نقش گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus-castus*) درکنترل روند رسیدگی جنسی ماهی قرمز (*Carrasius auratus*)

همایون حسین زاده صحافی *[۱]، سید عباس طالب زاده[۱]، طاهره ناجی[۲]

۱- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی ، تهران ، ایران، صندوق پستی :۱۳۳-۱۵۷۴۵

۲- گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران - ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲۵

چکیده

امروزه تاثیر فیتو استروژن‌ها بر روند طبیعی هورمون‌های جنسی در ماهیان بعنوان یک عامل تاثیرگذار به اثبات رسیده و هدف این پژوهش بررسی تاثیر عصاره گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus-castus*) در این روند بوده است. در این راستا اثر این گیاه بر ساختار گناد ماهی قرمز (*Carasius auratus*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۱۸۰ عدد ماهی ماده با میانگین وزنی ۰/۸±۱۶/۵گرم انتخاب شدند. سپس ماهیان به مدت ۴۸ ساعت با محیط عادت دهی شدند. فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب نظیر pH (۶/۵) ، درجه حرارت (۲۶) و اکسیژن محلول (۶/۵) تنظیم وآنگاه آزمایشات در ۸ گروه (۲ گروه کنترل و ۴ گروه تیمار) با ۳ تکرار که هر گروه شامل ۱۵ عددماهی ماده انجام شد. دوزهای مختلف از عصاره گیاه پنج انگشت (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر هر کیلوگرم) بصورت عضلانی (IM) و به مقدار ml ۰/۲ در ۱۰ نوبت طی ۲۰ روز تزریق شد. تزریق‌ها بمدت ۲۰ روز صورت پذیرفت. در روز بیستم ماهیان بی‌هوش گردیده و بیومتری ماهیان و اندازه گیری طول و وزن انجام شد. با انجام خونگیری از ساقه دمی مقدار هورمونهای جنسی تستوسترون و۱۷ بتا استرادیول به روش رادیو ایمنواسی تعیین گردید. میزان هورمون ۱۷ بتا استرادیول در کلیه تیمارهای دریافت کننده عصاره گیاه پنج انگشت، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ نسبت به گروه شاهد کاهش داشته که کاملاً وابسته به دوز بود ($P< ۰/۰۱$). تستوسترون نیز در تیمار ۳۰ و ۵۰ میلیگرم کاهش معنی دار داشت لکن در تیمارهای پایین تر نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار نشان نداد. همچنین میزان شاخص گنادوسوماتیک در تیمار ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم کاهش یافته لکن قطر تخمک در این دو تیماراختلاف معنی دار از خود نشان نداد. گناد ماهیان خارج و پس از انجام مراحل پاساژ بافت و رنگ آمیزی با روش H&E در زیر میکروسکوپ بررسی شد. در مجموع عصاره گیاه پنج انگشت در دوزهای ۳۰ و۵۰ مانع از رشد و تکوین سلولهای اوسیت در تمامی دوزها گردید. این عصاره می تواند در روند کنترل تولید مثلی ماهیان تاثیر داشته باشد.

کلمات کلیدی: گیاه پنج انگشت، ماهی قرمز، گناد، کنترل باروری.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). h_hosseinzadeh@yahoo.com

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]

مقدمه

سیستم تولید مثل ماهی مجموعه تکامل یافته‌ای از بافت‌ها و اندام‌های مرتبط است که تحت هدایت و فرمان سیستم عصبی و هورمونی به صورت دوره ای به فعالیت خود ادامه می دهد . از مهمترین فاکتورهای داخلی و یا فیزیولوژیک تاثیر گذار بر تولید مثل ماهی، می توان به فاکتورهای اندوکرینی و محور هیپوتالاموس – هیپوفیز – گناد اشاره کرد (Evance and Caliborn, 1993). در ماهی، همانند تمام مهره داران عالی، هورمون ها نقش تعیین کننده ای در فرایند تولیدمثل بر عهده دارند. هورمون ها پیام رسان های شیمیایی هستند که توسط اندام های خاصی، از قبیل غده ی هیپوفیز، به جریان خون ریخته می شوند. هورمون ها از طریق جریان خون به دیگر بافت انتقال می یابند و این بافت ها به طرق مختلف به این هورمون ها پاسخ می دهند.یکی از این پاسخ ها، آزاد شدن هورمون های دیگر از این بافت ها می باشد که این فرایند خود نیز پاسخ دیگری در بافت های هدف را در پی دارد. بافت های اولیه ی درگیر در رهاسازی هورمون شامل هیپوتالاموس، غده ی هیپوفیز و غدد جنسی می باشد (Meccariello *et al.*, Nozaki, 2013 :2014). هیپوتالاموس، واقع در پایه ی مغز، به سیگنال هایی که از گیرنده ها فرستاده می شود، حساس بوده و در پاسخ به محرک های محیطی با آزاد کردن هورمون های آزاد کننده پاسخ می دهد. اصلی ترین هورمون، هورمون آزاد کننده ی گنادوتروپین (GnRH می باشد، که از هیپوتالاموس به هیپوفیز منتقل می شود. غده ی هیپوفیز عهده دار کنش های مختلفی از قبیل رشد و تولیدمثل می باشد(Evance and Caliborn, 1993).

گیاهان دارویی از ارزش و اهمیت خاصی در تأمین بهداشت و سلامتی جوامع هم به لحاظ درمان و هم پیشگیری از بیماریها برخوردار هستند. این بخش از منابع طبیعی قدمتی همپای بشر داشته و یکی از مهمترین منابع تأمین غذایی و دارویی بشر درطول نسلها بوده اند.

