

## بررسی اثرات زولپیدم بر اووژنز و میزان FSH و LH 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 پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۸

### چکیده

**هدف:** این مطالعه با هدف بررسی اثرات زولپیدم بر اووژنز و 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  $26 \pm 30$  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 به صورت تزریق درون صفاقی به میزان ۵، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش به مدت ۱۴ روز دریافت نمودند گروه سم  $0.05$  میلی‌لیتر آب مقطر و کنترل هیچ ماده‌ای دریافت نکرد در پایان روز چهاردهم اندازه‌گیری میزان سرم هورمون‌های FSH و LH توسط روش الیزا انجام شد و همچنین تخمدان از بدن حیوانات خارج شد و مقاطع بافتی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین انوزین تهیه شد و تحت مطالعات میکروسکوپی و هیستولوژیکی قرار گرفت و نتایج از طریق آزمون‌های (One-way ANOVA) و تست (Tukey) با معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) تجزیه و تحلیل آماری شد.

**نتایج:** تزریق داروی زولپیدم به طور معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) باعث کاهش سرمی هورمون‌های FSH و LH در گروه‌های تجربی نسبت به سم و کنترل شد، در بررسی‌های بافتی ( $p < 0.05$ ) افزایش فولیکول‌های بدوی، کاهش فولیکول ثانویه، گراف، جسم زرد نسبت به گروه سم و کنترل مشاهده شد همچنین کاهش معنی‌داری در قطر فولیکول‌های ثانویه، گراف، جسم زرد و افزایش معنی‌داری در قطر فولیکول‌های بدوی، فولیکول‌های آترتیک در گروه‌های تجربی نسبت به سم و کنترل شد.

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

**واژگان کلیدی:** زولپیدم، اووژنز، LH و FSH

## مقدمه

اختلال‌هایی نظیر اضطراب، افسردگی و تنش‌های ذهنی و عاطفی، مشکل در روابط زناشویی و سوء مصرف الکل و یا کافئین 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). معمولاً 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 بنزودیازپینی، نیمه عمر ۲ تا ۳ 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 فلومازینیل متوقف می‌شود (۶، ۷) و بر خلاف بنزودیازپین‌ها اثرات شل‌کنندگی 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 (۹، ۱۰). 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 ديازپام 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 می‌شود (۱۴، ۱۵). اووژنز فرآیندی است که طی آن سلول‌های اووگونی به اووسیت‌های بالغ تمایز می‌یابند. 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 غده 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 باعث 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 می‌شود (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 اخیراً 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

که در موش بر اساس وزن آن‌ها محاسبه شد و تزریق شد (۲۸) هنگام کار با موش‌ها موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

**مواد دارویی:** زولپیدم به صورت 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 به صورت درون صفاقی بود، برای گروه کنترل هیچ تزریقی صورت نگرفت. برای گروه سم، آب مقطر و برای گروه‌های تجربی غلظت مورد نظر از زولپیدم، به مدت ۱۴ روز متوالی تزریق انجام شد (۲۹).

**سنجش میزان سرم‌ها:** همه‌ی گروه‌های مورد بررسی موش‌ها یک روز بعد از گذشت آخرین تزریق، توسط اثر بیهوش شدند خون‌گیری به‌طور مستقیم از بطن چپ صورت گرفت نمونه‌های خونی به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در آزمایشگاه ثابت نگه‌داری شدند و بعد به مدت 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 assay) و با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال می‌باشد به این منظور از پلت‌های ۹۶ خانه‌ای که به ترتیب 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-ESH, که متصل به آنزیم نشان‌دار هستند. 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 الیزا ریدر قرائت شد.

صورت نگرفته است لذا مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثرات داروی زولپیدم بر اووژنز و هورمون‌های HL 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  $23 \pm 2$  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 میلی لیتر غلظت ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن موش از زولپیدم، چهار: گروه تجربی ۲ با تزریق ۰/۵ میلی لیتر غلظت ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن موش از زولپیدم، پنج: گروه تجربی ۳ با تزریق ۰/۵ میلی لیتر غلظت ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن موش از زولپیدم، دوز مورد استفاده از این دارو در انسان ۵ و ۱۰ میلی‌گرم می‌باشد

بررسی‌های میکروسکوپی بیانگر افزایش معنی‌داری در تعداد فولیکول‌های بدوی و اتریک در گروه‌های 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 ۱، 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 فولیکول‌های 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 ۱، ۲، ۳ نسبت به گروه کنترل و شاهد می‌باشد که این کاهش در گروه تجربی ۱ در سطح  $p < 0.05$  و گروه تجربی ۲،  $p < 0.05$  و گروه تجربی ۳،  $p < 0.01$  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 ۱، ۲، ۳ نسبت به گروه کنترل و شاهد می‌باشد که این کاهش در گروه تجربی ۲ در سطح  $p < 0.05$  و گروه تجربی ۳،  $p < 0.01$  می‌باشد (mlu/mL).

