

"مقاله پژوهشی"

اثر آلپرازولام بر تخمدان ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*) پس از تزریق برومو کریپتین

یاسمن شبانی^۱، طاهره ناجی^{۱*}، همایون حسین زاده صفایی^۲

۱- گروه علوم پایه، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۹/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱

چکیده

این پژوهش، با هدف بررسی تاثیر آلپرازولام بر استروئیدهای جنسی، تکوین بافت تخمدان و فراساختار اووسیت ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*)، پس از القای برومو کریپتین، انجام شد. تعداد ۹۰ قطعه ماهی گورامی سه خال ماده بالغ تهیه و به شش گروه ۱۵ تایی شامل گروه شاهد دست نخورده، شاهد حلال، شاهد برومو کریپتین و سه گروه تیماری دریافت کننده برومو کریپتین با دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم و آلپرازولام با سه دوز ۱، ۲ و ۴ میلی گرم بر کیلوگرم، تقسیم شد. داروها بصورت عضلانی تزریق شد به این ترتیب که گروه های شاهد و تیماری در یک روز برومو کریپتین دریافت کردند و در روز بعد، گروه های تیماری، دوزهای مختلف آلپرازولام را گرفتند. پس از اتمام تزریقات، ماهی ها بدون درد و رنج، کشته و تشریح شدند. تخمدان ماهیان به منظور بررسی با میکروسکوپ نوری و الکترونی جدا شد. از مایع بافتی جهت اندازه گیری هورمون های استروئیدی به وسیله کیت الایزا، استفاده شد. در گروه شاهد برومو کریپتین، هورمون های استروئیدی، افت شدیدی داشتند و اووسیت ها در مرحله پیش هستکی بودند. در گروه تیماری با برومو کریپتین و آلپرازولام با دوز ۴ میلی گرم بر کیلوگرم، سطح ۱۷-بتا-استرادیول و تستوسترون، بالاتر از تمامی گروه های کنترل و تیماری بود ($p < 0/01$) و اووسیت ها در فاز ویلولوژنی قرار داشتند. می توان نتیجه گرفت که برومو کریپتین سبب انسداد محور HPG و آلپرازولام موجب تحریک مجدد این محور، رسیدگی اووسیت و ترشح استروئیدهای جنسی تخمدان شد.

کلمات کلیدی: آلپرازولام، ماهی گورامی سه خال، تخمدان، برومو کریپتین

مقدمه

گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*)

یک ماهی استخوانی، از خانواده اسفرونمیده و بومی شرق آسیا است (Degani, 2020). در ماهیان همانند سایر مهره داران، فعالیت تولید مثلی، تحت کنترل محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد (HPG) است (Fontaine et al., 2013). در پاسخ به ترشح GnRH از هیپوتالاموس، گنادوتروپین ها از هیپوفیز ترشح می شود. گنادوتروپین ها هم با اثر بر تخمدان، باعث آزادسازی هورمونهای استروئیدی جنسی می شوند (Bordini and Rosenfield, 2011). اووسیت در ماهی ها پیش از رسیدن به بلوغ مراحل را طی می کند. در مرحله هسته کروماتینی، هسته ای بزرگ در مرکز سلول دیده می شود که حاوی دو تا سه هستک کوچک است و سیتوپلاسم با تک لایه سلول احاطه می شود. در مرحله پیش هستکی، پروتوپلاسم سلول و تعداد هستک ها افزایش می یابد، غشای هسته، حاشیه های نامنظم دارد و واکوئل ها به دور هسته ظاهر می شوند. در مرحله کورتیکال آلوتولار، تخمک با دو لایه تکا و گرانولوزا پوشیده شده است، سیستم حفرات کورتیکال تشکیل می شود و زونارادیاتا پدیدار می گردد. در مرحله ویتلوزنی، زرده (ویتلوزن) که یک گلیکولیپوفسفوپروتئین حاوی کلسیم است در کبد و در پاسخ به افزایش ترشح هورمون ۱۷بتا-استرادیول سنتز می شود و از طریق جریان خون به تخمدان ماهی منتقل شده با اووسیت ترکیب می شود (Jackson west, 1990; et al., 1994). نهایتاً در مرحله بلوغ نهایی و تخم ریزی، اووسیت در محیط آب رها می شود (Tyler and Sumpter, 1996).

دوپامین یک نوروترنسمیتر کاتکول آمینی در مغز است (Vallone et al., 2000) و با اثر بر سطوح بالایی (هیپوتالاموس و هیپوفیز) محور HPG، تولید مثل را مهار می کند (حسینی جبلی، ۱۴۰۰). بروموکریپتین، آلکالوئید نیمه صناعی ارگوت و آگونیست انتخابی رسپتور دوپامینی D₂ است که در این پژوهش با هدف انسداد محور HPG به ماهیان تزریق شد (Moustafa et al., 1999).

گاما آمینوبوتیریک اسید با نام اختصاری گابا، عمده ترین نوروترنسمیتر مهاری در سیستم عصبی مهره داران است GABA_A، نام گیرنده گابا است و چند جایگاه آلوستریکی بر روی آن وجود دارد که یکی از آنها، محل اتصال بنزودیازپین ها می باشد (Gavish et al., 1999; Roy-Byrne, 2005). بنزودیازپین ها پس از اتصال به جایگاه مخصوص خود بر روی گیرنده GABA_A، به صورت آگونیست گابا عمل کرده، اثر مهاری گابا را تقویت می کنند و سبب هایپرپلاریزاسیون غشای نورون می شوند (Verster and Volkerts, 2004). بنزودیازپین ها در بالین، به منظور خواب آوری، آرام بخشی و کنترل تشنج مورد تجویز قرار می گیرد (Madhusoodanan and Bogunovic, 2004). آلپرازولام نیز یک بنزودیازپین است. امروزه به دلیل مصرف شایع، گسترده و روزافزون داروهای اعصاب و روان از جمله بنزودیازپین ها در سطح ایران و جهان، بروز عوارض جانبی در مصرف کنندگان، امری اجتناب ناپذیر است (انصاری، ۱۳۸۶). عوارض جانبی، پاسخ های ثانویه بیولوژیک هستند که با مصرف دارو،

در بدن ایجاد می‌شوند. این عوارض معمولاً مضر و گاهی هم مفید واقع می‌شوند (Rieder, 1994). این پژوهش، با محوریت بررسی تغییر سطوح هورمون‌های استروئیدی مترشح از تخمدان، تکامل اووسیت و فراساختار آن، طی تزریق بروموکریپتین و آلپرازولام صورت پذیرفت. علت استفاده از گورامی سه خال به عنوان مدل در مطالعات اندوکرائینی، شباهت زیاد محور HPG آن با انسان، کوتاه‌تر بودن دوره رسیدن به مراحل انتهایی بلوغ نسبت به سایر حیوانات مدل مرسوم، نظیر موش و همچنین مقرون به صرفه بودن آن است (باقری زیاری، ۱۳۹۴).

