., Bawa, S., Siddiqui, A.B., Alam, T., Alam, S.A., 2002. Components from seeds of *Cichorium intybus* Linn. Indian journal Chemistry, Section b, 41B, 2701–2705.
3. Anathy, V., Kirankumar, S., Pandian, T.J., 2003. Enhanced expression of beta-thymosin mRNA in the ovary of GnRH analog or 17beta-estradiol treated paradise fish, *Macropodus opercularis*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A, 134(3), 639-45.
4. Benavides, V., Trujillo, G., D'Arrigo, G., Paredes, U., Pino, J., 2000. Evaluación toxicológica preliminar de ruta graveolens, *Origanum vulgare* y persea americana sobre embriones preimplantacionales de ratón. Journal of Revista Peruana de Biología, Vol. 7(1), pp. 87-89.
5. Britt, K.L., et al., 2002. Estrogen regulates development of the somatic cell phenotype in the eutherian ovary. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 16(11), 1389-1397.
6. Bussmann, R.W., Glenn, A., 2010. Medicinal plants used in Northern Peru for reproductive problems and female health. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 6(1), 30-42.
7. Degani, G., Boker, R., 1992. Vitellogenesis level and the induction of maturation in the ovary of the blue gourami *Trichogaster trichopterus* (Anabantidae, Pallas 1770). Journal of Experimental Zoology, 263, 330-337.
8. Degani, G., Jackson, K., Marmelstein, G., 1995. The effect of LHRH analogue on sex steroid profiles in female *Trichogaster trichopterus* (Anabantidae, Pallas). Journal of aquaculture in the tropics, 10, 297-307.

مرحله‌ی پیش‌هستیکی اولیه قرار دارند. در مطالعاتی که توسط Degani و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر روی ماهی گورامی سه‌خال انجام گرفت، نشان داده شد که آنالوگ‌های LHRH می‌توانند بلوغ برخی از اووسیت‌ها را تا مرحله‌ی ویتلوژنز پیش ببرند (Degani et al., 2004). در ماهیان تحت تیمار با مرزنجوش در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، اووسیت‌ها بین مرحله‌ی ویتلوژنز و بلوغ نهایی بوده‌اند. مطالعاتی که Britt و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام دادند، نشان داده شد که فیتواستروژن‌ها می‌توانند همانند استروژن‌ها نقش مهمی را در تولید مثل داشته باشند (Britt et al., 2004). در تیمار ۱۷ بتا استرادیول و زیکول ژرمینال کاملاً در حاشیه‌ی تخمک قرار گرفته و GVBD ظاهر شد. در مطالعات بر روی مکمل ۱۷ بتا استرادیول بر بلوغ نهایی اووسیت در ماهی گورامی سه‌خال (Degani et al., 1992) نیز بلوغ نهایی اووسیت‌ها همراه با حضور GVBD بود که با نتایج به دست آمده در این آزمایش مطابقت دارد.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که گیاه مرزنجوش در مقایسه با LHRH-A<sub>2</sub> توانسته اثر بیش‌تری را بر روی باروری ماهی گورامی سه‌خال داشته باشد و در عین حال اثرات آن از ترکیب ۱۷ بتا استرادیول کم‌تر بوده است. علت این امر نیز می‌تواند به علت حضور فیتواستروژن موجود در این گیاه باشد که می‌تواند همانند هورمون اولیه‌ی جنسی بر سطوح مختلفی از محور هیپوفیز-هیپوتالاموس-گناد اثر بگذارند.

15. Patino, R., Thomas, P., 1990a. Induction of maturation of Atlantic croaker oocytes by 17a, 20p, 21-trihydroxy-4-pregnen- 3-one in vitro: Consideration of some biological and experimental variables. *Journal of Experimental Zoology*, Vol. 225, pp. 97-109.
16. Patino, R., Thomas, P., 1990b. Effect of gonadotropin on avian intra follicular processes during the development of oocytes maturational competence in Teleost's, the Atlantic croaker: Evidence for two distinct stages of gonadotropic control of final oocytes maturation. *Biology of Reproduction*, 43, 818-827.
17. Tekippe, J.A., Hristov, A.N., Heyler, K.S., Cassidy, T.W., Zheljzkov, V.D., Ferreira, J.F., Karnati, S.K., Varga, G.A., 2011. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare L.* leaves in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 5065-79.
18. Van Der Kraak, G., Dye, H.M., Donaldson, E.M., 1984. Effects of LH-RH and Des-Gly10 [D-Ala6] LH-RH-Ethyl amide on Plasma Sex Steroid Profiles in Adult Female Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology*, 55, 36-45.
19. Yildiz, F., 2005. Phytoestrogens in Functional Foods. Taylor and Francis Ltd, 1, 3-5, 210-211.
9. Degani, G., Jackson, K., Goldberg, D., 2004. Transcription of FSH- $\beta$ , LH- $\beta$  and growth hormone in female *Trichogaster trichopterus* (PALLAS 1770) treat with GnRH analog. VI International Congress on the Biology of Fish, the Molecular Basis of Environmental Adaptation, Manaus Brazil.
10. Htun-Han, C., 1979. The reproduction biology of the Dab *Limnda limnda* in the North Sea. Gonadosomatic index, Hepatosomatic index & condition factor. *Journal of Fish Biology*, 1, 369-378.
11. Kurzer, M.S., Xu, X., 1997. Dietary Phytoestrogens. *Annual Review of Nutrition*, 17, 353-381.
12. Nakari, T., Erkomaa, K., 2003. Effects of phytosterols on zebrafish reproduction in ultigeneration test. *Environmental Pollution*, 123(2), 267-273.
13. Ng, N.K., Tsi, D., Muro, A.D., 1997. Induced final maturation and ovulation in small anabantoid teleost, the Dawrf gourami (*Colisa lalia*) the modulatory effects of monoaminergic and opioid drugs on the responsiveness to LHRHa. *Aquarium Science and Conversation*, 107, 199-215.
14. Okubo, K., Nagahama, Y., 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiologica\_ (Oxford)*, 193, 3-15.