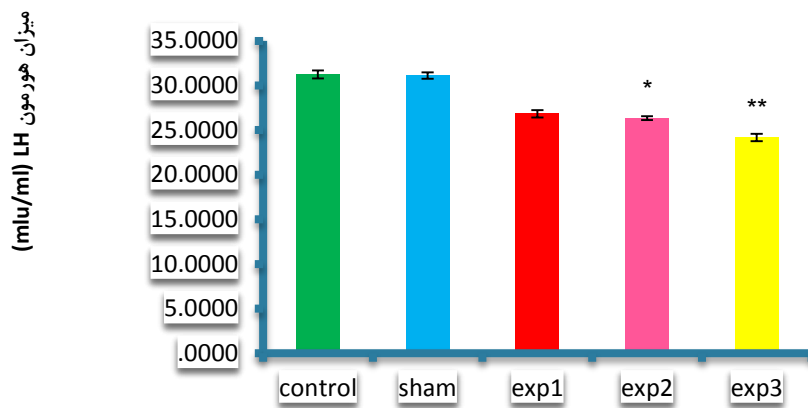
**آنالیز بافت شناسی بافت تخمدان:** پس از خون‌گیری از قلب، تخمدان‌ها جهت بررسی‌های هیستولوژیکی خارج شد سپس به ظرف حاوی بوئن منتقل شدند، پس از گذشت ۴ ساعت، تخمدان‌ها داخل الکل (الکل ۷۰ درصد) گذاشته شدند. پس از مراحل آب‌گیری و قالب‌گیری از هر گروه ۱۲ لام با برش‌های سریالی ۵ تا ۷ میکرومتری با میکروتوم تهیه و به وسیله‌ی 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 در حال 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 Spss20 در  $p < 0.05$ ،  $p < 0.001$ ،  $p < 0.1$  با در نظر 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.

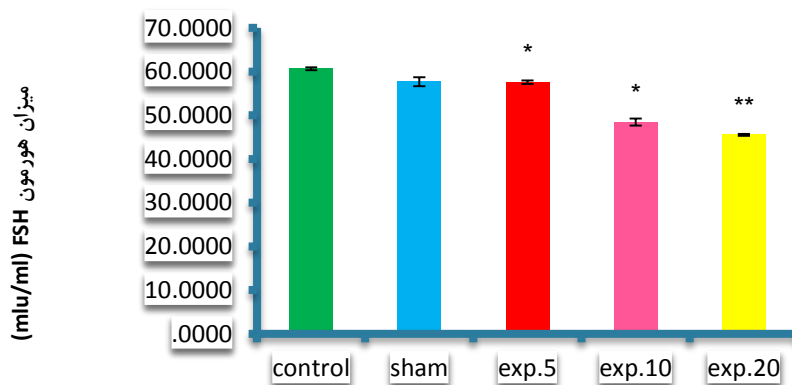
#### نتایج

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.



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 ۲، ۳ نسبت به گروه کنترل و شاهد (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). ( $\bar{x} \pm SE$ )



میانگین میزان هورمون FSH

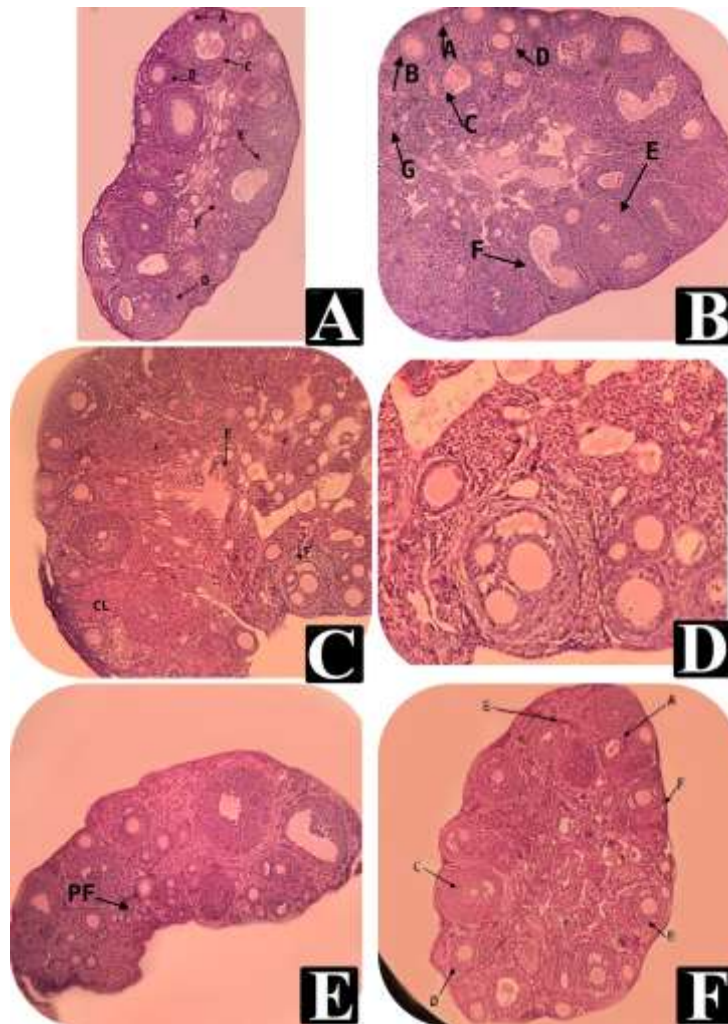
نمودار ۲: نتایج تحلیل مقایسه‌ی میزان هورمون FSH در گروه‌های کنترل، سم، تجربی ۱، ۲، ۳ کاهش معنی‌داری میزان FSH سرم خون در گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ نسبت به گروه کنترل و شاهد (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). ( $\bar{x} \pm SE$ )

