

اثرات داروی آلپرازولام بر روی رشد و نمو فولیکول‌های تخمدان موش صحرائی

دکتر محمد شادخواست^{۱*}، دکتر سعید حبیبیان^۲، مریم آزادمنش^۳

۱. دانشیار گروه علوم تشریحی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۲. دانشیار گروه فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳. دانش‌آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۱۲

خلاصه

مقدمه: داروی آلپرازولام از خانواده بنزودیازپین‌ها است. این دارو به دلیل اثرات فارماکولوژیک ویژه خود کاربردهای گوناگونی دارد. بیشترین مصرف این دارو به علت خواص خواب‌آور و آرام‌بخش آن است. آلپرازولام علاوه بر مغز بر روی بسیاری دیگر از اندام‌های بدن مؤثر است. با توجه به مصرف بسیار زیاد این دارو به خصوص توسط زنان، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات مصرف آلپرازولام با دوزهای مختلف بر ساختار هیستومورفومتری تخمدان موش صحرائی انجام شد.

روش کار: این مطالعه کاربردی در سال ۱۳۹۴ بر روی ۲۴ سر موش صحرائی ماده در ۴ گروه و هر گروه ۶ سر موش انجام گرفت. در گروه اول داروی آلپرازولام به مدت ۱۶ روز متوالی با دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت دهانی (گاواژ) خورانده شد. در گروه دوم و سوم دارو به مدت ۱۶ روز متوالی با دوزهای به ترتیب ۴ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت دهانی خورانده شد. موش‌های صحرائی گروه چهارم (گروه شاهد) به همان مقدار، زمان و روش گروه‌های تجربی، آب دریافت کردند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری Prism 5 و روش‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام گرفت. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: مطالعات هیستومورفولوژی نشان داد که استفاده از دوزهای بالای آلپرازولام ۴ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور معناداری باعث کاهش فولیکول‌های بالغ گردید ($p < 0/05$). همچنین تعداد فولیکول‌های اترتیک در گروه‌های تجربی به‌طور معناداری افزایش پیدا کرده بود ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: استفاده از دوزهای بالای آلپرازولام، به‌طور معنی‌داری سبب کاهش تعداد فولیکول‌های بالغ تخمدان و افزایش معنی‌دار در تعداد فولیکول‌های تحلیل یافته نسبت به گروه شاهد می‌شود. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً آلپرازولام با دوز بالا و استفاده طولانی مدت، باعث کاهش توانایی باروری می‌شود.

کلمات کلیدی: آلپرازولام، تخمدان، موش صحرائی، هیستومورفومتری

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر محمد شادخواست؛ دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۳۸-۳۲۳۲۴۴۲۷؛ پست الکترونیک:

shadhkhat@yahoo.com

مقدمه

بنزودیازپین‌ها، یکی از دسته‌های داروهای مؤثر بر سیستم اعصاب مرکزی هستند. قدرت ضداضطرابی و آرام‌بخشی بنزودیازپین‌ها از باربیتورات‌ها بیشتر است. یکی از پرکاربردترین بنزودیازپین‌ها، آلپرازولام است. این دارو اثرات آرام‌بخشی و خواب‌آوری دارد و به‌طور کلی رفتار تهاجمی را کنترل می‌کند. اثر دیگر این دارو، شل‌کنندگی عضلانی است. این دارو از راه بالا بردن آستانه تشنج، قابلیت ضد تشنجی نیز دارد. ترک ناگهانی این دارو موجب بی‌خوابی و اضطراب شدید می‌شود (۱). بنزودیازپین‌ها در بدن اثرات خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های GABA اعمال می‌کنند (۲). GABA یکی از انتقال‌دهنده‌های عصبی بدن است که در بسیاری از بافت‌های عصبی و غیرعصبی محیطی حضور دارد و در بسیاری از فعالیت‌های بدن نقش دارد. این نقش‌ها علاوه بر نقش اصلی آن به عنوان انتقال‌دهنده عصبی است (۳). با توجه به وجود گیرنده‌های GABA در غده‌های درون‌ریز بدن مانند تخمدان (۴)، بررسی اثر آلپرازولام بر روی رشد و نمو فولیکولی ضروری به‌نظر می‌رسد. از این رو مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات مصرف آلپرازولام با دوزهای مختلف بر ساختار هیستومورفومتری تخمدان موش صحرایی انجام شد.