مواد و روش‌ها

این پژوهش پس از دریافت کد اخلاق IR.IAU.PS.REC.1400.271 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، در ماه‌های دی و بهمن ۱۴۰۰، در آزمایشگاه آبریان دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، انجام شد. ۴۸ ساعت قبل از ورود ماهی‌ها، فضای آزمایشگاه با آبگیری آکوارיום‌ها، اتصال پمپ‌های هوا و کلرزدایی آب، آماده شد. تعداد ۱۳۰ ماهی گورامی سه خال بالغ ماده، از یک کارگاه پرورش ماهی در همدان، تهیه شد و ۴۸ ساعت با محیط آزمایشگاه سازگار شدند. سپس، طول کل بدن و وزن ماهی‌ها اندازه‌گیری شد و به طور تصادفی ۹۰ ماهی با میانگین وزنی کلی 4.43 ± 0.03 گرم در گروه‌های ۱۵ عددی به آکواریوم‌ها وارد شد. ماهیان در هر گروه به لحاظ میانگین طول و وزن، یکسان توزیع شد. پس از انتخاب دوزهای تزریقی بر حسب میلی گرم بر کیلوگرم، محاسبات براساس میانگین

وزنی ماهی‌ها در هر گروه انجام شد و وزن مورد نیاز از پودر مواد موثره دارویی بدست آمد. مقدار محاسبه شده توزین و در اتانول ۷۰ درجه حل شد. یک گرم پودر میخک در یک لیتر آب مقطر پراکنده شد و عصاره میخک بدست آمد. جهت تزریق دارو با کمترین درد و زجر، هر ماهی بطور متوسط به مدت ۵۰ ثانیه در عصاره میخک قرار گرفت تا بطور نسبی تعادل و هوشیاری خود را از دست داد (Ribas et al., 2007). تزریق به ماهی‌ها بصورت عضلانی با سرنگ انسولین BD و در هر نوبت به اندازه دو خط کوچک سرنگ، معادل ۰/۰۲ میلی لیتر، انجام شد. گروه کنترل دست نخورده (شاهد) هیچ تزریقی نگرفت. گروه کنترل حلال در هر نوبت تزریق، اتانول ۷۰ درجه دریافت کرد. گروه کنترل بروموکریپتین، در یک روز بروموکریپتین با دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم و در روز بعد اتانول ۷۰ درجه دریافت کرد. سه گروه تیماری، در یک روز، بروموکریپتین با دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم و در روز بعد، آلپرازولام با دوزهای ۱، ۲ و ۴ میلی گرم بر کیلوگرم، دریافت کردند (Pieróg et al., 2018؛ رشیدپور، ۱۳۹۹؛ تک‌زارع، ۱۳۸۹) کلیه تزریق‌ها دو روز در میان صورت گرفت، به این ترتیب که ماهی‌ها دو روز پشت سر هم دارو گرفتند و یک روز به آنها استراحت داده شد. پس از اتمام تزریق‌ها در نوبت بیستم، تا ۲۴ ساعت بعد، ماهی‌ها بدون هیچ تزریق یا مداخله‌ای، زنده نگهداشته شدند و پس از آن، تشریح ماهی‌ها آغاز شد. تخمدان ماهیان پس از تشریح، در فرمالین ۱۰٪ فیکس گردید. سپس از هر گروه، طی مراحل پاساژ، قالب‌گیری، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی بافتی، لام تهیه شد و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت (Tyler and Sumpter, 1996). به دلیل

کوچک بودن اندازه ماهیان، امکان خونگیری فراهم نبود. پس از تخلیه امعا و احشای ماهی‌ها در مرحله تشریح، بدن آنها داخل دستگاه آسیاب برقی هموژن شد و به لوله‌های آزمایش منتقل شد. لوله‌ها سانتریفیوژ شد و مایع بافتی جدا گشت و مقادیر هورمون‌های استروئیدی به وسیله کیت‌های الایزای شرکت مونوبایند، سنجش شد. جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی، بافت تخمدان در گلو تارآلدئید ۲/۵٪ و تترااکسید اسمیم ۱/۵٪ و بافر فسفات، فیکس شد. سپس نمونه‌ها در سری الککل صعودی (۷۰، ۵۰، ۹۵٪)، استون و مخلوط استون-رزین (۵۰/۵۰٪) آبیگری شد، در رزین پلیمریزه شد و بعد برش‌گیری انجام شد. برش‌ها روی شبکه مسی (گرید) مش ۳۰۰ قرار گرفت و رنگ آمیزی شد. در آخر، گریدها با میکروسکوپ الکترونی عبوری (Nederland, Philips, EM208) در ولتاژ شتاب دهنده ۱۰۰ کیلو ولت مورد بررسی قرار گرفت (Reynolds, 1963).

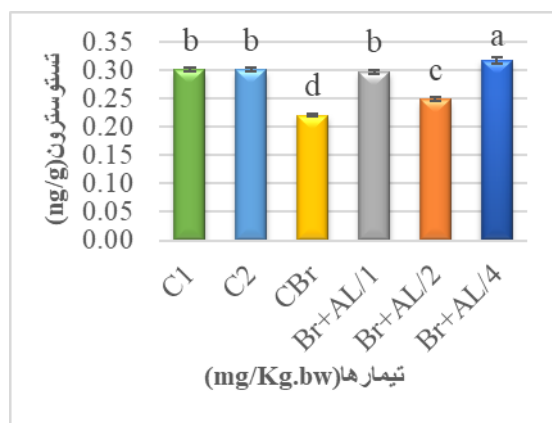
جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از سه بار تکرار در گروه‌های شاهد و تحت تیمار و بررسی میزان معنی‌دار بودن اختلافات مشاهده شده، از ورژن ۲۶ نرم‌افزار SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه (one way Anova) استفاده شد. به منظور مقایسه میانگین‌ها، از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel ورژن ۲۰۱۹ استفاده شد.

نتایج

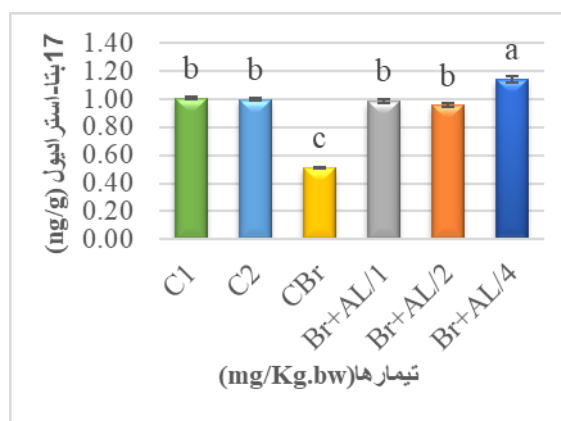
هورمون‌های استروئیدی

نتایج نشان داد که میان گروه شاهد دست‌نخورده و شاهد حلال، از نظر میزان ۱۷بتا-استرادیول (E_2) و تستوسترون، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت

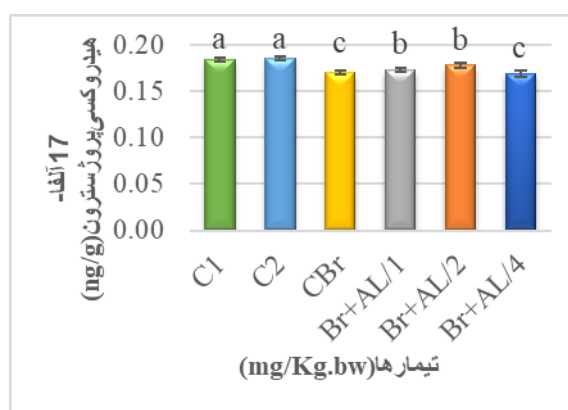
($p > 0.05$). در گروه شاهد بروموکریپتین، میزان E_2 و تستوسترون، با اختلافی معنی‌دار ($p < 0.01$)، کمتر از گروه‌های شاهد دست‌نخورده، حلال و سه گروه تیمار شده با بروموکریپتین و دوزهای مختلف آلپرازولام بود. E_2 و تستوسترون در گروه‌های تیمار شده با بروموکریپتین و دوزهای مختلف آلپرازولام، به‌طور معنی‌دار ($p < 0.01$)، نسبت به گروه شاهد بروموکریپتین، افزایش یافت و میزان این دو هورمون، در گروه تیمار شده با بروموکریپتین و آلپرازولام با دوز ۴ میلی گرم بر کیلوگرم، به حداکثر مقدار خود رسید و از گروه شاهد نیز، به صورت معنی‌دار ($p < 0.01$)، بیشتر شد (شکل ۱، الف و ب). میان گروه شاهد دست‌نخورده و شاهد حلال، از نظر میزان هورمون ۱۷آلفا-هیدروکسی پروژسترون ($17P$) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$). $17P$ در گروه شاهد بروموکریپتین، با اختلافی معنی‌دار ($p < 0.01$)، کمتر از گروه‌های کنترل دست‌نخورده، حلال و گروه‌های تیمار شده با بروموکریپتین و آلپرازولام با دوزهای ۱ و ۲ میلی گرم بر کیلوگرم، بود. $17P$ در گروه‌های تیمار شده با بروموکریپتین و دوزهای ۱ و ۲ میلی گرم بر کیلوگرم از آلپرازولام، به‌طور معنی‌دار ($p < 0.01$)، نسبت به گروه شاهد بروموکریپتین، افزایش یافت. در گروه تیماری بروموکریپتین و آلپرازولام با دوز ۴ میلی گرم بر کیلوگرم، میزان $17P$ نسبت به گروه شاهد بروموکریپتین تغییر معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$) (شکل ۱، ج).



ب



الف



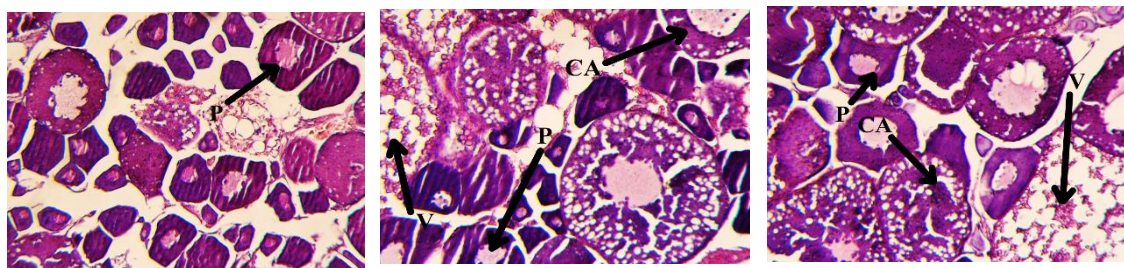
ج

شکل ۱- نمودار تغییرات سطوح هورمون‌های استروئیدی، الف) ۱۷β-استرادیول (E₂) ب) تستوسترون (ج) ۱۷α-هیدروکسی پروژسترون (۱۷P)، C1 نشان دهنده گروه کنترل دست‌نخورده (شاهد)، C2 نشان دهنده گروه کنترل حلال (اتانول ۷۰ درجه)، CBr نشان دهنده گروه کنترل بروموکریپتین و AL نشان دهنده داروی آلپرازولام است که با سه دوز ۱، ۲ و ۴ میلی گرم بر کیلوگرم، تزریق شده است. حروف مشابه در نمودارها به معنی عدم وجود اختلاف در سطح معنی داری ۰/۰۵ است.

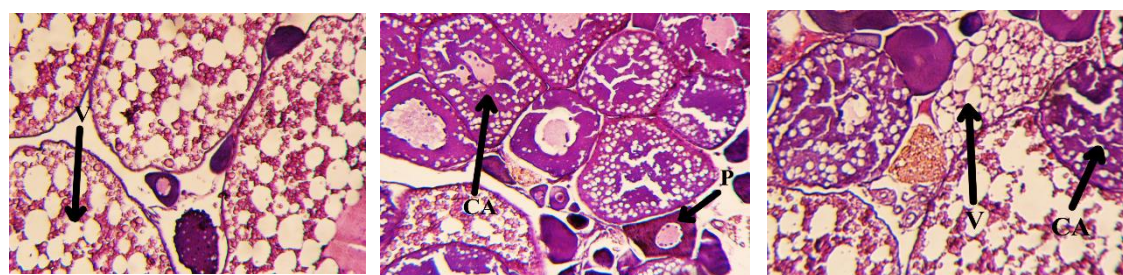
مشاهده بافت تخمدان با میکروسکوپ نوری

در مقاطع تخمدانی حاصل از گروه‌های کنترل دست‌نخورده و کنترل حلال (شکل ۲، الف و ب)، اغلب اووسیتها در مرحله کورتیکال آلوتولار و پیش‌هستکی و عده‌ای در فاز ویتلوژنی قرار داشتند. در گروه کنترل بروموکریپتین (شکل ۲، ج)، بیشتر

اووسیتها در مرحله پیش‌هستکی مانده بودند. در گروه تیماری بروموکریپتین و آلپرازولام با دوز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی (شکل ۲، ه)، اغلب اووسیتها در مرحله پیش‌هستکی و کورتیکال آلوتولار قرار داشتند. تظاهرات بافتی در گروه تیماری بروموکریپتین و آلپرازولام با دوز ۱ و ۴ میلی گرم بر کیلوگرم وزن



بدن ماهی (شکل ۲، د و ن)، حاکی از پیشرفت اکثر اووسیت‌ها به مرحله ویتلوژنی بود.