جدول ۱: نتایج تحلیل آماری تاثیر زولیبیدم بر روی قسمت‌های مختلف قطر بافت تخمدان، تعداد فولیکول در گروه‌های کنترل، سم، تجربی ۱، تجربی ۲ و تجربی ۳ (x̄ ± 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
تعداد فولیکول در حال رشد	2/33 ± 0/42	3 ± 0/36	2/83 ± 0/40	**4 ± 0/25	**4 ± 0/25
تعداد فولیکول گراف	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 و ۳ و اوسیت 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
قطر فولیکول ثانویه (μm)	19/16 ± 0/83	18/50 ± 0/34	14/50 ± 0/84	13/50 ± 0/22	12 ± 0/81
قطر فولیکول گراف (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

لایه تک و به هم ریختگی استرومای تخمدان نسبت به گروه کنترل و شاهد (شکل ۱، C و D) افزایش فولیکول بدوی (شکل ۱، E) افزایش فولیکول در حال رشد و کاهش قطر فولیکول در حال رشد، کاهش جسم زرد، و بی نظمی سلول‌های جسم زرد در گروه تجربی نسبت به کنترل (شکل ۱، F) مشاهده شد.

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 (شکل ۱، A) افزایش فولیکول آترتیک همچنین وجود فولیکول غیرطبیعی (وجود دو اووسیت در یک فولیکول) (شکل ۱، B)، کاهش قطر فولیکول گراف وجود فولیکول غیرطبیعی (سه اووسیت در یک فولیکول)، به هم ریختگی



شکل ۱: بافت تخمدان گروه تجربی دوم با تزریق ۱۰ میلی‌گرم زولپیدم بر کیلوگرم وزن موش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین 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 میلی‌گرم زولپیدم بر کیلوگرم وزن موش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین 400X به کاهش جسم زرد و افزایش فولیکول آترتیک و تحلیل اووسیت فولیکول گراف توجه شود. A: فولیکول بدوی، B: 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 میلی‌گرم زولپیدم بر کیلوگرم وزن موش، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین 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 از بافت تخمدان گروه تجربی دوم افزایش تعداد فولیکول‌های بدوی (PF) رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین 400X. 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-اُوزین 400X.

این بررسی نشان داد که در گروه‌های تجربی بیشتر سلول‌های 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 و بدوی به هم‌ریختگی در لایه سلول‌های گرانولوزا جداشدگی لایه‌ی تاج شعاعی از اوسیت، تحلیل اوسیت فولیکول گراف کاهش قطر فولیکول گراف، افزایش رگ خونی وجود دو و سه اوسیت در یک فولیکول و به هم‌ریختگی 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 دارو 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 به این که 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 گروه‌های تجربی؛ نسبت به گروه‌های کنترل و سم کاهش پیدا کرده و کمتر از حد معنی‌دار می‌باشد. بنابراین می‌توان این‌گونه پیش‌بینی کرد که در صورت افزایش دوز مصرفی به میزان بیشتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، کاهش در وزن و اندازه‌ی تخمدان‌ها دیده می‌شود. Paik و 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، Chakrabarty و همکاران (۳۱) در بررسی اثرات زوپیکلون بر روی دستگاه تناسلی موش ماده رت، در موش‌هایی که تحت تیمار با داروی زوپیکلون به مدت ۲۸ روز به صورت خوراکی قرار گرفتند. نشان دادند که سلول‌ها روند تخریبی داشته و فولیکول‌ها در حالت آتروفی هستند، در مطالعه‌ی حاضر تعداد فولیکول‌های آرتیک 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 مطالعه‌ی 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. احتمالاً زولپیدم از طریق مهار ترشح دوپامین به‌عنوان عامل مهار کننده ترشح پرولاکتین باعث افزایش ترشح پرولاکتین و در نتیجه کاهش ترشح TRH و به دنبال آن کاهش سطح سرمی هورمون‌های TSH, T<sub>4</sub> می‌شود (۱۹) مطالعاتی که بر روی داروهای ضدافسردگی (زولپیدم) با اثرات مرکزی و تاثیر بر روی محور هورمونی هیپوتالاموس-هیپوفیز-