روش کار

این مطالعه کاربردی در سال ۱۳۹۴ بر روی ۲۴ سر موش صحرایی ماده در ۴ گروه و هر گروه ۶ سر موش با میانگین وزنی حدود ۳۰۰ گرم انجام گرفت. قبل از شروع آزمایش به منظور سازگاری با شرایط محیط جدید، حیوانات به مدت ۲ هفته در شرایط محیطی $23-27^{\circ}\text{C}$ و چرخه شبانه‌روزی روشنایی - تاریک ۱۲ ساعته نگهداری شدند. میزان ۳۰ سی‌سی آلپرازولام تهیه شده در شرکت پورسینا از داروخانه سجاد وابسته به دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان خریداری و در مدت آزمایش در محیط خشک و خنک نگهداری شد. در طی مدت آزمایش، موش‌های صحرایی به صورت آزاد به آب و غذای مخصوص جوندگان دسترسی داشتند. قبل از گروه‌بندی، موش‌های صحرایی با استفاده از

ترازوی دیجیتال وزن و به‌طور تصادفی در ۴ گروه قرار گرفتند. گروه اول: موش‌های صحرایی که مقدار ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داروی آلپرازولام از راه دهان (گاوژ) به مدت ۱۶ روز دریافت کردند. گروه دوم: موش‌های صحرایی که مقدار ۴ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داروی آلپرازولام از راه دهان به مدت ۱۶ روز دریافت کردند. گروه سوم: موش‌های صحرایی که مقدار ۶ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داروی آلپرازولام از راه دهان به مدت ۱۶ روز دریافت کردند و گروه چهارم: موش‌های صحرایی شاهد که در این مدت معادل حجم محلول آلپرازولام خورنده شده به موش‌های صحرایی گروه اول تا سوم، آب مقطر از راه دهان دریافت کردند.

به منظور نمونه‌گیری، در پایان روز ۱۶، موش‌های صحرایی با استفاده از کلروفورم و در ظرف دسیکاتور بی‌هوش و در نهایت به روش انسانی کشته شدند. با استفاده از اسکالپل، پنس و قیچی، حفره شکمی آنها باز و بعد از کنار زدن زدن روده‌ها، رحم، شاخ‌های رحمی، لوله‌های تخم‌بر ماریچی و تخمدان‌ها نمایان شدند. جهت انجام مطالعات هیستومورفومتری، تخمدان‌ها و رحم خارج و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی به ظروف شماره‌دار حاوی محلول تثبیت‌کننده فرمالین ۱۵٪ بافر (مِرک، آلمان) منتقل و در یخچال نگهداری شدند. برای تثبیت بهتر بافت‌ها، ۲۴ ساعت بعد محلول فرمالین با محلول فرمالین بافر جدید جایگزین گردید. از این ارگان‌ها پس از انجام عملیات معمول بافت‌شناسی، مقطع‌گیری و رنگ‌آمیزی به روش معمول هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد و در نهایت نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. از هر تخمدان پس از کارهای آماده‌سازی، برش‌های طولی وسطی به ضخامت ۶ میکرون تهیه شد. علت انتخاب چنین روشی، تشابه میدان میکروسکوپی و امکان قضاوت نسبی بر روی هر تخمدان بود. مطالعه به‌صورت بررسی انواع فولیکول‌ها و شمارش فولیکولی در هر برش بافتی از گروه‌های تجربی و کنترل انجام شد. برای شمارش فولیکول‌ها ابتدا از تخمدان‌ها برش‌های سریالی تهیه و با روش مورفومتری تعداد کل فولیکول‌ها محاسبه گردید. ولی با توجه به