ج

ب

الف

ن

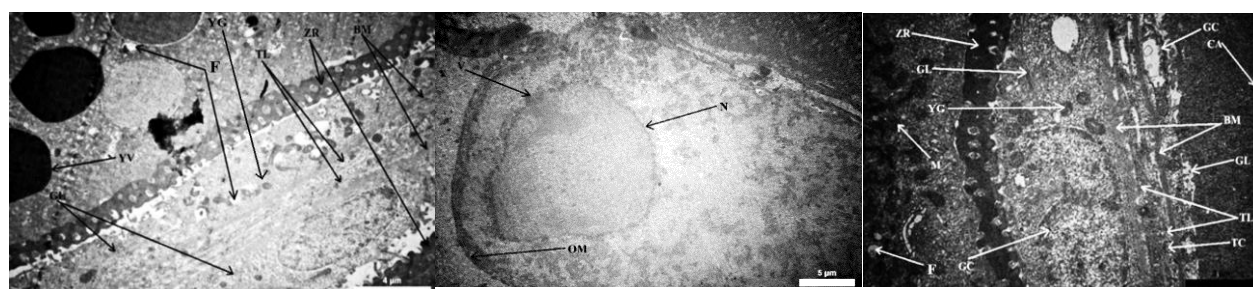
ه

د

شکل ۲- مقاطع بافت تخمدان، الف) گروه کنترل دست‌نخورده (شاهد)، ب) کنترل حلال، ج) کنترل بروموکریپتین، د) بروموکریپتین و آلپرازولام با دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی، ه) بروموکریپتین و آلپرازولام با دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی، ن) بروموکریپتین و آلپرازولام با دوز ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی، P: پیش‌هستکی، C: کورتیکال آلوتولار، V: ویتلوژنی، F: ذرات چربی، رنگ‌آمیزی H&E، بزرگنمایی ۱۰۰×

کروی و واضح بود، غشای آن، حاشیه‌های نامنظمی داشت و حدود یک سوم حجم سیتوپلاسم را اشغال کرد. درون هسته منطقه‌ای دانه‌دار و همگن وجود داشت و واکوئل‌هایی دور هسته مشاهده شد. در گروه تیماری بروموکریپتین و دوز بالای آلپرازولام (شکل ۳، ج)، تعداد زیادی وزیکول زرده در اووپلاسم تشکیل شده بود. قسمت کوچکی از فولیکول اووسیت مجاور نیز دیده شد که ضخامت زیادی داشت و نفوذ زرده به داخل آن، دیده شد.

تصویر میکروسکوپ الکترونی بدست آمده از گروه شاهد دست‌نخورده (شکل ۳، الف)، سطح مقطع دو اووسیت را در مجاورت هم نشان داد. در یکی از آن‌ها، فولیکول، به شکل دو لایه با ضخامت کم قرار گرفته بود و درون سیتوپلاسم، منطقه‌ای همگن دیده شد که حاوی تعداد اندکی حفرات کورتیکال بود. همچنین، قسمتی از یک اووسیت دیگر مشاهده شد که در آن، زونا رادیاتا تشکیل شده بود و گرانول‌های زرده در حال نفوذ به اووسیت بودند بعلاوه، تعداد زیادی میتوکندری به چشم خورد. در گروه شاهد بروموکریپتین (شکل ۳، ب)، هسته بزرگ، تقریباً



الف

ب

ج

شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از مقطع بافت تخمدان الف) گروه شاهد دست نخورده (شاهد) (SCALE BAR: 2µm) ب) گروه شاهد بروموکریپتین (SCALE BAR: 5µm) ج) تیمار بروموکریپتین و آلپرازولام با دوز ۴ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی (SCALE BAR: 4µm)، در این تصاویر، لایه نکا (TL) و سلول‌های تشکیل دهنده آن (TC)، لایه گرانولوزا (GL) و سلول‌های تشکیل دهنده آن (GC)، غشای پایه (BM)، زونارادیا (ZR)، میتوکندری (M)، گرانول زرده (YG)، حفره کورتیکال (CA) و وزیکول زرده (YV)، غشای اووسیت (OM)، هسته (N)، واکوئل‌های اطراف هسته (V) و ذرات چربی (F) مشخص شده‌اند.

هورمون‌ها است. در تایید این مطلب، تزریق اتانول ۹۶٪، تغییر معنی‌داری بر سطوح هورمون‌های استروئیدی E_2 ، تستوسترون و 17β در ماهی گورامی سه خال ایجاد نکرد (بطحایی، ۱۳۹۸). تزریق تک دوز بروموکریپتین، سبب افت شدید میزان هورمون‌های استروئیدی شد (شکل ۱، الف، ب و ج). در ماهی‌های استخوانی، نوروهای دوپامینژیک، اثر مهار بر محور HPG دارند و مستقیماً هیپوفیز و سلول‌های گنادوتروف را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Trudeau et al., 2000). دوپامین، با فعالسازی رسپتورهای D_2 در نوروهای دوپامینژیک هیپوتالاموس، سبب کاهش ترشح GnRH می‌شود (Bryant et al., 2016). در مطالعه‌ای مشابه، تزریق بروموکریپتین، سبب کاهش چشمگیر هورمون‌های 17β -استرادیول، تستوسترون و پروژسترون در ماهی گورامی سه خال شد (رشیدپور، ۱۳۹۹). با القای برون تن دوپامین به مغز ماهی

بحث

هورمون‌های استروئیدی به‌طور اساسی در فیزیولوژی تولید مثل ماهی‌ها نقش دارند (Tokarz et al., 2015). 17β -استرادیول (E_2) در ویتلوزن و اووژنز، نقش تعیین کننده دارد. تستوسترون در جنس ماده، در سلول‌های تکا بیوسنتز می‌شود و طی پدیده انتشار به سلول‌های گرانولوزا می‌رسد و به E_2 تبدیل می‌شود (Yaron and Levavi-Sivan, 2011). در ماهی‌ها، پروژسترون، به خودی خود، فعالیت بیولوژیکی ندارد اما یک واسطه کلیدی در بیوسنتز تستوسترون، 17β -استرادیول و سایر استروئیدهای جنسی است. پروژسترون توسط آنزیم $P-450_{17\alpha}$ تبدیل به 17β -آلفا-هیدروکسی پروژسترون (17β) می‌شود. تزریق حلال داروها (اتانول ۷۰٪) به ماهیان، سطح استروئیدهای تخمدانی را تغییر نداد (شکل ۱، الف، ب و ج) که احتمالاً به معنای عدم تاثیر اتانول بر سطح این

سیکلید و تحریک رسپتور D_2 ، سلول‌های ترشح کننده GnRH، در هیپوتالاموس مهار شد (Bryant *et al.*, 2016). با القای آگونیست‌های دوپامینی D_2 بر هیپوفیز ماهی قزل‌آلا، بروموکریپتین سبب کاهش GnRH شد (Vacher *et al.*, 2000). تزریق دوپامین و آپومورفین، سبب کاهش قابل توجه گنادوترپین در سرم گلدفیش شد (Chang *et al.*, 1984). با استناد به این پیشینه تحقیقاتی، پس از تزریق بروموکریپتین با دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم، احتمالاً سطح GnRH و سنتز گنادوتروپین‌ها در مغز ماهی گورامی سه‌خال کاهش یافت و به تبع آن، بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی، افت چشمگیری پیدا کرد. بنابراین می‌توان گفت که تک دوز بروموکریپتین، سطوح بالایی محور HPG را در ماهی گورامی سه‌خال، بلاک کرد. در گروه‌های تیماری، هورمون‌های E_2 و تستوسترون نسبت به گروه کنترل بروموکریپتین، افزایش یافت و هر دوی این هورمون‌ها، در گروه تیمار شده با بروموکریپتین و دوز بالای آلپرازولام، به حداکثر مقدار خود رسید و از گروه شاهد نیز بیشتر شد ($p < 0.01$). طی دوره زرده‌سازی و تکامل گنادی، همزمان با افزایش میزان استرادیول در طول مرحله ویتلوژنز، مقدار تستوسترون نیز افزایش یافته و به حداکثر میزان خود می‌رسد (سلطانزاده، ۱۳۹۲). از آنجا که مقاطع تخمدان (شکل ۲، د و ن) در گروه‌های تیماری، پیشرفت اووسیت‌ها به فاز ویتلوژنی را نشان می‌دهد، بنابراین افزایش همزمان E_2 و تستوسترون، قابل انتظار بود. در گروه‌های تیمار شده با بروموکریپتین و دوز کم و متوسط آلپرازولام، هورمون 17β تنها نسبت به گروه کنترل بروموکریپتین، افزایش یافت اما مقدار آن، همچنان کمتر از گروه شاهد و حلال بود ($p < 0.01$). 17β ، در