به دلیل عوارض بی‌شمار ناشی از مصرف داروهای مصنوعی، امروزه درکشورهای مختلف توجه زیادی به استفاده ازداروهای گیاهی‌شده است (WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2009). گیاه پنج انگشت با نام علمی *Vitex agnus-castus* از خانواده شاه پسند Verbenaceae درختچه زیبایی به ارتفاع یک متر و نیم است که به علت گل‌های زیبایی که دارد گاه به عنوان گیاه تزئینی کاشته می شود. بدین علت به آن پنج انگشت گویند که برگ‌های آن پنجه ای و پنج تایی است. گل‌های آن به رنگ آبی و شبیه سنبله ای دراز است که سپس تبدیل به گل می شود. این گیاه را فلفل بیابانی نیز می نامند و در بسیاری از مناطق ایران می روید.ترکیبات شیمیایی عصاره میوه پنج انگشت حاوی اسانس، ایریدوئیدگلوکزید و فلاونوئیدهاست. مهم‌ترین اجسام تشکیل دهنده اسانس شامل سینئول، لیمونن، سابی‌نن، آلفاوبتاپی‌نن، کاستین، میرسن، لینالول، سیترونلول، سیمن، کامفن، کاریوفیلن، کادینن، ایندول و فارنزن هستند. فلاونوئیدها شامل کاستی‌سین، اورینتین، وایزوویتکسین می‌باشند. ایریدوئیدگلوکزیدهای مهم آن از جمله آگنوزید به میزان ۰/۶ درصد و آکوبین ۲۰ به میزان ۰/۳ درصد گزارش شده‌اند. ترکیبات مهم برگ شامل ایریدوئیدگلوکزید، فلاونوئیدها و مقدار کمی اسانس می‌باشند که مشابهتی با میوه نیز دارد. پروژسترون و هیدروکسی پروژسترون به صورت آزاد و کنژوگه در

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]

گل‌ها و برگ‌ها گزارش شده‌اند. همچنین تستوسترون و اپی تستوسترون در گل‌ها گزارش شده‌اند دارند (Meier *et al.*, 2000) .

آثارفارماکولوژی ومصرف درمانی پنج انگشت *Vitex agnus-castus* با نفوذ روی غدد هیپوفیز وهیپوتالاموس وتعدیل دو هورمون هیپوفیزی FSH وLH، موجب تولید استروژن می شوند. مکانیسم دقیق اثر این گیاه مشخص نیست ولی مطالعات نشان داده است که این گیاه تحریک کننده (Agonist) گیرنده‌های دوپامین نوع دوم (D2) است و باعث کاهش ترشح پرولاکتین می شود. به نظرمی‌رسد گیاه پنج انگشت با اثر بر محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز اثر خود را اعمال می کند (Hobbs, 2003). این گیاه باعث کاهش آزاد شدن FSH و افزایش آزاد شدن LH و پرولاکتین از هیپوفیز می گردد (Wuttke *et al.*, 2003). هورمون‌های FSH و LH در تولید استروژن (هورمون جنسی زنانه) از تخمدان‌ها و دوره تخمک گذاری موثرند (Webster *et al.*, 2006) .همچنین ثابت شده است که میوه این گیاه اثرات درمانی زیادی برای رحم دارد (Chuong *et al.*, 1986). با توجه به هورمون های ترشح شده از ادنوهیپوفیز که شامل پرولاکتین، کورتیکوتروپ، تیروتروپ، سوماتوتروپ یا هورمون رشد، گنادو تروپ GTH، هورمون تحریک کننده ملانوفورها، سوماتولاکتین می باشند احتمال تاثیر این عصاره بر سایر روند های فیزیولوژیک نیز وجود دارد. امروزه در بسیاری از کارگاه های تکثیر ماهی ها موضوع همزمانی تخم ریزی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و بر این اساس ترکیبات مختلف نظیر انواع هورمون های سنتتیک (LHRHa, GnRHa ,CPE ,Ovaple, Ovaprime,) استفاده می گردد (Melamed *et al.*, 2002). معمولا مشکل اساسی در این ارتباط نا هناهنگ بودن روند رشد اووسیت ها در اکثر گونه ها بوده و که به دلیل خصوصیات ژنتیکی، تغذیه و نیز اختلاف سایز و سایر عوامل محیطی می باشد. برای رفع این معضل امروزه بکار گیری برخی دارو ها نظیر انواع اگونیست های دو پامینی (پیموزاید، دامپریدون، متکلوپرامید، کلوپرومازین) در کنترل روند های تولید مثلی کاربرد یافته اند (Ahmadnezhad *et al.*, 2013). در این تحقیق اثرات عصاره پنج انگشت بر کنترل روند رسیدگی جنسی ماهی قرمز بررسی و سطوح مختلف هورمونهای جنسی استرادیول و تستوسترون وهمچنین رشد گناد و رسیدگی اووسیت ها در مراحل مختلف تخمدانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه بچه ماهی ها

نمونه های ماهی قرمز حوض (*Carrasius auratus*) از دریاچه شهدای خلیج فارس منطقه ۲۲ تهران تهیه وبه اکواریوم موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور منتقل گردیدند. تعداد ۱۸۰ ماهی قرمز بالغ با میانگین وزنی۰/۸ ± ۱۶/۵ گرم انتخاب شد.

نمونه های تجربی و شرایط آزمایش

۲۴ ساعت قبل از وارد کردن ماهی ها ، مخازن آبگیری شده وپس از ورود ماهی ها به مخازن به مدت ۳ روز در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سازگاری انجام شد. pH محلول ۷/۱ و اکسیژن در حد mg/lit ۶ تنظیم گردید ماهی ها به صورت روزانه از غذای بیومارتغذیه شدند. سپس ۱۸۰ عدد ماهی ماده قرمز در ۶ گروه و ۳ تکرار و هر گروه شامل ۱۰ عدد ماهی در مخازن شیشه ای ذخیره سازی شدند.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]

تیمار های آزمایشی

عصاره گیاه پنج انگشت از طریق پرکولاسیون بافت گیاهی (میوه) که قبلاً در الکل هموژن شده بود بدست آمد. جهت عصاره گیری با استفاده از روش پرکولاسیون (Perculation) ۵۰ گرم از گیاه توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین و بعد به داخل قیف دکانتور انتقال یافت. سپس اتانول ۹۶ درجه به عنوان حلال مناسب به آن اضافه گردید طول مدت عصاره گیری ۳ روز و جمعا ۳ بار تکرار گردید. برای جداسازی حلال از عصاره خشک کردن در پتری دیش صورت پذیرفت.