یافته‌ها

در مطالعه حاضر تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه گروه شاهد و گروه‌های مختلف دریافت‌کننده آلپرازولام تفاوت معناداری با یکدیگر نداشتند ($p > 0.05$)، در حالی که مصرف آلپرازولام با دوزهای ۴ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش معنادار تعداد فولیکول‌های بالغ تخمدان موش صحرایی در مقایسه با گروه شاهد شد ($p < 0.05$). بین دو گروه دریافت‌کننده آلپرازولام با دوزهای ۴ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معناداری در تعداد فولیکول‌های بالغ مشاهده نشد ($p > 0.05$). همچنین مصرف آلپرازولام با دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب تفاوت معناداری از نظر تعداد فولیکول‌ها نسبت به گروه شاهد نشد ($p > 0.05$) (جدول ۱، شکل ۱).

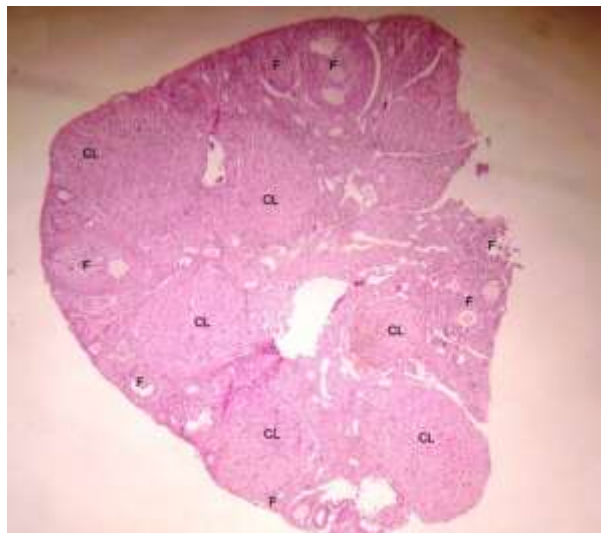
اهداف مطالعه که بررسی تغییرات روند رشد فولیکولی بود، از هر تخمدان به صورت تصادفی ۴ مقطع انتخاب شد که این انتخاب برای همه گروه‌های مورد آزمایش یکسان بود، سپس شمارش فولیکولی به صورت مارپیچ از نقطه‌ای از کورتکس در جهت عقربه‌های ساعت به سمت مدولا به عمل آمد. شمارش فولیکول‌ها به تفکیک انواع فولیکول‌های اولیه، ثانویه، بالغ، اترتیک و جسم زرد صورت گرفت.

داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری Prism 5 و روش‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱- میانگین و خطای معیار پارامترهای اندازه‌گیری شده در گروه‌های مختلف

گروه‌ها	شاهد	آلپرازولام (۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	آلپرازولام (۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	آلپرازولام (۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم)
تعداد فولیکول اولیه	۴/۰۰±۱/۰۹۵	۶/۲۰±۱/۳۹۳	۵/۲۵±۰/۸۵۳۹	۳/۶۰±۰/۶۰۰۰
تعداد فولیکول ثانویه	۲/۶۰±۰/۲۴۴۹	۳/۲۵±۱/۳۱۵	۲/۶۰±۰/۶۷۸۲	۲/۲۰±۰/۵۸۳۱
تعداد فولیکول بالغ	a۲/۴۰±۰/۲۴۴۹	a۲/۲۵±۰/۴۷۸۷	۰/۴۰±۰/۴۰۰۰	۰/۴۰±۰/۲۴۴۹
تعداد فولیکول تحلیل‌یافته	a۲/۶۰±۰/۴۰۰۰	a۵/۷۰±۰/۸۵۳۹	a۷/۴۰±۰/۵۰۹۹	۷/۴۰±۰/۶۰۰۰
تعداد جسم زرد	۰/۲۰±۰/۲۰۰۰	۱/۷۵±۰/۴۷۸۷	*۰/۶۰±۰/۴۰۰۰	۰/۶۰±۰/۲۴۴۹

a: در هر ردیف اختلاف با گروه شاهد معنی‌دار است ($p < 0.05$).