فاز رسیدگی اووسیت و تخمک‌گذاری که تنها در حضور ماهی نر، رخ می‌دهد، افزایش می‌یابد اما در فاز ویتلوژنی و قبل از آن، افزایش چشمگیری ندارد (Dequattro *et al.*, 2012; Degani, 2020). لذا افزایش اندک اندک هورمون 17β و سپس عدم تغییر آن، روندی طبیعی است. بنظر می‌رسد پس از مهار سطوح مغزی محور HPG توسط بروموکریپتین، آلپرازولام بصورت غیر وابسته به دوز، طی مکانیسمی تحریکی، ساخته شدن هورمون‌های استروئیدی در تخمدان را مجدداً راه‌اندازی کرده است. این شواهد، احتمال حضور گیرنده‌ای را برای آلپرازولام با اثر تحریک استروئیدوژنز، در تخمدان ماهی گورامی سه‌خال، تقویت می‌کند. در تایید این فرضیه، برخی پژوهش‌ها، از حضور گیرنده‌ای برای بنزودیازپین‌ها موسوم به گیرنده محیطی بنزودیازپین (PBR) در بافت‌های غیر عصبی شامل بیضه و تخمدان، گزارش داده‌اند. مطالعات درون‌سلولی نشان داده‌اند که رسپتورهای محیطی بنزودیازپین، در غشای خارجی میتوکندری‌های موجود در سلول‌های استروئیدساز، حضور دارند. نقش این رسپتور در گنادها، دخالت در بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی است (Gladkevich *et al.*, 2006; Gavish, 1995). از سویی دیگر، روش RT-PCR، نشان داده است که ژنهای سازنده زیرواحدهای رسپتور $GABA_A$ ، در بافتهای محیطی رت، شامل غدد فوق کلیه، جفت، رحم، تخمدان و بیضه، بیان می‌شوند (Gladkevich *et al.*, 2006). زیرواحدهای سازنده رسپتورهای $GABA_A$ نیز، در تخمدان ماهی باس دهان‌بزرگ شناسایی شده است که با بلوغ اووسیت، میزان این زیرواحدها بیشتر می‌شود. همچنین گابا در بافت‌های غیر عصبی شامل غدد فوق

(Van Wemmel *et al.*, 2005). همچنین القای برون تن دیازپام بر سلول‌های گرانولوزای تخمدان رت، سبب افزایش چشمگیر پروژسترون شد (Amsterdam and Suh, 1991). بنظر می‌رسد که نتایج باتوجه به نوع دارو و حیوان مدل، متفاوت باشد اما آنچه در داده‌های این پژوهش و سایر مطالعات مشابه به چشم می‌خورد، حاکی از احتمال تاثیر ترکیبات گابارژیک بر سطوح هورمون‌های جنسی می‌باشد. گابا و رسپتورهای آن، نقش مهمی در تنظیم محور HPG و تولید مثل دارد. شبکه گسترده‌ای از فیبرهای نورونی گابارژیک، در هیپوتالاموس وجود دارد که با نورون‌های ترشح کننده GnRH در تعامل هستند (Bencic *et al.*, 2013). در ماهی‌ها، گابا، اثر تحریکی بر ترشح GnRH دارد (Tsai and wang, 2000). گابا، با اثر مستقیم بر گیرنده‌هایش در سلول‌های گنادوتروف هیپوفیز ماهی‌های استخوانی، ترشح گنادوتروپین‌ها را افزایش می‌دهند (Arvat *et al.*, 2002). بنزودیازپین‌ها نیز به طریق واسطه‌های گابارژیک در هیپوتالاموس یا هیپوفیز، بر ترشح گنادوتروپین‌ها تاثیر گذار هستند. سیستم دوپامینرژیک و گابارژیک در مغز، با هم تداخل دارند. گابا و بنزودیازپین‌ها، انتقالات عصبی دوپامینرژیک در مغز را مهار می‌کنند (Root *et al.*, 2004). با تزریق گابا به لامپری، ترشح GnRH در مغز این ماهی، افزایش یافت (Root *et al.*, 2004). در ماهی شانک، گابا، اثر تحریکی بر ترشح GnRH داشت (Senthilkumaran *et al.*, 2001). تزریق گابا باعث افزایش میزان گنادوتروپین‌ها در گلدفیش شد. تزریق مهارکننده‌ی گاباترنس آمیناز (آنزیم تجزیه کننده گابا)، باعث افزایش وابسته به دوز گنادوتروپین‌ها و افزایش محتوای گابا در هیپوتالاموس و هیپوفیز را گلدفیش شد. القای

کلیه، جفت، بیضه و تخمدان نیز وجود دارد و در تخمدان، تنظیم جریان خون و تنظیم ترشح هورمون‌های جنسی را بر عهده دارد (Schaeffer and Hsueh, 1982). این داده‌ها از اثر احتمالی گابا و یا داروهای گابارژیک بر تخمدان مهره‌داران، حمایت می‌کند (Biggs, 2013). موسکیمول (آگونیست گابا)، میل اتصالی بالایی به سلول‌های گرانولوزای تخمدان دارد (Delrio and Caballero, 1980). RT-PCR نشان داده است که با القای برون تن موسکیمول بر سلول‌های جدا شده از آسپیراسیون فولیکولی تخمدان بیماران تحت IVF، mRNA‌های رونویسی کننده از ژن آروماتاز، افزایش یافت. آروماتاز، تنظیم کننده کلیدی در بیوسنتز استروژن در سلول‌های گرانولوزای تخمدان است (Hou and Yalcinkaya, 2008). با تجویز موضعی گابا بر تخمدان موش، ترشح ۱۷بتا-استرادیول، افزایش و ترشح پروژسترون کاهش یافت (Erdö *et al.*, 1985). القای برون تن گابا بر سلول‌های گرانولوزای خرگوش، باعث تحریک ترشح استروژن و مانع از ساخته شدن پروژسترون شد (Wei *et al.*, 1999). آلپرازولام، پیوستگی و اتصال گابا را به گیرنده $GABA_A$ ، افزایش می‌دهد (Petty *et al.*, 1995) و به عنوان آگونیست غیر مستقیم گابا در نظر گرفته می‌شود (Keene *et al.*, 1998). تغییرات سطوح هورمون‌های استروئیدی در این پژوهش، ممکن است مرتبط با تاثیر آلپرازولام بر گیرنده‌های گابا، در تخمدان ماهی گورامی سه خال باشد. هم‌راستا با این مطالعه، در دو پژوهش دیگر، با القای دیازپام (بنزودیازپین) بر سلول‌های تخمدان موش، تغییری در میزان استرادیول مشاهده نشد، تستوسترون را به صورت وابسته به دوز یافت و پروژسترون را در ابتدا افزایش و سپس کاهش پیدا کرد