قبل و بعد از انجام تزریقات بیومتری ماهیان (اندازه گیری طول و وزن ماهی) انجام شد. چهار دوز مختلف ازعصاره گیاه پنج انگشت در قالب ۴ تیمار (۱۰ ، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بصورت عضلانی(IM) و به مقدار ۰/۲ سی سی در هر نوبت تزریق شد (بهیار، ۱۳۹۱). عصاره به مدت ۲۰ روز، در ۱۰ نوبت و هر ۴۸ ساعت یکبار تزریق گردید . دو تیمار اتانولی (تزریق مقدار مشابه اتانول) و دست نخورده نیز بعنوان شاهد (C1 , C2) در نظر گرفته شدند. پس از پایان دوره ی تزریق ،تشریح ماهی ها آغاز گردید.

تشریح ماهی ها

در پایان روز بیستم ماهی ها به تعداد ۱۰ عدد در هر تیمار بیهوش و بیومتری ماهیان (اندازه گیری طول با استفاده از کولیس و وزن ماهی ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم) انجام شد .تشریح ماهی بوسیله قیچی از سمت مخرج به طرف شکم در امتداد خط میانی برش طولی تا زیر سرپوش آبششی ایجاد شد. سپس ۲ برش عرضی یکی در ابتدا و دیگری در انتهای برش اول تا بالای خط جانبی بر برش عمود شد . بعد دو برش عرضی در بالای خط جانبی به هم وصل شد. سپس لایه خارجی آن از اندامهای احشایی جدا شد. در این حالت با تفکیک کردن تخمدان از اندامهای داخلی آن را جدا کرده و در محلول بوئن قرار داده شد (بهیار، ۱۳۹۱).

خونگیری

خونگیری با استفاده از سرنگ های هپارینه و از ناحیه آئورت پشتی صورت پذیرفت. پلاسمای خون با انجام سانتریفوژ در ۱۵۰۰ دور در دقیقه و بمدت ۱۰ دقیقه جداسازی و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (Nasri *et al*., 2007).

اندازه گیری هورمون ها

سنجش هورمون های استروئیدی شامل تستوسترون و ۱۷ بتا استرادیول با کیت هورمونی ایمونوتک (محصول شرکت کاوشیار و ساخت کشور فرانسه) با استفاده از روش رادیو ایمنو اسی (Radio Immuno Assay) و به وسیله دستگاه تمام اتوماتیک گاماکانتر مدل LKB سنجش شد(Levavisivan *et al*., 2006).

تعیین شاخص گنادوسوماتیک (GSI)

برای اندازه گیری شاخص گنادی وزن گناد پس از تشریح اندازه گیری (۰/۰۱ گرم) شده ودرصد شاخص گنادی (GSI) براساس فرمول زیر برای هر ماهی محاسبه گردید .

$$GSI = \frac{WG}{W} \times 100$$ که در آن WG وزن گناد (گرم) و W وزن کل بدن ماهی (گرم) است (Biswas, 1993).

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]

بافت شناسی

به منظور بررسی تغییرات سلولی و رشد و تکوین اووسیت ها پس از تشریح، تخمدان خارج و قطعه ای از آن در محلول بوئن نگهداری و پس از ۱۲ ساعت در الکل ۷۵ درجه شستشو و نهایتاً نگهداری گردید. نمونه ها پس از انجام مراحل اماده سازی برای تهیه مقاطع بافتی با استفاده از میکروتوم برش گیری (بین ۵ تا ۷ میکرون) شده وسپس برای تشخیص و تمایز سلول ها، مقاطع بافتی با هماتوکسین و ائوزین رنگ آمیزی شد. مراحل رشد گنادی در سطح میکروسکوپی به ۶ مرحله تقسیم گردید (حسین زاده صحافی، ۱۳۸۰) .

تعیین قطر تخمک ها

برای تعیین قطر تخمک ابتدا از اسلایدهای تهیه شده از تخمدان گروه های تجربی عکس برداری شد و سپس با استفاده از نرم افزارAxiovision ۴/۸ محصول سال ۲۰۰۴ شرکت کارل زایس آلمان اندازه گیری قطر تخمک صورت پذیرفت (Biswas, 1993).

بررسی های آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی معنی دار بودن اختلافات مشاهده شده در تیمارهای مختلف از نرم افزار SPSS 17 و روش آماری آنالیزواریانس یک طرفه (one-way ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵٪ و برای مقایسه میانگین و تعیین دوز موثر از آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده شد . برای ترسیم نمودار نیز از نرم افزار Excel 13 استفاده گردید.

نتایج

طول و وزن ماهی

نتایج طول و وزن ماهی در تیمارهای مختلف پیش و پس از انجام تزریقات در جدول ۱ آمده است. در مجموع میانگین وزنی ماهی ها افزایش معنی داری را در قبل و بعد از آزمایشات از خود نشان دادند ($p<۰/۰۱$). در عین حال افزایش وزن سوماتیک ماهی‌ها در این دوره بین تیمارها و گروه های کنترل معنی دار نبود (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین وزن و طول ماهی ها قبل و بعد از انجام تزریقات