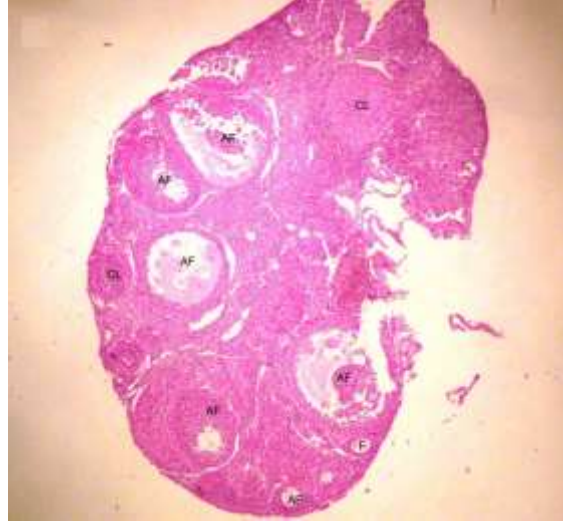


شکل ۱- نمایش فولیکول‌های گروه تجربی ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم

فولیکول (F)، فولیکول تحلیل‌یافته (AF)، جسم زرد (CL). رنگ آمیزی H&E بزرگ‌نمایی ۱۰x

۶ میلی گرم بر کیلوگرم تفاوت آماری معناداری وجود نداشت ($p > 0.05$) (شکل ۲).

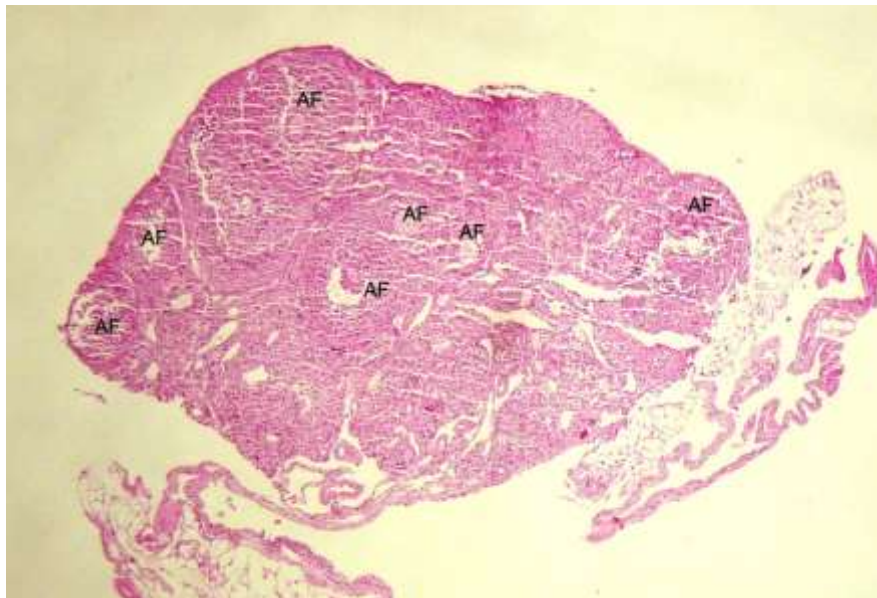
تعداد فولیکول‌های تحلیل رفته در گروه‌های دریافت-کننده آلپرازولام نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری داشت ($p < 0.05$). بین گروه‌های تجربی با دوزهای ۴ و



شکل ۲- نمایش فولیکول‌های گروه تجربی ۴ میلی گرم بر کیلوگرم فولیکول (F)، فولیکول تحلیل یافته (AF)، جسم زرد (CL). رنگ آمیزی H&E بزرگ‌نمایی ۱۰۰x

(جدول ۱). ($p < 0.05$) تعداد جسم زردها در گروه دریافت کننده آلپرازولام با دوز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری داشت ($p < 0.05$) (شکل ۳).