گابا به صورت برون تن بر قطعات مختلف هیپوتالاموس، سبب افزایش وابسته به دوز میزان GnRH شد که توجه قابل قبولی برای افزایش میزان گنادوتروپین‌ها با تزریق گابا به گلدفیش بود (Kah et al., 1992). تزریق موسکیمول به رت‌های ماده، منجر به افزایش LH و FSH و تزریق بیکوکلین (آنتاگونیست گابا)، منجر به کاهش ترشح LH و FSH شد (Moguilevsky et al., 1991). تحریک ترشح استروئیدهای تخمدانی در این پژوهش پس از مهار محور HPG توسط بروموکریپتین، می‌تواند مرتبط با تاثیر آلپرازولام بر گیرنده‌های گابا در هیپوتالاموس و هیپوفیز ماهی گورامی سه‌خال نیز باشد. این احتمال وجود دارد که آلپرازولام با تقویت انتقالات گابارژیک، سبب تحریک ترشح GnRH، گنادوتروپین‌ها و به تبع آن، تحریک استروئیدوزنر، شده باشد. رشد و بلوغ اووسیت‌ها در ماهیان استخوانی، پس از طی شدن مراحل مختلف و تحت کنترل هورمون‌های استروئیدی، هماهنگ با گنادوتروپین‌ها، رخ می‌دهد (سلطانزاده، ۱۳۹۲). حلال داروها تاثیری بر تکوین تخمدان نداشت چراکه فاز اووسیت‌ها در گروه‌های شاهد و کنترل حلال شبیه به هم بود (شکل ۲ الف و ب). علت حضور اغلب اووسیت‌ها در مرحله پیش‌هستی در گروه کنترل بروموکریپتین می‌تواند بلاک شدن محور HPG در سطح مغز، کاهش سطوح هورمون‌های استروئیدی، توقف زرده‌سازی و نتیجتاً توقف رشد اووسیت باشد. در مطالعه‌ای مشابه، تجویز خوراکی بروموکریپتین به ماهی‌های ماده و بالغ گامبوزیا سبب مهار رشد فولیکولی در ماهی گامبوزیا شد (Bhat and Ganesh, 2019). در غیاب ماهی نر (شرایط این پژوهش)، اووسیت‌ها در صورت رشد، می‌توانند نهایتاً تا مرحله ویتلوژنی، پیش بروند

(Degani, 2001). تظاهرات بافتی در گروه تیماری با بروموکریپتین و آلپرازولام با دوز ۱ و ۴ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی (شکل ۲، د و ن)، حاکی از پیشرفت اکثر اووسیت‌ها به مرحله ویتلوژنی بود. پس از تحریک ترشح استرادیول، زرده‌سازی در کبد ماهی رخ می‌دهد و زرده از طریق جریان خون به تخمدان ماهی می‌رسد، عرض فولیکول‌ها را طی می‌کند و از طریق اندوسیتوز، وارد اووسیت می‌شود (Moussavi et al., 2009). احتمالاً کبد با دریافت سیگنال از تخمدان، زرده‌سازی را افزایش داده است و اووسیت‌ها با جذب ویتلوژنین، به مرحله ویتلوژنی رسیده‌اند. در گروه بروموکریپتین و آلپرازولام با دوز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی (شکل ۲، ه)، رشد اووسیت‌ها در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با دوز کم و متوسط آلپرازولام، کمتر بود و در برخی اووسیت‌ها، ظهور حفرات کورتیکال و شمار اندکی از ذرات ویتلوژنین، نمایان بود. بنابراین آلپرازولام به صورت غیر وابسته به دوز سبب تکوین اووسیت‌ها شد. طی یک پژوهش با قرارگیری ماهی Fathead minnow در معرض دیازپام، روندی افزایشی در تعداد تخم مشاهده شد (Lorenzi et al., 2016) که همانند مطالعه ما، موید اثر محرک بنزودیازپین‌ها بر تکامل اووسیت بود. از طرفی تجویز خوراکی آلپرازولام به موش صحرایی، سبب کاهش فولیکول‌های بالغ تخمدان شد که در تضاد با نتایج ما بود (شادخواست، ۱۳۹۷). تظاهرات فراساختاری اووسیت در عکس‌های میکروسکوپ الکترونی، در تطابق با نتایج بدست آمده طی مطالعه بافت تخمدان با میکروسکوپ نوری بود. در گروه شاهد، اووسیت‌ها در مرحله کورتیکال آلئولار و ابتدای ویتلوژنی بودند (شکل ۳، الف)، در گروه کنترل بروموکریپتین،

سپاسگزاری

بدینوسیله، نویسندگان مقاله، از افرادی که در به انجام رساندن این کار پژوهشی همکاری کردند تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

۱. انصاری، ح.، آبشناس، م.، خان زاده، ق.، مسعودی، غ.، ۱۳۸۶. بررسی عوامل مرتبط با مصرف داروهای اعصاب و روان در دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی زاهدان در سال ۱۳۸۶. مجله اصول بهداشت روانی، شماره ۳۶، سال نهم، پاییز و زمستان ۸۶، صفحات ۳۳ تا ۵۵.
۲. باقری زیاری، ص.، ناجی، ط.، حسین زاده صحافی، ه.، ۱۳۹۴. مقایسه و بررسی تغییرات فراساختاری تخمک و هیپوفیز در ماهی گورامی سه خال نابالغ تحت تیمار با LHRH-A₂، ۱۷تا استرادیول و عصاره هیدروالکلی سرشاخه هوایی مرزنجوش. مجله یافته‌های نوین در علوم زیستی، شماره ۲، سال دوم، تابستان ۹۴، صفحات ۱۳۱ تا ۱۳۹.
۳. بطحائی، م.، ناجی، ط.، حسین زاده صحافی، ه.، ۱۳۹۸. بررسی سطح هورمون‌های استروئیدی و تکوین تخمک‌های ماهی ماده بالغ گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*) در مواجهه با عصاره الکلی گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus castus*) و فلوکسیتین. مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست شناسی ایران)، شماره ۲، سال سی و دوم، تابستان ۹۸، صفحات ۱۵۵ تا ۱۶۵.

اووسیت در فاز پیش‌هستی قرار داشت (شکل ۳، ب) و در گروه تیماری با بروموکریپتین و دوز بالای آلپرازولام، دو اووسیت مجاور، در اوج مرحله ویتلوژنی بودند (شکل ۳، ج) زیرا تعداد زیادی از گرانول‌های زرده در اووپلاسم تشکیل شده بود (West, 1990; Jackson et al., 1994).