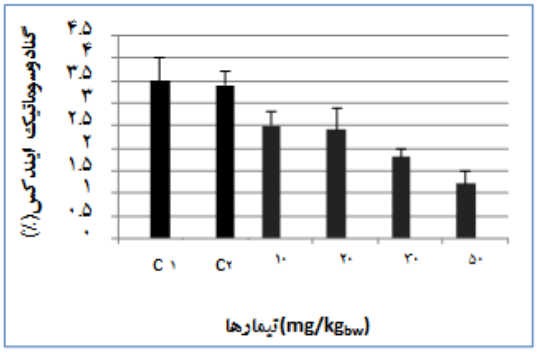
تیمار	قبل از تزریق				بعد از تزریق			
	طول(سانتی متر)		وزن(گرم)		طول(سانتی متر)		وزن(گرم)	
	میانگین	انحراف استاندارد	میانگین	انحراف استاندارد	میانگین	انحراف استاندارد	میانگین	انحراف استاندارد
عصاره پنج انگشت ۱۰ mg/kg	۱۲/۸	۰/۱	۱۶/۲	۰/۲	۱۲/۷	۰/۳	۱۷/۳	۰/۳
عصاره پنج انگشت ۲۰ mg/kg	۱۲/۴	۰/۱	۱۶/۳	۰/۱	۱۳/۱	۰/۲	۱۷/۲	۰/۱
عصاره پنج انگشت ۳۰ mg/kg	۱۲/۲	۰/۲	۱۶/۱	۰/۳	۱۲/۳	۰/۳	۱۷/۳	۰/۲
عصاره پنج انگشت ۵۰ mg/kg	۱۲/۷	۰/۲	۱۶/۲	۰/۱	۱۲/۵	۰/۱	۱۷/۱	۰/۱
کنترل ۱ اتانول ۲۰ µL	۱۲/۳	۰/۵	۱۶/۲	۰/۲	۱۳/۰	۰/۱	۱۷/۱	۰/۲
کنترل ۲ شاهد دست نخورده	۱۲/۵	۰/۲	۱۶/۳	۰/۳	۱۲/۹	۰/۱	۱۷/۰	۰/۳

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]

شاخص گنادوسوماتیک

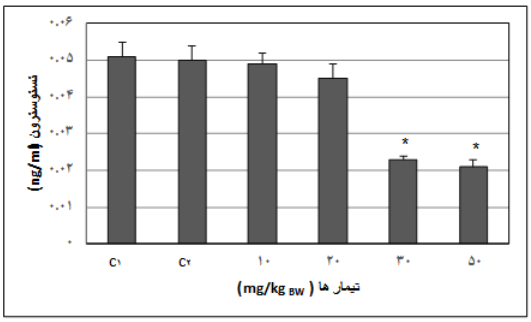
مقایسه مقادیر GSI در تیمارهای مختلف بیانگر کاهش معنی دار این شاخص با افزایش دوزهای عصاره گیاه پنج انگشت بود. بیشترین میزان تاثیر بر کاهش GSI مرتبط به دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود که اختلاف کاملاً معنی دار با میزان این شاخص در گروه های شاهد داشت ($p<0/01$). در عین حال اختلاف معنی دار در شاخص گنادی بین تیمار های شاهد مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱ - مقایسه شاخص رشد گنادی ماهی قرمز حوض در تیمارهای مختلف عصاره پنج انگشت. c_1 و c_2 به ترتیب شاهد دست نخورده و شاهد اتانولی می باشد.

تعیین میزان تستوسترون

نتایج نشان داد که اختلاف معنی دار در سطوح پلاسمایی تستوسترون بین تیمارهای شاهد و شاهد الکلی وجود نداشت ($p<0/01$) و این در حالی است که میزان تستوسترون پلاسمایی در دوز های ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی قرمز به شدت کاهش یافته (شکل ۲) بطوری که به ترتیب به ۰/۰۲۳ و ۰/۰۲۱ نانوگرم بر میلی لیتر رسید ($p<0/01$). بر اساس نتایج تستوسترون در تیمارهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به شاهد اختلاف معنی دار از خود نشان نداد (شکل ۲).

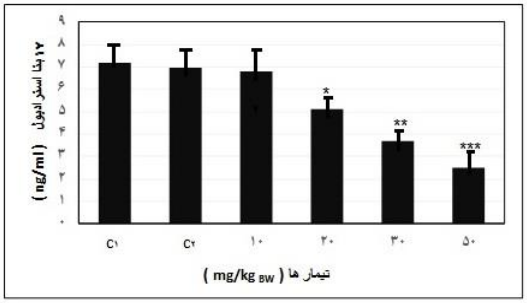


شکل ۲- مقایسه مقادیر پلاسمایی تستوسترون در ماهی قرمز حوض در تیمارهای مختلف عصاره پنج انگشت. c_1 و c_2 به ترتیب شاهد دست نخورده و شاهد اتانولی می باشد (*= معنی دار باحدود اطمینان ۹۵ درصد).

تعیین میزان ۱۷ بتا استرادیول

نتایج حاصل از تاثیر دوزهای مختلف عصاره گیاه پنج انگشت در سطوح پلاسمایی هورمون ۱۷ بتا استرادیول حاکی از تاثیر کاهشی معنی دار نسبت به شاهد می باشد. مقادیراین هورمون در تیمار ۱۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به ترتیب معادل ۰/۲ ±۷/۱ (ng/ml)، ۰/۱ ±۳/۷ (ng/ml)، ۰/۳ ±۲/۵ (ng/ml) بود. اختلاف معنی دار بین تیمارهای دریافت کننده عصاره گیاه با شاهد وجود داشت ($p<0/01$) ولی بین مقادیر هورمون ۱۷ بتا استرادیول در تیمار ۱۰ و شاهد الکلی و دست نخورده اختلاف معنی دار مشاهده نگردید (شکل ۳).

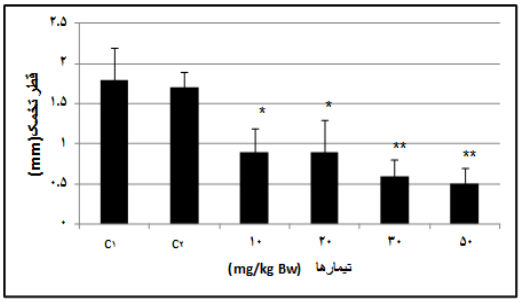
[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]



شکل ۳- مقایسه مقادیر پلاسمایی هورمون ۱۷ بتا استرادیول در ماهی قرمز حوض در تیمارهای مختلف عصاره پنج انگشت. C_1 و C_2 به ترتیب شاهد دست نخورده و شاهد اتانولی می باشد (*، ** و *** = معنی دار باحدود اطمینان ۹۵ درصد).