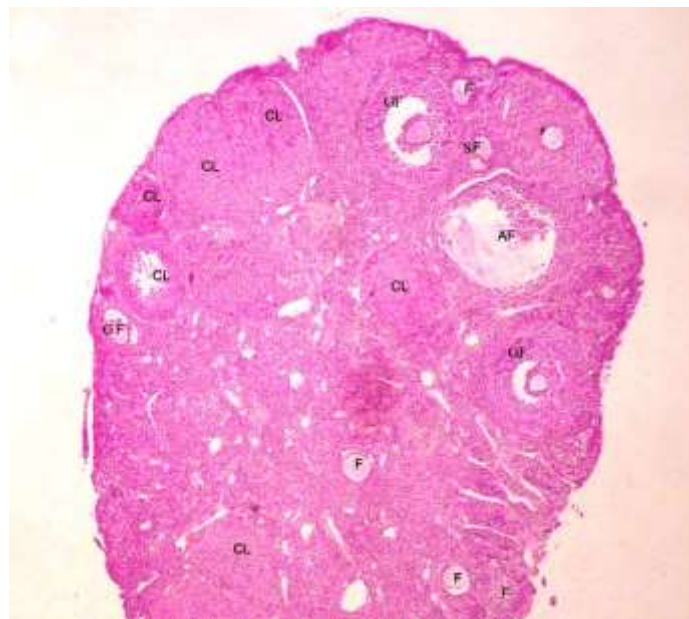
تعداد فولیکول‌های تحلیل یافته گروه دریافت کننده آلپرازولام با دوز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم به طور معناداری کمتر از تعداد فولیکول‌های مشابه در گروه‌های تجربی با دوزهای ۴ و ۶ میلی گرم بر کیلوگرم بود



شکل ۳- نمایش فولیکول‌های گروه تجربی ۶ میلی گرم بر کیلوگرم فولیکول‌های تحلیل یافته (AF). رنگ آمیزی H&E بزرگ‌نمایی ۱۰۰x

نظر آماری تفاوت معناداری مشاهده نشد ($p > 0.05$) (جدول ۱) (شکل ۴).

در حالی که بین گروه‌های دریافت‌کننده آلپرازولام با دوزهای ۴ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گروه شاهد از



شکل ۴- نمایش فولیکول‌های گروه شاهد

فولیکول (F)، فولیکول ثانویه (SF)، فولیکول تحلیل یافته (AF)، فولیکول گراف (GF)، جسم زرد (CL). رنگ آمیزی H&E بزرگ‌نمایی ۱۰۰x

هورمون‌های تخمدانی و جریان خون تخمدان را بررسی نمودند، نتیجه افزایش جریان خون، کاهش ترشح پروژسترون و افزایش ترشح استروژن در گروه تیمار شده با GABA بود (۸). یوندا و همکار (۱۹۸۴) با توجه به وجود گیرنده‌های GABA در غده‌های درون‌ریز بدن از جمله در هیپوتالاموس، هیپوفیز، پانکراس، تخمدان و غیره، بر تأثیر داروهای محرک GABA مانند بنزودیازپین‌ها تأکید نمودند (۴). هورمون پروژسترون در مغز به راحتی به ترکیب 3a,5a-THP تبدیل می‌شود. 3a,5a-THP در مغز مانند یک آرام‌بخش عمل می‌کند (۹)، این عمل آرام‌بخشی با افزایش عملکرد انتقال‌دهنده عصبی GABA انجام می‌گیرد (۱۰). علائم سندرم پیش از قاعدگی مانند اضطراب احتمالاً با کاهش شدید پروژسترون در گردش و در نتیجه کاهش 3a,5a-THP در ارتباط است. قطع ناگهانی مصرف بنزودیازپین‌ها مانند آلپرازولام نیز می‌تواند علائمی مشابه سندرم پیش از قاعدگی ایجاد کند (۱۱). این مشابهت سبب مؤثر بودن آلپرازولام در درمان علائم سندرم پیش از قاعدگی در