با آنالیز مقادیر هورمون‌های ۱۷بتا-استرادیول، تستوسترون و ۱۷آلفا-هیدروکسی پروژسترون، می‌توان نتیجه گرفت که داروی بروموکریپتین با دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی، سبب بلاک شدن محور HPG و داروی آلپرازولام خصوصاً با دوزهای ۱ و ۴ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی، منتج به تحریک مجدد این محور شده است (شکل ۱). تصاویر میکروسکوپ نوری و الکترونی گرفته شده از بافت تخمدان، نشان داد که بروموکریپتین، منجر به توقف رشد اووسیت‌ها شد، زونا رادیاتا تشکیل نشد و واکوئل‌هایی به دور هسته مشاهده شد که نشانگر مرحله پیش‌هستی بود (شکل ۲، ج و شکل ۳، ب). در گروه تیماری با بروموکریپتین و آلپرازولام با دوز ۴ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن ماهی، تخمدان به شدت تحریک شده بود و تقریباً تمام اووسیت‌ها سرشار از ذرات ویتلوژنین بودند. فراساختار اووسیت نیز ظهور لایه زونا رادیاتا و تجمع وزیکول‌های زرده را نشان داد که همگی دال بر رشد اووسیت و تکامل گنادی بود (شکل ۲، ن و شکل ۳، ج). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که امکان حضور گیرنده برای گابا یا آلپرازولام، در تخمدان ماهی گورامی سه خال، وجود دارد. این گیرنده، می‌تواند در آینده بعنوان هدف سنتز دارو جهت باروری ماهیان ماده در صنعت شیلات، مورد پژوهش قرار گیرد.

مامایی و نازایی ایران، شماره ۳، سال بیست و یکم، بهار ۹۷، صفحات ۱۵ تا ۲۱.

9. Amsterdam, A., Suh, B.S., 1991. An inducible functional peripheral benzodiazepine receptor in mitochondria of steroidogenic granulosa cells, *Endocrinology*, Vol. 48, pp :503-510.
10. Arvat, E., Giordano, R., Grottoli, S., Ghigo, E., 2002. Benzodiazepines and anterior pituitary function, *Journal of endocrinological investigation*, 25, 735-747.
11. Bencic, D.C., Villeneuve, D.L., Biales, A.D., Blake, L., Durhan, E.J., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Makynen, E.A., Martinović-Weigelt, D. Ankley, G.T., 2013. Effects of the insecticide fipronil on reproductive endocrinology in the fathead minnow, *Environmental toxicology and chemistry*. Vol. 32, pp: 1828-1834.
12. Bhat, S.K., Ganesh, C.B., 2019. Dopamine receptor agonist bromocriptine restrains the follicular development, hatchling success and puberty in *Gambusia affinis*, *Journal of Applied Ichthyology*. Vol. 35, pp :501-511.
13. Biggs, K., Seidel, J.S., Wilson, A., Martyniuk, C.J., 2013. Gamma amino-butyric acid (GABA) receptor subunit and transporter expression in the gonad and liver of the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *Comparative Biochemistry and Physiology*. Vol. 166, pp :119-127.
14. Bordini, B., Rosenfield, R.L., 2011. Normal pubertal development. *Pediatrics in Review*, Vol. 32, pp :223-229.
15. Bryant, A.S., Greenwood, A.K., Juntti, S.A., Byrne, A.E., Fernald, R.D., 2016. Dopaminergic inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons in the cichlid fish (*Astatotilapia burtoni*), *Journal of Experimental Biology*. Vol. 219, pp : 3861-3865.
16. Chang, J.P., Peter, R.E. Crim, L.W., 1984. Effects of dopamine and apomorphine on gonadotropin release from the transplanted pars distalis in goldfish, *General and Comparative Endocrinology*. Vol. 55, pp :347-350.

۴. تک زارع، ن.، بختیاریان، الف.، سعیدی، الف.، نیکوئی، و.، ۱۳۸۹. بررسی آثار تراتوژنیک آلپرازولام بر روی جنین موش صحرایی. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره ۱۰، سال شصت و هشتم، زمستان ۸۹، صفحات ۵۷۸ تا ۵۸۲.

۵. حسینی جبلی، م.، ناجی، ط.، حسین زاده صفافی، ه.، ۱۴۰۰. بررسی اثر داروی اس‌سیتالوپرام بر تغییرات استروئیدهای جنسی و فراساختار اووسیت در ماهی گورامی سه خال پس از افزایش سطح دوپامین با تزریق بروموکریپتین. مجله زیست‌شناسی کاربردی، شماره ۲، سال سی و چهارم، تابستان ۱۴۰۰، صفحات ۱۲۹ تا ۱۴۵.

۶. رشیدپور، ش.، ناجی، ط.، حسین‌زاده صفافی، ه.، ۱۳۹۹. تأثیر داروی فلووکسامین بر سطوح هورمون‌های جنسی و بافت‌شناسی تخمدان در ماهی گورامی سه خال (*Trichogaster trichopterus*) پس از تزریق بروموکریپتین. مجله ارمان دانش، شماره ۶، سال بیست و پنجم، زمستان ۹۹، صفحات ۷۴۶ تا ۷۶۲.

۷. سلطانزاده، ز.، نوری، الف.، سجادی، م.، ۱۳۹۲. بررسی روند تغییرات سطوح هورمون تستوسترون در ماهی *Abudefduf vaigiensis* در ساحل شمالی جزیره قشم، خلیج فارس. مجله نشریه علمی بوم‌شناسی آبزیان، شماره ۱، سال سوم، تابستان ۹۲، صفحات ۱ تا ۷.

۸. شادخواست، م.، حبیبیان، س.، آزادمنش، م.، ۱۳۹۷. اثرات داروی آلپرازولام بر روی رشد و نمو فولیکول‌های تخمدان موش صحرایی. مجله زنان