تعیین قطر تخمک

قطر تخمک در ماهی ها در تیمارهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که قطر تخمک ها در تیمارهای ۳۰ و۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش نسبی از خود نشان داد که به ترتیب ۰/۱ ±۰/۶ و ۰/۳ ± ۰/۵ میلی متر بود. در مجموع قطر تخمک در تیمارهای مختلف نسبت به شاهد (اختلاف معنی داری از خود نشان دادند ($p<۰/۰۱$). این اختلاف در تخمک های مربوط به تیمارهای ۱۰ و ۲۰ نیز با شاهد مشاهده شد لکن گناد از توسعه یافتگی بالاتری برخوردار بود (شکل ۴).

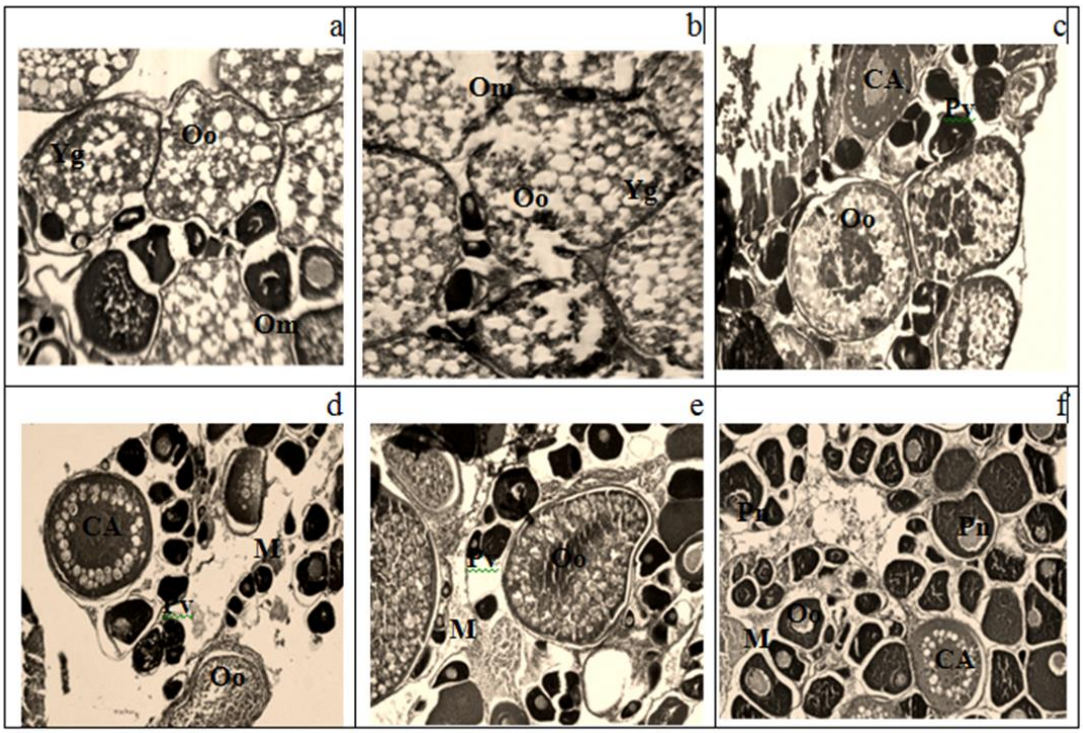


شکل ۴- مقایسه قطر تخمک در ماهی قرمز حوض در تیمارهای مختلف عصاره پنج انگشت. C_1 و C_2 به ترتیب شاهد دست نخورده و شاهد اتانولی می باشد(*، ** و *** = معنی دار باحدود اطمینان ۹۵ درصد).

نتایج مطالعات هیستولوژیک

نتایج حاصل از مطالعات بافت شناسی تخمدان در ماهی قرمز حوض بیانگر عدم رشد و تکوین سلولهای جنسی در تخمدان های ماهیان دریافت کننده دوزهای بالای عصاره گیاه پنج انگشت می باشد. اختلاف معنی دار در رشد و تکوین سلولهای جنسی در تیمار شاهد الکلی و شاهد دست نخورده مشاهده نشد. لکن در تیمارهای ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم از عصاره گیاه پنج انگشت سلولهای اوسیت در مراحل پایین تر تکوین مشاهده گردید. مراحل بلوغ تخمدان در ماهی قرمز شامل مرحله ۱ (هستک کروماتینی)، مرحله ۲ (پیش هستکی)، مرحله ۳ (کورتیکال آلوئولی) ، مرحله۴ (ویتلوژنز) ، مرحله ۵ (بلوغ) و مرحله ۶ (تخم رسیده) می باشد. در بررسی هایی که از مقاطع بافتی ۴ تیمار اصلی دریافت کننده عصاره انجام گرفت صرفا ۳ مرحله نخست رسیدگی جنسی تخمدان مشاهده شد و شاهد (گروه کنترل و گروه کنترل اتانولی) دارای مراحل بالاتر بلوغ بودند (مرحله ۵). تصاویر مراحل جنسی حاصل از برش های نازک از تخمدان نشان دهنده تاثیر گذاری منفی عصاره بر مراحل رشد و تکوین اووسیت ها می باشد. تخمدان ها همگی در مرحله ۲ تا ۴ جنسی بوده و مراحل پیشرفت و تکامل اوسیت ها در آن ها متفاوت بود (شکل ۵).

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]



شکل ۵- مراحل مختلف رشد و تکوین اوسیت ها در تیمارهای مختلف عصاره گیاه پنج انگشت. (a و b) شاهد و c,d,e,f به ترتیب تیمارهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره گیاه می باشند. اوسیت= Oo، بافت تخمدان= M ، مرحله پیش هستکی = Pn ، مرحله آلوئولی= CA ، غشاء اووسیت=OM، ذرات زره ای=YG، بزرگنمایی (X۴۰۰).