بحث

بنزودیازپین‌ها به خصوص آلپرازولام، از جمله داروهای بسیار پرکاربرد در سراسر جهان هستند (۵). این داروها بیشتر به علت خواص آرام‌بخشی، خواب‌آوری، ضداضطراب و ضدتنشج بودن تجویز می‌شوند. اگرچه موارد استفاده‌های دیگری نیز برای آنها ذکر شده است (۶). بنزودیازپین‌ها در بدن اثرات خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های GABA اعمال می‌کنند (۲). GABA یکی از انتقال‌دهنده‌های عصبی بدن است که در بسیاری از بافت‌های عصبی و غیرعصبی محیطی حضور دارد و در بسیاری از فعالیت‌های بدن نقش دارد. این نقش‌ها علاوه بر نقش اصلی آن، به‌عنوان انتقال‌دهنده عصبی است (۳). اردو و همکار (۱۹۸۲) وجود گیرنده GABA در تخمدان موش صحرائی با تعداد بسیار کمتری نسبت به تعداد آن در مغز را اثبات نمودند و احتمال نقش داشتن انتقال‌دهنده GABA در عملکرد تخمدان را مطرح کردند (۷). اردو و همکار (۱۹۸۵) اثر تجویز انتقال‌دهنده عصبی GABA بر ترشح

زنان می‌شود، در صورتی که تجویز پروژسترون در این زمان بی‌نتیجه است (۱۲).

دندرستین و همکاران (۱۹۸۴) اثر بنزودیازپین‌ها را بر هورمون‌های بدن زنان مبتلا به هیرسوتیسم بررسی کردند. در مطالعه آنها SHBG (گلوبولین اتصالی به هورمون‌های جنسی) به‌طور معناداری در بدن این زنان افزایش یافت، ولی در مجموع تغییر معناداری در میزان هورمون‌های جنسی این زنان مشاهده نشد (۱۳). تک زارع و همکاران (۲۰۱۱) آثار ترانوژنیک آلپرازولام را بر جنین موش صحرایی در دوران ارگانوژنز بررسی کردند، نتیجه این پژوهش بروز ناهنجاری ظاهری، چشم غیرطبیعی و شکاف کام و لب در جنین‌های گروه‌های تیمار بود (۱۴). تحقیقات گسترده در مورد داروهای پرمصرف و کم‌عارضه می‌تواند مانع بروز عوارض جانبی آنها شود. یکی از این گروه‌های دارویی، خانواده بنزودیازپین‌ها می‌باشد که عموماً جهت القای خواب، اثرات ضد اضطراب، ضد تشنج، ضد اسپاسم و القای بیهوشی به کار می‌رود. آلپرازولام پس از مصرف به سرعت جذب می‌شود و حداکثر غلظت پلاسمایی را بین ۱-۲ ساعت ایجاد می‌کند. در این مطالعه تجویز آلپرازولام در دوزهای بالا (۴ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) سبب بروز تغییراتی در الگوی رشد فولیکول‌های تخمدانی موش صحرایی گردید؛ به این‌صورت که میزان تولید فولیکول ثانویه از اولیه و به دنبال آن میزان تبدیل فولیکول گراف از فولیکول ثانویه به طور محسوسی کاهش یافت، در مقابل کاهش تعداد فولیکول‌های بالغ تعداد فولیکول‌های تحلیل رفته به‌طور محسوسی افزایش پیدا کرد و در مجموع راندمان باروری در موش‌های صحرایی تیمار شده با آلپرازولام کاهش چشم‌گیری