- Vol. 124, pp : 1-8.
26. Hou, L., Yalcinkaya, T.M., 2008. GABA_A agonists increase aromatase gene and protein expression in human granulosa cells via specific GABA_A receptors, Fertility and Sterility. Vol. 90, p : S123.
 27. Kah, O., Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Chang, J.P., Dubourg, P., Yu, K.L., Peter, R.E., 1992. Influence of GABA on gonadotrophin release in the goldfish, Neuroendocrinology. Vol. 55, pp :396-404.
 28. Keene, J.L., Noakes, D.L.G., Moccia, R.D., Soto, C.G., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*), Aquaculture Research. Vol. 29, pp :89-101.
 29. Lorenzi, V., Choe, R., Schlenk, D., 2016. Effects of environmental exposure to diazepam on the reproductive behavior of fathead minnow(*Pimephales promelas*), Environmental Toxicology. Vol. 31, pp :561-568.
 30. Madhusoodanan, S., Bogunovic, O.J., 2004. Safety of benzodiazepines in the geriatric population, Expert opinion on drug safety. Vol. 3, pp :485-493.
 31. Moguilevsky, J.A., Carbone, S., Szwarcfarb, B., Rondina, D., 1991. Sexual maturation modifies the GABAergic control of gonadotrophin secretion in female rats, Brain research. Vol. 563, pp :12-16.
 32. Moussavi, M., Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2009. Seasonal regulation of vitellogenin by growth hormone in the goldfish liver, General and comparative endocrinology. Vol. 161, pp :79-82.
 33. Moustafa, A.M., El-Sayed, E.M., Badary, O.A., Mansour, A.M., Hamada, F.M.A., 1999. Effect of bromocriptine on uterine contractility in near-term pregnant rats, Pharmacological research. Vol. 39, pp :89-95.
 34. Petty, F., Trivedi, M.H., Fulton, M., Rush, A.J., 1995. Benzodiazepines as antidepressants: does GABA play a role in depression?, Biological psychiatry.
 17. Degani, G., 2001. Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*): Model for labyrinth fish. Israel: Laser Pages Publishing.
 18. Degani, G., 2020. Brain control reproduction by the endocrine system of female blue gourami (*Trichogaster trichopterus*), Biology. Vol. 5, p :109.
 19. Del rio, R.M., Caballero, A.L., 1980. Presence of γ -aminobutyric acid in rat ovary, Journal of Neurochemistry. Vol. 34, pp :1584-1586.
 20. Dequattro, Z.A., Peissig, E.J., Antkiewicz, D.S., Lundgren, E.J., Hedman, C.J., Hemming, J.D., Barry, T.P., 2012. Effects of progesterone on reproduction and embryonic development in the fathead minnow (*Pimephales promelas*), Environmental toxicology and chemistry. Vol. 31, pp : 851-856.
 21. Erdő, S.L., Varga, B., Horváth, E., 1985. Effect of local GABA administration on rat ovarian blood flow, and on progesterone and estradiol secretion, European journal of pharmacology. Vol. 111, pp : 397-400.
 22. Fontaine, R., Affaticati, P., Yamamoto, K., Jolly, C., Bureau, C., Baloché, S., Gonnet, F., Vernier, P., Dufour, S., Pasqualini, C., 2013. Dopamine inhibits reproduction in female zebrafish (*Danio rerio*) via three pituitary D₂ receptor subtypes, Endocrinology. Vol. 154, pp : 807-818.
 23. Gavish, M., 1995. Hormonal regulation of peripheral-type benzodiazepine receptors, The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. Vol. 53, pp :57-59.
 24. Gavish, M., Bachman, I., Shoukrun, R., Katz, Y., Veenman, L., Weisinger, G., Weizman, A., 1999. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor, Pharmacological reviews. Vol. 51, pp :629-650.
 25. Gladkevich, A., Korf, J., Hakobyan, V.P., Melkonyan, K.V., 2006. The peripheral GABAergic system as a target in endocrine disorders, Autonomic Neuroscience.

- pituitary of red seabream (*Pagrus major*), Journal of Neuroendocrinology. Vol. 13, pp :395-400.
43. Tokarz, J., Möller, G., De Angelis, M.H., Adamski, J., 2015. Steroids in teleost fishes: A functional point of view, Steroids. Vol. 103, pp :123-144.
 44. Trudeau, V.L., Spanswick, D., Fraser, E.J., Lariviere, K., Crump, D., Chiu, S., MacMillan, M., Schulz, R.W., 2000. The role of amino acid neurotransmitters in the regulation of pituitary gonadotropin release in fish, Biochemistry and Cell Biology. Vol. 78, pp :241-259.
 45. Tsai, C.L., Wang, L.H., 2000. The alteration of γ -aminobutyric acid and glutamate contents in the discrete brain of female tilapia during certain stages of gonadal cycle, Neuroscience letters. Vol. 291, pp :171-174.
 46. Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts, Reviews in fish biology and fisheries. Vol. 6, pp :287-318.
 47. Vacher, C., Mananos, E.L., Breton, B., Marmignon, M.H., Saligaut, C., 2000. Modulation of pituitary dopamine D₁ or D₂ receptors and secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the annual reproductive cycle of female rainbow trout, Journal of Neuroendocrinology. Vol. 12, pp :1219-1226.
 48. Vallone, D., Picetti, R., Borrelli, E., 2000. Structure and function of dopamine receptors, Neuroscience & biobehavioral reviews. Vol. 24, pp :125-132.
 49. Van Wemmel, K., Gobbers, E., Eichenlaub-Ritter, U., Smits, J., Cortvrindt, R., 2005. Ovarian follicle bioassay reveals adverse effects of diazepam exposure upon follicle development and oocyte quality, Reproductive Toxicology. Vol. 20, pp :183-193.
 50. Verster, J.C., Volkerts, E.R., 2004. Clinical pharmacology, clinical efficacy, and behavioral toxicity of alprazolam: a review of the Vol. 38, pp :578-591.
 35. Pieróg, M., Guz, L., Doboszevska, U., Poleszak, E. and Wlaź, P., 2018. Effects of alprazolam treatment on anxiety-like behavior induced by color stimulation in adult zebrafish, Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. Vol. 82, pp :297-306.
 36. Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, The Journal of cell biology. Vol 17, p :208.
 37. Ribas, L., Flos, R., Reig, L., MacKenzie, S., Barton, B.A., Tort, L., 2007. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: stress responses and final product quality, Aquaculture. Vol. 269, pp :250-258.
 38. Rieder, M.J., 1994. Mechanisms of unpredictable adverse drug reactions, Drug Safety. Vol. 11, pp :196-212.
 39. Root, A.R., Sanford, J.D., Kavanaugh, S.I., Sower, S.A., 2004. In vitro and in vivo effects of GABA, muscimol, and bicuculline on lamprey GnRH concentration in the brain of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*), Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. Vol. 138, pp :493-501.
 40. Roy-Byrne, P.P., 2005. The GABA-benzodiazepine receptor complex: structure, function, and role in anxiety, J Clin Psychiatry. Vol. 66, pp :14-20.
 41. Schaeffer, J.M. Hsueh, A.J., 1982. Identification of gamma-aminobutyric acid and its binding sites in the rat ovary, Life Sciences. Vol. 30, pp :1599-1604.
 42. Senthilkumaran, B., Okuzawa, K., Gen, K., Kagawa, H., 2001. Effects of serotonin, GABA and neuropeptide Y on seabream gonadotropin releasing hormone release in vitro from preoptic-anterior hypothalamus and

- literature, CNS drug reviews. Vol. 10, pp :45-76.
51. Wei, Z., Jiang, N., Longqing, C., Hui, Z., Jinghua, W., Limin, Z., 1999. Effect of inhibitory and excitatory amino acid on the production of estrogen and progesterone by granulosa cells of Rabbits in vitro, Basic Medical Sciences and Clinics. Vol. 19, pp :49-52.
 52. West, G., 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes, a review, Marine and freshwater research. Vol. 41, pp :199-222.
 53. Yaron, Z., Levavi-Sivan, B., 2011. Endocrine regulation of fish reproduction, Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment. Vol. 2, pp :1500-1508.