بحث

گیاه پنج انگشت از جمله گیاهان دارای اثرات فیتواستروژنی بوده منابع متعدد به آن اشاره نموده اند (Jarry *et al.*, 1993; Sliutz *et al.*, 1993; Milewicz *et al.*, 1993). رچه تاثیر فیتو استروژن ها بر روند تکوین سلول های جنسی و رشد اووسیت ها در برخی منابع تاکید شده است لکن امروزه شواهد متعدد بر تاثیر این گونه ترکیبات بعنوان اخلال گر های هورمونی به اثبات رسیده است (Patiño and Carr, 2015; Jarry *et al.*, 1994).

در پژوهش صورت پذیرفته بررسی در صد شاخص گنادی و تغییرات بافت شناسی در سطح تخمدان نیزحاکی از آن است که استفاده از عصاره پنج انگشت موجب کاهش رشد اووسیت ها در ماهی قرمز شد. گرچه در این پژوهش مقایسه آماری گروههای کنترل ۱و۲ اختلاف معنی داری ازنظر تغییرات شاخص گنادی نشان ندادند ($P<0.05$)، لکن کاهش معنی دار در این شاخص بین دوز های مختلف تزریق شده دیده شد (شکل ۱). احمد نژادو همکاران در سال ۲۰۱۳ جهت بررسی تاثیرات LHRH-A2 ، داروی پیموزاید و کلرپرومازین بر توسعه و بلوغ تخمدان ماهی سیم ماده انجام دادند، بی تأثیربودن نرمال سالین و اتانول در روندتسریع رسیدگی نهایی اووسین ها را اثبات نمودند (Ahmadnezhad *et al.*, 2013). عصاره گیاه پنج

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]

انگشت دارای انواع ترکیبات فلاونوئیدی بوده (Hajdú *et al.*, 2007: Mesaik *et al.*, 2009: Jarry *et al.*, 2003) که تاثیر انها بر روند تولید مثلی و تغییرات سطوح هورمون های جنسی از طریق تاثیر بر گیرنده های دو پامینی D2 قبلا به اثبات رسیده است (Meier *et al.*, 2000; Wuttke *et al.*, 2003) .

در عین حال مطالعات بیانگر تاثیر پذیری سیستم های هورمونی و تولید مثلی از گیرنده های دو پامینی و بویژه گیرنده های D2 در ناحیه هیپوتالاموس می باشند (Nasri *et al.*, 2007). گل مکانی وهمکاران در سال ۲۰۱۱ بر اثر عصاره گیاه پنج انگشت بر تغییرات هورمونی در پستاندارن اشاره کردند.این موضوع توسط Cahill و همکاران در خصوص تاثیر عصاره های گیاهی از جمله گیاه پنج انگشت بر تولید مثل انسان تصدیق گردید. از طرفی شواهد مبنی بر روند استفاده از برخی فیتو هورمون ها در تسریع روند رشد و رسیدگی اووسیت ها در انواع ماهیان استخوانی وجود دارد (Bagheri Ziaria *et al.*, 2015). با توجه به اینکه در تحقیق حاظر اختلاف معنا داری بین تیمار شاهد (تنها تزریق با اتانول) و تیمار دست نخورده وجود ندارد ($P<0.05$)، که این امر نشان از بی تاثیر بودن اتانول در رشد و رسیدگی اووسیتها می باشد و تنها اختلاف مشاهده شده بین تیمارهای مختلف با مقدار دوز تزریقی می باشد، لذا کاهش شاخص GSI هماهنگ با افزایش دوز تزریقی عصاره گیاه پنج انگشت می تواند نشان دهنده اثر کاهش دهنده آن بر روند رشد تخمدان باشد. همچنین در تحقیقی که آذرنیا و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام دادند و درآن تاثیر عصاره پنج انگشت را بر جنین موش های صحرایی بررسی نمودند، متوجه شدند که عصاره پنج انگشت باعث ایجاد ناهنجاری و اثرات منفی بر رشد جنین موش می شود .Sliutz و همکاران نیز در سال ۱۹۹۳ به تاثیر کاهش دهنده عصاره گیاه *Vitex agnos* بر ترشح پرولاکتین اشاره نمودند.Liu و همکاران در سال ۲۰۰۴ به وجود اسید لینولئیک بعنوان یک ترکیب استروژنیک در عصاره گیاه پنج انگشت اشاره نموده که بر اساس تحقیقات انجام شده کاهش آن باعث نقص در تولید مثل در پرندگان میشود (Lillie *et al.*, 1967). در عین حال برخی شواهد در تاثیر متضاد عصاره های گیاهی بر روند رسیدگی و رشد تخمدان وجود دارد . باقری و همکاران نشان دادند که با افزایش دوز عصاره مرزن جوش در تیمار های مختلف با افزایش دوز تزریقی روند رشد و رسیدگی اووسیت ها افزایش می یابد (Bagheri Ziaria *et al.*, 2015) .در مطالعه ای که Balali و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی اثر مکمل ۱۷ بتا استرادیول بر روی ماهی *Xiphophorus helleri* انجام دادند به این نتیجه دست یافتند که ۱۷ بتا استرادیول، به عنوان یک استروژن طبیعی که توسط سلول های فولیکولی تخمدان تولید می گردد، نقش مهمی را در رشد اووسیت های تخمدان ماهی بازی کند (Balali *et al.*, 2012).

بررسی نتایج حاصل از ۴ تیمار پنج انگشت با دوزهای ۱۰-۲۰-۳۰-۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن ماهی ، نشان داد که گروه های تحت تیمار با عصاره پنج انگشت از نظر هورمون های ۱۷ بتا استرادیول و تستوسترون و نیز قطر تخمک ها دارای اختلاف معنا داری نسبت به گروه شاهد بودند (شکل ۲ و۳) و این اختلاف در تیمار های ۳۰ و ۵۰ میلی گرم با شاهدکاملا بارز بود ($P<0.05$).