تیروئید باعث کاهش سطح سرمی هورمون‌های این محور هورمونی و به‌ویژه T4 همراه است (۳۴). در تحقیق حاضر از آنجایی که 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 کننده دارو مشخص کننده این واقعیت است که تعداد اندکی فولیکول‌ها توانسته‌اند به مرحله بلوغ نهایی رسیده تا بتوانند تبدیل به جسم زرد شوند. به عبارتی کاهش میزان LH که نسبت گروه کنترل به شدت 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 به دلیل 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 و ۲۰ 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 و ۲۰ از نظر آماری، معنی‌دار بوده است. در این دوزها، فولیکول‌ها در مراحل ابتدایی رشدشان باقی مانده‌اند و از تکوین آن‌ها نیز ممانعت به عمل آمده است جلوگیری از تکوین سلولی در مطالعات پیشین در دیگر بافت‌ها گزارش شده است (۳۵). تعداد فولیکول‌های آترتیک در گروه‌های تجربی، افزایش وابسته به دوز و از نظر آماری بسیار معنی‌دار را داشته است. افزایش مرگ سلولی در سلول‌های فولیکولی احاطه کننده 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 گاباژرژیک اعمال می‌کند و سیستم

گابا آرژیک برای تکوین متناسب و تخصیص‌یابی سلول‌ها اهمیت دارند (۳۷) بنابراین احتمالاً اثر آگونستی 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 به دست آمده حاکی از افزایش طول فولیکول اولیه به صورت وابسته به دوز است که در دوزهای ۲۰ این میزان از نظر آماری معنی‌دار بوده است. این فولیکول‌ها تنها بزرگ شده‌اند لایه سلول‌های فولیکولی آن‌ها هیچ تغییری نکرده و چند لایه نشده است و به نظر 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 در حال رشد به صورت وابسته به دوز است که در دوز ۱۰ و ۲۰ این میزان از نظر آماری معنی‌دار بوده است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول جسم زرد، حاکی از کاهش قطر جسم زرد به صورت وابسته به دوز است که در دوز ۵، ۱۰ و 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 بر اندازه‌ی 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 به هم‌ریختگی سلول‌های آن و تحلیل اووسیت فولیکول کاهش میزان هورمون HSF را تایید می‌کند. و میزان هورمون HL در گروه‌های تجربی ۱۰ و ۲۰

- 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 as hypnotic. *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-metabolizing cytochromes P450 in primary cultures of human hepatocytes. *Toxicol.* 2009; 191(1): 74-78.
5. Du B, Shan A, Zhang Y, Zhong X, 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, Botzolakis J. Chapter 14-GABA A receptor channels. In: Alvarez-leefmans FJ, Delpire E, 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. GABA A 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 hypnotics: 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.

معنی دار 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 به دوز بر اوژنز بوده و در دوزهای بالا، همچنین موجب کاهش سرعت اوژنز، افزایش فولیکول‌های آرتیک، 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 به دوز مصرفی می‌باشد. در نتیجه 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 اوژنز و هورمون‌های جنسی بوده که می‌تواند موجب کاهش باروری شود. با این حال 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)

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 Psychiatr 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. *Langman embriologiamedica* 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 Pharmacol*. 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, Kripke DF, Loving RT. Meta-analyses of hypnotics and infections: eszopiclone, rameltcon, zaleplone, and zolpidem. *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. Increased 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 aeting disorder. *J Clin. 5 Sleep, 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

- of methylphenidate on the reproductive axis of adolescent female rats. *FertilSteril* 2005; 84: 1131-1138.
32. Clark AS, Kelton 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. first indian ed. delhi: published by s.k.jain for cbs publishers and distributors. 2000; 229-268.
37. Saler Tw. *Langman embryologia medica* 011.ed. Rio de janerio: Guanabara Koogan . 2010. 230 p.

## 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  $30 \pm 26$  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 done intraperitoneally 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 increase 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