داشت که البته این تغییرات وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز، این اثرات بیشتر خود را نشان می‌دهند. بدیهی است که مطالعه حاضر مرحله اول از بررسی اثرات آلپرازولام بر روی رشد و نمو فولیکول‌های تخمدان است و برای به‌دست آوردن نتیجه قطعی، باروری حیوانات مورد آزمایش و بررسی بازده تولید مثل تخمدان در موش‌های صحرایی تیمار شده با آلپرازولام نیاز است. مطالعه حاضر برای اولین بار به بررسی اثرات داروی آلپرازولام در روند رشد فولیکول‌های تخمدان پرداخت که با مصرف رو به افزایش داروی آلپرازولام به‌ویژه در زنان، می‌تواند به‌عنوان پایه‌ای در مطالعات سایر همکاران در تبیین اثرات ضد تولید مثلی و همچنین اثرات ترانوژنی این دارو مورد استفاده قرار گیرد. بدیهی است که برای بیان نتایج کامل‌تر در مورد اثرات داروی آلپرازولام، نیاز به ادامه مطالعات می‌باشد که جزو اهداف این مطالعه بود.

نتیجه‌گیری

استفاده از دوزهای بالای آلپرازولام، به‌طور معنی‌داری سبب کاهش تعداد فولیکول‌های بالغ تخمدان و افزایش معنی‌دار در تعداد فولیکول‌های تحلیل یافته نسبت به گروه شاهد می‌شود. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً آلپرازولام با دوز بالا و استفاده طولانی مدت، باعث کاهش توانایی باروری می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد برای تأمین هزینه‌های این مطالعه تشکر و قدردانی می‌گردد.

1. Vizhe H. Pharmacology. 3rd ed. Tehran. Kalemeh Publication; 1989. P. 197-200. (Persian).
2. Hanson SM, Czajkowski C. Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABAA receptor. *J Neurosci* 2008; 28(13):3490-9.
3. Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* 2002; 213:1-47.
4. Yondea Y, Kuriyama K. GABA and endocrine regulation relation to neurologic-psychiatric disorders. *Neurochem Int* 1984; 6(1):23-6.
5. Woods JH, Katz JL, Winger G. Benzodiazepines: use, abuse, and consequences. *Pharmacol Rev* 1992; 44(2):151-347.
6. Laurijssens BE, Greenblatt DJ. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for benzodiazepines. *Clin Pharmacokinet* 1996; 30(1):52-76.
7. Erdö SL, Lapis E. Bicuculline-sensitive GABA receptors in rat ovary. *Eur J Pharmacol* 1982; 85(2):243-6.
8. Erdö SL, Varga B, Horváth E. Effect of local GABA administration on rat ovarian blood flow, and on progesterone and estradiol secretion. *Eur J Pharmacol* 1985; 111(3):397-400.
9. Belelli D, Bolger MB, Gee KW. Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *Eur J Pharmacol* 1989; 166(2):325-9.
10. Twyman RE, Macdonald RL. Neurosteroid regulation of GABAA receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture. *J Physiol* 1992; 456:215-45.
11. File SE. The history of benzodiazepine dependence: a review of animal studies. *Neurosci Biobehav Rev* 1990; 14(2):135-46.
12. Guthrie HD, Grimes RW, Cooper BS, Hammond JM. Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J Anim Sci* 1995; 73(9):2834-44.
13. Dennerstein L, Callan A, Warne G, Montalto J, Brown J, Burrows G, et al. The effects of benzodiazepines on hormones in women with idiopathic hirsutism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1984; 8(1):11-7.
14. Takzare N, Bakhtiarian A, Saeedi E, Nekoui V. The teratogenic effects of alprazolam intake on rat fetus. *Tehran Univ Med J* 2011; 68(10):578-82. (Persian).