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]

تاثیر عصاره این گیاه در سطوح بالای مغز و محور هیپو تالاموس هیپوفیز گناد می تواند عامل اساسی کاهش هورمون های استروئیدی (۱۷ بتا استرادیول و تستوسترون) باشد. دلیل اصلی این کاهش را می توان به تحریک نورون های دوپامینرژیک و در نتیجه ترشح دوپامین بویژه از طریق اتصال ترکیبات فعال عصاره برگیرنده های D2 دانست. این اتصال بصورت اگونیستیک منجر به افزایش ترشح دوپامین گردیده که خود مانع از ترشح هورمون های گونادو تروپین و در نتیجه کاهش سطح هورمون های استروئیدی تخمدانی می گردد(Vacher *et al.*, 2002; Levavi-Sivan *et al.*, *2006*). نتایج نشان داد که عصاره پنج انگشت با تغییرات هورمونی و تاثیر منفی بر ترشح هورمونهای جنسی اثر خفیف ضد باروری در ماهی قرمز حوض دارد . نتایج این آزمایش با نتایج قبلی که برروی موش صحرایی انجام گرفته بود نیز مطابقت دارد .در تحقیقی که نصری و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی اثر پنج انگشت بر روی موش صحرایی انجام دادن نشان از اثرات خفیف ضدبارداری این گیاه بر روی موش صحرایی داشت که در مقاله حاضر نیز با در نظر گرفتن تاثیر آن بر رشد گناد و اووسیت ماهی ها تایید شد (Nasri *et al.*, 2007).

در این تحقیق مقایسه مقادیر هورمونی تستوسترون و ۱۷ بتا استرادیول بین تیمارهای تزریق شده با عصاره پنج انگشت از یک طرف و با تیمار کنترل از طرف دیگر اختلاف معناداری را نشان داد ($P<0.05$). ولی تیمار ۱۰ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن ماهی در خصوص هر دو هورمون با تیمار کنترل اختلاف معنی دار نداشت ($P>0.05$). این اختلافات را می توان بر عدم توان تحریک عصاره گیاه پنج انگشت در دوز های پایین بر گیرنده های دوپامینی و همچنین تاثیر پذیری گیرنده های D2 از مقادیر بالای عصاره گیاه پنج انگشت دانست که در واقع تحریک پذیری وابسته به دوز را از خود نشان میدهند(Schellenberg *et al.*, 2012). تحقیقات بهیار نیز نشان دهنده تاثیر منفی عصاره گیاه پنج انگشت در دوزهای مختلف ۱۰و ۲۰و ۳۰و ۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن ماهی بر رشد اووسیت ها و شاخص تخمدانی در ماهی گورامی سه خال بوده که در انتها یک سیر نزولی شاخص GSI در مقابل افزایش دوز را نشان می دهد (بهیار، ۱۳۹۱). نتایج بدست آمده از اندازه قطر تخمک ها در تیمارهای گیاه پنج انگشت تصدیقی بر نتایج حاصل از شاخص رشد و رسیدگی تخمک هاست که با افزایش دوز تزریق شده قطر تخمک ها یی که تشکیل شده اند پایین می آید (شکل ۴). کمترین قطر تخمک در تیمار با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن ماهی می باشد.و همچنین بین قطر تخمک های تیمارهای تیمارهای گیاه پنج انگشت با شاهد اختلاف معنی داری وجود داشت ($P<0.05$). همچنین بررسی برش های بافتی تخمدان نیز حاکی از کاهش قابل توجه اووسیت های در حال رشد در تیمار های ۳۰ و ۵۰ میلی گرم عصاره گیاه پنج انگشت می باشد (شکل ۵). در اشکال a و b که مربوط به شاهد می باشند تعداد اووسیت ها در مرحله ویتلوژنز زیاد بوده و این در حالی است که با تزریق عصاره گیاهی شاهد عدم رشد اووسیت ها و باقی ماندن انها در همان مراحل ابتدایی پیش هستکی و کورتیکال الوئولی بوده و اووسیت های تکامل یافته در این تیمار ها یافت نگردید. با توجه به تاثیر قابل ملاحظه هورمون ها بر روند تکوین اووسیت ها و اختلال ایجاد شده ناشی از دوز های بالای عصاره

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]

گیاه پنج انگشت که منجر به کاهش هورمون های تستوسترون و استرادیول در بافت تخمدان گردیده است به نظر می رسد این تاثیر از طریق محور هیپو تالاموس هیپوفیز گناد اعمال و کاهش ترشح این هورمون ها باعث کاهش روند رشد اووسیت ها شده باشد (Nagahama and Yamashita, 2008). نتایج این تحقیق بیانگر تاثیر بازدارنده عصاره گیاه پنج انگشت بر روند رشد گناد و اووسیت ها در ماهی قرمز می باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب تشکر و قدر دانی خود را از اقایان دکتر رامین و نیز همکاران محترم پژوهشکده آبزی پروری آب های داخلی برای تامین بخشی از ماهی ها اعلام می نماییم. همچنین از ستاد توسعه علوم و فناوری گیاهان دارویی و طب سنتی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری برای تامین بخشی از اعتبارات طرح تشکر و قدردانی می نماید.

منابع

۱. بهیار، غ.، ۱۳۹۱. داروی ۱۷ بتا استرادیول و گیاه پنج انگشت بر ساختار گنادی ماهی نابالغ گورامی، رساله دکتری ، دانشکده علوم دارویی ،دانشگاه ازاد اسلامی. ص ۸۵.

۲. حسین زاده صحافی، ه.، ۱۳۸۰. بیولوژی تولید مثل ماهی، انتشارات جهاد دانشگاهی. ص ۲۷۲.

3. Ahmadnezhad, M., Oryan, S., Hosseinzadeh Sahafi, H. and Khara, H., 2013.Effect of Synthetic Luteinizing Hormone – Releasing Hormone (LHRH-A2) 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 Scinces, 13: 95-100.

4. Bagheri Ziaria, S., Najia T., Hosseinzadeh Sahafi H., 2015. Comparison of the effects of *Origanum vulgare* with LHRH-A2and 17β-estradiol on the ultrastructure of gonadotroph cells and ovarian oogenesis in immature *Trichogaster trichopterus*, Animal Reproduction Science, 161, 32–39.
5. Balali, S., Sudagar, M., Hoseini, S.A and korai, H., 2012. The Effect of 17β-Estradiol on Growth and Survival of Sword Tail (*Xiphophorus helleri*). World Journal of Fish and Marine Sciences, 4(4): 335-339.
6. Biswas, S. P., 1993. Manual of methods in fish biology, South Asian Publishers, New Delhi.P. 90
7. Cahill, D. J., 1994. Multiple follicular development associated with herbal medicine, Human Reproduction, vol. 9, No. 8, pp. 1469-1470.
8. Chuong, C.J., Coulam, C.B, Kao, P.C., Bergstralh, E.J, Go, V.L., 1985. Neuropeptide levels in premenstrual syndrome. Fertility and Sterility, 44(6):760–5.
9. Evauce, D., Caliborn, E., 1993. The physiology of fishes, Academic Press, New York.
10. Hajdú, Z.1, Hohmann, J., Forgo, P., Martinek, T., Dervarics, M., Zupkó, I., Falkay, G., Cossuta, D., Máthé, I., 2007. Diterpenoids and flavonoids from the fruits of *Vitex agnus-castus* and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. Phytotherapy Research, 21(4):391-4.
11. Hobbs, C., 2003. Vitex: The Women's Herb. Healthy Living Publications; Summertown.
12. Jarry, H., Leonhardt, S., Gorkow, C., Wuttke, W., 1994. In vitro prolactin but not LH and FSH release is inhibited by compounds in extracts of *Agnus castus*: direct evidence for a dopaminergic principle by the dopamine receptor assay. Experimental and clinical endocrinology, 102(6):448–54.
13. Jarry, H., Spengler, B., Porzel, A., Schmidt, J., Wuttke, W., Christoffel, V., 2003. Evidence for estrogen receptor beta-selective activity of *Vitex agnus-castus* and isolated flavones. Planta Med, 69(10):945-7.
14. Levavi-Sivan, B., Biran, J., and Fireman, E., 2006. Sex Steroids Are Involved in the Regulation of Gonadotropin-Releasing

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]

and its interaction with dopaminergic system on LH and testosterone in male mice. Pakistan Journal of Biological Sciences. 15, 10(14):2300-7.

24. Nozaki1, M., 2013. Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Endocrine System in the Hagfish, Front Endocrinol (Lausanne), 4: 200.
25. Patiño, R., and Carr, J. A., 2015, Introduction to Special Issue: Disruption of thyroid, sex steroid, and adrenal hormone systems and their crosstalk in aquatic wildlife , General and Comparative Endocrinology, 08-01, 219, 1-5.
26. Schellenberg, R. Zimmermann, C., Drewe, J., Hoexter, G., Zahner, C., 2012. Dose-dependent efficacy of the *Vitex agnus castus* extract Ze 440 in patients suffering from premenstrual syndrome. Phytomedicine, 15,19(14):1325-31.
27. Sliutz, G., 1993. Agnus Castus Extracts Inhibit Prolactin Secretion of Rat Pituitary Cells. Hormone and Metabolic Research, 25. 253-255.
28. Vacher, C. Ferrière, F., Marmignon, M.H., Pellegrini, E., Saligaut, C., 2002. Dopamine D2 receptors and secretion of FSH and LH: role of sexual steroids on the pituitary of the female rainbow trout, General and Comparative Endocrinology, 127(2):198-206.
29. Webster, D.E, Lu, J., Chen, S.N., Farnsworth, N.R., Wang, Z.J., 2006. Activation of the mu-opiate receptor by *Vitex agnus-castus* methanol extracts: implication for its use in PMS. Journal of Ethnopharmacology, 106(2):216–21.
30. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2009. WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 4, World Health Organization, Spain
31. Wuttke, W., Jarry, H., Christoffel, V., Spengler, B., Seidlova-Wuttke, D., 2003. Chaste tree (*Vitex agnus-castus*)--pharmacology and clinical indications. Phytomedicine, 10(4):348–57.

Hormone and Dopamine D2 Receptors in Female Tilapia Pituitary, Biology of Reproduction 75, 642–650.

15. Lillie et al., 1967. Effect of linoleic acid deficiency on the fertilizing capacity and semen fatty acid profile of the male chicken. Journal of Nutritions, 95: 311-315.
16. Liu, J., Burdette, J.E., Sun, Y., Deng, S., Schlecht, S.M., Zheng, W., Nikolic, D., Mahady, G., van Breemen, R.B,, Fong, H.H., Pezzuto, J.M., Bolton, J.L., Farnsworth, N.R., 2004. Isolation of Linoleic Acid as an Estrogenic Compound from the Fruits of *Vitex Agnus-Castus*L. (chaste-berry)., Phytomedicine ,11:18-23.
17. Meccariello, R., Fasano, S., Pierantoni, R., and Cobellis, G., 2014. Modulators of Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axis for the Control of Spermatogenesis and Sperm Quality in Vertebrates, Front Endocrinol (Lausanne), 5: 135.
18. Meier, B., Berger, D., Hoberg, E., Sticher, O., Schaffner, W., 2000. Pharmacological activities of *Vitex agnus-castus* extracts in vitro. Phytomedicine. 7(5):373–81.
19. Melamed, P., Gonga, Z., Fletcherb, G., Hewa, C. L., 2002. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture, Aquaculture, 204, 3(4), 255–269.
20. Mesaik, M.A., Azizuddin, M. S., Khan K.M., Tareen, R.B., Ahmed, A., Atta-ur, R., Choudhary, M.I., 2009. Isolation and immunomodulatory properties of a flavonoid, casticin from *Vitex agnus-castus*. Phytotherapy Research, (11):1516-20.
21. Maleic, A., Gejdel, E., Sworen, H., Sienkiewicz, K., Jedrzejak, J., Teucher, T., 1993. *Vitex agnus castus* extract in the treatment of luteal phase defects due to latent hyperprolactinemia. Results of a randomized placebo-controlled double-blind study Arzneimittelforschung. 43:752–6.
22. Nagahama, Y.1, Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish, Dev Growth Differ, 50, Suppl 1: S, 195-219.
23. Nasri, S., Oryan, S., Rohani, A.H, Amin, G.R., 2007. The effects of *Vitex agnus* castus extract

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.4.2]